

Identifizierung und Charakterisierung T-zellerkannter tumorassoziierter Antigene im Melanommodell D41

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes-Gutenberg-Universität
Mainz

Sandra Kuhs
geb. in Wuppertal (NRW)

Mainz 2009

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung.....	1
1 Tumorentstehung.....	1
2 Immunogenität von Tumoren.....	2
2.1 Mechanismen der immunologischen Tumorabwehr.....	4
2.2 Antigenprozessierung und -präsentation.....	6
2.3 Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen	9
2.4 Tumorantigene	12
2.5 Methoden zur Identifizierung von Tumorantigenen.....	15
2.5.1 T-zellbasierte cDNA-Expressionsklonierung	16
2.5.2 SEREX	18
2.5.3 HLA-Ligandensequenzierung und „reverse Immunologie“	18
3 Das maligne Melanom.....	20
4 Zielsetzung der Arbeit.....	21
 B Material und Methoden.....	 22
1 Material.....	22
1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	22
1.1.1 Laborgeräte.....	22
1.1.2 Plastik- und Glaswaren / Verbrauchsmaterialien.....	23
1.1.3 Chemikalien, Substanzen, Zusätze und Reagenzien.....	23
1.2 Lösungen und Puffer.....	25
1.3 Antibiotika.....	26
1.4 Enzyme.....	26
1.5 Molekulargewichtsmarker.....	26
1.6 Zytokine.....	26
1.6.1 Für die Stimulation von PBL bzw. T-Zellen.....	26
1.6.2 Für die Generierung dendritischer Zellen.....	26
1.6.3 Für eine verstärkte Expression von HLA-Molekülen.....	27
1.7 Antikörper.....	27
1.7.1 Für durchflusszytometrische Analysen und T-Zellblockade- Experimente	27
1.7.2 Für IFN- γ -ELISPOT-Assay.....	28

	Inhalt
1.7.3 Micro Beads.....	28
1.8 Oligonukleotide.....	28
1.8.1 Für HLA-Sequenzen.....	28
1.8.2 Zur Feststellung der Orientierung von Inserts, kloniert in pcDNA3.1V5-His-TOPO / Sequenzierungsprimer	28
1.8.3 Für den spezifischen Nachweis von β -Aktin in PCR-Reaktionen.....	29
1.8.4 Für den Nachweis von T-Zellrezeptor V β -Familien.....	29
1.8.5 Zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der TSPY-cDNA und zur Klonierung des kompletten TSPY 1-ORFs aus D41-MEL....	29
1.8.6 Zum spezifischen Nachweis von TSPY in Light Cycler Analysen....	30
1.8.7 Sonden für Light Cycler Analysen.....	30
1.9 Synthetische Peptide.....	30
1.10 Plasmide und Vektoren.....	30
1.11 Bakterien.....	32
1.12 Zelllinien.....	33
1.13 Bakteriennährmedien.....	35
1.14 Zellkulturmedien.....	35
1.15 Molekular- und Immunbiologische Kits.....	36
2 Methoden.....	37
2.1 Immun- und zellbiologische Methoden.....	37
2.1.1 Zellkultur, Bestimmung der Zellzahl und Vitabilität	37
2.1.2 Behandlung von Zellen mit Wirkstoffen.....	37
2.1.3 Isolierung peripherer Blutlymphozyten aus Vollblut.....	38
2.1.4 Generierung tumorspezifischer Lymphozyten.....	38
2.1.5 Anreicherung von CD8 ⁺ Lymphozyten aus PBMC durch magnetische Zellseparation.....	38
2.1.6 Klonierung von Zellen nach dem Grenzverdünnungsverfahren.....	38
2.1.7 Generierung von Fast-DCs aus plastik-adhärenenten Monozyten.....	39
2.1.8 Transfektion von Zellen.....	39
2.1.9 Interferon-gamma-ELISPOT-Assay.....	40
2.1.10 Antikörperblockaden der T-Zellen.....	41
2.1.11 Zytotoxizitätstest.....	41
2.1.12 Peptiderkennungstest im IFN- γ -ELISPOT- und Zytotoxizitätsassay..	42
2.1.13 Durchflusszytometrie.....	42
2.1.13.1 Färbung von Oberflächenmolekülen.....	42

2.1.13.2	Intrazelluläre Färbung mit dem <i>Cytofix / Cytoperm Permeabilization and Fixation</i> [®] Kit	43
2.1.13.3	Intrazelluläre Färbung mit Zytospin.....	43
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	44
2.2.1	Arbeiten mit Bakterien.....	44
2.2.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	44
2.2.1.2	Titerbestimmung.....	44
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus rekombinanten Bakterien.....	45
2.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	45
2.2.4	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	45
2.2.5	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	45
2.2.6	Isolierung von Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen.....	46
2.2.7	5'-Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase.....	46
2.2.8	Aufreinigung und -konzentrierung von Nukleinsäuren.....	46
2.2.8.1	Aufreinigung mit <i>High Pure</i> [®] <i>PCR Product Purification</i> Kit.....	46
2.2.8.2	Phenolisierung.....	46
2.2.8.3	Alkoholfällung.....	46
2.2.8.4	Ammoniumazetat-Präzipitation nach Glycogen-Extraktion.....	47
2.2.9	DNA-Ligation.....	47
2.2.9.1	Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten.....	47
2.2.9.2	Ligation von DNA-Amplifikaten.....	47
2.2.10	Transformation von Bakterien.....	47
2.2.11	Isolierung von RNA.....	48
2.2.12	Reverse Transkription (RT-PCR).....	48
2.2.13	<i>In Vitro</i> -Transkription (IVT).....	48
2.2.14	Polymerase-Kettenreaktion („ <i>Polymerase-Chain-Reaction</i> “, <i>PCR</i>)...	49
2.2.14.1	Nicht-quantitative PCR.....	49
2.2.14.2	Light Cyclers Analysen.....	50
2.2.15	Klonierung von HLA-Allelen.....	54
2.2.16	Generierung von Fragmenten antigenkodierender cDNA.....	54
2.2.17	Sequenzanalysen.....	55
2.2.18	Herstellung einer cDNA-Bank von D41-MEL.....	55
2.2.19	Klonierung antigenkodierender cDNA durch cDNA-Expressionsklonierung	57
2.2.20	Computer-gestützte Datenbanksuchen.....	58

C Ergebnisse.....	59
1 Charakterisierung der Melanomzelllinie D41-MEL.....	59
2 Konstruktion und Überprüfung einer cDNA-Bank aus D41-MEL-Zellen	61
2.1 Konstruktion der cDNA-Bank im Expressionsvektor pcDNA 3.1.....	61
2.2 Überprüfung der D41-cDNA-Bank.....	62
3 Generierung und Charakterisierung von MLTCs im	
Melanommodell D41.....	63
3.1 Generierung und Expansion der MLTCs	64
3.2 Charakterisierung der MLTCs.....	66
3.2.1 Erkennung von D41-MEL	66
3.2.2 Paneltestung mit bekannten, Melanom-assoziierten Antigenen.....	67
4 Generierung und Charakterisierung tumorreaktiver T-Zellklone aus	
MLTC-Responderpopulationen.....	71
4.1 Generierung tumorreaktiver T-Zellklone	71
4.2 Charakterisierung tumorreaktiver T-Zellklone	72
4.3 Kreuzlyse allogener, partiell HLA-übereinstimmender Tumorzell-	
linien durch D41-CTL-Klone mit unbekannter Antigenspezifität.....	75
5 cDNA-Expressionsklonierung mit klonalen T-Zellen	77
5.1 D41-cDNA-Bank-Screening mit D41-CTL-Klonen	77
5.2 Sequenzidentifizierung eines antigenkodierenden cDNA-Klons.....	79
5.3 Peptididentifizierung.....	80
5.4 Peptidtestung.....	82
6 Expression des Antigens TSPY 1.....	84
6.1 Expression von TSPY 1 in der Melanomzelllinie D41-MEL.....	84
6.2 Klonierung der Melanomzelllinie D41-MEL.....	87
6.3 Expression von TSPY 1 in D41-MEL Klonen.....	88
6.4 Steigerung der TSPY 1-Expression in D41-Melanomzellen.....	90
6.4.1 IFN- γ -Vorbehandlung.....	91
6.4.2 5-Aza-2'-deoxycytidine(DAC)-Vorbehandlung.....	94
6.5 Expression von TSPY 1 in allogenen, HLA-A*0201-positiven	
Zelllinien.....	97
6.5.1 Wirkung einer 5-Aza-2'-deoxycytidine(DAC)-Behandlung.....	98
6.6 Quantifizierung der TSPY 1-mRNA-Expression und Ermittlung des	
Schwellenwertes für die T-Zellerkennung im IFN- γ -ELISPOT-Assay..	100
6.7 Koexpression von TSPY 1 mit CD133.....	104

	Inhalt
7 Reaktivität gegen TSPY 1 bei Patienten mit testikulären Tumoren.....	105
 D Diskussion.....	 108
1 Antitumorale T-Zellantworten im Melanommodell D41	108
2 Identifizierung tumorassoziierter Antigene durch T-zellvermitteltes cDNA-Expressionsscreening.....	115
3 TSPY 1 als T-Zell-erkanntes Antigen.....	117
4 Heterogenität der TSPY 1-Expression.....	123
5 Einfluss von IFN- γ und DAC auf die Expression und T-Zellerkennung von TSPY 1.....	130
5.1 Einfluss von IFN- γ	130
5.2 Einfluss von DAC.....	133
 E Zusammenfassung.....	 141
 F Literaturverzeichnis.....	 142
 G Anhang.....	 171
 H Abkürzungsverzeichnis.....	 181

A Einleitung

1 Tumorentstehung

Zellproliferation und Apoptose werden über verschiedene Mechanismen in der Zelle sehr genau reguliert. Wenn in einem Gewebe die Neubildung und Apoptose der Zellen aus dem Gleichgewicht gerät, indem es z.B. zu einer verstärkten, nicht regulierten Proliferation von Zellen kommt, entstehen Tumore. Weltweit ist Krebs die Ursache für 12% aller Todesfälle. In den Industrieländern ist Krebs mit 25% die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit steigender Inzidenz [rezensiert aus dem Informationsmaterial der Deutschen Krebshilfe und der WHO].

Die Entstehung von Krebs ist ein äußerst komplexer, mehrstufiger, noch nicht vollständig verstandener Prozess [1]. Er ist gekennzeichnet durch eine sequenzielle Akkumulation verschiedener, genetischer Alterationen. Eine einzelne genetische Veränderung ist dabei für die progressive Transformation normaler Zellen in maligne Tumorzellen nicht ausreichend [4]. Allerdings verschaffen die Veränderungen der Zelle Wachstumsvorteile und enden letztendlich in der Transformation einer normalen Zelle in eine maligne Zelle [5;6]. Genmutationen sind an der Entstehung von Krebs beteiligt u.a. lassen sich NIH3T3-Zellen mit DNA aus menschlichen Tumoren transformieren, so dass ein „maligner“ Phänotyp mit unkontrolliertem, substratunabhängigem Wachstum und Verlust der Zell-Zell-Kontakte hervorgerufen wird. Weitere Hinweise liefern der Einfluss von endogenen Faktoren, wie die genetische Disposition, das Alter, das Geschlecht sowie der Einfluss von exogenen Faktoren, wie chemische, physikalische und infektiöse (virale) Noxen, für die Krebsentstehung. Dabei sind für die Karzinogenese Mutationen in drei Gruppen von Genen entscheidend, nämlich Proto-Onkogene, Tumorsuppressorgene und an der DNA-Reparatur beteiligte Gene [7].

Proto-Onkogene sind Gene, deren Genprodukte aufgrund von erhöhter Expression zu abnormer Zellexpansion führen. Dabei wird die Funktion dieser Gene durch „*gain of function*“-Mutationen verstärkt. Beispiele für Proto-Onkogene sind Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Myc), Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren (z.B. EGFP-R), intrazelluläre Signalüberträger (z.B. Ras oder STAT-3), Zellzykluskontrollproteine (z.B. Cyclin D1) und Proteine, die in der Apoptose involviert sind, wie bcl-2 [7].

Tumorsuppressorgene sind Gene, die die Tumorigenität unterdrücken, indem sie z.B. die Proliferation negativ beeinflussen. Als Beispiele dienen p53, das eine wichtige

Funktion im Fortschreiten des Zellzyklus, der zellulären Differenzierung, der DNA-Reparatur und der Apoptose hat, und p16, dessen Funktionsverlust zu unkontrollierter Zellproliferation führen kann [7-9]. Mutationen der Tumorsuppressorgene und der DNA-Reparaturgene führen zu einem Funktionsverlust und werden daher als „*loss of function*“-Mutationen bezeichnet [1]. Funktionsverluste der DNA-Reparaturgene führen dabei zu einer Akkumulation von Mutationen und verstärken dadurch den Prozess der Karzinogenese.

Die klassischen Behandlungsmethoden für Krebs sind Chemotherapie, Bestrahlung und chirurgische Entfernung des Tumors. Die teilweise extremen Nebenwirkungen und der in vielen Fällen nur mäßige Behandlungserfolg sind große Nachteile dieser Behandlungsmethoden. Für die Therapie der Tumore werden aufgrund dieser Nachteile neue Strategien gesucht. Dabei ruhen große Hoffnungen auf der Tumorimmunologie. Durch die Erforschung der Immunreaktionen werden immuntherapeutische Ansätze für die Bekämpfung von Tumoren erhofft. Allerdings stellt nahezu jede Tumorerkrankung durch die genetische Heterogenität der Tumore ein individuelles Problem dar. Die Bekämpfung einer Tumorerkrankung erfordert somit eine differenzierte, individuelle und gezielte Therapie.

2 Immunogenität von Tumoren

Die Tumorimmunologie befasst sich mit der Erforschung der Immunreaktionen gegen Malignome. Die Ursprünge dieses Forschungszweiges reichen bis ans Ende des 19. Jahrhunderts. 1863 gelang es Robert Virchow, Leukozyteninfiltrate im Tumorgewebe nachzuweisen, und 1893 stellte der Chirurg Wilhelm Coley fest, dass die Stimulation des Immunsystems mit pyogenen Bakterien zu einer Regression von Tumoren führen kann [10]. Aber erst Paul Ehrlich stellte 1909 anhand von Beobachtungen bei Tierversuchen die Hypothese einer körpereigenen Tumorbekämpfung auf. Mehr als fünfzig Jahre später wurde diese Theorie von Macfarlane Burnet zur „*Immunosurveillance*“-Theorie ausformuliert. Diese besagt, dass Krebszellen mit einer ähnlichen Häufigkeit wie Infektionen mit pathogenen Erregern auftreten und ebenso wie diese Infektionen der Überwachung des Immunsystems unterliegen, weshalb sie meistens eliminiert werden, bevor sie klinisch sichtbar werden [11]. Dieser Theorie wurde lange Zeit mit gewisser Skepsis begegnet und die vorherrschenden Dogmata in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts waren zum einen, dass spontan entstandene Tumore im Gegensatz zu chemisch/physikalisch oder viral induzierten Tumoren nicht immunogen sind, und zum

anderen, dass die Immunantwort gegenüber immunogenen Tumoren durch die humorale Antwort in Form von Antikörpern dominiert wird. Die Tumoresistenz von thymuslosen Nacktmäusen, die nur eine rudimentäre, adaptive Immunität besitzen, sprach für diese Theorien [12]. Mittlerweile wurde diese Tatsache durch die Existenz von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in diesen Mäusen, die gegen Tumore vorgehen und IFN- γ produzieren können, widerlegt [13;14]. In den neunziger Jahren erlebte die „*Immunosurveillance*“-Theorie von Burnet durch einige Publikationen eine Renaissance und Ergebnisse neuerer Studien unterstützen mehr und mehr die Ansicht von Burnet, dass das Immunsystem eine wichtige Rolle bei malignen Erkrankungen spielt [15;16]. Die Blockade von IFN- γ , einem Effektorzytokin der zytotoxischen T-Zelle, durch Antikörper bewirkte bei Mäusen z.B. ein schnelleres Wachstum transplanterter Fibrosarkome [17]. Der Knockout einer Untereinheit des IFN- γ -Rezeptors bei Mäusen führte zu einer zehn bis 20mal höheren chemischen Induzierbarkeit von Tumoren [18;19]. Der genetische Ausfall eines weiteren Effektormoleküls, des Perforins, veranlasste bei Mäusen ein häufigeres Entstehen von Lymphomen und Bronchialkarzinomen [20], ebenso konnte an RAG2- und STAT1-defizienten Mäusen eine erhöhte Inzidenz von spontanen und chemisch induzierten Tumoren gezeigt werden. Dabei wurde beobachtet, dass Tumore aus immundefizienten oder –kompromittierten Mäusen wesentlich immunogener waren als Tumore aus immunkompetenten Mäusen, die sich in Anwesenheit eines intakten Immunsystems entwickelt hatten [15]. Anhand dieser Beobachtung wurde angenommen, dass das Immunsystem am Anfang der Erkrankung eine protektive Rolle hat, aber mit Fortschreiten der Erkrankung zu einer Selektion besonders maligner Klone führt, die sich der Kontrolle durch das Immunsystem entziehen können („*Immune escape*“) [14]. Aufgrund der komplexen Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem des Wirtes wurde vorgeschlagen, den Begriff „*Immunosurveillance*“ durch „*Immunoediting*“ zu ersetzen [14;21].

Zahlreiche Studien widerlegten die Annahme, dass die Immunantwort gegen Tumore von der humoralen Antwort bestimmt wird. Hinweise für die Art der Immunantwort gegen Tumore ergaben sich aus dem Vorkommen zytotoxischer T-Zell-Infiltrate im Tumorgewebe und damit einhergehender Regression [22;23] sowie dem Nachweis spontaner, tumorspezifischer, humoraler und zellulärer Immunantworten im peripheren Blut von Patienten [24]. Zudem wurde ein erhöhtes Vorkommen von Tumoren bei Patienten mit Immundefizienz-Syndromen beobachtet [25]. Die Arbeiten von Thierry Boon und seinen Kollegen zeigten, dass Karzinogen-induzierte Tumore in der Maus durch

T-Zellen, welche tumorspezifische Antigene erkannten, abgestoßen wurden [26]. Spontan auftretende $CD8^+$ -T-Zellen konnten bei malignen Melanomen, Leukämien und Karzinomen gefunden werden [27]. Diese Ergebnisse machten die Bedeutung der zytotoxischen T-Zellen für die Tumorabstoßung klar. Es folgte der Versuch der Charakterisierung tumorspezifischer Antigene in spontan entstehenden, humanen Tumoren. 1991 wurde das erste Epitop, welches durch T-Zellen erkannt wurde, identifiziert. Es handelte sich dabei um MAGE-1 beim malignen Melanom [28]. Die Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort resultiert dabei aus einem komplexen Zusammenspiel der antigenpräsentierenden Zellen (APCs), zytotoxischen T-Zellen (CTLs), T-Helferzellen, antikörperproduzierenden B-Zellen und Effektorzellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen.

2.1 Mechanismen der immunologischen Tumorabwehr

An den Interaktionen des Immunsystems mit malignen Erkrankungen sind Mechanismen sowohl der angeborenen als auch der adaptiven/erworbenen Immunität beteiligt [29]. Die Komponenten der angeborenen Immunität reagieren schnell und unspezifisch auf Krankheitserreger. Sie setzen sich zusammen aus physikalisch-chemischen Barrieren, dem Komplementsystem und zellulären Komponenten. Als Effektorzellen der angeborenen Immunität bei der immunologischen Tumorabwehr können folgende Zelltypen beteiligt sein:

- **Natürliche Killer-(NK-)Zellen:** Die NK-Zellen binden über immunglobulin-ähnliche KIR-Rezeptoren („*killer inhibitory receptors*“) an MHC-Klasse I-Moleküle und werden durch diese Bindung in ihren Effektorfunktionen inhibiert [30]. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr von Tumoren, indem sie MHC-Klasse I-negative Zellen spontan lysieren. Dieses Phänomen wird „*Missing Self*“ beschrieben [31;32]. Die Bindung der NK-Zellen ist dabei spezifisch, d.h. bestimmte KIR-Rezeptoren binden an bestimmte HLA-Klasse I-Moleküle [33-35]. Beim Konzept der NK-Alloreaktivität gelangen Spender-NK-Zellen in die HLA-differente Umgebung des Empfängers und durch ein KIR-Ligand-Mismatch werden die NK-Zellen in ihrer Reaktivität nicht mehr gehemmt. Dieses Konzept erlaubt es, eine NK-Zell-Alloreaktivität allein auf Grundlage der HLA-B- und HLA-C-Allel-Konstellation von Spender und Empfänger vorherzusagen. Effekte der NK-Zell-Alloreaktivität wurden bereits bei der haploidentischen Stammzelltherapie (SZT) bei akuter myeloischer Leukämie (AML) und akuter

lymphatischer Leukämie (ALL) beobachtet [36-38]. Zusätzlich können NK-Zellen auch MHC-Klasse I-positive Zellen lysieren, falls diese die MHC-Klasse I-ähnlichen Moleküle (z.B. MICA und MICB) exprimieren. Diese Moleküle werden stressinduziert gebildet und durch den NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen erkannt. Diese Erkennung führt trotz Bindung des KIR-Rezeptors an MHC-Klasse I-Moleküle zu einer Aktivierung der Effektorfunktionen der NK-Zelle [39]. Generell aktiviert werden NK-Zellen durch IFN- α und IFN- β sowie IL-12 [40].

- **Makrophagen:** Tumor-assoziierte Makrophagen spielen bei der Tumorentstehung eine duale Rolle. Einerseits produzieren sie Faktoren, die die Etablierung von Tumoren fördern. Andererseits können sie über vielfältige Mechanismen dahingehend aktiviert werden, dass sie das Tumorstadium inhibieren und maligne Zellen zerstören [41-44].

Die Komponenten der adaptiven Immunität bestehen aus den B- und T-Lymphozyten [45]. Sie reagieren spezifisch auf Fremdmoleküle bzw. auf veränderte Körperzellen. Zwar reagiert die erworbene Immunität mit einer Verzögerung von ein paar Tagen oder Wochen im Vergleich zu der angeborenen Immunität, kann aber ein immunologisches Gedächtnis ausbilden, so dass sie bei einem wiederholten Antigenkontakt schneller und effizienter reagiert. Die Lymphozyten entwickeln sich, wie alle anderen Zellen des Immunsystems, aus den hämatopoetischen Stammzellen. Dabei stammen sowohl B- als auch T-Lymphozyten von einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle ab.

- **B-Lymphozyten:** Die Ausreifung der B-Lymphozyten vollzieht sich im Knochenmark. Sie sezernieren Antikörper gegen mikrobielle und virale Antigene oder gegen Tumorantigene und markieren so Mikroorganismen oder erkrankte Körperzellen für Phagozyten.
- **T-Lymphozyten:** Die Ausreifung der T-Lymphozyten vollzieht sich im Thymus. Sie stellen für das Immunsystem die einzige Möglichkeit dar, in eine Zelle „hinein zu schauen“. Die Antigenerkennung erfolgt über den T-Zell-Rezeptor (TCR) auf der Oberfläche der T-Lymphozyten. Die von ihnen erkannten Antigene werden als prozessierte Peptide exogener oder endogener Proteine über spezielle, membranständige Glykoproteine präsentiert. Diese Glykoproteine werden beim Menschen als „*human leukocyte antigen*“ (HLA) bezeichnet und von den Genen des auf dem Chromosom 6 lokalisierten Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) kodiert. Man unterscheidet zwei Typen von T-Lymphozyten:

1. Zytotoxische T-Zellen, die durch das Oberflächenmolekül CD8 („*cluster of differentiation 8*“) charakterisiert sind, und die Antigene über MHC-Klasse I-Moleküle erkennen [46] sowie
 2. T-Helferzellen, die durch das Oberflächenmolekül CD4 charakterisiert sind, und die Antigene über MHC-Klasse II-Moleküle erkennen. Die T-Helferzellen lassen sich ihrerseits in T_H1- und T_H2-Zellen einteilen [47].
- **NKT-Zellen:** Sie sind CD4⁺ T-Zellen, die den NK1.1 Marker exprimieren, der normalerweise mit NK-Zellen assoziiert ist. Diese Zellen besitzen immer denselben $\alpha\beta$ -TCR. Zudem sind sie nicht durch MHC-Klasse II-Moleküle restringiert und erkennen Lipide über MHC IB-Moleküle, die nicht vom MHC kodiert werden. NKT-Zellen beeinflussen das Gleichgewicht zwischen T_H1- und T_H2-Zellen mittels Sekretion von IL-4 und IFN- γ [48;49]

2.2 Antigenprozessierung und -präsentation

Die MHC-Moleküle sind hochpolymorph. Es werden MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Moleküle unterschieden. Für MHC-Klasse I-Moleküle existieren sechs verschiedene Genregionen: HLA-A, -B und -C. Die meisten Individuen sind für diese drei Genregionen heterozygot, so dass sie aufgrund der Kodominanz der Allele bis zu sechs verschiedene MHC-Klasse I-Moleküle exprimieren. Die Genregionen für die Allele der MHC-Klasse II-Moleküle sind HLA-DP, -DQ und -DR. Die Heterozygotie und Kodominanz bei diesen Allelen führt bei Individuen zur Expression von bis zu acht verschiedenen MHC-Klasse II-Molekülen. Aufgrund der hohen Varianz der Allele sind bisher 2215 HLA-Allele der MHC-Klasse I-Moleküle und 1012 HLA-Allele der MHC-Klasse II-Moleküle identifiziert worden (IMGT/HLA Sequence Database <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>). Die polymorphen Unterschiede der MHC-Moleküle finden sich häufig im Bereich der Peptidbindungsstelle. Aminosäurepositionen der gebundenen Peptide, die engen Kontakt zu der Peptidbindungsregion haben, werden als Ankerpositionen bezeichnet. Sie bestimmen, welche MHC-Klasse I-Moleküle bevorzugte Bindungspartner sind.

T-Zell-erkannte Antigene werden als Komplexe von Peptiden mit MHC-Klasse I- oder MHC-Klasse II-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert. MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren Peptide aus Proteinen jeglicher subzellulärer Lokalisation. Im Zytosol werden die Proteine durch die Proteasomen [50;51] und durch den TPP-II-Komplex [52] unter ATP-Verbrauch zu Peptiden fragmentiert, die von Aminopeptidasen

weiter abgebaut werden. Das Proteasom ist ein im Zytoplasma lokalisierter, multikatalytischer Enzymkomplex, der zum nicht-lysosomalen System gehört und ATP-abhängig die Degradation falsch gefalteter oder nicht mehr von der Zelle benötigter Proteine katalysiert [50]. Das 26S-Proteasom ist aufgebaut aus der zentralen 20S-Untereinheit und zwei weiteren, regulatorischen, peripheren 19S-Komplexen. Es ist das Schlüsselenzym des Ubiquitin/ATP-abhängigen, kontrollierten Abbaus von allen kurzlebigen und vielen langlebigen Proteinen [53;54]. Ubiquitinierung ist dabei eine reversible, posttranslationale Modifikation. Das aus 76 Aminosäuren bestehende Polypeptid Ubiquitin wird isopeptidisch an einen Lysinrest mit dem Zielprotein verknüpft. Eine Poly-Ubiquitinkette, die aus mindestens drei verknüpften Ubiquitineinheiten besteht, bewirkt eine Erkennung des Proteins durch das Proteasom und eine anschließende Proteolyse [55;56]. Vom Proteasom abgebaute Proteine gehören u.a. zu den Zellzyklus-Regulatoren, wie Cycline und cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren, Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressorproteine, wie p53, und antiapoptotische Proteine, wie Bcl-2 [57]. Die entfalteten Proteine werden beim Durchtritt durch das katalytische Zentrum zu Peptiden mit einer Länge von drei bis 25 Aminosäuren gespalten [58;59]. Das Proteasom besitzt dabei als wichtigste, katalytische Aktivitäten eine chymotrypsin-ähnliche, trypsin-ähnliche und peptidyl-glutamyl-ähnliche (caspase-ähnliche) Aktivität, die sich jeweils in der Spaltung nach bestimmten Aminosäureresten unterscheiden [60]. Die chymotrypsin-ähnliche Aktivität spaltet dabei das Protein nach hydrophoben Aminosäureresten und hat eine starke Präferenz für Leucin, gefolgt von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan. Die trypsin-ähnliche Aktivität spaltet nach basischen Aminosäureresten mit einer bevorzugten Präferenz für Arginin, gefolgt von Lysin. Die caspase-ähnliche Aktivität hingegen spaltet nach sauren Aminosäuren und hat dabei eine Präferenz für Asparaginsäure vor Glutaminsäure [61]. Nach der Degradation der Proteine durch das Proteasom sind ungefähr 60% der Peptide zu klein für die Bindung an MHC-Klasse I-Moleküle, ungefähr 15% besitzen die korrekte Länge und die weiteren 25% sind zu lang für eine Bindung an MHC-Klasse I-Moleküle [62]. Für eine Bindung der längeren Peptide müssten diese im Zytosol oder endoplasmatischen Retikulum (ER) verkürzt werden. Es wird angenommen, dass nur N-terminal verlängerte Peptide durch Aminopeptidasen zu MHC-Klasse I-Liganden verkürzt werden können, da bisher keine zytosolische oder ER-residente Carboxypeptidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Es wurden bereits mehrere Peptidasen beschrieben, die Peptide N-terminal verkürzen [52;63;64]. Im ER können aufgrund von N-terminaler Extension für die Bindung an MHC-Klasse I-Molekülen zu

lange Peptide durch Aminopeptidasen verkürzt werden. Eine dafür hauptsächlich als verantwortlich identifizierte Protease ist ERAAP (*ER Aminopeptidase I*) / ERAAP (*ER Aminopeptidase Associated with Antigen Processing*) [65;66]. Die Peptidfragmente werden durch den TAP-Transporter („*transporter associated with antigen processing*“), einem ABC-Transporter, der als Heterodimer aus TAP1 und TAP2 besteht, in das ER transportiert [67]. Im ER werden die MHC-Klasse I-Moleküle mit diesen Peptiden beladen und zur Zelloberfläche transportiert.

Die MHC-Klasse I-Moleküle bestehen aus zwei Untereinheiten, einer α -Kette mit 45 kDa und einer β -Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (β_2m), mit 12 kDa. Die neusynthetisierte α -Kette wird im ER durch Bindung mit dem membrangebundenen Chaperon-Protein Calnexin partiell gefaltet und zurückgehalten. Bei Anlagerung des β_2 -Mikroglobulins an die α -Kette dissoziiert das $\alpha:\beta_2$ -Mikroglobulin-Heterodimer vom Calnexin und lagert sich an einen anderen Komplex aus Proteinen an. Dieser Komplex besteht u.a. aus Calreticulin, das die Funktion des Calnexins übernimmt, und aus Tapasin, einem mit TAP-assoziierten Protein. Die Bindung eines mit TAP assoziierten Peptides an das MHC-Klasse I-Molekül bewirkt die Loslösung des Peptides von TAP, die vollständige Faltung des MHC-Klasse I-Moleküls, die Dissoziation des MHC-Klasse I-Moleküls von Calreticulin und schließlich den Transport des Peptid-MHC-Klasse I-Komplexes durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. An der Zelloberfläche wird der Komplex aus Peptid und MHC-Klasse I-Molekül von T-Lymphozyten durch den T-Zell-Rezeptor der $CD8^+$ -T-Zellen erkannt [68-70].

Die Peptide, die aus dem vesikulären System stammen und über MHC-Klasse II-Moleküle präsentiert werden, sind in der Regel durch Endozytose von der Zelle aufgenommen worden. Phagozytose und Makropinozytose ermöglichen so die Präsentation von Mikroorganismen sowie apoptotischen oder nekrotischen Zellfragmenten [71]. Die Endosomen werden auf dem Weg zum Zellinneren zunehmend saurer und verschmelzen schließlich mit Lysosomen zu sogenannten Phagolysosomen. Die Phagolysosomen enthalten Proteasen, die bei niedrigem pH-Wert aktiviert werden und die aufgenommenen Proteine zu Peptiden spalten. Bei entsprechender Länge und Sequenz binden die Peptide an MHC-Klasse II-Moleküle und werden als MHC-Klasse II-Peptid-Komplex zur Zelloberfläche transportiert. MHC-Klasse II-Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, die ebenfalls aus zwei Untereinheiten bestehen, der 34 kDa großen α -Kette und der 24 kDa großen β -Kette [72]. Nach Translokation der neu synthetisierten MHC-Klasse II-Moleküle ins ER, wird durch die sogenannte invariante Kette (Ii) die

Beladung der Peptidbindungsgrube verhindert. Zusätzlich steuert die invariante Kette den Transport der MHC-Klasse II-Moleküle vom ER zum Phagolysosom. Dort wird Ii durch Proteasen wie dem Cathepsin S in mehreren Schritten abgespalten und nach Dissoziation des sogenannten „*class II-associated invariant chain peptide*“ (CLIP) werden MHC-Klasse II-Moleküle mit Peptiden aus den Endosomen beladen und zur Zelloberfläche transportiert. Dort werden die Peptide CD4⁺ T-Zellen präsentiert.

2.3 Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen

Die Ausreifung von T-Zellen findet im Thymus statt. Dabei werden die Gene des TCR rearrangiert, so dass jede T-Zelle anschließend einen individuellen Rezeptor besitzt. Der TCR besteht aus α - und β -Ketten oder aus γ - und δ -Ketten ($\gamma\delta$ -T-Zellen). Die Ketten sind über Disulfidbrücken verbundene Glykoproteine mit Immunglobulinstruktur. Der variable N-terminale Bereich des TCR ist für die Antigenerkennung zuständig und setzt sich aus bis zu drei verschiedenen Gensegmenten zusammen. Die variable Domäne der β -Kette des TCR wird rearrangiert aus der V(*Variability*)-, der D(*Diversity*)- und der J(*Joining*)-Region. Die α -Kette besteht nur aus der V- und J-Region. Jede dieser Regionen wird durch mehrere Exons kodiert, von denen jeweils eines beim Rearrangement der Gene für den TCR zufällig rekombiniert wird. Durch das Rearrangement entsteht eine Diversität von ungefähr 10^{15} potentiellen TCR-Varianten [73]. Die $\alpha\beta$ -Ketten sind auf der Zelloberfläche nicht-kovalent an CD3-Moleküle gebunden. Die zytoplasmatischen Bereiche des CD3-Moleküls enthalten ITAM („*immune receptor tyrosine-based activation motif*“)-Bereiche, die nach der Antigenerkennung mit Tyrosinkinasen in Wechselwirkung treten und über Phosphorylierung die Signaltransduktion propagieren [74].

Neben dem Rearrangement der Gene des TCR durchläuft jede T-Zelle im Thymus mehrere Differenzierungsstufen positiver und negativer Selektion. Die positive Selektion überprüft, ob der TCR zu MHC-Komplexen passt, d.h. ob eine Selbst-MHC-Restriktion, eine Erkennung von MHC-Molekül und Peptid durch die T-Zelle potentiell möglich ist. Durch die Selbst-MHC-Restriktion erhält die T-Zelle ein Überlebenssignal und geht nicht in Apoptose (*non-selection; death by neglect*). Allerdings führt eine sehr starke Bindung von TCR an MHC-Komplexe zu einem qualitativ anderen Signal. Solche T-Zellen unterliegen dann der Apoptose, da sie als autoreaktive T-Zellen negativ selektioniert werden [75]. Tumorassoziierte Antigene sind zum Teil körpereigene Antigene, werden aber von T-Zellen erkannt. Damit zeigt sich, dass autoreaktive T-Zellen potentiell der

negativen Selektion entkommen können, aber auch, dass für eine erfolgreiche Tumorabstoßung eine autoreaktive Immunantwort unter Umständen von Vorteil ist.

Es können vier Gruppen von Effektor-T-Zellen unterschieden werden:

- Naive T-Zellen expandieren nach Antigenkontakt mit APCs erst nach stunden- bis tagelanger Aktivierungsphase.
- Terminal differenzierte, zytotoxische T-Zellen wirken direkt bei Antigenkontakt zytolytisch und unterliegen dem AICD („*activation-induced-cell-death*“).
- Zentrale T-Memory-Zellen exprimieren den Homing-Rezeptor CCR7, wandern in periphere Lymphknoten und generieren die sekundäre Immunantwort.
- Effektor-T-Memory-Zellen sind CCR7-negativ und in der Lage, in Gewebe einzuwandern [76;77].

Die Effektivität einer Immunantwort gegen Antigene ist dabei von mehreren Faktoren abhängig, die in ihrer Summe entscheiden, ob es zu einer produktiven T-Zellantwort oder zu Tumortoleranz bzw. Anergie kommt [78;79], wobei Mechanismen einer antigen-spezifischen Toleranzinduktion gegen körpereigene Strukturen wesentlich für die Prävention einer Autoimmunreaktion und für die Immunhomöostase sind. Es gibt zunehmend Hinweise, dass aktive, supprimierende Mechanismen autoaggressive Immunreaktionen auch gegen den Tumor hemmen [80;81].

Generelle Faktoren für eine erfolgreiche T-Zellaktivierung sind die Antigenpräsentation, die Antigenkonzentration, die Kreuzpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) und der Reifungsgrad der APCs [82]. Bei der Kreuzpräsentation („*cross priming*“) werden Proteine apoptotischer Zellen von APCs über Endozytose aufgenommen und in den Weg der Antigenpräsentierung über MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Moleküle eingeschleust. Die Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen durch die Antigenpräsentierung findet hierbei überwiegend in lymphatischen Organen statt [83] und beginnt mit der Bindung von TCR an den MHC-Peptidkomplex [84]. Dieses erste Signal ist allerdings nicht ausreichend für die funktionelle Aktivierung einer ruhenden, naiven T-Zelle. Die Aktivierung der T-Zelle benötigt ein zweites, kostimulatorisches Signal, das z.B. über die Bindung eines B7-Moleküls der APCs (CD80 oder 86) an den CD28-Rezeptor der T-Zelle erfolgen kann [85]. Eine Rolle spielt die Dauer der Interaktion zwischen T-Zellen und APC [78], die abhängig von der Affinität des jeweiligen Peptids zum MHC-Allel und der Affinität des TCR zum Epitop ist. Die Interaktion des TCR mit dem MHC-Peptidkomplex auf den APCs und gleichzeitiger Kostimulation führt zu einer adäquaten Stimulation, bei der es zu einer massiven

Phosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste in der T-Zelle kommt. Aus dieser Phosphorylierung resultiert eine Aktivierung multipler Signalkaskaden, die einhergeht mit einer verstärkten Expression akzessorischer Moleküle auf der T-Zelloberfläche, der Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ , welches die Antigenpräsentierung der APCs erhöht, und IL-2, das eine zusätzliche T-Zellaktivierung bewirkt. Die Aktivierung führt letztendlich zu einer starken, klonalen Expansion. Durch diese Proliferation entstehen viele lytisch aktive T-Zellen, die keine Kostimulation mehr benötigen [78]. Fehlt dagegen die Kostimulation bei naiven T-Zellen, binden diese zwar an die Liganden, jedoch bilden sie kein IL-2 und proliferieren nicht. Sie werden anergisch [76;78]. Dieser Mechanismus ist für einige Selbstantigene beschrieben worden. Zudem scheint für die Toleranzinduktion durch Tumorzellen das Fehlen bestimmter Moleküle, sogenannter „Gefahrensignale“, die von normalen Zellen nicht produziert werden, wie z.B. IFN- γ , TNF, CD40L und IL-1 β , wichtig zu sein [86;87]. Einige der aktivierten T-Zellen differenzieren zu T-Memory-Zellen mit einer hohen Lebensdauer, lytisch aktive T-Zellen dagegen unterliegen ohne weitere Aktivierung durch Fremdanigene dem AICD („*activation-induced-cell-death*“) [88].

Die Lyse durch aktivierte, zytotoxische T-Zellen erfolgt mittels Effektormolekülen, wie Perforin und Granzyme B, oder durch die Fas-Liganden vermittelte Apoptose. Die Sekretion von Perforin oder Granzyme B erfolgt über Exozytose. Perforin polymerisiert in der Zellmembran der Zielzelle zu Poren und bewirkt eine osmotische Lyse durch unkontrolliertes Eindringen von Wasser in die Zellen. Granzyme B gelangt durch Perforinporen oder durch Endozytose in die Zielzellen und löst dort durch Aktivierung von Caspasen und Proteasen eine Apoptose aus. Die über Fas-Liganden vermittelte Apoptose erfolgt über Bindung des Fas-Liganden (CD95L) der T-Zelle mit dem Fas-Rezeptor (CD95) der Zielzelle und führt zur Aktivierung von Caspasen und zur Apoptose [89]. Zusätzlich sezernieren zytotoxische T-Zellen Zytokine, wie TNF- α oder IFN- γ . TNF- α wirkt direkt toxisch auf die Zielzellen [86], während IFN- γ ein wichtiges Effektormolekül bei der immunologischen Abwehr von Tumorzellen und der Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses ist. Es aktiviert NK-Zellen und fördert die Antigenprozessierung, die Expression von MHC-Molekülen und von Kostimulatoren auf den APCs. Die Eliminierung der Tumorzellen kann zusätzlich durch IFN- γ induzierte, direkte und indirekte, nicht-immunologische Mechanismen erfolgen, wie z.B. der Hemmung der Angiogenese über IFN- γ induzierte Angiogenese-Inhibitoren-Faktoren wie IP-10 („*IFN- γ -inducible protein 10*“) und Mig („*monokine induced by IFN-gamma*“) [88].

Außerdem ist ein über IFN- γ vermittelter Wachstumsstopp in der G₁-Phase des Zellzyklus beschrieben [90].

2.4 Tumorantigene

Tumorzellen exprimieren ein Spektrum an mehr oder weniger spezifischen Proteinen, die intrazellulär prozessiert und als acht bis 15 Aminosäuren lange Peptide auf MHC-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Peptide können grundsätzlich von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden, wenn sie an individuelle MHC-Klasse I-Moleküle binden und von ihnen präsentiert werden. CD4⁺ T-Zellen erkennen Peptide aus elf bis 15 Aminosäuren, die über MHC-Klasse II-Moleküle präsentiert werden. Die von Tumorzellen exprimierten Antigene unterliegen wie bei allen körpereigenen Zellen den zentralen und peripheren Toleranzmechanismen. Deshalb wird ein Großteil der prozessierten Proteine vom T-Zellsystem als eigen identifiziert und toleriert. Genetische und epigenetische Veränderungen in Tumorzellen können dagegen zur Generierung von unbekannten immunogenen Peptiden führen, wenn die prozessierten Peptide strukturell verändert sind, eine ektopische Lokalisation aufweisen oder aberrant exprimiert werden [91;92]. Ein Teil dieser Peptide entspricht Neoantigenen bzw. im strengen Sinne tumorspezifischen oder individualspezifischen Antigenen. Diese immunogenen Peptide stellen eine Basis für viele immuntherapeutische Ansätze dar, die als Ziele die Potenzierung einer natürlich vorkommenden Immunantwort oder die Induktion einer neuen Antwort verfolgen. Für alle Antigene gilt jedoch, dass die vorbestehende Toleranz oder die durch das Tumorgewebe induzierte Toleranz überwunden und eine Art von Autoimmunreaktion initiiert werden muss. Die Eigenschaften eines idealen tumorassoziierten Antigens (TAA) als Targetzielstruktur für die onkologische Immuntherapie wären dabei (www.cancerimmunity.org) [3]:

- spezifische Expression in Tumorzellen und –gewebe,
- häufige Expression bei bekannten Tumorarten oder gar bei verschiedenen Tumorarten
- stabile Expression auch in Metastasen, bei Entdifferenzierung und über alle Zellzyklusphasen hinweg (auch in sogenannten Tumor-initiiierenden Zellen)
- Prozessierung von Peptiden, die über häufige HLA-Allele präsentiert werden
- Immunogenität in einem hohen Anteil von Patienten

Die ersten TAAs wurden beim malignen Melanom identifiziert [28]. Mittlerweile sind zahlreiche TAAs auch für andere Tumorentitäten bekannt. Aufgrund der genetischen Instabilität maligner Zellen kann zudem mit einer großen Heterogenität von noch zu

identifizierenden TAAs gerechnet werden [93]. Die Analyse des antitumoralen T-Zellrepertoires einzelner Patienten zeigte, dass diese Immunreaktionen gegen viele Antigene unterschiedlicher Kategorien entwickeln und die Immunantwort durch die Antigenität des individuellen Tumors, den individuellen HLA-Typ sowie die Kapazität des individuellen T-Zellrepertoires bestimmt wird [94-96]. Die bereits bekannten TAAs werden in erster Linie nach ihrem Expressionsprofil unterteilt (www.cancerimmunity.org) [97].

Die erste Gruppe stellen die **individuellen TAAs** dar. Diese Antigene werden selektiv in Tumorzellen, aber nicht in somatischen Zellen exprimiert, da sie sich von mutierten Genen herleiten. Sie sind streng tumorspezifisch und werden daher auch „*tumor-specific unique antigens*“ genannt [98]. Die Genmutationen entstehen aufgrund von Punktmutationen, die zu einem Aminosäureaustausch oder zu einer Leserasterverschiebung führen können [95;99], von Peptiden aus kryptischen Translationsprodukten [100], von eingefügten Intron-kodierenden Sequenzen [101;102] oder durch Translokationen [103]. Mutationen können die Proteinaktivität beeinflussen und zur onkogenen Transformation bzw. zur Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps beitragen. Weil diese Antigene im strengen Sinn tumorspezifisch sind, mit hoher Wahrscheinlichkeit homogen und stabil exprimiert werden und nicht einer zentralen Toleranzinduktion unterliegen, sind sie vielversprechende Targetstrukturen für die Immuntherapie [104]. Die hohe Heterogenität der individuellen Tumorantigene begrenzt allerdings die Nutzung als universelle Antigene für die Immuntherapie von Malignomen.

Die zweite Gruppe der TAAs stellen die sogenannten „**shared tumor antigens**“ (**STA**) dar. Diese sind nicht im strengen Sinne tumorspezifisch. Sie werden nach ihrem Expressionsprofil in folgende Gruppen eingeteilt:

1. **Cancer/Testis-Antigene (CTA)** werden außer in Tumorzellen nur in Plazenta, Testis und in Zellen der Embryogenese exprimiert. In somatischen Zellen sind die Promotorbereiche für diese Gene methyliert, so dass die Expression stark reprimiert ist. In malignen Zellen liegen häufig Demethylierungen der Promotorbereiche vor, wodurch es zu einer Expression ruhender Gene kommt, die daraufhin immunogen wirken können [105;106]. Die immunprivilegierten Zellen der Keimzellbahn exprimieren keine bzw. wenig MHC-Moleküle und ein direkter Kontakt von Immunzellen und Zellen der Keimbahn findet nicht statt. Diese Gründe werden als Ursache angenommen, dass diese Gene in Keimzellen nicht immunogen wirken [107;108]. Für einige der CTAs wurde allerdings nachgewiesen, dass sie zumindest

teilweise im Thymus exprimiert werden, woraus eine zentrale Toleranz resultiert [109;110]. Beispiele für CTAs sind die Gene der MAGE-Familie, BAGE und NY-ESO-1 [111;112].

2. **Differenzierungsantigene** sind für das Gewebe, aus dem sich die Malignome entwickeln, typisch bzw. spezifisch. Beispiele für Differenzierungsantigene sind Melan-A, Tyrosinase, gp100 und PSA [94;113].
3. **Überexprimierte Antigene** sind Proteine, die in normalem Gewebe gering exprimiert werden, aber in Tumoren deutlich überexprimiert sind. Durch geringer exprimierte Antigenmengen können normale Zellen der Zytolyse durch niedrig affine, auto-reaktive T-Zellen entgehen. Die Überexpression der Proteine dagegen führt zu einer deutlich erhöhten Präsentationsdichte von immunogenen Peptiden auf der Tumorzelle und zu einer verstärkten Kreuzpräsentation durch APCs. Beispiele für überexprimierte Antigene sind Her2/neu, PRAME, WT1 und Survivin [114-116].
4. **Virale Antigene** sind Proteine, die von onkogenen Viren stammen und eine maligne Transformation verursachen können. Beispiele hierfür sind die Proteine E6 und E7 des humanen Papillomvirus 16 (HPV16) [117]. Solche Antigene unterliegen ebenfalls nicht der Selbsttoleranz und sind in der Lage, T-Zellantworten zu induzieren. Da gegen sie keine Toleranzinduktion stattgefunden hat, bilden sie eine sehr immunogene Gruppe von Tumorantigenen [118].

Differenzierungsantigene und Überexpressionsantigene sind strukturell intakte Autoantigene, weshalb gegen sie gerichtete Immunantworten der Kontrolle durch vorbestehende zentrale und periphere Toleranzmechanismen unterliegen. Bei Brechung dieser Toleranz sind Autoimmunreaktionen nicht auszuschließen. Neben den genannten TAA-Kategorien wurde über Antigene berichtet, die durch tumorspezifisches Spleißen der prä-mRNAs [119], tumorspezifische post-translationale Modifikationen [120;121] oder post-translationales Proteinspleißen [122] entstehen. Ein Beispiel für ein fehlerhaft glykosyliertes Protein stellt das Protein MUC-1 dar, welches in zahlreichen Tumoren vorkommt [123]. Einige der tumorassoziierten Antigene werden ebenfalls über MHC-Klasse II-Epitope von CD4⁺ T-Helferzellen erkannt [98;124;125] und verursachen neben der zellulären Immunantwort auch eine humorale Antwort. Zusätzlich spielen einige der tumorassoziierten Antigene eine wichtige Rolle als Biomarker in der serologischen Diagnostik. PSA ist z.B. ein TAA, das sezerniert wird und als löslicher, zirkulierender Biomarker für die Diagnostik des Prostatakarzinoms dient.

2.5 Methoden zur Identifizierung von Tumorantigenen

Die Identifizierung von TAAs als diagnostische, prognostische und therapeutische Marker ist ein Gegenstand heutiger, onkologisch-immunologischer Forschung. Für die Identifizierung der TAAs bzw. T-Zell-Epitope stehen mehrere Strategien zur Verfügung, wobei als Quelle für die Identifizierung von TAAs DNA, RNA und Proteine aus Tumorzelllinien oder Biopsien dienen können. **Tabelle A-1** gibt einen Überblick über die verschiedenen Strategien und das dafür benötigte Quellmaterial [2;3].

Identifizierung über	Methoden und Techniken
Genomische DNA	Sequenzierungen (Mutationen, Polymorphismen) Hybridisierungstechniken
mRNA (Transkriptomanalyse)	cDNA-Subtraktion Differential Display DNA-Microarray, SAGE, EST-Datenbanken
Protein (Proteomanalyse)	Expressionsprofilvergleiche (2D-PAGE, Protein-Chips) Identifizierung durch HLA-gebundene Peptide (HPLC, MS)
Immunogenität	cDNA-Expressionsklonierung mit tumorreaktiven T-Zellen cDNA-Expressionsklonierung mit Patienten-Serum (SEREX) Phagen-Peptid-Bibliotheken mit Patienten-Serum 2D-Page zusammen mit Patienten-Serum (SERPA, SPEAR)

Tab. A-1: Strategien zur Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen (modifiziert nach Carter, P., *Endocr. Relat Cancer*, 2004 und Kawakami, Y., *Cancer Sci.*, 2004 [2;3]).

SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), EST (Expressed Sequence Tag), HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), SEREX (serological analysis of autologous tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning), SERPA (serological proteome analysis), SPEAR (serological and proteomic evaluation of antibody response).

Die Identifizierung der TAAs erfolgt entweder mit genetischen oder mit biochemischen Methoden. Strategien, bei denen primär keine immunologischen Effektoren eingesetzt werden, haben den Nachteil, dass die tatsächliche Immunogenität der damit gefundenen Kandidatenantigene anschließend noch zu demonstrieren ist. Außerdem lassen sich bei diesen Methoden häufig nur Proteine identifizieren, die hoch exprimiert werden, während bspw. durch T-Zellen auch Proteine seltener Transkripte gefunden werden können [126]. Nachfolgend sind einige der Strategien der Identifizierung tumorassoziiierter Antigene mit einer kurzen Erläuterung vorgestellt.

2.5.1 T-zellbasierte cDNA-Expressionsklonierung

Diese Methode basiert auf der Isolierung tumorspezifischer, zytotoxischer T-Zell-Klone und führte zur Entdeckung des ersten menschlichen Tumorantigens, MAGE-1 in Assoziation mit HLA-A*0101 [28]. Für die Identifizierung von MAGE-1 wurde genomische DNA in Cosmide eingebracht und stabil in antigen-negative Empfängerzellen transfiziert. Im Fall von MAGE-1 waren die Empfängerzellen Antigenverlustvarianten der Tumorzelllinie, die zuvor durch T-Zell-Klone identifiziert wurden, weil sie von einem bestimmten T-Zell-Klon nicht erkannt wurden. Für die stabile Transfektion von Cosmid-Banken war es ferner nötig, die Transfektanten aufwendig und langwierig in antibiotikahaltigem Medium zu selektionieren. Zudem wurde das gesamte Genom durch die Cosmid-Banken durchsucht, das überwiegend aus nicht exprimierten Sequenzen besteht. Eine verbesserte Methodik bestand in der transienten Transfektion von COS-7-Zellen mit cDNA-Bibliotheken aus Tumorzelllinien [127], wie sie heutzutage auch angewendet wird. Der Einsatz von cDNA-Bibliotheken in eukaryontischen Expressionsvektoren hat zum einen den Vorteil der Nutzung des Transkriptoms, zum anderen des Wegfalls der zeitaufwändigen Selektion von stabilen Transfektanten. Aus Gesamt-mRNA, revers transkribierte cDNA wird in eukaryontische Expressionsvektoren kloniert, die mit einem SV40-Replikationsursprung ausgestattet sind. Bei Transfektion der rekombinanten Plasmide in Zellen, die das „Large T“-Onkogen von SV40 tragen, wie z.B. COS-7- oder 293T-Zellen, löst der SV40-Replikationsursprung eine hohe, extrachromosomale Replikation der transfizierten Plasmide aus [128]. Verstärkt durch die Expressions-Promotoren kommt es zu einer noch größeren gebildeten Menge an Protein und somit an Antigen. Die Detektion von antigenkodierender cDNA erfolgt über transiente Kotransfektion von COS-7- oder 293T-Zellen mit HLA-cDNA und Tumor-cDNA. Diese Transfektanten werden dann mit T-Zell-Klonen, die durch das kotransfizierte HLA-Allel restringiert sind, auf Erkennung durch den Nachweis der Freisetzung von Lymphokinen getestet.

Um einerseits bereits identifizierte Antigene zu berücksichtigen und zugleich bislang unbekannte Peptide und Antigene zu entdecken, die vom antitumoralen T-Zellrepertoire individueller Patienten erkannt werden können, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Wölfel (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) ein komplexes Verfahren des T-Zell-expressionsscreenings entwickelt [96;129]. **Abbildung A-1** fasst dies schematisch zusammen. Zuerst erfolgt die Überprüfung der Erkennung von bekannten, tumorassoziierten Antigenen durch tumorreaktive Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen

(MLTC, „mixed lymphocyte/tumor cell cultures“) oder durch T-Zell-Klone in einem Paneltest. Hierbei wird die Plasmid-DNA bekannter Antigene zusammen mit der Plasmid-DNA von allen HLA-Klasse I-Allelen des individuellen Patienten transfiziert. Die Transfektanten werden dann auf Erkennung durch die T-Zellen im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Von den durch die T-Zellen erkannten tumorassoziierten Antigenen wird die peptidkodierende Region durch Genfragmentierung und Datenbankabgleich bestimmt.

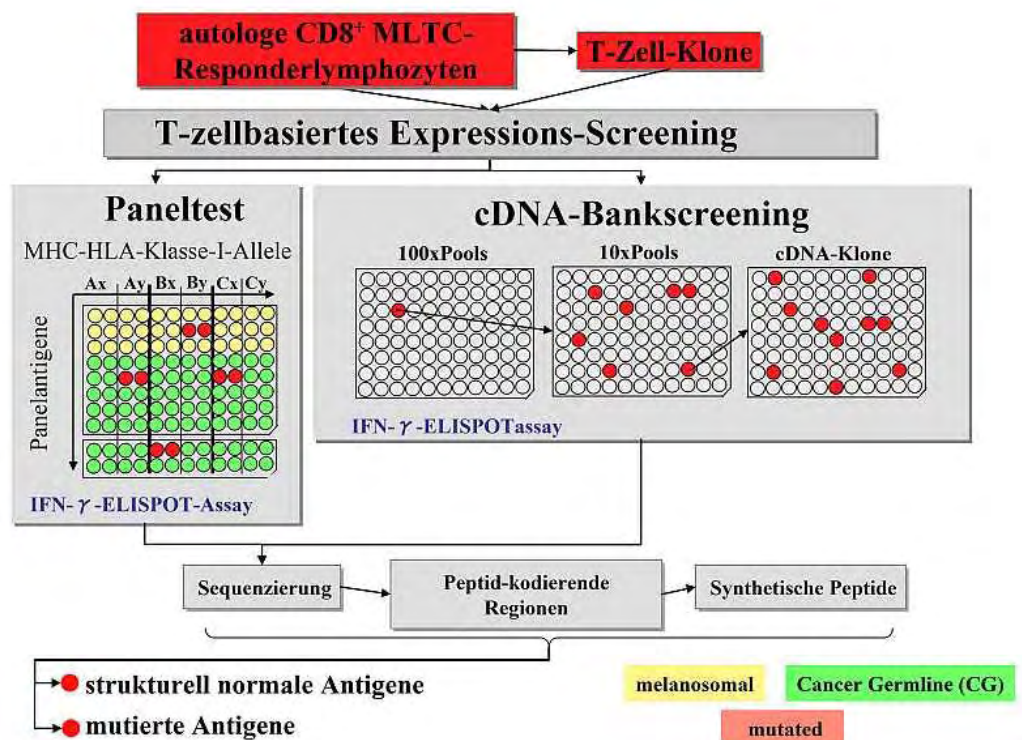


Abb. A-1: Schematische Darstellung des T-zellbasierten Expressions-Screenings. Zuerst erfolgt die Überprüfung bekannter, tumorassoziiierter Antigene im Paneltest mit tumorreaktiven T-Zellen. Anschließend werden cDNA-Pools von 100x cDNA-Pools einer in einen eukaryontischen Expressionsvektor konstruierten cDNA-Bank des Tumors zusammen mit HLA-cDNA-Plasmiden in COS-7- oder 293T-Zellen transfiziert. Diese werden in einem Lymphokinassay mit T-Zellen bezüglich der Antigenpräsentation verifiziert. Von den T-Zellen erkannte Pools werden selektiert, subkloniert und schließlich erneut transfiziert. Durch wiederholte Subklonierung und Transfektion wird die antigenkodierende cDNA isoliert, kloniert und auf die peptid-kodierende Region überprüft.

Desweiteren erfolgt die Identifizierung unbekannter, tumorassoziiierter Antigene durch ein cDNA-Bankscreening. Dazu werden cDNA-Pools aus 100 Bakterienkolonien zusammen mit potentiell restringierenden HLA-cDNA-Plasmiden transfiziert. Die Transfektanten werden ebenfalls auf Erkennung durch T-Zell-Klone oder durch MLTCs getestet. Von einem T-Zell-Klon oder einer MLTC erkannte cDNA-Pools werden schrittweise kloniert. Die peptid-kodierende Genregion eines identifizierten cDNA-Klons wird anschließend durch Genfragmentierung in weiteren Schritten eingegrenzt. Aus der eingegrenzten Proteinsequenz werden Peptide vorhergesagt, synthetisiert und auf Erkennung durch den T-Zell-Klon / MLTC getestet.

2.5.2 SEREX (*serological analysis of recombinant expression libraries*)

Bei der SEREX-Methode [130] werden cDNA-Expressionsbanken aus Tumorgewebe mit Patientenseren gescreent. Dazu werden die cDNA-Banken in einen λ -Phagen-Vektor kloniert. Anschließend werden sie in *Escherichia coli* durch Infektion mit dem Phagen λ zur Expression gebracht. Die Lysate der transfizierten *E.coli* und somit die rekombinanten Proteine werden auf Nitrozellulosemembranen gebunden und mit Patientenseren inkubiert. Die Reaktionen der autologen IgG-Antikörper mit den rekombinanten Proteinen können durch die Inkubation mit einem sekundären, anti-humanen-IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Die durch die Patientenseren entdeckten, rekombinanten Proteine werden durch Sequenzierung der cDNA-Fragmente identifiziert. Diese Methode führte bei verschiedenen Tumorentitäten zur Identifikation einer großen Anzahl neuer Antigene (www2.licr.org/CancerImmunomeDB/). Primär führt SEREX zur Identifizierung von humoralen Immunantworten. Da aber für die Entstehung der humoralen Immunantwort auch die Hilfe von T-Zellen nötig ist, wird davon ausgegangen, dass SEREX-Antigene grundsätzlich auch von T-Zellen erkannt werden, zumal manche der durch SEREX entdeckten Antigene zuerst mit Hilfe von T-Zell-Klonen identifiziert wurden [131]. Ein weiterer Hinweis ist, dass z.B. für das durch SEREX identifizierte Antigen NY-ESO-1 in einigen Patienten gleich starke T- und B-Zellantworten vorliegen [132;133].

Die Verwendung von Zufalls-Peptid-Bibliotheken in einem Phage-Display-System zur Analyse des Antikörperrepertoire bei Tumorpatienten stellt dabei eine Variante der SEREX-Methode dar [134]. Darüber hinaus etablierten sich auch Proteom-basierte Techniken (SERPA, SPEAR), die auf der Kombination zweidimensionaler Gelelektrophorese und nachfolgender Western-Blot-Analyse basieren [135]. Mit diesen Methoden gelang es auch Antigene zu detektieren, die aufgrund von posttranslationalen Modifikationen immunogen waren [136].

2.5.3 HLA-Ligandensequenzierung und „reverse Immunologie“

Die Identifikation von tumorassoziierten Antigenen mit biochemischen Verfahren beruht auf der direkten Isolierung und Sequenzierung von MHC-gebundenen Peptiden [137;138]. Als Quelle dienen hierbei Tumorzelllinien oder Tumorgewebe. Die Identifizierung von MHC-Klasse I-gebundenen Tumorantigenen erfolgt durch Säureelution von HLA-Liganden aus immunchromatographisch aufgereinigten HLA-Molekülen. Die membran-gebundenen Proteine des Tumors werden durch Detergenzien

zuerst solubilisiert und anschließend affinitätschromatographisch über Säulen isoliert sowie extrahiert. Später werden die eluierten Peptide mittels HPLC („*high performance liquid chromatography*“) fraktioniert [139;140]. Die einzelnen Peptidfraktionen können nach Beladung auf HLA-identische antigenpräsentierende Zellen hinsichtlich der Erkennung durch tumorreaktive, zytotoxische T-Zellklone getestet werden. Die Identifizierung immunologisch interessanter Peptide kann durch Erkennung mittels etablierter T-Zellklone oder frisch isolierter TILs bzw. PBLs des Patienten erfolgen [137]. Die Aminosäuresequenz von positiven Peptidfraktionen wird anschließend durch Tandem-Massenspektrometrie bestimmt [141].

Durch die Identifizierung und Optimierung von Peptidmotiven aufgrund von Aminosäuresequenzen natürlicher HLA-Liganden oder von Peptidbindungsstudien können Vorhersagen über HLA-Liganden aus Proteinsequenzen getroffen werden [142]. Suchalgorithmen wie die im Internet frei zugängliche Datenbank SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) können dabei aus Proteinsequenzen mögliche HLA-Liganden vorhersagen [143;144]. Diese Methodik zählt zu den Methoden der „Reversen Immunologie“. Unter diesem Begriff werden Verfahren zusammengefasst, die Proteine auf der Basis ihres Expressionsmusters und ihrer Funktionalität als Kandidatenantigene für die Immuntherapie benennen. Kandidaten-Antigene ergeben sich z.B. aus Genomanalysen wie Sequenzierungen oder Hybridisierungstechniken und aus Hochdurchsatzverfahren wie z.B. RDA („*representational difference analysis*“), „*in silico cloning*“, DNA-Microarray-Techniken und Proteomanalysen [145]. Die Methode setzt dabei die Verfügbarkeit von tumorreaktiven T-Zellen nicht voraus. Es kann sich auch um bereits bekannte TAA handeln, für die weitere immunogene Peptide, die über dasselbe oder andere HLA-Proteine präsentiert werden, identifiziert werden sollen [146]. Erst in einem zweiten Schritt wird untersucht, ob diese Antigene tatsächlich immunogen sind. T-Zellen von Tumorpatienten oder gesunden Spendern werden mit den potentiellen Antigenen stimuliert. Dies kann bspw. durch Antigen-beladene oder viral transduzierte antigen-präsentierende Zellen erfolgen. Nach erfolgter Stimulation muss das potentielle Antigen noch bezüglich der *in vivo*-Prozessierung in und -Präsentation durch Tumorzellen validiert werden [146]. Eine Limitierung der „reversen Immunologie“ ist, dass Antigene, die auf individuelle genetische Alterationen zurückzuführen sind, mit dieser Methodik nicht erfasst werden können. Dagegen ist der Vorteil der T-zellbasierten Methoden, neben der hohen Sensitivität [126], die Erfassung gerade solcher Antigene. Unabhängig von der Methode der Identifizierung tumorassoziierter Antigene sind vor einer möglichen Anwendung in der Immuntherapie

zahlreiche Validierungsschritte notwendig. Dazu gehören Untersuchungen zur Verteilung und Stärke der Expression, zur funktionellen Bedeutung und zur Immunogenität *in vivo*.

3 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom macht in Mitteleuropa mit einer Häufigkeit von 10-12 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner im Jahr ca. 2% der Krebserkrankungen aus. Die Inzidenz ist zudem weltweit steigend [rezensiert aus dem Informationsmaterial der Deutschen Krebshilfe, WHO].

Das maligne Melanom ist ein von den Melanozyten ausgehender Tumor der Haut, seltener der Schleimhaut, der Aderhaut und der Hirnhäute. Die Zellen sind neuroektodermalen Ursprungs mit früher lymphogener und nachfolgend hämatogener Metastasierung. 90% der Primärtumore manifestieren sich in der Basalzellschicht der Haut. Die Entstehung des malignen Melanoms wird begünstigt durch helle Haut, übermäßige Sonnenlichtexposition, häufige und schwere Sonnenbrände, genetische Disposition und Immunschwäche. Für den Patienten prognostisch wichtig sind die oberflächliche Ulzeration die vertikale Tumordicke (nach BRESLOW), die Invasion in die unterschiedlichen Hautschichten (nach CLARK), die Lokalisation, die Tumorhistologie, das Geschlecht und das Alter des Patienten sowie der Metastasierungsgrad [147]. Die hohe Letalität ist mit der häufig frühen Metastasierung des Primärtumors begründet [147;148]. Das metastasierte Melanom gilt als unheilbar und die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit Metastasen innerer Organe liegt unter einem Jahr. Die Behandlung von Patienten mit metastasiertem malignem Melanom ist daher in der Regel palliativ. Die kurative Behandlung ist limitiert auf die Operation des Primärtumors im Frühstadium. Diese Sachlage macht deutlich, dass neue Therapiemöglichkeiten für bessere Heilungschancen und eine höhere Überlebenszeit der Patienten entwickelt werden müssen.

Bei Studien wiesen einige Tumorentitäten eine deutlich höhere Immunogenität auf als andere [27]. Als hoch immunogen wurde dabei auch das maligne Melanom eingestuft. So entwickeln 75% der Patienten $CD8^+$ T-Zellen gegen Melan-A mit einer Frequenz von 2% im peripheren Blut und sogar 3,5% in tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) [149]. Zudem werden beim malignen Melanom verglichen mit anderen Tumorentitäten relativ häufig spontane Remissionen des Primärtumors mit simultan auftretenden Infiltraten aus T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen beschrieben [150]. Es wurde eine Korrelation zwischen der Tumorregression und dem Auftreten von TILs beobachtet [151].

6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Antigenen im Melanommodell D41, die von autologen, tumorreaktiven T-Zellen erkannt werden. Die Melanomzelllinie D41-MEL stammte von einem männlichen Patienten, der innerhalb einer Impfstudie am Queensland Institute of Medical Research in Brisbane, Australien, unter Vakzinierung eines Gemisches aus eigenen Tumorzellen und dendritischen Zellen eine dauerhafte, komplette Remission erreichte [152].

Die Untersuchung der individuellen Antigenität des Melanommodells D41 sollte die Basis für eine Korrelation zwischen der Vakzinierung und tumorspezifischen Immunantworten schaffen. Für die Identifizierung der Antigene wurde die T-zellbasierte cDNA-Expressionsklonierung als Methode gewählt. Voraussetzungen hierfür waren:

- kryokonservierte, periphere Blutlymphozyten des Patienten und
- die stabil etablierte Melanomzelllinie D41-MEL des Patienten.

Folgende Arbeitsschritte waren geplant:

- Charakterisierung der Melanomzelllinie in Bezug auf die Expression von HLA-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen,
- Klonierung aller HLA-Klasse I-Allele des Patienten,
- Konstruktion einer cDNA-Bank von D41-MEL in einen Expressionsvektor,
- Generierung und Charakterisierung autologer MLTCs,
- Untersuchung, ob in autologen MLTCs Immunantworten gegen bereits bekannte tumorassoziierte Antigene vorlagen,
- Identifizierung und Charakterisierung neuer Tumorantigene durch cDNA-Bankscreening.

Die Ergebnisse sollten zum besseren Verständnis der Interaktion zwischen Immunsystem und Tumor im individuellen Patienten beitragen und die Basis für eine künftige individualisierte Immuntherapie verbessern helfen.

B Material und Methoden

1 Material

1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

1.1.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Autoklaven	KSG Sterilisatoren / Olching Systec / Wettengel
Bakterienbrutschrank	Heraeus / Hanau
Brucheis-Automat	Ziegra / Isernhagen
¹³⁷ Cäsiumquelle	Gammacell 2000, Molsgaard Med. / Denmark
Chemikalienwaage	Sartorius / Göttingen
CO ₂ -Inkubator	Heraeus / Hanau
Durchflusszytometer	FACS Canto, Becton Dickinson / Heidelberg
Elektroporationsgerät	Gene Pulser [®] V, Bio-Rad GmbH / München
ELISPOT-Analyse-System	Karl Zeiss / Jena
Feinwaage	Precisia, PAG Oerlikan AG / Zürich
Geldokumentationsanlage	BioDocAnalyze, Biometra / Göttingen
Gelelektrophoresekammern	PEQLAB / Erlangen
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf / Hamburg
Hybridpumpe	Econopump, Bio-Rad GmbH / München
Immunfluoreszenzmikroskop LeicaDMR + Kamera LeicaDFC340 FX	Leica / Solms
Kolbenhubpipetten	Gilson / Middleton (USA); Eppendorf / Hamburg
Kühl- und Gefrierschränke	Sikafrost, Liebherr/
LightCycler	LightCycler [®] 2.0, Roche / Mannheim
Magnetrührer mit Heizplatte	IKAMAG RET, Janke & Kunkel / Staufen
Magnetständer / Magnet (Zellseparation)	OctoMacs, Miltenyi Biotec / Bergisch Gladbach
Mikrowelle	MWS 2819, Bauknecht / Neunkirchen
Multikanalpipetten	Dunn, Labortechnik / Asbach
Nunc-Immunowasher TM Washer	Nunc / Wiesbaden
PCR-Cycler	Thermocycler T3 Labotec / Remseck
Phasenkontrastmikroskop	Nikon
pH-Meter	CG 837, Schott / Mainz
Pipettierhilfen	Brand / Wertheim
Schüttelinkubator	Certomat, Sartorius / Göttingen
Spektralphotometer	Ultrospec 3000, Pharmacia / Freiburg
sterile Werkbank	Heraeus / Hanau
Stickstoffbank	MVE
Stickstoffvorrattank	Taylor-Wharton
Trockenschrank	UT 6420, Heraeus / Hanau
Vortexer	Janke & Kunkel
Wasserbad, beheizbar	GFL / Großburgwedel
Wasserdeionisierungsanlage	Elga Labwater / Celle
Wasserstrahlpumpe	Brand / Wertheim
Zentrifugen	5415D, Eppendorf / Hamburg, Hettich

Gerät	Hersteller
Zytozentrifuge	Shandon / Pittsburgh

1.1.2 Plastik- und Glaswaren / Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Bechergläser, Glas	500 ml, 1000 ml, 2000 ml, Jenaer Glas bzw. Schott / Mainz
Bechergläser, Kunststoff	Vitlab / Seeheim-Jugenheim
Cytoclip	Shandon / Pittsburgh
Cytoträger	Shandon / Pittsburgh
Duran-Glasflaschen	0,5 l, 1 l, 2 l und 5 l, Schott / Mainz
Einfrierboxen	Nalge Nunc / Wiesbaden
Einfrierröhrchen	2 ml Cryotube PP, Greiner / Nütringen
Einmalpipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml, Greiner / Nütringen
Einmalspritzen	10 ml, 20 ml und 50 ml, Braun / Melsungen
Elektroporationsküvetten	0,1 cm / 0,4 cm, Bio-Rad GmbH / München
Elispotplatten	Multiscreen _{HTS} -HP- bzw. Multiscreen _{HTS} -IP-Filterplatten, Millipore / Eschborn
Eppendorf-Cups	0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml, Eppendorf / Wesseling
Erlenmeyerkolben	500 ml, 1000 ml und 2000 ml Jenaer Glas bzw. Schott / Mainz
Falcon-Röhrchen, PP	15 ml und 50 ml, Greiner / Nütringen
FACS-Röhrchen	5 ml, Greiner / Nütringen
Gewebekulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ² , Greiner / Nütringen
Gewebekulturplatten	24- Loch-, 48-Loch- und 96-Loch-Gewebekulturplatten, Greiner / Nütringen; 6-Loch-Gewebekulturplatten, Costar / USA
Impfösen	Nunc / Roskilde, Denmark
Hybridomsäulen	Affinitätssäulen HiTrap, 1 ml Amersham Bioscience / Buckinghamshire, UK
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner / Nütringen
Petrischalen	Ø35mm, 60mm und 100mm, Greiner / Nütringen
Pipettenspitzen	Starlab
Quartzküvetten	Pharmacia / Freiburg
MS-Säulen (Zellseparation)	Miltenyi Biotec / Bergisch Gladbach
Skalpelle für Gelextraktion	Präzisa, Dahlhausen / Köln
Sterilfilter (0,22 µm / 0,45 µm)	Steritop™, Millipore / Eschborn
Zählkammern	Fuchs-Rosenthal, Schrenk / Hofheim

1.1.3 Chemikalien, Substanzen, Zusätze und Reagenzien

Chemikalie / Zusätze / Reagenzien	Bezugsquelle
2'-Aza-5'-deoxycytidin	Sigma / Deisenhofen
AEC-(3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)-Tabletten	Sigma / Deisenhofen
Agarose	Serva Electrophoresis
AIMV® Medium	Gibco BRL / Karlsruhe
Albumine, bovine	Sigma / Deisenhofen
Ammoniumacetat	Merck / Darmstadt
Bacto Agar	Difco / Stuttgart
Bacto Tryptone	Difco / Stuttgart
Bromphenolblau	Merck / Darmstadt

Chemikalie / Zusätze / Reagenzien	Bezugsquelle
Chloroform	Riedel-de Haen / Selze
Diethyl-Pyroc carbonat (DEPC)	Sigma / Deisenhofen
Dimethylformamid (DMF)	Merck / Darmstadt
Dimethyl-Desoxysulfat (DMSO)	Merck / Darmstadt
DNA-Molekulargewichtsmarker	Roche / , peQlab /
Essigsäure	Carl Roth AG / Karlsruhe
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Merck / Darmstadt
Ethanol	Applichem / Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma / Deisenhofen
FCS (fötales Kälberserum)	PAA
Ficoll 400	PAA
Formaldehyd 37%	Merck / Darmstadt
Formamid	Merck / Darmstadt
Glycerol	Sigma / Deisenhofen
Hefe-Extract	Difco / Stuttgart
Human Albumin Kalbi 20%	Octapharm / Langenfeld
Interferon-gamma (IFN γ)	R & D Systems / Minneapolis, USA
Isopropanol	Fisher-Scientific / Schwerte
Lipofectamine	LF2000, Invitrogen / Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck / Darmstadt
Methanol	J. T. Baker, Deventer / Niederlande
β -Mercaptoethanol	Sigma / Deisenhofen
Natriumacetat	Merck / Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth AG / Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck / Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck / Darmstadt
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck / Darmstadt
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Merck / Darmstadt
(N-Morpholino-)-Propansulfonsäure	Carl Roth AG / Karlsruhe
PBS (phosphate-buffered saline)	Gibco BRL / Karlsruhe
Pellet Paint [®] Ko-Präzipitant	Novagen, Bad Soden
RNA-Molekulargewichtsmarker	0,5-10 kb Ladder, Invitrogen / Karlsruhe
RPMI	Gibco BRL / Karlsruhe
Salzsäure 98%	Merck / Darmstadt
TBE-Puffer (10x)	Serva Electrophoresis GmbH / Heidelberg
Transmessenger-Reagenz	Qiagen / Hilden
Tris (-hydroxymethyl)-aminoethan	Sigma / Deisenhofen
Tris-HCl	Sigma / Deisenhofen
Trypanblau	Merck / Darmstadt
Trypsin-EDTA	Gibco BRL / Karlsruhe
Tween 20%	Sigma / Deisenhofen
Versen (1% EDTA)	Biochrom KG / Berlin
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth AG / Karlsruhe
Xylencyanol	Merck / Darmstadt

1.2 Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Stoff / Substanz	Menge in ml
Acetatpuffer für ELISPOT- Assays	Essigsäure 0,2 N	4,6 ml
	Natriumacetat 0,2 N	11,0 ml
	H ₂ O	46,9 ml
Ammoniumacetat 10M / 7,5M	Ammoniumacetat	770,0 g / 577,5 g
	H ₂ O ad	1,0 l
Ampicillin (50 mg /ml)	Ampicillin	50,0 g
	H ₂ O ad	1,0 l
DEPC-H ₂ O	DEPC	2,0 ml
	H ₂ O ad	2,0 l
	20 min rühren, nach 24h autoklavieren und dunkel lagern	
Elispotpuffer	NaHCO ₃	2,9 g
	Na ₂ CO ₃	1,6 g
	Na-Azid	0,2% (w/v)
	H ₂ O ad	1,0 l
Essigsäure 0,2 N	Essigsäure 96%	11,3 g
	H ₂ O ad	1,0 l
FACS-Puffer pH 7	BSA 1%	5,0 g
	EDTA (0,5M)	0,345 g
	PBS ad	500,0 ml
SDS 30% (w/v)	SDS	150,0 g
	H ₂ O ad	500,0 ml
Ladungspuffer für Agarosegele (Bromphenolblau 6x)	Bromphenolblau	25,0 mg
	Xylencyanol	25,0 mg
	Glycerol	3,0 ml
	H ₂ O ad	10,0 ml
MOPS-Puffer (10x)	(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	41,86 g
	Natriumacetat pH7 (3 M)	16,7 ml
	EDTA, pH8 (0,5M)	10,0 ml
	H ₂ O ad	1,0 l
Natriumacetat 0,2 N	Natriumacetat	16,4 g
	H ₂ O ad	1,0 l
PBS (1x)	Instamed PBS-Pulver	95,5 g
	H ₂ O ad	10,0 l
Puffer zur FACS-Fixierung	Formaldehyd 37%	1,35 ml
	PBS ad	50,00 ml
RNA-Ladepuffer	Formamid (deionisiert)	100,0 µl
	Formaldehyd (37%)	70,0 µl
	MOPS (10x)	50,0 µl
	Bromphenolblau (6x)	20,0 µl
	Ethidiumbromid (4µg/ml)	1,0 µl
	H ₂ O DEPC ad	500,0 µl
TBE-Puffer (0,5x)	TBE-Puffer (10x)	50,0 ml
	H ₂ O ad	1,0 l
Trypanblau (Stammlösung)	Trypanblau	2,0 g
	H ₂ O ad	1,0 l
Trypanblau (Gebrauchslösung)	Trypanblau (Stammlösung)	37,5 ml
	H ₂ O ad	12,5 ml

1.3 Antibiotika

Antibiotika	Bezugsquelle	Endkonzentration
Ampicillin	Sigma / Deisenhofen	100 µg / ml
Geneticin	Gibco BRL / Karlsruhe	1 mg / ml
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL / Karlsruhe	50 µg / ml
Kanamycin	Sigma / Deisenhofen	50 µg / ml

1.4 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle	Konzentration
Easy-A-Polymerase	Stratagene / Amsterdam	5 U / µl
Restriktionsendonukleasen	Biolabs / Ipswich Promega / Mannheim	8-20 U / µl
Taq-Polymerase	peQlab / Erlangen	5 U / µl
DNAse I	Qiagen, Hilden	3 U/µl

1.5 Molekulargewichtsmarker

Als Größenstandards in DNA- und RNA-Gelen wurden in dieser Arbeit folgende Marker verwendet.

Bezeichnung	Bezugsquelle	Verwendung
DNA-Marker III	Roche	Agarosegele für DNA
RNA Ladder	invitrogen	Formaldehydgele für RNA

1.6 Zytokine

1.6.1 Für die Stimulation von PBL bzw. kryokonservierter, melanomreaktiver T-Zellen sind folgende Zytokine dem Medium zugesetzt worden:

Zytokin	Bezugsquelle	Endkonzentration
Interleukin-2 (IL-2)	R & D Systems / Minneapolis, USA	250 U / ml 25 U / ml
Interleukin-7 (IL-7)	R & D Systems / Minneapolis, USA	5 ng / ml
Interleukin-15 (IL-15)	R & D Systems / Minneapolis, USA	5 ng / ml

1.6.2 Um humane, dendritische Zellen aus adhärenenten Monocyten zu generieren, sind folgende Zytokine dem Medium zugesetzt worden:

Zytokin	Bezugsquelle	Endkonzentration
Interleukin-1β (IL-1β)	Pharmingen / San Diego	10 ng / ml
Interleukin-4 (IL-4)	PBH / Hannover	500 U / ml
Interleukin-6 (IL-6)	Strathman / Hannover	1000 U / ml
Zytokin	Bezugsquelle	Endkonzentration
Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF)	Sandoz / Ismaning	800 U / ml
Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)	Sigma / Deisenhofen	10 ng / ml
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Sigma / Deisenhofen	1 µg / ml

1.6.3 Für eine verstärkte Expression von HLA-Molekülen auf Melanomzellen, sind diese Zellen mit 100 U/ml Interferon-gamma (IFN γ , 500 I.E./ml) von R&D (Minneapolis, USA) kokultiviert worden.

1.7 Antikörper

Die im nachfolgenden aufgeführten Antikörper sind in der Durchflusszytometrie zur Markierung von Oberflächenmolekülen bzw. intrazellulären Molekülen und für T-Zellblockadeexperimente in dieser Arbeit eingesetzt worden. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte entweder durch eine Kopplung der Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder mit einem an einen Fluoreszenzfarbstoff gebundenen Sekundärantikörper.

Fluoreszenzfarbstoff	Nachweis von
Fluoresceinthiocyanat (-FITC)	CD3, CD4, CD8, CD16, CD54, CD16, CD80, IgG1, TSPY, Anti-HLA-A02, Antikörper gegen V β -Ketten, W6/32, HB55, B1.23.2, SFR8.B6, PA2.1, MA2.1
Phycoerythrin (-PE)	CD8, CD56, CD133,
Alexa [®] fluor488	TSPY

1.7.1 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen und T-Zellblockadeexperimente

Bezeichnung	Bezugsquelle	Verwendung
IgG1	Immunotech / Marseille	Isotyp-Kontrolle
CD80	Immunotech / Marseille	Analyse von Oberflächenmolekülen bei Melanomzellen
CD3 / CD8 / CD4 / CD56 / CD16	Beckham Coulter	Analyse der T-Zellverteilung in MLTC
CD54	Immunotech / Marseille	Analyse von Oberflächenmolekülen bei Melanomzellen
Anti-HLA-A02	One Lambda / CA, USA	Nachweis von HLA-A02
CD 133	Miltenyi / Bergisch Gladbach	Nachweis von Oberflächenmolekül CD133 bei Melanomzellen
TSPY	(1)	Intrazellulärer Nachweis von TSPY
Anti-V β 22, -V β 14, -V β 5.2	Immunotech / Marseille	Nachweis der V β -Ketten auf CD8 ⁺ T-Zellen

(1) freundlich von Dr. Y.-F. Lau (Departement of Medicine VA Medical Center, University of California, San Francisco) zur Verfügung gestellt

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp	ATCC*	Literatur
W6/32	HLA-Klasse I	IgG2a	(1)	[153;154]
HB55	HLA-DR	IgG2a		[155;156]
B1.23.2	HLA-B, HLA-C, HLA-Aw-Subgruppe	IgG2b	(2)	[157;158]
SFR8.B6	HLA-Bw6, einige HLA-C-Allele	IgG2b**	HB-122	[159;160]
PA2.1	HLA-A2	IgG1		[161;162]
MA2.1	HLA-A2	IgG1		[161;162]

*American Type Tissue and Cell Cultures

** der SFR8-B6-Antikörper stammt aus der Ratte

- (1) freundlich von Dr. P. Parham (Departments of Structural Biology and Microbiology and Immunology, Stanford University, Stanford, USA) zur Verfügung gestellt
- (2) freundlich von Dr. F. A. Lemmonière (Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy, Frankreich) zur Verfügung gestellt

1.7.2 Antikörper für IFN γ -ELISPOT-Assay

Antikörper	Bezugsquelle	Verwendung
MAB-TEk 1-DK-1 (Maus-IgG1)	Hölzel Diagnostika / Köln (Hersteller Mabtech AB / Nacka, Schweden)	Primärantikörper zur Beschichtung der Nitrocellulosemembran der ELISPOT-Platte
Biotin7B6-1 (Maus-IgG1)	Hölzel Diagnostika / Köln (Hersteller Mabtech AB / Nacka, Schweden)	Detektionsantikörper für den Nachweis von an den Primärantikörper gebundenem IFN- γ

1.7.3 Micro Beads

Die verwendeten CD8⁺-Micro Beads wurden von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) bezogen und für die magnetische Separation von CD8⁺-Zellen aus ficollisierten bzw. kryokonservierten PBMC oder aus MLTCs eingesetzt

1.8 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma MWG in Ebersberg bezogen und für die Amplifikation definierter DNA-Bereiche verwendet. Die in lyophilisierter Form vorliegenden Oligonukleotide wurden in H₂O_{dest} auf eine Stockkonzentration von 100 pmol/ μ l gelöst und für den Einsatz in eine PCR-Reaktion nochmals um das 20fache verdünnt (5 pmol). Sofern nicht anders angegeben wurden pro PCR-Reaktion 5-10 pmol (1-2 μ l) Primer eingesetzt.

1.8.1 Für HLA-Sequenzen

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' -> 3')
HLA-5p2	sense	GGGCGAATTCGGACTCAGAATCTCCCCAGACGCCGAG
HLA-3pA	antisense	CCGCGTCGACTTGGGGAGGGAGCACAGGTCAGCGTGGAAG
HLA-3pB	antisense	GGGCGTCGACTGGGGAGGAAACACAGGTCAGCATGGGAAC
HLA-3pC	antisense	GGGCGTCGACCTGCATCTCAGTCCCACACAGGC
HLA-4N	antisense	GCCAGGTCAGTGTGATCTCCGC
HLA-2S	sense	AGGGGCCGGAGTATTGGGAC

1.8.2 Primer zur Feststellung der Orientierung von Inserts, kloniert in pcDNA3.1V5-His-TOPO / Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' -> 3')
T7	sense	TAATACGACTCACTATAGGG
BGHrev	antisense	TAGAAGGCACAGTCGAGG

1.8.3 Primer für den spezifischen Nachweis von β -Aktin in PCR-Reaktionen

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' -> 3')
actb-852_s	sense	TCCTGTGGCATCCACGAAACT
actb-1166_as	antisense	GAAGCATTTCGCGGTGGACGAT

1.8.4 Primer für den Nachweis von T-Zell-Rezeptor V β -Familien

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' -> 3')
V β -1	sense	CCGCACAACAGTTCCCTGACTTGC
V β -2	sense	GGCCACATACGAGCAAGGCGTCGA
V β -3	sense	ACAGTGCTCTAGAGAGAAG
V β -4	sense	TCCCCATCAGCCGCCCAAACCTAA
V β -5.1	sense	AGTGAGACACAGAGAAACAA
V β -5.4-8	sense	AGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCC
V β -6	sense	TCAGGTGTGATCCAATTC
V β -7	sense	CCTGAATGCCCAACAGCTCTC
V β -8.1-2	sense	TGTCACCAGACTGGGAACCACCAC
V β -8.3	sense	TCTGGTACAGACAGACCATGAT
V β -9	sense	TCCCTGGAGCTTGGTGACTCTGC
V β -10.1	sense	GCTCCAAAACTCATCCTGTAC
V β -11	sense	TGCCAGGCCCTCACATACCTCTCA
V β -12.2	sense	CCAAGACACAAGGTCACAGAGACA
V β -13	sense	GTGTCACTCAGACCCCAAAATTCC
V β -14	sense	TCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAA
V β -15	sense	CAGGCACAGGCTAAATTCTCCCTG
V β -16	sense	GCCTGCAGAACTGGAGGATTCTGG
V β -17	sense	TCCTCTCACTGTGACATCGGCCCA
V β -18	sense	CTGCTGAATTTCCCAAGAGGGCC
V β -19	sense	TCTCAATGCCCAAGAACGCACCC
V β -20.1	sense	CCTCCAGCTGCTCTTCTACTC
V β -21	sense	GATTACAGTTGCCTAAGGA
V β -22	sense	AAGTGATCTTGCGCTGTGTCCCCA
V β -23	sense	GCAGGGTCCAGGTCAGGACCCCA
V β -24	sense	CCCAGTTTGAAAGCCAGTGACCC
V β -25	sense	GACAGAAAGCAAAATTATATTGTGCC
CB-as	antisense	CGGGCTGCTCCTTGAGGGGCTGCG

1.8.5 Primer zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der TSPY-cDNA und zur Klonierung des kompletten TSPY 1-ORFs aus D41-MEL

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' -> 3')
TSPY-69_for	sense	GCCTTCAGGATGGAGGCTGTA
TSPY-PPE_rev	antisense	TCATTTCAGGTGGCTTCATCCTCTTGT
TSPY-RKA_rev	antisense	TCAGGCCTTCCTGGCTTGGGCATT
TSPY-SAL_rev	antisense	TCACAGTGCAGACTCTGGGGTCAT
TSPY-SSL_rev	antisense	TCAAAGGCTGCTGTTGTGTCT
TSPY-YRA_rev	antisense	TCAAGCCCTGTATTCTGTGATGTTTAC
TSPY-ANH_rev	antisense	TCAGTGGTTTGCAATAACATTGGCCC
TSPY-EVE_rev	antisense	TCATTCCACCTCCAGGCTGACCA
TSPY-LLLD_rev	antisense	TCAATCCAACAGCAGCACCGCCT

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' -> 3')
TSPY-MAE_rev	antisense	TCACTCCGCCATTATGTCATCAA
TSPY-AEV_rev	antisense	TCACACCTCCGCCATTATGTCATC
TSPY-stop_rev	antisense	CCATCATATTCAACTCAACAAGTGGGA
TSPY-full_for	sense	GAAGCCC GGCGCATGCGCCCT

1.8.6 Primer zum spezifischen Nachweis von TSPY in LightCycler® Analysen

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' -> 3')
TSPY-F_s	sense	TTCTTTTCGGAGTAACCCCTACT
TSPY-A_as	antisense	GGTCCTTACATAGGATCTCAGCAA

1.8.7 Sonden für LightCycler® Analysen

Die Sonden wurden bei der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) in Auftrag gegeben und dienten in LightCycler® Analysen dem spezifischen und quantitativen Nachweis von TSPY.

Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')	Tm
TSPY_LC	LC640-GACCACAACTTCGCAGGATCTAACAAG--PH	64,3°C
TSPY_FL	CAGCAGCCTTAACTTCTTCAACTGGTTCTC--FL	65,4°C

1.9 Synthetische Peptide

Die in der Arbeit verwendeten Peptide wurden bei Dr. Jan-Wouter Drijfhout vom Medizinischen Center der Universität Leiden/Niederlande, der Abteilung Immunohämatologie und Bluttransfusion in Auftrag gegeben und synthetisiert. Die lyophilisierten Peptide wurden in PBS/5% DMSO gelöst und auf eine Konzentration von 2 mg/ml eingestellt. Aliquotiert wurden sie bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	Sequenz	Protein	Aminosäurenposition im Protein
EAA	EAAGIGILTV	Melan-A	Melan-A ₂₈₋₃₅
AAG	AAGIGILTV	Melan-A	Melan-A ₂₇₋₃₅
EVD	EVDGIGHLY	MAGE-A3	MAGE-A3 ₁₆₈₋₁₇₆
LLL	LLLDDIMAEV	TSPY 1	TSPY 1 ₆₅₋₇₃
LLD	LLDDIMAEV	TSPY 1	TSPY 1 ₆₆₋₇₃
GVY	GVYDGREHTV	MAGE-A4	MAGE-A4 ₂₃₀₋₂₃₉
GLY	GLYDGMEHL	MAGE-A10	MAGE-A10 ₂₅₄₋₂₆₂
SLL	SLLMWITQC	NY-ESO-1	NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅
QLS	QLSLLMWIT	NY-ESO-1	NY-ESO-1 ₁₅₅₋₁₆₃
NLV	NLVPMVATV	pp65	pp65 ₄₉₅₋₅₀₃

1.10 Plasmide und Vektoren

Plasmidkonstrukte dieser Arbeit
D41cDNA-Klon 218.138.69/pcDNA3.1/RFA/Dest. #6
D41-MEL TSPY full length #24/pcDNA3.1/V5-His Topo
TSPY-LLLD#6/pcDNA3.1/V5-His Topo
TSPY-SAL#4/pcDNA3.1/V5-His Topo
TSPY-PPE#1/pcDNA3.1/V5-His Topo

Plasmidkonstrukte dieser Arbeit
TSPY-YRA#1/pcDNA3.1/V5-His Topo
TSPY-STOP#2/pcDNA3.1/V5-His Topo
TSPY-SSL#3/pcDNA3.1/V5-His Topo
TSPY-EVD#2/pcDNA3.1/V5-His Topo
TSPY-ANH1#1/pcDNA3.1/V5-His Topo
TSPY-RKA#6/pcDNA3.1/V5-His Topo
TSPY-MAE#1/pcDNA3.1/V5-His Topo
TSPY-AEV#2/pcDNA3.1/V5-His Topo

Der Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen, Leek, Niederlande) wurde für die Expression heterologer DNA in eukaryontischen Zellen entwickelt. Eine Weiterentwicklung dieses Vektors ist der pcDNA3.1/V5-His TOPO, der zusammen mit dem *pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Cloning Kit*® verwendet wird. Die wichtigsten Eigenschaften für die prokaryontische Amplifikation sind:

- Durch die Expression des β -Lactamasegens eine Selektion von rekombinanten Bakterien durch Ampicillin möglich
- Eine hohe Kopienzahl in Bakterien durch die ColE1 Replikationsinitiationssequenz aus dem pUC19 Plasmid

Die wichtigsten Eigenschaften für die eukaryontische Expression sind:

- Promotor / Enhancer des humanen Cytomegalievirus kontrolliert die Expression des nachgeschalteten Gens, wobei das erste ATG der Insertsequenz als Translationsstart dient
- Der „Polylinker“ enthält Erkennungssequenzen für 11 verschiedene Restriktionsendonukleasen, die eine Klonierung von cDNA in gewünschter Orientierung erlauben
- Die Polyadenylierungssequenz aus dem bovinen Wachstumshormon (BGH) gewährleistet die Polyadenylierung des Transkripts
- Der SV40 Replikationsursprung ermöglicht die episomale Replikation des Plasmids in Zellen, die das große T-Antigen des Virus stabil exprimieren. Daraus resultiert eine massive Expression des transfizierten Gens, die nach 72 Stunden zum Absterben der transfizierten Zellen führt.
- Das Neomycingen, welches unter der Kontrolle des SV40 Promotors steht, erlaubt eine Selektion stabiler Transfektanten mit G418

Die Klonierung von HLA-Allelen und kürzeren Fragmenten antigenkodierender cDNA erfolgten in den Vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO aus dem *pcDNA3.1/V5-His*®

TOPO[®] TA Expression Kit (s. **Punkt 15**). Für die Amplifikation wurde die Easy-A-Polymerase verwendet, die an PCR-Produkte flankierende 3'-A-Nukleotide generiert, was eine direkte Klonierung in den Vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO mit flankierenden T-Nukleotiden ermöglicht. Die cDNA-Klone wurden anschließend sequenziert.

Der pDONR[™] 222-Vektor diente als Übergangsvektor bei der Herstellung einer cDNA-Bank und wurde zusammen mit dem *CloneMiner[™] cDNA Library Construction Kit* (Invitrogen, Leek, Niederlande) verwendet. Die wichtigsten Eigenschaften sind:

- Das Kanamycinresistenzgen, welches eine andere Selektion ermöglicht als der Endvektor
- Eine Rekombinationskassette, die die flankierenden Rekombinationsstellen *attP1* und *attP2* enthält, für die Klonierung durch eine Rekombinase
- Das *ccdB*- und Chloramphenicolresistenzgen, welches eine negative Selektion ermöglicht

Der pcDNA3.1/RfA/Dest.-Vektor ist eine modifizierte Form des pcDNA3.1-Vektors und wurde als Endvektor bei der Herstellung einer cDNA-Bank verwendet. Zusätzliche wichtige Eigenschaften neben denen bei pcDNA3.1 genannten:

- Enthält die Rekombinationskassette *RfA* mit den flankierenden Rekombinationsstellen *attR1* und *attR2*
- Das *ccdB*- und Chloramphenicolresistenzgen, welches eine negative Selektion ermöglicht

1.11 Bakterien

Escherichia coli

In dieser Arbeit wurde für Standard-Transformationen rekombinanter Plasmid-DNA *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Leek, Niederlande) bis auf unten aufgeführte Ausnahme verwendet. Mit einer Transformationseffizienz von 1×10^9 cfu/ μ g „supercoiled“ DNA sind diese Bakterien geeignet für Klonierungen und Plasmidamplifikationen in hoher Kopienzahl und besitzen folgenden Genotyp:

Stamm	Genotyp, relevante Eigenschaften
Top 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>

- ***hsdR*** - für eine effiziente Transformation nichtmethylierter DNA aus PCR-Amplifikationen
- ***mcrA*** - für eine effiziente Transformation nichtmethylierter DNA aus genomischen Präparationen
- ***ZΔM15*** - für eine Blau/Weiss-Selektion von Rekombinanten
- ***end A1*** – für reine DNA-Präparationen und bessere Resultate in folgenden Anwendungen aufgrund der Eliminierung eines unspezifischen Verdaus durch Endonuklease-I
- ***recA1*** - für eine Reduktion unspezifischer Rekombinationen in klonierter DNA

Für die Transformation des konstruierten pcDNA3.1/RfA/DEST-Vektors wurde der chemokompetente *Escherichia coli* Stamm One Shot® ccdB Survival™-T1R von Invitrogen verwendet. Dieser Stamm eignet sich für die Vermehrung von Plasmiden, die das *ccdB*-Gen enthalten und besitzt eine Transformationseffizienz von $> 5 \times 10^8$ Transformanden/μg DNA. Der Stamm weist folgenden Genotyp auf:

Stamm	Genotyp, relevante Eigenschaften
One Shot® ccdB Survival™-T1R	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ139 D(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> <i>tonA::Ptrc</i> – <i>ccdA</i>

Für die Transformation der D41-MEL cDNA-Bibliothek (D41-MEL cDNA Bank LRIV von BP assay II in pcDNA3.1/RFA/DEST.#6) wurden elektrokompetente *Escherichia coli* ElektroMAX DH10B von Invitrogen verwendet. Der Stamm weist folgenden Genotyp auf:

Stamm	Genotyp, relevante Eigenschaften
ElektroMAX DH10B	F' <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>l⁻</i> <i>rpsL</i> <i>nupG</i>

1.12 Zelllinie

Melanomzelllinie D41-MEL

Die Melanomzelllinie stammte von einem männlichen Patienten mit kompletter Remission nach Vakzinierung mit dendritischen Zellen und Tumorzellen [152]. Die Zelllinie, sowie die Blutlymphozyten wurden vom Queensland Institute of Medical Research, Brisbane / Australien zur Verfügung gestellt.

Die ebenfalls in der Arbeit verwendeten Zelllinien COS-7 und 293T dienten ausschließlich der transienten Expression von Genen. Melanom- und

Nierenzellkarzinomzelllinien, die hier nicht im Einzelnen aufgelistet wurden, sind Bestandteil von Expressionsanalysen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden.

COS-7-Zellen

COS-7 (CV-1 oigin SV40)-7 ist eine adhärente, in einem Monolayer wachsende Zelllinie mit fibroblastärer Morphologie, die aus gesunden Nierenzellen eines adulten Männchens der Meerkatzenart *Cercopithecus aethiops* (Grüne Meerkatze) generiert wurde. Die Zellen wurden mit dem defekten Genom des SV40-Virus transformiert, in dem der DNA-Replikationsursprung deletiert war. COS-7 Zellen exprimieren konstitutiv das große T-Antigen dieses Polyomavirus und ermöglichen dadurch die episomale Replikation von zirkulären Plasmiden, die einen SV40-DNA-Replikationsursprung tragen [128]. Die Expressionsplasmide pcDNA3.1 und pcDNA3.1 V5-His TOPO tragen den SV40-DNA-Replikationsursprung.

293 T-Zellen

Die 293-Zelllinie ist eine semi-adhärente permanente Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen, die durch das transformierte Gen des Adenovirus-Typ5 immortalisiert wurden [163]. Die 293-Zelllinie wurde zusätzlich mit dem großen T-Antigen des SV40-Virus stabil transfiziert. Die so erzeugte 293T-Zelllinie wurde freundlicherweise von N. Shastri (The University of California, Berkeley, USA) zur Verfügung gestellt und eignet sich alternativ zur COS-7-Zelllinie für die transiente Transfektion mit Plasmiden, die den SV40 Replikationsursprung tragen.

K562

K562 ist eine etablierte Suspensionszelllinie, die ursprünglich aus einem Patienten mit Chronischer Myeloischer Leukämie (CML) isoliert wurde. Diese Zelllinie exprimiert weder HLA-Klasse-I- noch HLA-Klasse-II-Moleküle und wird somit von CD8⁺-Lymphozyten nicht erkannt. Als NK-Zielzelle dienen K562 in vorliegender Arbeit der Abgrenzung einer unspezifischen Erkennung durch Lymphozyten [164].

1.13 Bakteriennährmedien

Zur Kultivierung und Kryokonservierung von *Escherichia coli*, wurden Medien folgender Zusammensetzung verwendet.

Medium	Zusätze	Mengenangaben
LB-Medium (Luria-Bertani)	Trypton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	10,0 g
	H ₂ O ad	1,0 l
LB-Agar	LB-Medium	1,0 l
	Bacto-Agar	15,0 g
Einfriermedium	Glycerol	(60%) 30,0 ml
	H ₂ O ad	50,0 ml

Sowohl LB-Medien als auch LB-Agar wurden in 1 l Duranglasflaschen angesetzt und für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde den Medien Antibiotika (siehe Punkt 1.3) entsprechender Konzentration zugesetzt. Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurde das mit Antibiotikum versetzte LB-Agar Medium in Petrischalen (Ø 100 mm) gegossen und unter der Sterilbank bei geöffnetem Deckel sich verfestigen (ca. 30 min).

1.14 Zellkulturmedien

Die hier aufgeführten Medien wurden für die (Re)-Kultivierung bzw. Kryokonservierung von T-Zellen, Melanomzellen und anderen Zelllinien, sowie für die Generierung von Fast-DCs aus plastikadhärenten Monozyten verwendet. Medien, die für Transfektionsexperimente benötigt wurden, sind ebenfalls hier aufgeführt. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4°C.

Medium zur Kultivierung von COS-7-, 293T-, K562-, Melanom- und EBV-B-Zelllinien

RPMI 1640 + Glutamin (Gibco, Karlsruhe) (RPMI _{komplett})	10% Fötales Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert , 1h / 56°C) 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin (PenStrep)
---	---

Medium zur Kultivierung von T-Zellen

AIM-V + L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe)	10% Humanserum* 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin (PenStrep)
---	---

* Das Humanserum stammte aus freiwilliger Blutspende. Die Aufarbeitung des Serums, sowie der Auftrag für die jeweilige Infektionsserologie des Blutes / Serums erfolgte in der bzw. durch die Transfusionszentrale / Uniklinik Mainz. Anschließend erfolgte die Labor-interne Hitzeinaktivierung (1h/56°C) und Aliquotierung des Serums zu 50 ml Portionen in 50 ml Falcon-Röhrchen unter sterilen Bedingungen. Das humane Serum wurde bei -80°C gelagert.

Medium zur Generierung von Fast-DCs aus plastik-adhärenenten Monozyten

RPMI 1640 + Glutamin (Gibco, Karlsruhe)	2% Humanserum (hitzeinaktiviert , 1h / 56°C) 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin (PenStrep)
---	--

Medien für Transfektionsexperimente

RPMI 1640 + Glutamin (Gibco, Karlsruhe)	I) 10% FCS, Ø PenStrep (Zellen) II) ohne Zusätze (cDNA, Lipofectamine 2000)
--	--

Medium zum Einfrieren eukaryotischer Zellen

Einfriermedium	Fötales Kälberserum (FCS) 5% DMSO
-----------------------	--------------------------------------

1.15 Molekular- und Immunbiologische Kits

Soweit nicht anders angegeben wurde bei der Verwendung der „Kits“ nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Kit	Hersteller
CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit	Invitrogen
BD Cytofix / Cytoperm Permeabilization and Fixation Kit	BD
Gateway® Vector Conversion System	Invitrogen
High Pure® PCR Product Purification Kit	Roche
HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
IOtest® BetaMark Kit	Beckman Coulter
Light Cycler® Fast Start Kit	Roche
pcDNA3.1/V5-His® TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAprep® 96 Turbo Miniprep Kit	QIAGEN
RiboMAX Large Scale RNA Production System T7	Promega
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
Olidotex® mRNA Mini Kit	QIAGEN
RNase-Free DNase Set	QIAGEN
SMART cDNA Synthesis Kit	Clontech
SuperScript™III Reverse Transcriptase	Invitrogen
Taq PCR Core Kit	QIAGEN
Kit	Hersteller
Taq-DNA-Polymerase Kit	Peqlab
Vectastain® Elite Kit	Vektor Laboratories

2 Methoden

2.1 Immun- und zellbiologische Methoden

2.1.1 Zellkultur, Bestimmung der Zellzahl und Viabilität

Die Kultur eukaryontischer Zellen erfolgte nach Standardmethoden (Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag). Alle Zell-Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen bearbeitet und in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt kultiviert. Adhärente Zelllinien wurden einmal wöchentlich, COS-7-Zellen und 293T-Zellen zweimal wöchentlich in Zellkulturflaschen in RPMI_{komplett} subkultiviert. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin-EDTA in Suspension gebracht und anschließend abzentrifugiert. Ein Teil der Zellen wurde mit frischem Zellkulturmedium in neue Zellkulturflaschen überführt. Die Subkultivierung von Suspensionszellkulturen erfolgte zweimal pro Woche durch Zugabe von frischem RPMI_{komplett}. Dabei wurden sie mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen / ml eingestellt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde 50 µl einer Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit der Trypanblau-Gebrauchslösung versetzt und die Zellzahl in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop gezählt. Tote oder geschädigte Zellen konnten durch die Aufnahme des Farbstoffes (blau) von intakten Zellen unterschieden werden. Die Bestimmung der Zellzahl / ml erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Fläche } 16 \text{ mm}^2 \times \text{Tiefe } 0,2 \text{ mm}^2 \times \text{Verdünnung}} \times 10^4 = \text{Zellen / ml}$$

2.1.2 Behandlung von Zellen mit Wirkstoffen

Je nach Behandlungsdauer der Zellen mit den verschiedenen Wirkstoffen wurden die Zellen mit einer Dichte zwischen $1,1 \times 10^4$ und $2,8 \times 10^4$ pro cm² und Suspensionszellen mit einer Dichte von $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml einen Tag vor Behandlung kultiviert. Bei der IFN-γ-Vorbehandlung wurde zu den Zellen IFN-γ in einer Konzentration von 100 U/ml gegeben und die Zellen vier Tage lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die DAC-Behandlung erfolgte über neun Tage. An Tag eins, drei, fünf und sieben nach Kultivierung wurde DAC in einer Konzentration von 2 ng/ml zu den Zellen gegeben. An Tag zwei, vier und sechs fand ein Mediumwechsel sowohl der behandelten als auch der unbehandelten Zellen statt. An Tag acht wurden die Zellen abgelöst und für weitere Experimente verwendet.

2.1.3 Isolierung peripherer Blutlymphozyten aus Vollblut

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation durch Ficoll in 50 ml Falcon-Röhrchen. Das Blut wurde zuerst 1:2 mit PBS verdünnt und dann vorsichtig in 50 ml Falcon-Röhrchen mit 15 ml Ficoll pipettiert. Die Lymphozyten setzten sich nach Zentrifugation bei 1000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur und ohne Bremse als trübe Interphase oberhalb der Ficollschicht ab und wurden dann mit einer Pipette abgenommen. Anschließend wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und entweder kryokonserviert oder zur Isolierung von CD8⁺ T-Zellen eingesetzt.

2.1.4 Generierung tumorspezifischer T-Lymphozyten

Kryokonservierte PBL des Patienten D41 wurden in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut, 1:10 in RPMI verdünnt, zweimal mit RPMI gewaschen und abzentrifugiert. Die Generierung von D41-MLTCs erfolgte durch Stimulation mit D41-Melanomzellen wie bei Lennerz et al. 2005 [96] angegeben. Bezeichnet wurden die D41-MLTCs mit dx+y, wobei x den Tag der letzten Stimulation und y den Tag nach der letzten Stimulation bezeichnet.

2.1.5 Anreicherung von CD8⁺-Lymphozyten aus PBMC durch magnetische Zellseparation

Für die Anreicherung von CD8⁺-Lymphozyten aus PBMC oder MLTCs wurden die magnetischen CD8-MicroBeads von Miltenyi verwendet. Die Positivselektion von CD8⁺-Zellen erfolgte über MS-Säulen (Miltenyi), die jeweils mit maximal 1 x 10⁷ gelabelten Zellen oder 5 x 10⁷ PBLs beladen wurden. Die Verwendung der Micro Beads erfolgte anschließend nach den Angaben des Herstellers.

2.1.6 Klonierung von Zellen nach dem Grenzverdünnungsverfahren

Die Klonierung der D41-MLTCs und der D41-Melanomzellen erfolgte nach dem „limited dilution“-Verfahren wie bei Wölfel et al. 1993 [165] beschrieben. Als „feeder“-Zellen wurden bei den D41-Melanomzellen mit 100 Gy bestrahlte NIH 3T3-Zellen und bei den D41-MLTCs bestrahlte allogene EBV-B-Zellen eingesetzt.

Die Wahrscheinlichkeit, dass die proliferierten Kolonien jeweils einem Klon entsprechen, ergibt sich aus der Poisson-Verteilung und lässt sich nach folgender Formel ausrechnen:

$$p(m) = \frac{(u \times e^{-u})}{(1 - e^{-u})}$$

p(m) = Wahrscheinlichkeit für Monoklonalität

u = Frequenz ausgesäter Zellen

Diese Rechnung setzt voraus, dass tatsächlich jede Zelle einen Klon ergibt. In der Realität ist das allerdings häufig nicht der Fall. Die Effizienz der Klonierung, d.h. der Prozentsatz an kultivierten Zellen, die tatsächlich Klone ergeben, errechnet sich aus:

$$\text{Klonierungseffizienz (\%)} = \frac{N_{\text{Klone}}}{N_{\text{Aussaat}}} \times 100$$

N_{Klone} = Zahl gewachsener Klone

N_{Aussaat} = Zahl ausgesäter Zellen

2.1.7 Generierung von Fast-DCs aus plastik-adhärenenten Monozyten

Aus PBMCs isolierte CD8⁺-Zellen wurden zu $10\text{--}15 \times 10^6$ Zellen/Loch einer 6-Lochboden-Platte in je 3 ml Fast-DC-Komplettmedium ausgesät. Nach 90 - 120 min Inkubation wurden die nicht-adhärenenten Zellen mit 37°C warmen PBS abgespült und eingefroren. Zu den adhärenenten Monozyten wurde wieder 3 ml Fast-DC-Komplettmedium/Loch gegeben. Die Generierung der Fast-DCs erfolgte wie bei Dauer et al. 2003 beschrieben [166].

2.1.8 Transfektion von Zellen

In dieser Arbeit wurden 293T, COS-7 und FastDCs für eine transiente Expression von Genen transfiziert. Für 293T und COS-7 Zellen war es wichtig, dass die Zellen sich im Wachstum befanden, um gute Transfektionseffizienzen zu erreichen. Daher wurden die Zellen 3-4 Tage vor der Transfektion subkultiviert. Eingesetzt wurden die Zellen, wenn sie zu 60-80% konfluent waren.

Die *Lipofektion* diente als Standard-Methode für die transiente Transfektion von COS-7- und 293T-Zellen. In einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurde der Transfektionsansatz (12 µl pro 1 x 96-Loch) mit cDNA (300 ng in RPMI-1640) vorgelegt und bei IFN γ -ELISPOT-Assays auch HLA-cDNA (100 ng in RPMI-1640) dazugemischt. Die Menge des verwendeten Lipofektamins war chargenabhängig und wurde zuvor austitriert. Das Lipofektamin (LF2000) wurde vor Gebrauch gut gemischt und nach Einstellen der Konzentration (pro Ansatz: 0,2 - 0,5 µl LF2000 ad 21 µl RPMI-1640) 5 min vorinkubiert, ansonsten wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Transfektion erfolgte durch das Mischen des Transfektionsansatz/Lipofektamin-Gemisches (30 µl/Loch) mit den zu transfizierenden Zellen. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C für 24 h inkubiert.

Die Transfektion mit dem *TransMessenger-Reagenz* nach der Methode von Qiagen (Hilden) erfolgte für die Transfektion von RNA in FastDCs und 293T-Zellen. Die Menge der verwendeten PolyA⁺-RNA und das RNA-Transmessenger-Verhältnis war

chargenabhängig und wurde für jede neue Charge mit eGFP-PolyA⁺-RNA ausgetestet. Das Ansetzen des Transfektionsgemisches erfolgte nach Herstellerangaben. Vor Zugabe zu den Zellen wurden die Ansätze mit FastDC-Komplettmedium auf 200 µl aufgefüllt und pro Ansatz 0,2 x 10⁶ Fast-DCs transfiziert. Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die transfizierten Fast-DCs wurden anschließend im IFN-γ-ELISPOT-Assay oder für Stimulationen von CD8⁺ T-Zellen verwendet.

2.1.9 Interferon-gamma-“ELISPOT-Assay“

Interferon-gamma (IFN-γ) ist ein Zytokin, welches von T-Lymphozyten nach Antigenkontakt freigesetzt wird. Das Prinzip des ELISPOT-Assays (**E**nzyme-linked **I**mmunosorbent **S**pot-Assay [167;168] besteht darin, dass ein monoklonaler Antikörper gegen ein Zytokinepitop mit dem konstanten Teil seiner schweren Kette an eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran gebunden wird. Das bei Antigenkontakt von Lymphozyten freigesetzte Zytokin wird durch den variablen Abschnitt des Antikörpers gebunden und mit einem Detektionsantikörper, der ein zweites Epitop des Zytokins erkennt, nachgewiesen. Die Methode erfolgte wie bei Britten C. et al. 2002 beschrieben [169]. Vor der Primärantikörperbeschichtung mussten die Elispotplatten allerdings mit 35% Ethanol vorbehandelt werden. Dazu wurde auf die Platte 15 µl 35%igen Ethanols pro Testeinheit (TE einer Elispotplatte) gegeben, so dass die Membran benetzt wurde. Anschließend wurde 3-mal mit PBS (150 µl/TE) gewaschen. Die Beschichtung der Elispotplatten mit dem Primärantikörper erfolgte am Vorabend des Testtages und die Inkubation über Nacht bei 4°C.

Zielzellen waren transient transfizierte COS-7-, 293T- (20.000 Zellen/TE), K562-Zellen (75.000 Zellen/TE), mit RNA transfizierte Fast-DCs (20.000 Zellen/TE), Melanom-, Pankreaskarzinom-, Kolonkarzinom-, Leberzellkarzinom-, Nierenzellkarzinom- oder Leukämie-Zellen (50.000 Zellen/TE) oder mit synthetischen Peptiden beladene bzw. unbeladene EBV-B-Zellen (75.000 Zellen/TE). Während die Belegung mit Lymphozyten bei transfizierten Zielzellen erst 20 Stunden nach der Transfektion erfolgte, wurden die Lymphozyten auf Melanom- bzw. mit synthetischen Peptiden beladene EBV-B-Zellen nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten gegeben. Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden mit 500.000 Zellen, mehrfach stimulierte, nicht-klonale T-Zellen mit 10.000 und CTL-Klone mit 5.000 – 10.000 Zellen pro TE eingesetzt. Die automatische Auswertung geschah durch das *KS ELISPOT-System Version 4.9* der Firma Zeiss (Jena).

2.1.10 Antikörperblockaden der T-Zellen

Die Reaktivität von T-Zellpopulationen gegen ihre Zielzellen wurde durch monoklonale Antikörper gegen einzelne HLA-Moleküle oder Gruppen von HLA-Molekülen im IFN- γ -ELISPOT-Assay (2.1.9) blockiert. Dadurch wurde die HLA-Restriktion der T-Zellen ermittelt werden. Die Antikörper wurden aus Hybridomüberstand mittels Hybridompumpe über eine Affinitätssäule (HiTrap, 1ml) aufgereinigt, aliquotiert und bis zur Verwendung kryokonserviert. Die aufgereinigten Antikörper hatten eine Konzentration zwischen 1 und 2 mg/ml. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Antikörper für die Blockade verwendet.

- Der Antikörper *W6/32* erkennt ein gemeinsames Epitop aller MHC-Klasse I-Moleküle und blockiert dadurch alle MHC-Klasse-I-restringierten T-Zellen. Der aufgereinigte Antikörper wurde in Konzentrationen zwischen 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ zur Blockade verwendet.
- Der *B1.23.2*-Antikörper erkennt ein gemeinsames Epitop aller HLA-B- und HLA-Cw-Allele sowie Mitglieder der HLA-Aw19-Subgruppe der HLA-A-Allele. Der Antikörper wurde in Konzentrationen zwischen 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ verwendet.
- Der monoklonale Antikörper *SFR8-B6* erkennt ein gemeinsames Epitop (Bw6-Epitop) einer Subgruppe von HLA-B-Proteinen. Die für eine Blockade geeignete Konzentration lag bei über 300 $\mu\text{g/ml}$.
- Der HLA-A2-spezifische Antikörper *PA2.1* wurde in Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.
- Der Antikörper *HB55* erkennt ein gemeinsames Epitop aller MHC Klasse II-Proteine und blockiert dadurch alle Klasse II-restringierten T-Zellen. Der aufgereinigte Antikörper wurde in Konzentrationen zwischen 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ zur Blockade verwendet.

2.1.11 Zytotoxizitätstest

Zytotoxische T-Zellen (CTL) lysieren die Zielzelle durch verschiedene Effektormechanismen. Diese Zell-Zellinteraktion kann durch den ^{51}Cr -Freisetzungstest gemessen werden [170]. Die Durchführung erfolgte wie bei Britten, C. et al. 2002 beschrieben [169]. Die T-Zellen wurden in Effektorzell- zu Targetzell-Verhältnissen von 0,2:1 bis 60:1 zu den Zielzellen gegeben.

80 μl der Überstände wurden im Gamma-Counter auf freigesetztes Chrom überprüft. Als Positivkontrolle diente der Überstand chromierter Zellen, die durch Zugabe von H_2O +

1% Tween (80 µl/Ansatz) vollständig lysiert wurden. Die spezifische Lyse monospezifischer T-Zell-Populationen wurde nach folgender Formel bestimmt.

$$\frac{\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}{\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}} \times 100$$

2.1.12 Peptiderkennungstest im IFN- γ -ELISPOT- und Zytotoxizitätsassay

Durch Peptiderkennungstests sollte die genaue Spezifität der T-Zellen ermittelt werden. Die lyophilisierten Peptide wurden auf eine Konzentration von 2 mg/ml in PBS/5% DMSO eingestellt, aliquotiert und bis zum Einsatz bei -20°C eingefroren. Peptiderkennungstests wurden entweder im Lysetest oder im IFN- γ -ELISPOT-Assay durchgeführt. In beiden Fällen dienten D41-EBV-B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen. Im IFN- γ -ELISPOT-Assay konnten auch mit HLA-Allelen des Patienten transfizierte COS-7- oder 293T-Zellen als APCs eingesetzt werden. Peptiderkennungstests im IFN- γ -ELISPOT-Assay wurden direkt in der Elispotplatte durchgeführt. Für den IFN- γ -ELISPOT-Assay wurde wie unter Punkt 2.1.9 beschrieben vorgegangen.

Die Überprüfung der Peptiderkennung im ^{51}Cr -Freisetzungstest wurde mit autologen EBV-B-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 100 µCi Na(^{51}Cr)O₄, 100 µl FCS und 100 µl W6/32 für 90 min bei 37°C inkubiert. Die chromierten Zellen wurden viermal mit RPMI_{komplett} gewaschen, auf 2.000 Zellen/80 µl RPMI_{komplett} eingestellt und in einer 96-Loch-Spitzbodenplatte mit 80 µl/TE vorgelegt. Der Test erfolgte mit Bestimmung von Duplikaten. Peptide wurden seriell verdünnt und in je 40 µl RPMI_{komplett}/TE zu den chromierten EBV-B-Zellen dazugegeben. Die Inkubationszeit bei 37°C betrug anschließend 30 min. Die T-Zellen wurden mit einem Effektorzell- zu Targetzell-Verhältnis von 10:1 eingestellt und mit 40 µl/TE auf die Zielzellen gegeben. Es wurde wie unter Punkt 2.1.11 angegeben weiter verfahren.

2.1.13 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie diente in dieser Arbeit der Analyse immunphänotypischer Oberflächenmoleküle von Zellen und der intrazellulären Expression von Zellproteinen mit Hilfe monoklonaler Antikörper.

2.1.13.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Die Zellen wurden einmal mit FACS-Puffer gewaschen, gezählt und für jeden zu testenden Antikörper zwischen 0,1 und 0,2 x 10⁶ Zellen pro FACS-Röhrchen eingestellt. Nach Zentrifugation von 5 min bei 1500 rpm, dekantieren des Überstandes und

Resuspension des Zellpellets wurde der Antikörper (als unverdünnter Hybridomüberstand oder 1:100 bis 1:1000 in FACS-Puffer verdünnter, aufgereinigter bzw. kommerziell erhältlicher Antikörper) direkt zu den Zellen gegeben und für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit unkonjugiertem Antikörper durch Inkubation mit einem FITC-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Fab-Fragment (siehe Punkt 1.7) für 15 min bei 4°C inkubiert. Dieser Zweit-antikörper wurde 1:100 mit PBS/1%BSA verdünnt und 50 µl pro Ansatz auf die resuspendierten Zellen gegeben. Die Analyse erfolgte nach zweimaligem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer und anschließender Fixierung mit 0,5 ml FACS-Fixierungs-Puffer im Durchflusszytometer (Punkt 1.1.1). Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software *ExpoTM32* (Beckman Coulter, Krefeld) und *BD FACS DIVA* (BD Biosciences, Heidelberg).

2.1.13.2 Intrazelluläre Färbung mit dem *Cytofix / Cytoperm Permeabilization and Fixation[®]* Kit

Um Proteine in der Zelle nachzuweisen, die nicht von der Zelle an die Oberfläche transportiert werden, muss die Zellmembran permeabilisiert und fixiert werden. Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und dann auf $0,2 \times 10^6$ Zellen pro Antikörper im FACS-Röhrchen eingestellt. Dem 1x BD Perm/WashTM buffer wurde dem 1% BSA zugesetzt. Bei der Durchführung wurde bis auf folgende Änderungen nach den Herstellerangaben. Der aus der Maus stammende, monoklonale TSPY-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:2000 direkt auf das resuspendierte Zellpellet gegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt für 30 min bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper, ein FITC-gekoppeltes Ziege-anti-Maus Fab-Fragment, wurde 1:100 in dem Waschpuffer/1% BSA verdünnt und mit 50 µl auf das resuspendierte Zellpellet gegeben. Die Zellen wurden anschließend 20 min bei 4°C inkubiert. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die vom hersteller empfohlenen Waschschrirte durchgeführt. Die Analyse und Auswertung erfolgte unter Verwendung eines Durchflusszytometers (Punkt 1.1.1), der Software *ExpoTM32* (Beckman Coulter, Krefeld) und *BD FACS DIVA* (BD Biosciences, Heidelberg).

2.1.13.3 Intrazelluläre Färbung mit Zytospin

Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und auf 2×10^5 Zellen pro ml FACS-Puffer eingestellt. Auf Cytoträger wurde ein Papierfilter aufgebracht und beides in einen Cytoclip gespannt. 250 µl pro Cytoträger wurden in den Trichter gefüllt und mit 700 rpm 5 min in der Shandon-Zytozentrifuge zentrifugiert. Der Papierfilter wurde abgenommen und die Cytoträger über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Färbung erfolgte in einer feuchten Kammer. Auf die Zellen wurden 100 µl

Fixation/Permeabilization™ Solution aus dem BD *Cytofix/Cytoperm Permeabilization and Fixation*® Kit getropft und für 20 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit 1x BD Perm/Wash™ buffer/1% BSA gewaschen, indem 200 µl des Waschpuffers auf die Zellen getropft wurden und nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur der Waschpuffer abtropfte. Anschließend folgte ein Inkubationsschritt von 30 min bei Raumtemperatur mit 200 µl des Waschpuffers/1% BSA auf den Zellen. Nach Abtropfen des 1x BD Perm/Wash™ buffer wurde 100 µl des Erstantikörpers in einer Konzentration von 1:2000 vorverdünnt in 1x BD Perm/Wash™ buffer/1% BSA auf die Zellen getropft. Die Inkubation der Zellen mit dem Antikörper fand für 30 min bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde nach der Inkubation dreimal mit 200 µl 1x BD Perm/Wash™ buffer/1% BSA gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde 1:200 in 1x BD Perm/Wash™ buffer/1% BSA vorverdünnt und 100 µl auf die Zellen getropft. Danach inkubierten die Zellen bei 4°C für 20 min und wurden wie nach dem Erstantikörper dreimal mit 1x BD Perm/Wash™ buffer gewaschen. Die Objektträger wurden mit Mounting Medium + DAPI von Vectashield® eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mittels des DMR-Immunfluoreszenzmikroskopes von Leica und der Software *Ima500*.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologische Methoden wurden entsprechend den zitierten Protokollen durchgeführt. Lediglich Abweichungen von den Protokollen und Anpassungen werden detailliert beschrieben.

2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen

Die Anzucht von Bakterienkulturen erfolgte mit LB-Medium oder LB-Agarplatten und dem zugesetzten Antibiotikum bei einer Temperatur von 37 °C über Nacht (ü/N). Zur dauerhaften Konservierung $\frac{2}{3}$ Volumen (Vol.) Bakteriensuspension mit $\frac{1}{3}$ Vol. 60% Glycerol versetzt. Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von –80 °C.

2.2.1.2 Titerbestimmung

Das Wachstum von Bakterien in einer Flüssigkultur kann durch die Messung der optischen Dichte (o.D.) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 580$ nm überprüft werden. Als Referenz dient das jeweilige sterile Nährmedium bzw. der entsprechende Resuspensionspuffer. Bei *E.coli* entspricht eine o.D. von 0,1 einem Lebendtiter von ca. $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus rekombinanten Bakterien

Für eine Plasmidisolierung aus Bakterien wurden standardgemäß die „Kits“ der Firma QIAGEN verwendet. Dazu wurde nach den vom Hersteller angegebenen Protokollen verfahren.

2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Eine Methode der Auftrennung und Charakterisierung von Nukleinsäuren ist die Agarose-Gelelektrophorese. Die Agarosekonzentration (0,7 - 2 %) war abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem die effektive Auftrennung der Fragmente erfolgen sollte, und die angelegte Spannung sowie Stromstärke von der Größe des Gels (ca. 5-10 V/cm). Die größenfraktionierte DNA wurde durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (10 µg/ml Agarosegel) sichtbar gemacht und das Ergebnis der Elektrophorese mit dem BioDocAnalyze-System von Biometra (Göttingen) dokumentiert.

RNA-Moleküle wurden mit Hilfe von denaturierenden Agarosegelen analysiert. Das Agarosegel wurde dafür nicht mit TBE-Puffer angesetzt, sondern mit MOPS-Puffer unter Zugabe von Formaldehyd. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Puffer bei 5-10 V/cm (Sambrook and Russell, 3rd Edition, CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 2001).

2.2.4 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde die Extinktion an einem Spektralphotometer gemessen. Das Photometer wurde dabei mit dem Puffer, in dem die DNA oder RNA aufgenommen worden war, abgeglichen. Die Extinktion wurde bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen. Durch folgende Formel wurde die Nukleinsäurekonzentration bestimmt:

$$E_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{Verdünnung} = \mu\text{g/ml dsDNA}$$

$$E_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnung} = \mu\text{g/ml ssDNA oder RNA}$$

Der Quotient zwischen den Extinktionen bei 260 und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) diene der Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösung und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Dadurch konnten Proteinkontaminationen weitgehend ausgeschlossen werden.

2.2.5 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsanalyse führt zu einer Charakterisierung und Identifizierung doppelsträngiger DNA. Die Restriktion von doppelsträngiger DNA wird auch zur Klonierung eingesetzt, wobei auf die Restriktion eine Ligation folgt. DNA-Hydrolysen mit

Restriktionsendonukleasen wurden nach den Vorschriften der Enzymhersteller durchgeführt.

2.2.6 Isolierung von Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen

Für eine Isolierung von DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde standardgemäß das *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma QIAGEN verwendet. Dazu wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokollen verfahren.

2.2.7 5'-Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Zu 50 µl hydrolysierten Plasmid-DNA (Restriktionsansatz) wurde 1 µl alkalische Phosphatase hinzugefügt und gemischt. Der Ansatz wurde 90 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde die Phosphatase bei 70°C für 10min hitzeinaktiviert. Es folgte eine Phenolextraktion und eine Ethanol-fällung. Die DNA wurde wieder in H₂O bidest. aufgenommen.

2.2.8 Aufreinigung und –Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.2.8.1 Aufreinigung mit High Pure[®] PCR Product Purification Kit

Das Kit stammt von der Firma Roche und wurde zur Aufreinigung nach Restriktion und PCR verwendet. Es wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll verfahren.

2.2.8.2 Phenolisierung

Eine Phenolextraktion führt zu einer Reinigung der Nukleinsäurelösung von Proteinen. Zu 1 Vol. der Nukleinsäurelösung wurde 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) mit pH 4,5 hinzugefügt und 1 min gevortext. Die Probe wurde anschließend 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Zu der abgenommenen, oberen wässrigen Phase wurde 1 Vol. eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) gegeben. Die Probe wurde wieder 1 min gevortext und bei 13000 rpm 5 min abzentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde wieder abgenommen und es schloss sich eine Aufkonzentration mittels Alkoholfällung an.

2.2.8.3 Alkoholfällung

Die Fällung mit Alkohol führt zu einer Konzentrierung und Reinigung von Nukleinsäuren. Zu 1 Vol. Nukleinsäurelösung wurde $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Na-Acetat (pH 7,5) und 2,5 Vol. Ethanol oder 1 Vol. 2-Propanol hinzugefügt und kurz invertiert. Die Probe wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 60 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet mit 700 µl 70% Ethanol gewaschen und 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Eventuelle Reste des Ethanols wurden vorsichtig

abpipettiert. Anschließend wurde das Pellet 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und in nuklease-freiem H₂O resuspendiert.

2.2.8.4 Ammoniumazetat-Präzipitation nach Glycogen-Extraktion

Die Aufkonzentrierung von DNA-Reaktionen bei der Konstruktion der cDNA-Bank erfolgte durch Zugabe von 1 µl Glycogen (20 mg/ml), 0,3 M Ammoniumacetat (7,5M) und 2 x Vol. kaltem 100% Ethanol. Nach Inkubation von 2h bei -20°C wurden die Proben 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet 2x mit 75%igem Ethanol gewaschen. Die Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in TE-Puffer resuspendiert.

2.2.9 DNA-Ligation

2.2.9.1 Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten

Die Ligation von mit Restriktionsendonukleasen gespaltener DNA wird durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Dabei können „sticky ends“ mit kompatiblen Überhängen oder „blunt ends“ ligiert werden. Die Ligation erfolgt nach vorheriger Restriktion des Vektors und der Insert-DNA, sowie der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen. Die DNA wird in dem mitgelieferten Ligationspuffer aufgenommen, wobei die Insert-DNA in einer größeren Menge dazu gegeben wird als die Vektor-DNA. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgt entweder ü/N bei 4 °C oder bei 16 °C für 2-3 h. Nach Inaktivierung der Ligase bei 65 °C kann der Reaktionsansatz weiter verwendet werden.

2.2.9.2 Ligation von DNA-Amplifikaten

Die Ligation von HLA-cDNA und kürzeren Fragmenten antigenkodierender cDNA erfolgte standardgemäß in den *pcDNATM3.1/V5-His* Vektor mittels des *pcDNATM3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kits* der Firma Invitrogen. Abweichend zum Protokoll des Herstellers enthielt ein Ligationsansatz 2 µl des aufgereinigten PCR-Produktes, 0,5 µl Vektor und 0,5 µl Salzlösung (200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) und wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* TOP10.

2.2.10 Transformation von Bakterien

50 µl kompetente Top10 Bakterien der Firma invitrogen wurden auf Eis aufgetaut. Zu den Bakterien wurden dann 10 µl eines Ligationsansatzes mit der T4-Ligase bzw. 2 µl des Ligationsansatzes, synthetisiert mit *pcDNATM3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit*, gegeben und gemischt. Anschließend wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.2.11 Isolierung von RNA

Für RNA-Isolierungen wurde standardgemäß das *RNeasy Mini*[®] Kit der Firma QIAgen verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Isolierung der RNA erfolgte aus $5 - 10 \times 10^6$ Zellen. Die Isolierung von PolyA⁺-RNA erfolgte aus 5 µg Total-RNA mit *Oligotex*[®] *mRNA Mini* Kit ebenfalls der Firma QIAgen. Die Qualität der RNA wurde auf einem analytischen, 1 prozentigen Agarosegel überprüft und die Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Die RNA wurde grundsätzlich bei -80°C gelagert.

2.2.12 Reverse Transkription (RT-PCR)

Für die Synthese von komplementärer DNA (*complementary DNA*, cDNA) durch reverse Transkription (RT) wurde standardgemäß der *Superscript*[™]*III Reverse Transcriptase*[®] Kit von Invitrogen verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Ein Ansatz enthielt dabei 5 µg Total-RNA und für Standard-RT-Reaktionen wurden Oligo-dT Primer eingesetzt. Für sich anschließende PCR-Amplifikationen mittels genspezifischer Primer wurde die cDNA 1:5 mit H₂O verdünnt. Die Lagerung von cDNA erfolgte bei -20°C.

2.2.13 In Vitro -Transkription (IVT)

Für die *In Vitro*-Transkription wurde das *RiboMAX TM Large Scale RNA Production System- T7*[®] Kit von Promega verwendet. Dieses ermöglicht die Synthese klonaler RNA aus rekombinanten DNA Templates, deren Plasmid über einen T7-Promotor verfügt. Nach einer DNA-Hydrolyse (Punkt 2.2.5) mittels einem hinter dem Stop-Codon der Insertsequenz schneidenden Restriktionsenzym wurde die Reaktion mit dem *High Pure*[®] *PCR Product Purification* Kit (Punkt 2.2.8.1) aufgereinigt. Die IVT-Reaktion wurde nach Herstellerangaben mit einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Entfernung des DNA-Templates erfolgte durch Zugabe von DNase (1 U/µg DNA) und Inkubation bei 37°C für 15 min. Nach Aufreinigung der IVT-Reaktion durch Phenolextraktion (Punkt 2.2.8.2) und Aufkonzentrierung durch Alkoholfällung (Punkt 2.2.8.3) wurden die Proben in 50 µl Nuklease-freiem H₂O resuspendiert und 3 µl auf einem Formaldehyd-Gel aufgetragen. Für die weitere Polyadenylierungsreaktion wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt und $\frac{1}{10}$ des gemessenen Wertes als Grundlage für die Berechnung von rATP- und PolyA-Polymerase-Mengen verwendet.

Ein 60 µl Reaktionsansatz enthielt 25 µl IVT-RNA, 1x PolyA-Polymerase Puffer (5x), x_4 µl rATP (10mM), x_6 µl Poly-A-Polymerase (Stocklösung 600 U/µl) und wurde mit

Nuklease freiem H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Berechnung der rATP- und PolyA-Polymerase-Mengen erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{x_1 \text{ pg IVT-RNA}}{330 \text{ (Molekulargewicht einer Base in g/mol)} * \text{Anzahl der Basen des Templates}} = x_2 \text{ pmol}$$

rATP (10mM) - Bedarf

$$x_2 \text{ pmol} * 300 \text{ (Länge der Poly-A-Basen)} * 2 \text{ (Überschuss)} = x_3 \text{ nmol}$$

$$\text{rATP (10 mM)} = 10 \text{ nmol}/\mu\text{l} \rightarrow x_3 \text{ nmol} = x_4 \mu\text{l}$$

PolyA-Polymerase -Bedarf

$$\frac{x_2 \text{ pmol} * 300 \text{ (PolyA-Länge)}}{15 - 90 \text{ min}} = x_5 \text{ U} = x_6 \mu\text{l}$$

15 - 90 min

Polyadenylierungsreaktionen wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung und Aufkonzentrierung des Polyadenylierungsproduktes erfolgte wie für das IVT-Produkt beschrieben. 3 µl des Polyadenylierungsprodukt wurden auf einem Formaldehyd-Gel mit dem 3 µl des IVT-Produktes verglichen. Die photometrisch bestimmte RNA-Konzentration der IVT-PolyA⁺-Reaktion diente als Grundlage für weitere Berechnungen. Die Lagerung von (PolyA⁺)-RNA erfolgte bei -80°C.

2.2.14 Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase-Chain-Reaction“, PCR)

2.2.14.1 Nicht-quantitative PCR

Die Amplifikation von z.B. HLA-cDNA oder Tumor-cDNA durch PCR erfolgte nach Standardverfahren. Ein PCR-Ansatz zur Amplifikation definierter DNA-Bereiche enthielt in einem Gesamtansatz von 50 µl standardgemäß:

- 1x PCR-Puffer (10x)
- 2 mM dNTP-Mix (100mM)
- 5-10 pmol 5'-Primer
- 5-10 pmol 3'-Primer
- 1,5 U *Taq*-Polymerase (5U/µl) (aus *Thermus aquaticus*)
- oder 2,5 U Easy-A-Polymerase (5 U/µl)
- 5-50 ng cDNA (in Tris-HCl, pH8)

Für die PCR-Reaktionen wurde der *Taq-DNA-Polymerase* Kit von peqlab nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Amplifikation definierter DNA-Bereiche, die im Anschluss unter Verwendung des *pcDNA3.1/V5-His© TOPO® TA Expression* Kit kloniert wurden, erfolgte mittels Easy-A-Polymerase. Zur Kontrolle der PCR wurde jeweils eine Wasserkontrolle mitgeführt, in die anstatt der zu amplifizierenden DNA Wasser eingesetzt wurde, und eine Positivkontrolle, in die Primer für hochexprimierte Sequenzen wie z.B. für Aktin eingesetzt wurde. Für die Amplifikation im Thermocycler wurden Standardprogramme verwendet. Die „Annealing“-Temperatur der Primer richtete sich nach den Schmelzpunkten, welche entweder nach dem G-C-Gehalt der Nukleinsäuresequenz oder mit *Primer Designer* für Windows von Sci-Ed (Scientific & Educational Software, Durham) kalkuliert oder in einem programmierbaren Temperaturgradienten ausgetestet wurden. Das folgende Beispiel zeigt ein typisches, programmierbares Protokoll zur Durchführung einer PCR.

I. Denaturierung Initial	4 min	94°C
II. Denaturierung	45 sec	94°C
III. Annealing	45 sec	60°C
IV. Extension	1 min 30 sec	72°C
V. Extension	10 min	72°C

Der Amplifikationszyklus II. – IV. wurde 25 - 35fach wiederholt. Die PCR-Produkte wurden in 1 bis 1,5 %-igen Agarosegelen aufgetrennt, unter UV-Licht analysiert und dokumentiert. Die Lagerung von PCR-Produkten erfolgte bei -20°C.

2.2.14.2 Light Cycler Analysen

I) Grundlagen der Real-Time-PCR im Lightcycler

Die Real-Time-PCR, beruhend auf dem Prinzip einer klassischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bietet den Vorteil der „Echtzeit“-Analyse während des Reaktionslaufes. Der spezifische Nachweis von Genen erfolgte mittels den unter Punkt 1.8.6 und 1.8.7 angegebenen Primern und Hybridisierungssonden von Tib Molbiol (Berlin). Dabei ist an Hybridisierungssonde 1 am 3'-Ende das Fluorescein und an Hybridisierungssonde 2 am 5'-Ende der Farbstoff *LightCycler® Red640* gekoppelt. Wenn die Sonden mit der Ziel-DNA hybridisieren, was nur in der Annealing-Phase geschieht, wird zum Messzeitpunkt am Ende dieser Phase das Fluorescein durch blaues Licht der Wellenlänge 470 nm der LED des LightCycler Gerätes angeregt. Durch das abgestrahlte, grüne Licht des Fluorescein mit der Wellenlänge 530 nm wird der Farbstoff *LC Red 640* angeregt. Das emittierte Licht dieses Farbstoffes wird dann in Kanal F2 der Lightcycler-Optik detektiert. Die Fluoreszenz wird über das Verhältnis des Messkanals F2 (dessen Signal mit steigendem Produkt ansteigt) zum Kanal F1 (dessen Signal mit steigendem

Produkt fällt) dargestellt. Die Energie-Übertragung ist nur wirksam bei möglichst geringem Abstand der beiden Hybridisierungssonden zueinander, weshalb der Abstand der Sonden auf der Ziel-DNA nicht 1-5 Nukleotide überschreiten darf. Der Vorgang der Energieübertragung wird als FRET (*Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer*) bezeichnet.

II) LightCycler Instrument

Als Gerät wurde das LightCycler 1.5 Instrument von Roche verwendet. Die Analyse der Daten erfolgt mit der LightCycler[®] Software 3.5.

III) Prinzip der quantitative PCR

Die Fluoreszenz und die ansteigende Menge an PCR-Produkt stehen in Relation zueinander. Dabei stellt die Software die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl dar. Die PCR lässt sich in drei Phasen unterteilen: die background oder frühe Phase, die Log- oder exponentielle Wachstumsphase und die Plateau-Phase. Die frühe Phase ist dadurch gekennzeichnet, dass die Hintergrundsignale höher sind als die Fluoreszenzsignale des PCR-Produktes. Die Plateau-Phase ist gekennzeichnet durch ein Abfallen der Reaktionseffizienz. Die Log-Phase dagegen beginnt, wenn sich die Fluoreszenzsignale des PCR-Produktes statistisch signifikant von den Hintergrundsignalen abheben. Dieser Zeitpunkt wird von der Software als sogenannter „*Crossing Point*“ (CP) determiniert. Der CP ist definiert als die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal die Schwelle des Hintergrundsignales signifikant überschreitet. Über die CPs lassen sich quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge an Ziel-DNA machen. Eine absolute Quantifizierung ist durch Bestimmung der CPs nach folgenden Überlegungen möglich. In der Log-Phase wird die Reaktion mathematisch definiert über die Formel:

$$N = N_0 \times (E_{\text{const.}})^n$$

N = Zahl amplifizierter Moleküle

N₀ = initial eingesetzte Moleküle

n = Zyklenzahl

E = Amplifikationseffizienz

Nach dieser Formel verhalten sich die CPs umgekehrt proportional zum Logarithmus der initial eingesetzten Kopienzahlen. Wird ein externer Standard mit bekannten Ausgangskonzentrationen in der PCR eingesetzt, bestimmt die Software die CPs der einzelnen Verdünnungsstufen. Über die Darstellung der Crossing Points gegen die initial eingesetzten Moleküle der Verdünnungen erhält man eine Standardkurve mit der folgenden Gleichung:

$$CP = -(1/\log E) * \log N_0 + (\log N / \log E)$$

- N ist in diesem Fall die Kopienzahl am Crossing Point, die für alle Verdünnungen an diesem Punkt gleich ist.
- E als Amplifikationseffizienz kann Werte ≥ 1 und ≤ 2 annehmen. Ein Wert von 2 wäre die theoretisch beste Effizienz, da er einer Verdoppelung pro Zyklus entspricht. Ein Wert von 1 würde hingegen keiner Amplifikation entsprechen. Die Effizienz ist dabei unter anderem abhängig von der Sequenz der zu amplifizierenden DNA. Da diese aber in allen Verdünnungsstufen gleich ist, ist die Effizienz innerhalb der Verdünnungsreihe ebenfalls gleich.
- N_0 ist die Ausgangskonzentration an Molekülen.

Die Quantifizierung unbekannter Proben wird über das Messen der CPs ermöglicht. Diese werden von der Software über die Gleichung der Standardkurve in Ausgangskonzentrationen umgerechnet. Dabei ist entscheidend, dass die Amplifikationseffizienz der Standards und der Proben möglichst gleich sind, weil die Standardabweichung umso höher ist, je höher die Differenz zwischen den Effizienzen und je höher die Zyklenzahl. Aus diesem Grund ist es ebenfalls wichtig die Proben so zu verdünnen, dass die CPs nicht stark voneinander abweichen.

IV) externer Standard

Als externer Standard wurde das Plasmid TSPY full length #24 aus D41-MEL kloniert in pcDNA3.1, nachfolgend als D41-TSPYfull bezeichnet, eingesetzt. Dieses wurde mit *XbaI* linearisiert und mit dem *High Pure[®] PCR Purification Kit* aufgereinigt. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung war die Konzentration mit 123 µg/ml vorgegeben. Eine Verdünnungsreihe mit 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000 wurde hergestellt und als Standard in den LightCycler-Experimenten eingesetzt. Die entsprechende Kopienzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$1000 \text{ bp ds DNA} = 9,1 * 10^{11} \text{ Kopien/}\mu\text{g}$$

Der Standard hat eine Länge von 6375 bp und entspricht somit einer Kopienzahl von $5,8 \times 10^{12}$ Kopien/µg. Die Kopienzahl (N) pro ml berechnet nach folgender Formel:

$$N = C (\mu\text{g/ml}) \times \text{Kopien/}\mu\text{g}$$

$$C = \text{Konzentration (123 } \mu\text{g/ml)}$$

$$N = 123 \mu\text{g/ml} \times 5,8 \times 10^{12} \text{ Kopien/}\mu\text{g}$$

$$= 713,4 \times 10^{12} \text{ Kopien/ml}$$

$$= 7,134 \times 10^{14} \text{ Kopien/ml}$$

$$= 7,134 \times 10^{11} \text{ Kopien/}\mu\text{l}$$

Die Verdünnungsreihe umfasste die Kopienzahl von $7,134 \cdot 10^9 - 10^5/\mu\text{l}$. Eingesetzt wurde der Standard mit 2 μl pro PCR-Ansatz.

V) Probenmaterial

Als Probenmaterial diente cDNA von Zelllinien. Diese wurde wie unter Punkt **2.2.12** beschrieben synthetisiert. Anschließend wurde photometrisch die DNA-Konzentration bestimmt und die cDNA 1:5 verdünnt. In einem PCR-Ansatz wurde 2 μl der Probe eingesetzt. Da absolute Werte sowohl für cDNA als auch für RNA bestimmt wurden, wurde die Normalisierung absoluter Werte auf ein Housekeeping-Gen umgegangen. In diesem Fall wurde allerdings davon ausgegangen, dass 5 μg Total-RNA von der Transkriptase komplett in cDNA umgeschrieben werden. Die endgültige absolute Angabe erfolgt in Kopien/Zelle, da die RNA aus einer gegebenen Anzahl von Zellen isoliert wurde, unter der Voraussetzung, dass kein Verlust an RNA bei der Isolierung aufgetreten ist.

VI) LightCycler PCR

Die Primer sind an Exongrenzen lokalisiert, um eine Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden. Die Länge des Amplikon von TSPY beträgt 205 bp und entspricht damit der von Roche angegebenen idealen Länge (<700 bp). Da nach Anlagerung der Primer sofort die DNA-Neusynthese beginnt und so die Zielsequenz der Sonden auf der DNA maskiert wäre, liegen die Schmelzpunkte um 9 °C höher als die der Primer. Für die PCR wurde das *LightCycler® Fast StartDNA Master^{Plus} Hybridization Probes* Kit von Roche verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Dabei wurden die Primer mit 0,5 μl einer 20 pmol-Stammlösung und die Sonden mit 0,25 μl einer 8 pmol-Stammlösung eingesetzt. Eine Negativkontrolle wurde stets mitgeführt. Die Lagerung eines einmal angesetzten 5x Mix war bei 4°C für einen Monat möglich. Die Reaktionsansätze wurden grundsätzlich auf Eis pipettiert und die Reagenzien nach dem vollständigen Auftauen für die Dauer ihrer Verwendung auf Eis gelagert. Die Sonden wurden nur im Dunkeln bei 4°C gelagert. Vor der ersten Anwendung wurden grundsätzlich alle Komponenten aliquotiert, um Kontaminationen zu vermeiden.

LightCycler Protokoll:

		Target Temp. °C	Incubation time	Temp. Transition Rate °C/sec	Secondary Target Temp.	Step Size	Step Delay (cycles)	Acquisition
Pre-inc.	Initial-denaturierung	95°	10 min	20°	0	0,0	0	none
Ampli.	Denaturierung	95°	10 sec	20°	0	0,0	0	none
	Annealing	62°	7 sec	20°	0	0,0	0	single
	Extension	72°	16 sec	20°	0	0,0	0	none
melt		95°	0 sec	20°	0	0,0	0	none
		48°	30 sec	20°	0	0,0	0	none
		72°	0 sec	0,1°	0	0,0	0	cont.
cool		40°	30 sec	20°	0	0,0	0	none

Bei einer Zahl von 50 Zyklen betrug die Dauer der kompletten PCR ca. 1 h.

2.2.15 Klonierung von HLA-Allelen

Die Genotypisierung der HLA-A-, HLA-B-, und HLA-Cw-Allele des Patienten erfolgte durch Sequenzanalysen des aus Melanom cDNA amplifizierten HLA-PCR-Produktes und am Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserlautern im Labor von Dr. Thiele.

2.2.16 Generierung von Fragmenten antigenkodierender cDNA

Zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region eines identifizierten cDNA-Klons wurden mittels PCR in 3'→5'-Richtung verkürzte und mit Stopcodons versehene Fragmente amplifiziert. Die mit Hilfe der Easy-A-Polymerase amplifizierten Fragmente wurden unter Verwendung des *pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®] TA Expression Kits* in den Vektor *pcDNA3.1/V5-His TOPO* kloniert (Punkt 2.2.9.2). Durch PCR oder Sequenzierungsanalysen (Punkt 2.2.17) der Klone wurde die Orientierung der Inserts in dem bi-direktionalen Vektor überprüft. Korrekt orientierte und sequenzierte Fragmente wurden anschließend in COS-7- oder 293T-Zellen transfiziert und die Erkennung durch die T-Zellpopulation im IFN-γ-ELISPOT-Assay getestet. Gegebenfalls erfolgte eine weitere Fragmentierung erkannter cDNA-Klone. War eine Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der antigenkodierenden cDNA gelungen, wurden aus einer erkannten Region, die noch für 40-60 Aminosäuren kodierte, synthetische Peptide bestellt. Zuvor wurden mittels einer im Internet frei verfügbaren Datenbank (<http://www.syfpeithi.de/>) Vorhersageanalysen für mögliche nona- und dekamere Peptidkandidaten für ein

betrachtetes HLA-Allel durchgeführt. Die synthetisch hergestellten Peptide wurden im IFN- γ -ELISPOT-Assay (Punkt 2.1.12) getestet.

2.2.17 Sequenzanalysen

Sämtliche Sequenzierungsreaktionen wurden im Labor als „cycle sequencing“ mittels des *Thermo SequenaseTM Cy5TM Dye Terminator Sequencing* Kits von Amersham nach Herstellerangaben durchgeführt. Die weitere Analyse der Proben, die elektrophoretischen Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel und die Sequenzanalyse mittels des Kapillar-Sequenziergerätes *ABI Prism 3730* wurde bei der Firma GENterprise (Mainz) in Auftrag gegeben. Die Auswertung der erhaltenen Sequenz-Dateien erfolgte unter Verwendung der Software von *DNA-Star* (GATC-Biotech, Konstanz) und *chromas* (Technelysium)

2.2.18 Herstellung einer cDNA-Bank von D41-MEL

Zur Herstellung einer cDNA-Bank von D41-MEL wurde die Gateway[®] Technologie aus dem *CloneMinerTM cDNA Library Construction* Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Expression der cDNA-Bibliothek wurde der pcDNA3.1-Vektor gewählt, der durch die Integration der Rekombinationskassette *RfA* mittels Gateway[®] Vector Conversion Systems von Dr. C. Wölfel zu einem Gateway-Zielvektor adaptiert wurde.

Für die Herstellung einer cDNA-Bank von D41-MEL wurde aus 200×10^6 Melanomzellen Total-RNA (Punkt 2.2.11) präpariert. Anschließend folgte die Umschreibung des „First strand“ mittels RT-PCR aus 5 μ g Total-RNA durch Zugabe des im Kit vorhandenen Biotin-attB2-Oligo(dT) Primers. Die Synthese des „Second strand“ erfolgte wie im Kit beschrieben mit anschließender Aufreinigung über Phenolfällung (Punkt 2.2.8.2). Nach der wie im Kit beschriebenen Ligation der attB1-Adapter erfolgte eine Größen-Fraktionierung der cDNA mittels Sephadex-Säulen (CHROMA Spin-400) aus dem *SMART[®] cDNA Synthesis* Kit (Clontech). Die Größen-Fraktionierung der cDNA (D41-MEL) erfolgte in 15 Fraktionen (#1-15). Die cDNA-Fraktionen wurden mittels 0,3 M Ammoniumacetat-Präzipitation (Stock 7,5 M; Punkt 2.2.8.4) aufkonzentriert und im Anschluss wurde die DNA-Konzentration mittels eines Vergleiches einer 1:10 und einer 1:20 Verdünnung zu einem Vektor bekannter Konzentration auf einem 1%-igen Agarosegel bestimmt.

Als nächster Schritt erfolgte mit den Fraktionen die BP-Rekombination, wie vom Hersteller angegeben. Für BP-Rekombination assay I wurde die Fraktion 4 (100ng) verwendet, für BP-Rekombination assay II wurden die Fraktionen 4 (80ng) und 5 (20ng) verwendet. In der BP-Rekombinationsreaktion erfolgte die Herstellung der D41-MEL

„Entry library“ in pDONRTM222 (*attL1-attL2*). Die D41-MEL „Entry library“ in pDONRTM222 BPassay I bzw. II wurde in Electromax DH10B Bakterien elektroporiert mit folgenden Elektroporationsbedingungen:

2,0 kV

200 Ω

25 μ F

Nach Zugabe von 250 μ l SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend über Nacht auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden am nächsten Tag in Kanamycinhaltigem LB-Medium für 6 h bei 37°C amplifiziert. Die DNA wurde dann mit Hilfe des *HighSpeed[®] Maxi Prep Kit* von Qiagen isoliert und mittels 0,3 M Ammoniumacetat-Präzipitation aufkonzentriert. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die nach Herstellerangaben angewandte LR-Rekombinationsreaktion eingesetzt, welche die D41-MEL „Expression library“ in pcDNA3.1/RfA/DEST generierte. Der pcDNA3.1/RfA/DEST-Vektor wurde linearisiert (*BbvCI*-Restriktionshydrolyse, 1h30, 80°C) eingesetzt. Die D41-MEL „Expression library“ in pcDNA3.1/RfA/DEST LRI, LRII und LRIII sind von BPassay I hergestellt, die D41-MEL „Expression library“ in pcDNA3.1/RfA/DEST LRIV ist von BPassay II hergestellt.

Bestimmung der Transformandenanzahl

Jeweils ein Aliquot (0,2 ml) des gepoolten BP- bzw. LR-Transformationsansatzes wurde auf Kanamycinhaltigen (BP) bzw. Ampicillinhaltigen (LR) LB-Agarplatten titriert. Für die Berechnung der Transformandenanzahl wurde folgende Formel verwendet.

$$\frac{\# \text{ Anzahl Kolonien}}{\text{Transformanden}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{\text{Transformations-}}{\text{volumen}_{\text{gesamt}}} \times 10 = \#$$

10 pg transformierte DNA	μg	# μl ausplattiert	μg Plasmid-DNA
--------------------------------	----	-------------------	----------------

Analyse der Rekombinationsfrequenz

Von jeweils 24 Klonen der BP- und LR-Rekombinationsreaktion wurde nach DNA-Präparation (siehe Punkt 2.2.2) eine *BsrGI*-Restriktionshydrolyse durchgeführt, um den Erfolg der Rekombinationsreaktionen anhand der Anzahl inserierter cDNA-Klone zu überprüfen.

Kryokonservierung des D41-MEL Expression library in pcDNA3.1/RfA/DEST

Nach Berechnung der Transformandenanzahl wurde die nicht-amplifizierte D41-MEL cDNA-Bibliothek („Expression library“ in pcDNA3.1/RfA/DEST) in Aliquots à 10.000

cDNA-Klone in S.O.C.-Medium + 15% Glycerol kryokonserviert und bei -80°C aufbewahrt.

DNA-Präparation von 100 x cDNA-Pools aus der D41-MEL „Expression library“ in pcDNA3.1/RfA/DEST

Die DNA-Präparation der D41-MEL „Expression library“ in pcDNA3.1/RfA/DEST erfolgte in 100 x cDNA-Pools im 96-Lochboden-Format. Ein Aliquot bestehend aus 10.000 cDNA-Klonen wurde aufgetaut, in 5 ml LB-Medium + Amp100 überführt und auf einer 25 x 25 cm großen LB-Agarplatte + Amp100 gleichmäßig ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden mit Hilfe einer Impföse 96 x 100 cDNA-Pools in jeweils 5 ml LB-Amp-Flüssigmedium in 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und auf einem Schüttelinkubator angezogen (ü/N bei 37°C). Die DNA-Präparationen erfolgten im 96-Loch-Format mittels des QIAprep® 96 Turbo Miniprep Kits von Qiagen, nachdem zuvor von jedem cDNA-Pool ein Glycerolstock angelegt wurde. Die DNA wurde in jeweils 200 µl EB-Puffer eluiert. Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration von 8 aus 96 präparierten 100x cDNA-Pools diente als Grundlage für die Berechnung der Vorverdünnungen. Diese wurden auf eine Konzentration von 300 ng/5µl eingestellt und waren somit direkt für eine cDNA-Expressionsklonierung (Punkt 2.2.19) einsatzbereit. Die Lagerung der präparierten cDNA-Bibliothek D41-MEL „Expression library“ in pcDNA3.1/RfA/DEST LRIV von BPassayII sowie deren Vorverdünnungen erfolgten bei -20°C.

2.2.19 Klonierung antigenkodierender cDNA durch cDNA-Expressionsklonierung

Aus der cDNA-Bank der Melanomzelllinie D41-MEL sollten Klone isoliert werden, die für T-Zellerkannte Antigene kodieren. Dazu wurden die cDNA-Pools (Punkt 2.2.18) in COS-7- bzw. 293T-Zellen zusammen mit dem HLA-Allel kotransfiziert, für das die T-Zellpopulation, mit der nach dem Antigen gesucht werden sollte, restringiert war. Die Transfektion wurde mit Lipofektamin 2000™ (Punkt 2.1.8) durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die T-Zellen zu den Transfektanten gegeben. Die Reaktion der T-Zellen wurde durch den IFN-γ-ELISPOT-Assay gemessen (Punkt 2.1.9). Positiv getestete cDNA-Pools wurden zunächst in Pools zu je 10 Klonen subkloniert und durch erneute Transfektion auf die Erkennung durch die T-Zellen überprüft. Nach erneuter Subklonierung positiver 10er-Pools in einzelne Kolonien und der Transfektion der daraus isolierten Plasmide wurden Klone identifiziert, sequenziert und näher charakterisiert.

2.2.20 Computer-gestützte Datenbanksuchen

Für Homologievergleiche von eigenen mit veröffentlichten Sequenzen wurden im Internet zugängliche Datenbanken verwendet. Von den spezialisierten Datenbanken für MHC-Klasse-I-Sequenzen wurden die Datenbank des International Immunogenetics Projects (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>) und die KABAT-Datenbank, die mit dem BLAST-Programm des NCBI (National Center for Biotechnology Information) genutzt werden konnte (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), verwendet. Für sonstige Sequenzen wurden die Datenbanken GenBank und SwissProt über das NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sowie EMBL des European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) herangezogen. Weitere nützliche Datenbanken, insbesondere mit Informationen über Tumorantigene von menschlichen Tumoren und Gene im Allgemeinen, sind über Internetseiten des Ludwig-Instituts für Krebsforschung: <http://www-ludwig.unil.ch/SEREX/> und das Weizmann Institute of Science in Israel: <http://www.genecards.org/background.shtml> zu erreichen. Für Vorhersagen von Peptidkandidaten wurde die Datenbank für MHC-Liganden und Peptid-Motive des BMI Heidelberg (<http://www.syfpeithi.de/>) verwendet. Die Analyse von T-Zell-Rezeptor erfolgte mit der Datenbank des International ImMunoGeneTics Information Systems: http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/share/textes/index.html.

C Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von tumorassoziierten Antigenen im Melanommodell D41, die von autologen T-Zellen erkannt wurden. Die Melanomzelllinie D41-MEL war am „Queensland Institute of Medical Research“ in Brisbane etabliert worden. Sie stammte von einem männlichen Patienten, der innerhalb einer Impfstudie unter Vakzinierung eines Gemisches aus eigenen Tumorzellen und dendritischen Zellen eine komplette Remission entwickelte [152].

1 Charakterisierung der Melanomzelllinie D41-MEL

Peptide von z. B. tumorassoziierten Antigenen (TAA) werden zytotoxischen T-Zellen auf MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert, weshalb die Identifizierung der restringierenden HLA-Klasse I-Moleküle einen ersten Schritt zur Identifizierung dieser Antigene mit Hilfe der cDNA-Expressionsklonierung darstellt. Bei Tumoren wurden eine reduzierte Oberflächenexpression von MHC-Klasse I-Molekülen, HLA-Allel- und Haplotypverluste beschrieben [165;166]. Eine IFN- γ -Vorbehandlung der Tumorzelllinie kann Hinweise darauf geben, ob es sich um eine verminderte Expression der HLA-Moleküle oder einen echten Allel- bzw. Haplotypverlust handelt [167], da die Expression verschiedener HLA-Moleküle durch eine IFN- γ -Vorbehandlung verstärkt wird [168;169].

Die Melanomzelllinie D41-MEL wurde charakterisiert bezüglich der Expression von MHC-Klasse I-Molekülen, von MHC-Klasse II-Molekülen sowie der kostimulatorischen Moleküle CD54 und CD80 [85;170;171]. Serologisch wurden bei der Melanomzelllinie D41-MEL die Expression der HLA-Moleküle HLA-A1, HLA-A2, HLA-B8 und HLA-Cw7 verifiziert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden D41-Melanomzellen vier Tage mit IFN- γ vorbehandelt, wobei IFN- γ in einer Konzentration von 100 U/ml an Tag 1 (d1) hinzugefügt wurde. Als Kontrolle wurden unbehandelte D41-Melanomzellen mitgeführt. Die durchflusszytometrische Analyse der Melanomzelllinie D41-MEL mit und ohne IFN- γ -Vorbehandlung, wie in **Abb. C-1** dargestellt, zeigte keine veränderte Expression der mit dem Antikörper W6/32 markierten MHC-Klasse I-Moleküle des Melanoms. Die Anfärbung der Melanomzellen mit den Antikörpern B1.23.2 und SFR8-B6 zeigte eine oberhalb der durchflusszytometrischen Nachweisgrenze erkennbare Expression der HLA-B- und HLA-C-Moleküle nur unter IFN- γ -Vorbehandlung (zur Spezifität der Antikörper siehe Material und Methoden Punkt 1.7.1). Die Expression von HLA-A02, nachgewiesen mittels eines gegen HLA-A2 gerichteten, kommerziell erhältlichen Antikörpers, erhöhte sich gering unter IFN- γ -Vorbehandlung. Die MHC-

Klasse II-Moleküle, nachgewiesen mit dem Antikörper HB55, waren vor IFN- γ -Behandlung nur sehr gering exprimiert. Die Expression erhöhte sich sehr stark unter IFN- γ . Die per se hohe Expression von CD54 war durch IFN- γ nicht beeinflussbar. Die Expression von CD80 auf der Oberfläche der Melanomzellen war unterhalb der durchflusszytometrischen Nachweisgrenze und wurde durch IFN- γ nicht verstärkt.

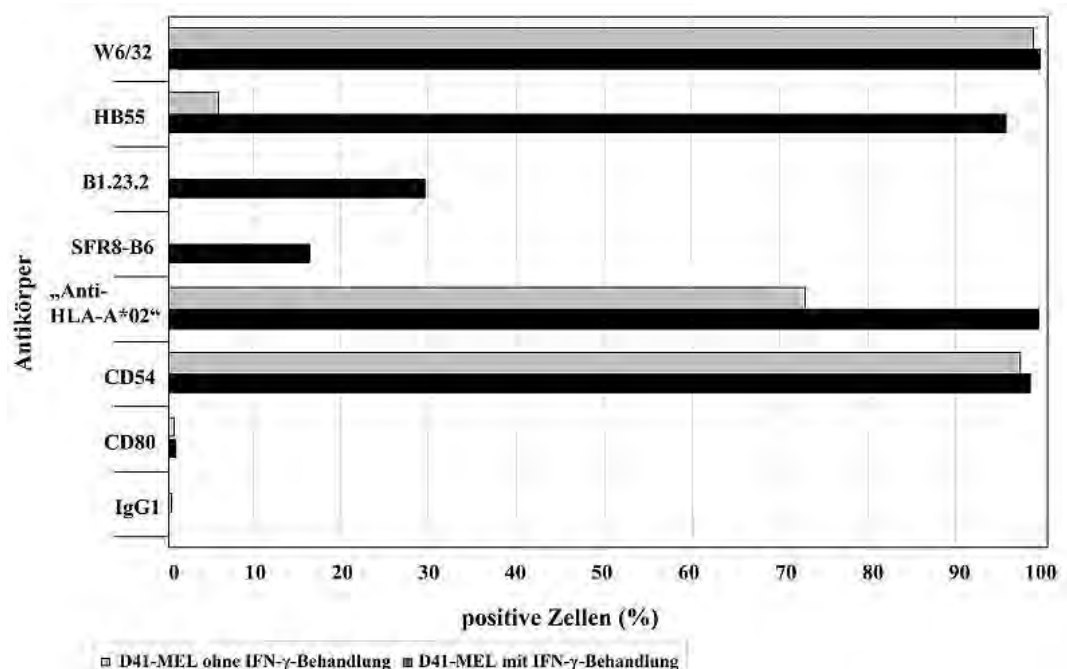


Abb. C-1: Durchflusszytometrische Analyse der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle bei D41-MEL ohne und mit IFN- γ -Vorbehandlung. Die IFN- γ -Vorbehandlung und die Färbung der Oberflächenmoleküle wurde durchgeführt wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.3 und 2.1.14.1 beschrieben.

Die RT-PCR mit Primern für die HLA-A-, HLA-B-, HLA-C-Loci an der Melanomzelllinie D41-MEL ergab die in **Tab. C-1** aufgelisteten HLA-Allele. Die HLA-Klasse I-Genotypisierung der Melanom- und der EBV-B-Zelllinie durch das Labor von Dr. Thiele am Institut für Immunologie und Genetik in Kaiserslautern zeigte, dass sowohl die D41-EBV-B-Zelllinie als auch die D41-Melanomzelllinie homozygot für das HLA-B- und das HLA-C-Allel sind. Die beiden HLA-A-Allele bestätigten sich durch das Labor ebenfalls. Somit lag bei der Melanomzelllinie D41-MEL kein Haplotypverlust eines HLA-Allels vor. Die in D41-Zellen nachweisbaren HLA-Allele waren bereits im Rahmen anderer Projekte in den Vektor pcDNA3.1 kloniert worden.

Lokus	HLA-A	HLA-B	HLA-C
Allel	A*0201 A*0101	B*0801	Cw*0701

Tab. C-1: Auflistung der HLA-Klasse-I-Allele des Patienten D41

Schlussfolgerung

Die D41-Melanomzelllinie und die D41-EBV-B-Zelllinie sind heterozygot für das HLA-A-Allel und homozygot für das HLA-B- sowie das HLA-C-Allel. Die Expression der HLA-Klasse I- und der HLA-Klasse II-Allele waren bei D41-Melanomzellen zum Teil durch IFN- γ beeinflussbar. Es zeigte sich nur unter IFN- γ -Vorbehandlung eine oberhalb der durchflusszytometrischen Nachweisgrenze erkennbare Expression der HLA-B- und HLA-C-Moleküle.

2 Konstruktion und Überprüfung einer cDNA-Bank aus D41-MEL-Zellen

Bei der T-zellvermittelten cDNA-Expressionsklonierung werden tumorassoziierte Antigene identifiziert, die auf Tumorzellen von T-Zellen erkannt werden. Als Quelle für die cDNA-Expressionsklonierung dient das Transkriptom aus Tumorzellen. Die mRNA wird dazu über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und in einen Expressionsvektor kloniert.

2.1 Konstruktion der cDNA-Bank im Expressionsvektor pcDNA3.1

Die Konstruktion der cDNA-Bank von D41-MEL zur Klonierung tumorassoziiierter Antigene erfolgte in einer modifizierten Variante des Expressionsvektors pcDNA3.1. Dieser erlaubt eine hohe, transiente Expression in COS-7- oder 293T-Zellen, da er mit dem SV40-Replikationsursprung ausgestattet ist. In Vorarbeiten durch Dr. C. Wölfel war der pcDNA3.1-Vektor durch die Integration der Rekombinationskassette *RfA* mittels des Gateway® Vector Conversion Systems zu einem Gateway®-Zielvektor adaptiert worden. Dieser diente dann als Expressionsvektor für die cDNA-Bank aus D41-MEL, nachfolgend als D41-cDNA-Bank bezeichnet. In **Abb. A** und **B** im Anhang sind die Konstruktion der D41-cDNA-Bank und die Adaptierung des pcDNA3.1-Vektors schematisch dargestellt. Dabei wurde die aus 5,6 μ g Poly-A⁺-RNA über reverse Transkription hergestellte und durch spezielle Primer mit *att*-Rekombinationsschnittstellen versehene, komplementäre DNA (cDNA, *complementary DNA*) in einen ersten Donorvektor mit Hilfe von homologer Rekombination kloniert. Dieser Donorvektor war der „Eintrittsvektor“ für die cDNA-Bank. Die Überprüfung der Plasmid-DNA von 24 willkürlich ausgewählten Einzelkolonien (Daten nicht gezeigt) durch Restriktionshydrolyse zeigte ein vorhandenes cDNA-Insert bei 21 Einzelkolonien. Die Rekombinationseffizienz lag somit bei 87 %. Die cDNA-Inserts

wurden anschließend ebenfalls durch homologe Rekombination in den Expressionsvektor pcDNA3.1/RfA/DEST.#6 umklontiert. Der Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Effizienz einer „*site-specific*“ Rekombination, wodurch zufällige Ligationsvorgänge ausgeschaltet werden. Dieses führt zu einer Klonierung der cDNA-Inserts in der gewünschten Orientierung und zudem lässt sich nahezu jeder Expressionsvektor für diese Methode kompatibel machen. Nach Umklonierung der cDNA-Inserts in den Expressionsvektor pcDNA3.1/RfA/DEST.#6, der Transformation in Bakterien und der Selektion auf den Vektor mit Insert zeigt **Abb. C-2** eine gelelektrophoretische Auftrennung der mit dem Enzym *Bsr*GI gespaltenen Plasmid-cDNA von 24 Einzelkolonien.

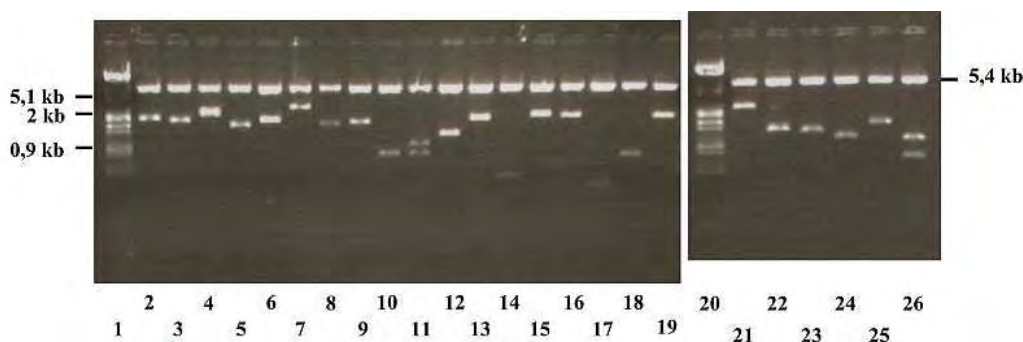


Abb. C-2: Restriktionshydrolyse der Plasmid-cDNA von willkürlich ausgewählten 24 Einzelkolonien (2-19 und 21-26) der D41-cDNA-Bank in pcDNA3.1/RfA/DEST.#6. Die Durchführung der Restriktionshydrolyse erfolgte wie in Material und Methoden unter Punkt 2.2.5 beschrieben. Als Standard wurde der DNA Molecular Weight Marker III der Firma Roche eingesetzt (1 und 20).

In **Abb. C-2** repräsentiert die etwa bei 5,4 kb liegende Bande den Vektor pcDNA3.1/RfA/DEST.#6, während die darunter liegenden Banden verschieden lange Inserts präsentieren. Bei 24 von 24 Einzelkolonien befand sich im Vektor mindestens ein cDNA-Insert. Die Rekombinationseffizienz lag somit bei 100%. Nach Titration der Bakterien auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ergab sich eine endgültige Ausbeute von 550.000 cDNA-Klonen, die in 20% Glycerol bei -80°C eingefroren wurden.

Schlussfolgerung:

Die D41-cDNA-Bank wurde mittels zweier Rekombinationsschritte in eine modifizierte Variante des Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Die Klonierungseffizienz der D41-MEL-cDNA lag bei 87%.

2.2 Überprüfung der D41-cDNA-Bank

Die Funktionalität der D41-cDNA-Bank wurde über die Detektion von HLA-A*0201-cDNA in der cDNA-Bank verifiziert. Dazu wurden 100x Pools der D41-cDNA-Bank mit einem für das mutierte Antigen CDK4^{mut} kodierenden Expressionsplasmid in COS-7-Zellen kotransfiziert. Die Transfektanten wurden im IFN-γ-

ELISPOT-Assay auf Erkennung durch den CTL-Klon SK29-CTL14/35 getestet. Dieser erkennt CDK4^{mut} in Assoziation mit HLA-A*0201. Eine Erkennung der COS-7-Transfektanten durch SK29-CTL14/35 war dann gegeben, wenn sich im transfizierten 100x Pool die cDNA für HLA-A*0201 befand. Wie in **Abb. C-3** zu sehen ist, enthielten zwei von insgesamt 96 100x Pools mit SK29-CTL14/35 HLA-A*0201-kodierende Plasmide.

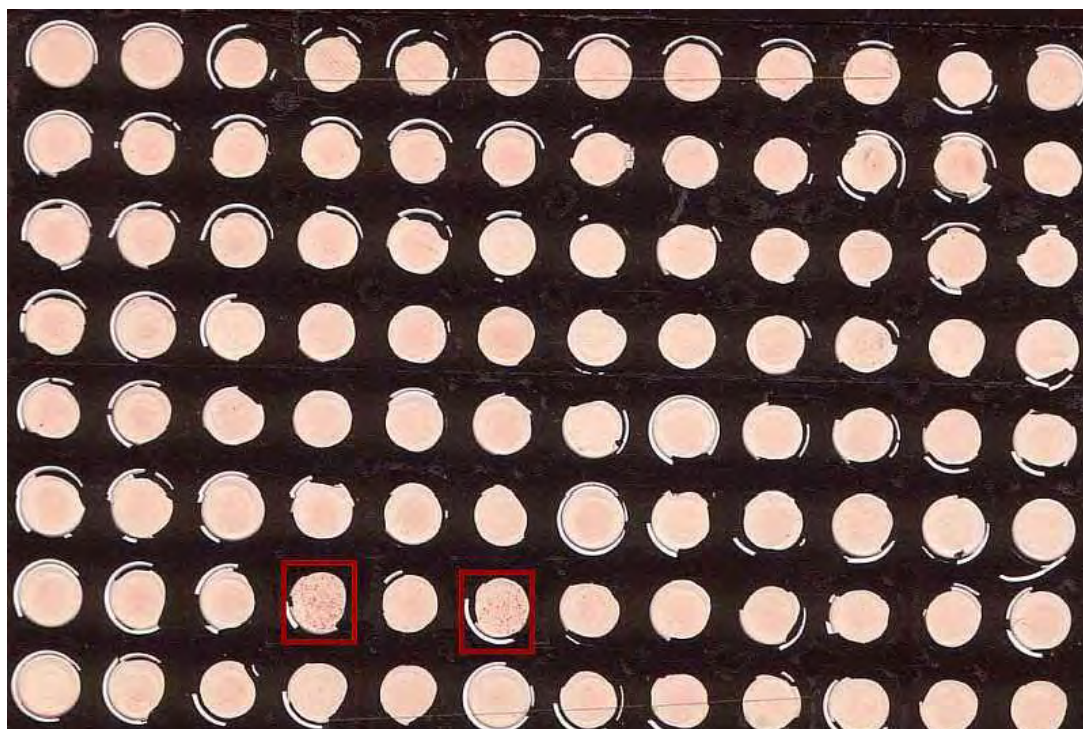


Abb. C-3: Funktionsanalyse der D41-cDNA-Bank. CDK4^{mut} wurde kotransfiziert mit 96 100x Pools der D41-cDNA-Bank (LRIV von BPassay II; siehe Punkt 2.2.18 bei Material und Methoden) in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE). Als Effektorzelle wurde der durch HLA-A*0201 restringierte CTL-Klon SK29-CTL14/35 (10.000 Lymphozyten/TE) eingesetzt. Die eingerahmten TE kennzeichnen die von dem CTL erkannten und mutmaßlich HLA-A*0201 enthaltenden 100x Pools. Die Durchführung des IFN- γ -ELISPOT-Assays erfolgte wie bei Material und Methoden unter Punkt 2.1.9 und 2.1.10 angegeben.

Schlussfolgerung:

Die Funktionalität der D41-cDNA-Bank konnte mittels des Nachweises exprimierter HLA-A*0201-cDNA aus der cDNA-Bank in Assoziation mit CDK4^{mut} durch SK29-CTL14/35 gezeigt werden.

3 Generierung und Charakterisierung von MLTCs im Melanommodell D41

Die Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen (TAA) durch cDNA-Expressionsklonierung erfolgt mit Hilfe von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. Diese T-Zellen erkennen Proteinfragmente aus acht bis 15 Aminosäuren, die durch Proteinprozessierung von Proteinen jeglicher subzellulärer Kompartimente generiert und

über MHC-Moleküle von der Tumorzelle präsentiert werden. Für die Identifizierung ist es nötig, T-Lymphozyten zu generieren, die die Tumorzellen mit hoher Spezifität erkennen, lysieren und sich auf möglichst hohe Zellzahlen in „*in vitro*“-Langzeitkultur expandieren lassen [91].

Für die Generierung von tumorreaktiven CD8⁺-T-Zellen in Form von gemischten Lymphozyten-Tumorzellkulturen (MLTCs, „*mixed lymphocyte tumor cell culture*“) wurden in dieser Arbeit periphere Blutlymphozyten (PBMC) dreier Blutproben verwendet, die dem Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten der Vakzinierungsstudie entnommen wurden. Die Lymphozyten wurden mit autologen Melanomzellen stimuliert. Nach drei Tagen wurde der Kultur IL-2 in einer Endkonzentration von 250 U/ml als Wachstumsfaktor hinzugefügt. Eine Restimulation mit bestrahlten, autologen Melanomzellen wurde wöchentlich durchgeführt. Drei verschiedene MLTCs wurden so im Modell D41 generiert. D41-MLTC 1 wurde mit PBMCs vor der ersten Vakzinierung, D41-MLTC 2 mit PBMCs vor Vakzinierung acht und D41-MLTC 3 mit PBMCs vor Vakzinierung 15 angesetzt. Bei dem Patienten trat zum Zeitpunkt der Vakzinierung acht im Oktober 2002 eine komplette Remission auf, die nach mittlerweile sechs Jahren erfreulicherweise immer noch anhält. **Tab. C-2** ist eine Übersicht der generierten T-Zellresponderpopulationen.

Bezeichnung	Datum der PBMC-Entnahme	Impfstatus bei PBMC-Entnahme	CD8 ⁺ -Isolierung (Tag nach Erststimulation)	T-Zellklonierung (Tag nach Erststimulation)
D41-MLTC 1	15.01.2002	vor Impfung	d20	-
D41-MLTC 2	11.10.2002	vor 8. Impfung	d20	d27
D41-MLTC 3	04.04.2004	vor 15. Impfung	-	d37

Tab. C-2: Tabellarische Übersicht der generierten D41-MLTCs. Die Tabelle gibt einen Überblick über die Bezeichnungen der MLTCs und das Datum, an dem die Lymphozyten, aus denen die MLTCs generiert wurden, dem Patienten entnommen worden waren. Desweiteren sind angegeben der Impfstatus bei PBMC-Entnahme und der Tag nach Erststimulation der PBMCs, an dem eine CD8⁺-Isolation bzw. eine T-Zellklonierung durchgeführt wurden.

3.1 Generierung und Expansion der MLTCs

Für jede MLTC wurden die PBMCs aufgetaut, gewaschen und in Kultur genommen. Die Ausbeuten an lebenden Zellen waren unterschiedlich, so dass die MLTCs mit verschiedenen PBMC-Ausgangszellzahlen gestartet wurden. Bei D41-MLTC 1 und 2 wurden jeweils insgesamt 4×10^6 PBMCs eingesetzt, bei D41-MLTC 3 $2,5 \times 10^6$ PBMCs. Die MLTCs wurden wöchentlich mit autologen, letal bestrahlten Tumorzellen stimuliert. D41-MLTC 1 und 2 wurden über einen Zeitraum von 24 Tagen, D41-MLTC 3 über 43 Tage expandiert. **Abbildung C-4** gibt die Expansion der drei MLTCs wieder. In der ersten

Woche nach Stimulation kam es zu einer Abnahme der Zellzahl bei allen drei MLTCs. D41-MLTC 2 wies die höchste Expansionsrate auf (bis zu 25-facher Vermehrung gegenüber der Ausgangszellzahl). Unmittelbar vor der dritten Restimulation mit autologen Tumorzellen wurden aus den Responderlymphozyten D41-MLTC 1 und D41-MLTC 2 die $CD8^+$ -T-Zellen isoliert. Die Bestimmung des Anteils $CD8^+$ -T-Zellen in den MLTCs erfolgte mittels Durchflusszytometrie vor der $CD8^+$ -Isolierung mit Micro Beads und lag bei den drei D41-MLTCs zwischen 80,2 und 92,8%. Die isolierten $CD8^+$ -T-Zellen wurden erneut mit autologen Melanomzellen restimuliert. 2×10^5 bestrahlte Zellen der autologen $CD8^-$ -Fraktion pro Kultureinheit wurden nach der Isolierung als sogenannte „feeder“-Zellen hinzugegeben. An Tag 4 nach Restimulation der $CD8^+$ T-Zellen wurden beide MLTCs im IFN- γ -ELISPOT-Assay näher charakterisiert und kryokonserviert.

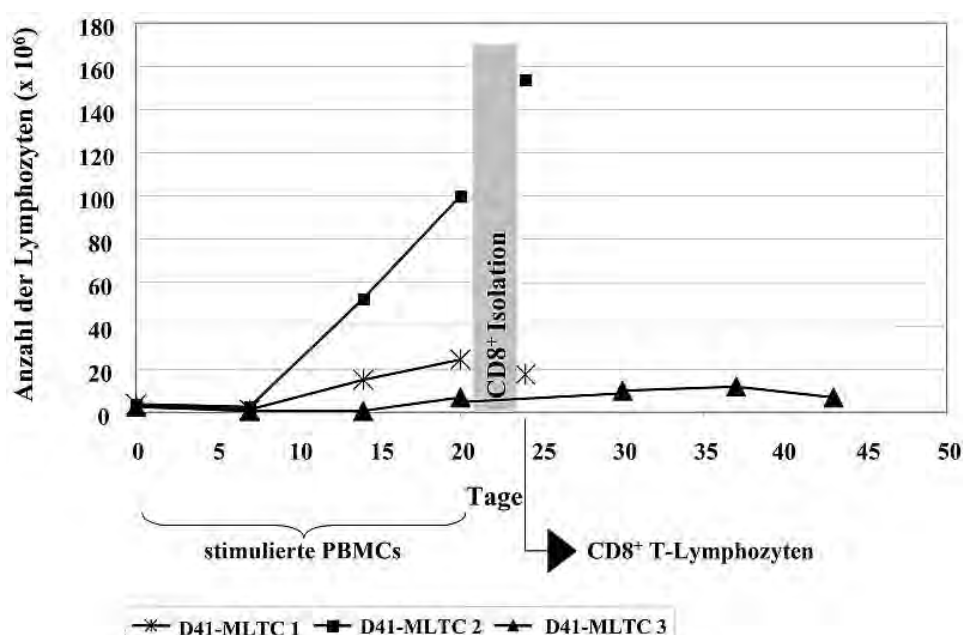


Abb. C-4: Generierung von MLTCs im Modell D41. Gezeigt ist die Expansion der MLTCs, die aus kryokonservierten Blutlymphozyten von drei verschiedenen Zeitpunkten angesetzt wurden. Als Stimulatorzellen wurden mit 100 Gy bestrahlte autologe Melanomzellen eingesetzt. Die Viabilität der Zellen wurde einmal wöchentlich vor der Stimulation bestimmt, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.2 angegeben.

Alle weiteren Experimente wurden mit dieser kryokonservierten $CD8^+$ -Population durchgeführt. Für D41-MLTC 3 wurde aufgrund der geringen Expansion keine $CD8^+$ -Isolierung durchgeführt.

Schlussfolgerung:

Nach Stimulation von PBMCs dreier verschiedener Blutentnahmen mit letal bestrahlten, autologen Melanomzellen proliferierten die Lymphozyten bis zu 25fach gegenüber der Ausgangszellzahl. Tumorreaktive $CD8^+$ -T-Zellen in Form von drei voneinander unabhängigen gemischten Lymphozyten-Tumorzellkulturen (MLTCs) konnten so generiert werden.

3.2 Charakterisierung der MLTCs

Die MLTC-Responderlymphozyten wurden im IFN- γ -ELISPOT-Assay auf Reaktivität gegen die autologen Melanomzellen, die autologe EBV-B-Zelllinie sowie 293T- und COS-7-Zellen getestet. Letztere kamen als Empfängerzellen für das cDNA-Bank-Screening in Betracht. Zusätzlich wurden die D41-MLTCs in einem Paneltest daraufhin untersucht, ob sie bekannte Melanom-assoziierte Antigene erkennen.

3.2.1 Erkennung von D41-MEL

Nach Antigenkontakt können CD8⁺ zytotoxische T-Zellen zwei Arten von Effektormolekülen freisetzen. Zum einen Zytotoxine und zum anderen Zytokine. Die Zytotoxine, wie z.B. Perforin oder Granzyme B, sind zytotoxische Effektorproteine, die bei der Targetzelle eine Apoptose auslösen können. Die Zytokine verändern die Eigenschaften der Zielzelle oder anderer Zellen in der näheren Umgebung, ohne direkt toxisch zu wirken. CD8⁺-T-Zellen reagieren auf Antigenkontakt z.B. mit IFN- γ -Freisetzung, welche im IFN- γ -ELISPOT-Assay nachgewiesen werden kann [172].

Im IFN- γ -ELISPOT-Assay wurde überprüft, ob in den verschiedenen D41-MLTCs T-Zellen angereichert waren, die die autologe Tumورlinie D41-MEL erkannten. Wie aus **Abb. C-5** hervorgeht, erkannten D41-MLTCs die D41-Melanomzellen, jedoch nur schwach autologe EBV-B-Zellen und nicht K562-Zellen. Die Erkennung der autologen Melanomzellen wurde bei allen drei MLTCs durch Zugabe des Antikörpers W6/32 (gegen HLA-Klasse I) vollständig und durch Zugabe des Antikörpers PA2.1 (gegen HLA-A2) teilweise blockiert. Die Zugabe der Antikörper B1.23.2 (gegen HLA-B/-C) und SFR8-B6 (gegen HLA-Bw6) blockierte die Erkennung autologer Melanomzellen nicht. Dieses Blockademuster legte nahe, dass alle drei D41-MLTCs durch HLA-A*0101 und HLA-A*0201 restringiert waren. Ein weiterer IFN- γ -ELISPOT-Assay zeigte keine Reaktivität der D41-MLTCs gegenüber COS-7- und 293T-Zellen transfiziert mit den HLA-Allelen des Patienten (Daten nicht gezeigt).

Versuchsansatz	Antikörper (Spezifität)	D41 MLTC 1	D41 MLTC 2	D41 MLTC 3
T-Zellen allein	ohne			
T-Zellen + D41-MEL	ohne			
T-Zellen + D41-EBV-B	ohne			
T-Zellen + K562	ohne			
T-Zellen + D41-MEL	W6/32 (MHC-Klasse I)			
T-Zellen + D41-MEL	PA2.1 (HLA-A2)			
T-Zellen + D41-MEL	B1.23.2 (HLA-B und -C)			
T-Zellen + D41-MEL	SFR8-B6 (HLA-Bw6)			
T-Zellen + D41-MEL	HB55 (MHC-Klasse II)			

Abb. C-5: Reaktivität und HLA-Blockade der D41-MLTC 1 (d20 + 4), D41-MLTC 2 (d20 + 4) und D41-MLTC 3 (d30 + 4) im 24h-IFN- γ -ELISPOT-Assay gegen das autologe Melanom. 10.000 T-Zellen pro Ansatz wurden mit 50.000 Melanomzellen mit und ohne Antikörper bzw. 75.000 autologen EBV-B-Zellen oder 75.000 K562-Zellen für 20 Stunden kokubiert. Die Durchführung erfolgte, wie unter Punkt 2.1.10 und 2.1.11 in Material und Methoden angegeben.

Schlussfolgerung:

Durch die Stimulation von PBMCs des Patienten mit bestrahlten autologen Melanomzellen konnten melanomreaktive T-Zellen angereichert werden. Die Blockade der Melanomerkennung durch die T-Zellen mit Hilfe von Antikörpern legte eine Restriktion der D41-MLTCs durch HLA-A*0101 und HLA-A*0201 nahe.

3.2.2 Paneltestung mit bekannten, Melanom-assoziierten Antigenen

Um zu ermitteln, inwiefern sich die T-Zellantworten der D41-MLTCs gegen die Melanomzelllinie D41-MEL aus Immunantworten gegen bereits bekannte Antigene zusammensetzten, wurde die IFN- γ -Freisetzung der D41-MLTCs gegenüber COS-7-Transfektanten getestet, die mit Plasmiden, die für Panelantigene und HLA-Klasse I-Allele des Patienten kodierten, kotransfiziert waren. Durch die Transfektion mit cDNA voller Länge und die Berücksichtigung aller individuellen HLA-Klasse I-Allele konnte die Beschränkung auf einzelne bekannte Peptide umgangen und die Gesamtheit der Reaktionen gegen bereits bekannte TAAs in den D41-MLTCs ermittelt werden. **Tabelle**

C-3 zeigt den schematischen Aufbau des IFN- γ -ELISPOT-Assays und die im Panel enthaltenen Antigene.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MAGE-A1	MAGE-A2	MAGE-A3	MAGE-A4	MAGE-A6	MAGE-A8	MAGE-A9	MAGE-A10	MAGE-A11	MAGE-A12	MAGE-B1	MAGE-C1
B	MAGE-A1	MAGE-A2	MAGE-A3	MAGE-A4	MAGE-A6	MAGE-A8	MAGE-A9	MAGE-A10	MAGE-A11	MAGE-A12	MAGE-B1	MAGE-C1
C	MAGE-C2	GAGE-1	GAGE-2	GAGE-3	GAGE-4	GAGE-5	GAGE-6	GAGE-7b	GAGE-8	RAGE-1	RAGE-2	RAGE-3
D	MAGE-C2	GAGE-1	GAGE-2	GAGE-3	GAGE-4	GAGE-5	GAGE-6	GAGE-7b	GAGE-8	RAGE-1	RAGE-2	RAGE-3
E	RAGE-4	BAGE	PRAME	WT1	gp100	Melan-A	Tyros. ¹	TRP-2	NY-ESO-1	Surv.1 ²	Surv.2 ³	RAB38
F	RAGE-4	BAGE	PRAME	WT1	gp100	Melan-A	Tyros.	TRP-2	NY-ESO-1	Surv.1	Surv.2	RAB38
G	HER-2/neu	mock	HLA	ohne Targetzellen	D41-MEL							
H	HER-2/neu	mock	HLA	ohne Targetzellen	D41-MEL							

Tab. C-3: Schematischer Versuchsaufbau des Antigenpaneltests der **Abb. C-6 bis 8**. Aufbau des IFN- γ -ELISPOT-Assays mit der Kotransfektion von ein bis zwei HLA-Molekülen und verschiedenen, bekannten, tumorassoziierten Antigenen in COS-7-Zellen. Den Abbildungen C-6 bis C-8 liegt dieser Versuchsaufbau zugrunde.

1= Tyrosinase 2= Survivin 1 3= Survivin 2

Responderlymphozyten der D41-MLTC 2 wurden auf Erkennung von COS-7-Transfektanten überprüft, welche mit Panelantigenen sowie je zwei HLA-Allelen, HLA-A*0101 und HLA-B*0801 in **Abb. C-6**, HLA-A*0201 und HLA-Cw*0701 in **Abb. C-7**, kotransfiziert waren. Die IFN- γ -Freisetzung der D41-MLTC 2 gegenüber COS-7-Zellen kotransfiziert mit HLA-A*0101/HLA-B*0801 und den Antigenen MAGE-A3 bzw. MAGE-A6 (**Abb. C-6**) war höher als im Vergleich zu COS-7-Zellen transfiziert mit HLA-A*0101/HLA-B*0801-Plasmid-DNA alleine. Bei der Kotransfektion von HLA-A*0201/HLA-Cw*0701 und den Panelantigenen in COS-7-Zellen war die IFN- γ -Freisetzung gegenüber den mit MAGE-A10, Melan-A und NY-ESO-1 kotransfizierten COS-7-Zellen höher im Vergleich zu den mit den HLA-Molekülen alleine transfizierten COS-7-Zellen (**Abb. C-7**).

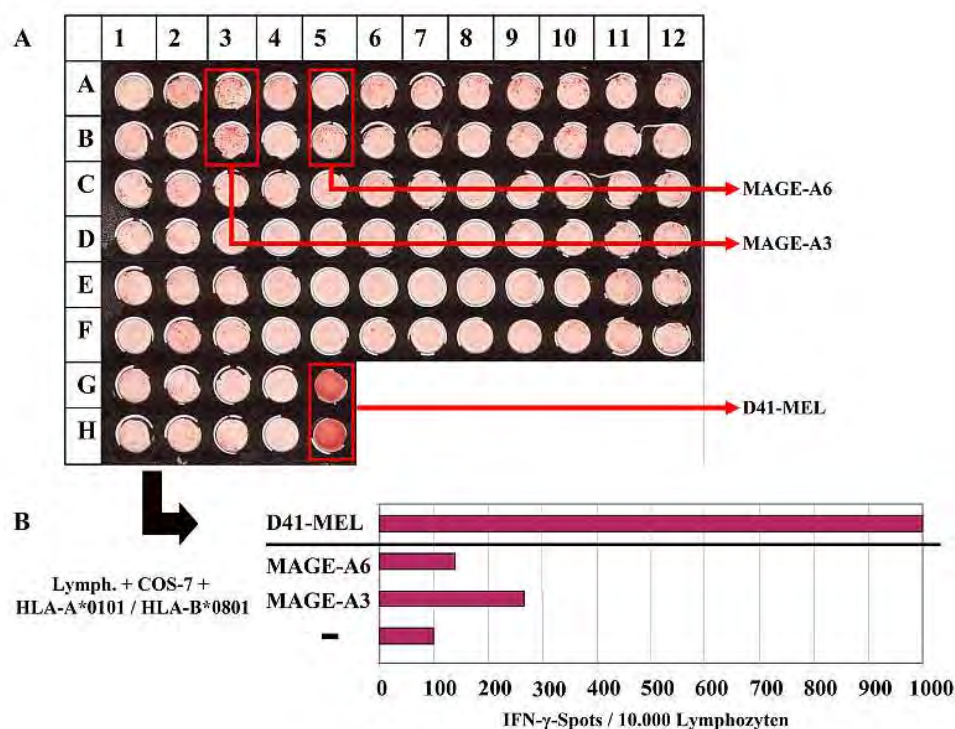


Abb. C-6: Reaktivität der D41-MLTC 2 gegen bekannte Panelantigene kotransfiziert mit HLA-A*0101 und HLA-B*0801 in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE). Die an d20+4 kryokonservierte MLTC wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut, in Medium mit IL-2 inkubiert und schließlich in einer Konzentration von 10.000 Lymphozyten /TE eingesetzt. Die Durchführung erfolgte, wie unter Punkt 2.1.9 und 2.1.10 bei Material und Methoden beschrieben.

A: IFN- γ -ELISPOT-Assay **B:** Auswertung des IFN- γ -ELISPOT-Assays mittels „computer associated video image analysis (Auswahl, Mittelwerte von Doppelbestimmungen)

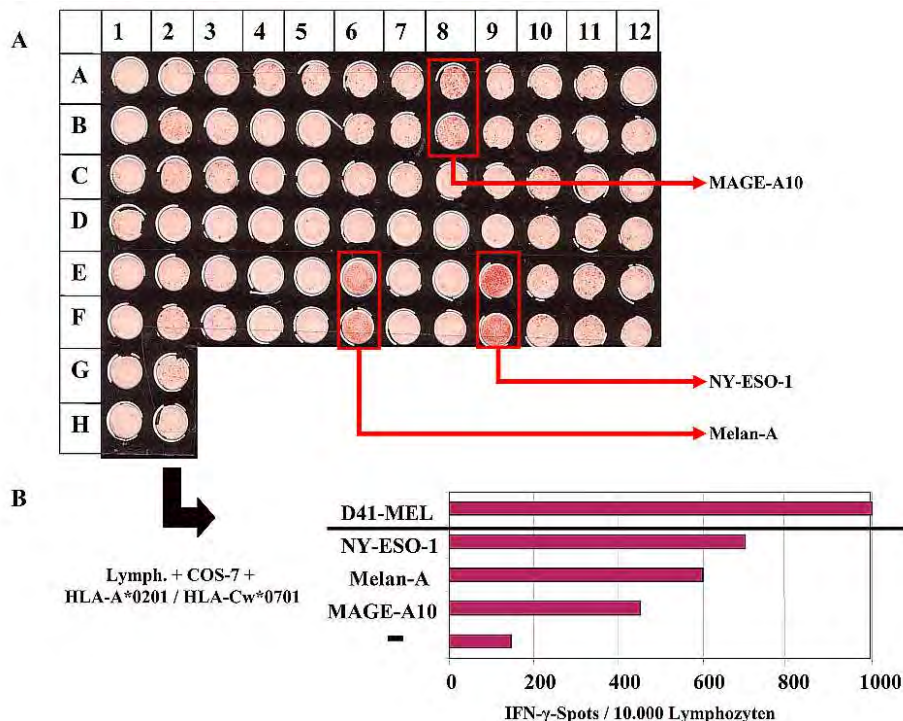


Abb. C-7: Reaktivität der D41-MLTC 2 gegen bekannte Panelantigene kotransfiziert mit HLA-A*0201 und HLA-Cw*0701 in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE). Die an d20+4 kryokonservierte MLTC wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut, in Medium mit IL-2 inkubiert und schließlich in einer Konzentration von 10.000 Lymphozyten /TE eingesetzt. Die Durchführung erfolgte, wie unter Punkt 2.1.9 und 2.1.10 bei Material und Methoden beschrieben.

A: IFN- γ -ELISPOT-Assay **B:** Auswertung des IFN- γ -ELISPOT-Assays mittels „computer associated video image analysis (Auswahl, Mittelwerte von Doppelbestimmungen)

In einem zweiten Schritt wurden die potentiell positiven Panelantigene mit den einzelnen HLA-Molekülen in COS-7-Zellen kotransfiziert (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte D41-MLTC 2 eine gering erhöhte IFN- γ -Freisetzung gegenüber COS-7-Zellen transfiziert mit MAGE-A3 bzw. MAGE-A6 in Assoziation mit HLA-A*0101 im Vergleich zu COS-7-Zellen transfiziert mit dem HLA-Molekül alleine. Die IFN- γ -Freisetzung gegenüber COS-7-Zellen kotransfiziert mit HLA-A*0201 und Melan-A bzw. NY-ESO-1 war stark erhöht im Vergleich zu COS-7-Zellen transfiziert mit dem HLA-Molekül alleine. Eine erhöhte IFN- γ -Freisetzung konnte ebenfalls gegenüber COS-7-Zellen kotransfiziert mit HLA-A*0201 und MAGE-A10 nachgewiesen werden. Eine Reaktivität der D41-MLTC 2 gegenüber Panelantigenen in Assoziation mit HLA-B*0801 bzw. HLA-Cw*0701 konnte nicht festgestellt werden.

Abbildung C-8 gibt die Paneltestung der D41-MLTC 1 wieder. Im ersten Schritt wurden COS-7-Zellen mit den Panelantigenen und den beiden HLA-Allelen HLA-A*0101 und HLA-A*0201 (**Abb. C-8**) bzw. HLA-B*0801 und HLA-Cw0701 (Daten nicht gezeigt) kotransfiziert und auf Erkennung durch die D41-MLTC 1-Responderlymphozyten getestet.

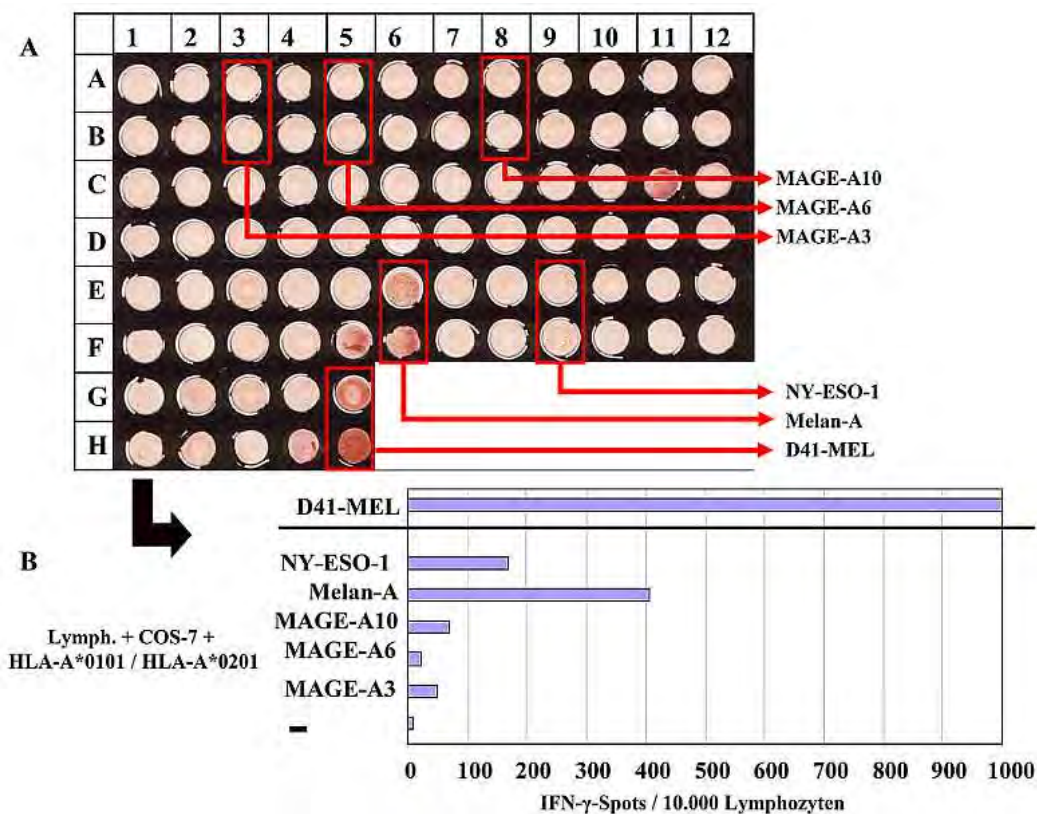


Abb. C-8: Reaktivität der D41-MLTC 1 gegen bekannte Panelantigene kotransfiziert mit HLA-A*0101 und HLA-A*0201 in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE). Die an d20+4 kryokonservierte MLTC wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut, in Medium mit IL-2 inkubiert und schließlich in einer Konzentration von 10.000 Lymphozyten /TE eingesetzt. Die Durchführung erfolgte, wie unter Punkt 2.1.9 und 2.1.10 bei Material und Methoden beschrieben.

A: IFN- γ -ELISPOT-Assay **B:** Auswertung des IFN- γ -ELISPOT-Assays mittels „computer associated video image analysis (Auswahl, Mittelwerte von Doppelbestimmungen)

Eine Erkennung der Panelantigene in Assoziation mit HLA-B*0801 und HLA-Cw*0701 durch D41-MLTC 1 konnte nicht nachgewiesen werden. Eine erhöhte Reaktivität der D41-MLTC 1 gegenüber den Panelantigenen MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, Melan-A und NY-ESO-1 kotransfiziert mit den HLA-Molekülen in COS-7-Zellen war in Form einer erhöhten IFN- γ -Freisetzung im Vergleich zu COS-7-Zellen transfiziert mit den HLA-Allelen alleine festzustellen (**Abb. C-8**). Eine Kotransfektion dieser Panelantigene mit HLA-A*0101 oder HLA-A*0201 in COS-7-Zellen in einem zweiten Schritt (Daten nicht gezeigt) zeigte eine hohe IFN- γ -Freisetzung der Responderlymphozyten gegenüber Melan-A und NY-ESO-1 in Assoziation mit HLA-A*0201. D41-MLTC 1 erkannte ebenfalls MAGE-A10 in Assoziation mit HLA-A*0201 sowie MAGE-A3 und MAGE-A6 jeweils in Assoziation mit HLA-A*0101.

Die Paneltestung der D41-MLTC 3 (Daten nicht gezeigt) zeigte eine Erkennung der Panelantigene MAGE-A3 und MAGE-A6 sowie Tyrosinase in Assoziation mit HLA-A*0101 oder HLA-B*0801. Ebenfalls konnte eine Erkennung der Panelantigene Melan-A, MAGE-A10 und NY-ESO-1 in Assoziation mit HLA-A*0201 oder HLA-Cw*0701 nachgewiesen werden. Eine Aufschlüsselung der Erkennung dieser Panelantigene in Assoziation mit den einzelnen HLA-Allelen konnte aufgrund der schlechten Expansion der D41-MLTC 3 und einer auftretenden Reaktivität gegen COS-7- und 293T-Zellen nicht durchgeführt werden.

Schlussfolgerung:

Die Kotransfektion von COS-7-Zellen mit Plasmiden, die für Panelantigene und HLA-Klasse I-Allele des Patienten kodierten, und einer anschließenden Inkubation dieser Transfektanten mit D41-MLTC-Responderlymphozyten im IFN- γ -ELISPOT-Assay zeigte Reaktivitäten der MLTCs gegen MAGE-A3 und MAGE-A6 in Assoziation mit HLA-A*0101 und MAGE-A10, Melan-A und NY-ESO-1 in Assoziation mit HLA-A*0201.

4 Generierung und Charakterisierung tumorreaktiver T-Zell-Klone aus MLTC-Responderpopulationen

4.1 Generierung tumorreaktiver T-Zell-Klone

Die D41-MLTCs waren aufgrund der starken Reaktivität gegen Melan-A und NY-ESO-1 für ein Screening der D41-cDNA-Bank ungeeignet, da davon auszugehen war, dass Melan-A und NY-ESO-1 in der Bank überwiegend durch die MLTCs identifiziert werden würden. Aus diesem Grund wurde versucht, verschiedene T-Zell-Klone mittels

Grenzverdünnungsverfahren zu etablieren. Dazu wurde D41-MLTC 2, welche von allen drei MLTCs die höchste Proliferation aufwies, an Tag 27 nach Erststimulation kloniert. Es wurde dabei so vorgegangen, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.7 beschrieben. Aus D41-MLTC 2 wurden 165 T-Zell-Klone isoliert, von denen 21 T-Zell-Klone für weiterführende Untersuchungen etabliert werden konnten. Die T-Zell-Klone wurden vier Tage nach der letzten Stimulation kryokonserviert und für alle weiteren Testungen zwei Tage nach Auftauen und Kultivierung in IL-2-haltigem Medium eingesetzt. Aus D41-MLTC 3 wurden 98 T-Zell-Klone isoliert, von denen 20 T-Zell-Klone für weiterführende Analysen etabliert werden konnten.

Schlussfolgerung:

Von D41-MLTC 2 und von D41-MLTC 3 konnten insgesamt 41 T-Zell-Klone isoliert werden.

4.2 Charakterisierung tumorreaktiver T-Zell-Klone

Die Reaktivität der T-Zell-Klone gegen die autologe Melanomzelllinie und die autologe EBV-B-Zelllinie wurde in IFN- γ -ELISPOT-Assays analysiert (Daten nicht gezeigt). Vierzig der 41 etablierten T-Zell-Klone reagierten im IFN- γ -ELISPOT-Assay gegen die D41-Melanomzellen mit hoher IFN- γ -Freisetzung, ohne spontan IFN- γ freizusetzen. Fünf von insgesamt 41 T-Zell-Klonen erkannten, wenngleich schwächer, auch die autologe EBV-B-Zelllinie, wobei die IFN- γ -Sekretion gegenüber der EBV-B-Zelllinie geringer war als gegenüber der autologen Melanomzelllinie. Bei 37 von 41 T-Zell-Klonen wurde die Erkennung autologer Melanomzellen durch den Antikörper PA2.1 blockiert. Bei den restlichen vier T-Zell-Klonen wurde die Erkennung der autologen Melanomzellen nur durch den Antikörper W6/32 blockiert. Somit waren alle stabil etablierten T-Zell-Klone durch HLA-A*0201 oder HLA-A*0101 restringiert.

Die Antigenspezifität der T-Zell-Klone sollte zuerst anhand des durch D41-MLTC 2 bekannten Antigenspektrums untersucht werden. Im IFN- γ -ELISPOT-Assay (Daten nicht gezeigt) wurden dazu COS-7-Zellen mit der Plasmid-cDNA der im Modell D41 bekannten Antigene und der Plasmid-cDNA des jeweiligen HLA-Moleküls (s. Kapitel 3.2.2) kotransfiziert. Die Antigenspezifität der einzelnen T-Zell-Klone wurde durch die Erkennung der COS-7-Transfektanten bestimmt. **Abbildung C-9** zeigt die Verteilung der Antigenspezifität bei den getesteten T-Zell-Klonen von D41-MLTC 2 und D41-MLTC 3. Dabei wurden folgende Antigenspezifitäten bei den T-Zell-Klonen identifiziert, die bereits in der D41-MLTC 2 nachgewiesen wurden:

- MAGE-A3 in Assoziation mit HLA-A*0101
- MAGE-A6 in Assoziation mit HLA-A*0101
- MAGE-A10 in Assoziation mit HLA-A*0201
- Melan-A in Assoziation mit HLA-A*0201
- NY-ESO-1 in Assoziation mit HLA-A*0201

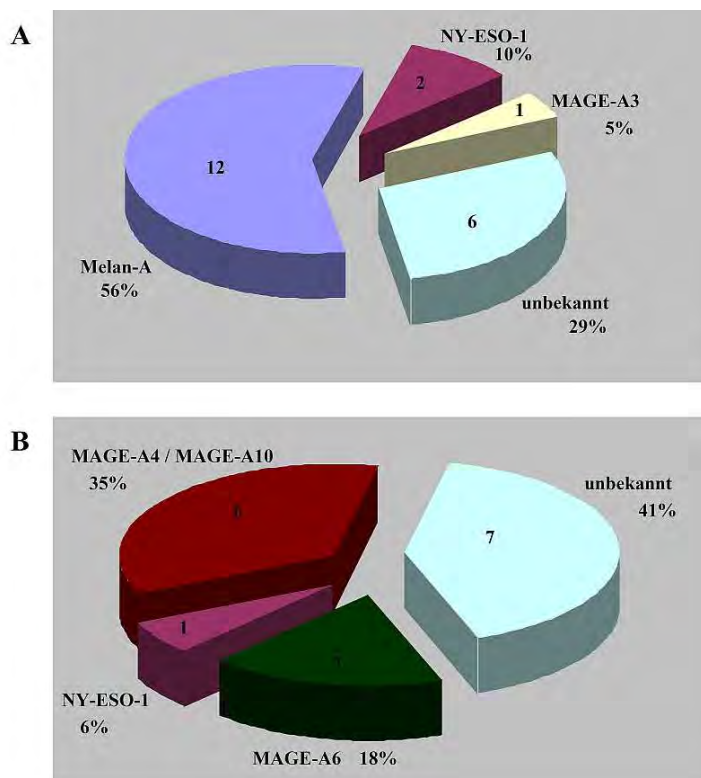


Abb. C-9: Grafik über die Verteilung der Antigenpezifität bei den T-Zellklonen aus D41-MLTC 2 (A) und aus D41-MLTC 3 (B).

T-Zell-Klone, die reaktiv gegen MAGE-A10 in Assoziation mit HLA-A*0201 waren, zeigten ebenfalls Reaktivität gegen MAGE-A4 in Assoziation mit HLA-A*0201. Dreizehn CTL-Klone erkannten kein von D41-MLTC 2 bekanntes, tumorassoziiertes Antigen. Für die Antigene MAGE-A4, MAGE-A10, Melan-A und NY-ESO-1 in Assoziation mit HLA-A*0201 und MAGE-A3 in Assoziation mit HLA-A*0101 sind in der Literatur Peptide beschrieben, die in Verbindung mit diesen HLA-Allelen von CD8⁺-T-Zellen erkannt werden [173-176]. Diese Peptide wurden synthetisiert und im IFN- γ -ELISPOT-Assay auf Erkennung durch die aus D41-MLTC 2 isolierten CTL-Klone oder durch die MLTC überprüft (**siehe Anhang C, D und E**). Mittels Sequenzanalysen und Durchflusszytometrie wurden die TCR-V β -Ketten der aus D41-MLTC 2 stabil etablierten T-Zell-Klone identifiziert. Da die aus D41-MLTC 3 isolierten T-Zell-Klone nur schwach proliferierten, konnten die von ihnen erkannten Peptide und die V β -Ketten des TCRs nicht analysiert werden. **Tabelle C-4** fasst die Peptidspezifität der CTL-Klone aus D41-MLTC 2 zusammen.

Antigen	Peptid	Restriktion	Reaktivität nachweisbar in D41-	Erkennung durch klonale T-Zellen aus D41-MLTC 2	In Erkennung involvierte V β -Ketten
Melan-A	(E)AAGIGILTV	HLA-A*0201	MLTC 1, MLTC 2	12	5.2, 14, 4, 7, 21, unbekannt
NY-ESO-1	SLLMWITQA	HLA-A*0201	MLTC 1, MLTC 2	2	22, unbekannt
MAGE-A4	GVYDGREHTV	HLA-A*0201	MLTC 2	-	unbekannt
MAGE-A10	GLYDGMHL	HLA-A*0201	MLTC 1, MLTC 2	-	unbekannt
MAGE-A3	EVDPIGHL	HLA-A*0101	MLTC 1, MLTC 2	1	unbekannt
MAGE-A6	unbekannt	HLA-A*0101	MLTC 1, MLTC 2	-	unbekannt
unbekannt	unbekannt	HLA-A*0201		6	22, 6, unbekannt

Tab. C-4: Zusammenfassung der Antigenspezifität der etablierten T-Zell-Klone aus der Klonierung von D41-MLTC 2.

Die V β -Ketten 5.2, 14, 22 und 21 konnten auch durch durchflusszytometrische Analysen in D41-MLTC 2 nachgewiesen werden. Die V β 4- und V β 7-Ketten waren in D41-MLTC 2 durch Durchflusszytometrie nicht nachweisbar. Die V β -Kette 6 konnte in D41-MLTC 2 nicht durchflusszytometrisch detektiert werden, da für diese V β -Kette kein Antikörper vorhanden war.

Bei den sechs CTL-Klonen, die kein von D41-MLTC 2 bekanntes tumor-assoziiertes Antigen erkannten, zeigten in der Sequenzanalyse vier CTL-Klone jeweils zwei identische Sequenzen für die variable D-Region der V β -Kette des TCRs. Die D-Region des TCRs der Klone D41-CTL2/62 und 2/152 mit der V β -Kette 22 und die D-Region des TCRs der Klone D41-CTL2/121 und 2/155 mit der V β -Kette 6 waren identisch. Damit waren jeweils zwei dieser CTL-Klone identische Klone (Daten siehe **Anhang F** und **G**). Bei den zwei übrigen CTL-Klonen, D41-CTL2/66 und 2/141, konnten die V β -Ketten des TCRs mittels Durchflusszytometrie und Sequenzanalyse nicht bestimmt werden. **Abbildungen F** und **G** im Anhang zeigen den Vergleich der in der variablen D-Region befindlichen Sequenzen von D41-CTL2/62 und D41-CTL2/152 (**Anhang F**) sowie von D41-CTL 2/121 mit D41-CTL2/155 (**Anhang G**).

Um auszuschließen, dass die T-Zell-Klone spezifisch für ein bekanntes tumor-assoziiertes Antigen waren, welches im MLTC-Paneltest nicht nachgewiesen werden

konnte, wurde die Reaktivität der T-Zell-Klone D41-CTL2/62 mit der V β -Kette 22 und CTL2/155 mit der V β -Kette 6 im IFN- γ -ELISPOT-Assay gegen COS-7-Transfektanten getestet, die mit Plasmid-cDNA von Panelantigenen und HLA-A*0201-cDNA kotransfiziert waren. Die Darstellung des Versuchsaufbaus mit den transfizierten Antigenen gibt **Tab. C-3** (S.86) wieder. Beide CTL-Klone erkannten keine der im Panel vorhandenen Antigene (Daten nicht gezeigt). Beide T-Zell-Klone wurden daher für ein Screening der D41-cDNA-Bank ausgewählt. Die Klone D41-CTL2/66 und 2/141 hingegen konnten nur gegen bereits aus dem Modell D41 bekannte Antigene getestet werden, da diese T-Zell-Klone sich nicht auf höhere Zellzahlen expandieren ließen.

Schlussfolgerung:

Die Mehrzahl der T-Zell-Klone erkannte Antigene des durch den D41-MLTC 2-Paneltest bekannten Antigenspektrums. Die identifizierten Antigenspezifitäten der T-Zell-Klone waren MAGE-A3, MAGE-A6 in Assoziation mit HLA-A*0101 sowie MAGE-A10, Melan-A, NY-ESO-1 in Assoziation mit HLA-A*0201. Dreizehn T-Zell-Klone erkannten keines der von D41-MLTC 2 bekannten Antigene. Sechs dieser dreizehn T-Zell-Klone erkannten ebenfalls kein Antigen des Antigenpaneltests. Zwei T-Zell-Klone wurden für ein Screening der D41-cDNA-Bank ausgewählt.

4.3 Kreuzlyse allogener, partiell HLA-übereinstimmender Tumorzelllinien durch D41-CTL-Klone mit unbekannter Antigenspezifität

Die Kreuzreaktivität der Klone D41-CTL2/62 und 2/155 gegen verschiedene HLA-A*0201-positive Tumorzelllinien, EBV-B-Zelllinien und Leukämien wurde im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Insgesamt 22 Melanom-, vier Kolonkarzinom- und zwei Pankreaskarzinomzelllinien, zehn Leukämien (sechs AMLs, drei CMLs und eine CLL), sieben Nierenzellkarzinom-, eine Leberzellkarzinom- und zwei EBV-B-Zelllinien wurden auf Erkennung durch die beiden CTL-Klone überprüft. D41-CTL2/62 erkannte neben der autologen Melanomzelllinie, die autologe EBV-B-Zelllinie und die allogene Melanomzelllinie MZ9-MEL. **Abbildung C-9** zeigt die Ergebnisse mit D41-CTL2/62 an einem Teil der getesteten Zelllinien.

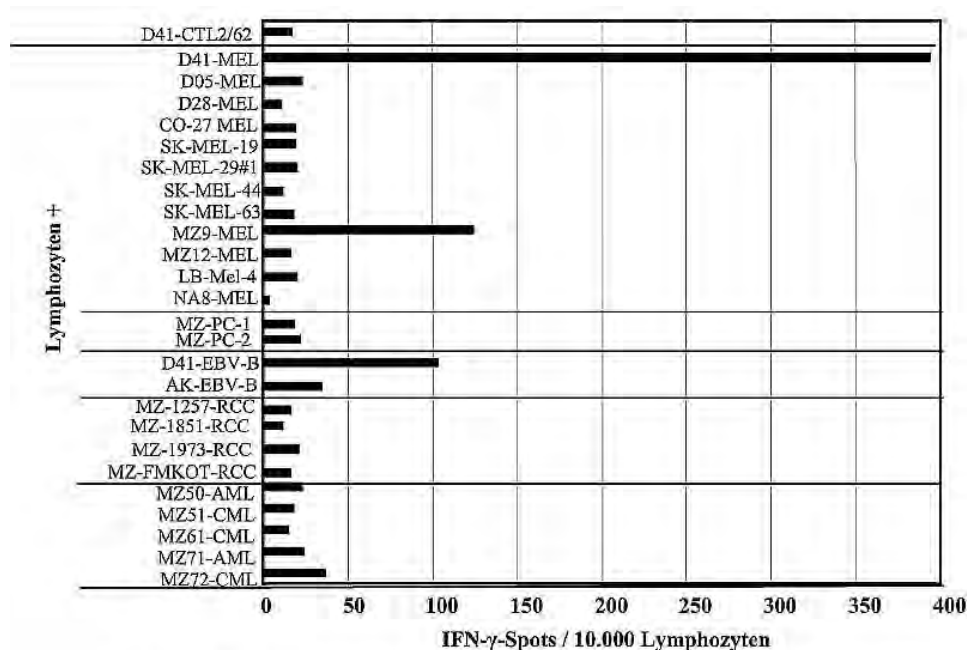


Abb. C-9: Reaktivität von D41-CTL2/62 gegen HLA-A*0201-positive Zelllinien. Der an d4 nach letzter Stimulation kryokonservierte CTL-Klon wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 bei 37°C inkubiert (10.000 Lymphozyten/TE). Die Tumorzelllinien wurden eine Woche vor Test aufgetaut, kultiviert und mit 50.000 Zellen/TE eingesetzt. Die Leukämien wurden einen Tag vor dem Test aufgetaut und ebenfalls mit 50.000 Zellen/TE eingesetzt. Die EBV-B-Zelllinien wurden mit 75.000 Zellen/TE eingesetzt. Die Durchführung des IFN-γ-ELISPOT-Assays erfolgte, wie bei Material und Methoden unter Punkt 2.1.10 angegeben.

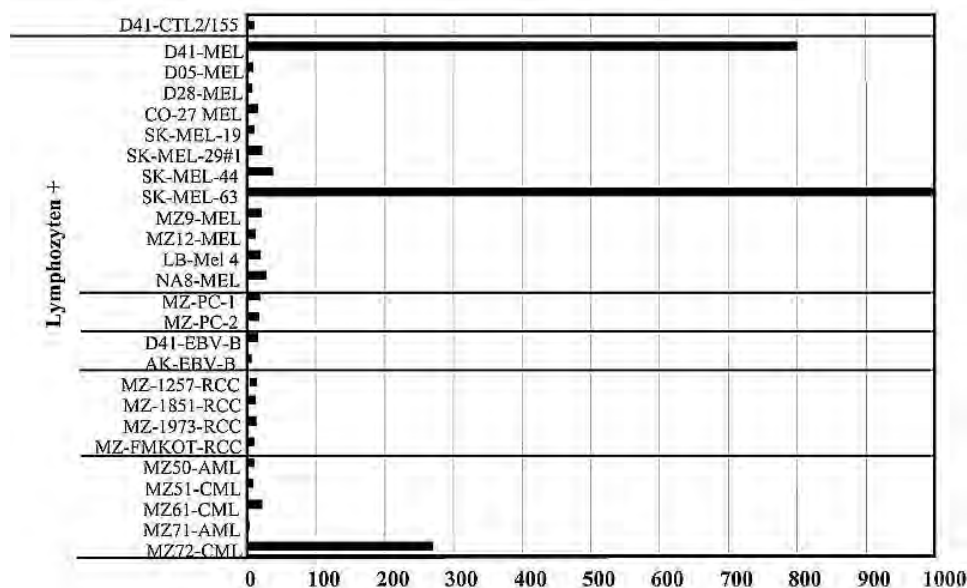


Abb. C-10: Reaktivität von D41-CTL2/155 gegen HLA-A*0201-positive Zelllinien. Der an d4 nach letzter Stimulation kryokonservierte CTL-Klon wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 inkubiert (eingesetzt mit 10.000 Lymphozyten/TE). Die Tumorzelllinien wurden eine Woche vor Test aufgetaut, kultiviert und mit 50.000 Zellen/TE eingesetzt. Die Leukämien wurden einen Tag vor dem Test aufgetaut und ebenfalls mit 50.000 Zellen/TE eingesetzt. Die EBV-B-Zelllinien wurden mit 75.000 Zellen/TE eingesetzt. Die Durchführung des IFN-γ-ELISPOT-Assays erfolgte, wie bei Material und Methoden unter Punkt 2.1.10 angegeben.

D41-CTL2/155 erkannte neben der autologen Melanomzelllinie, sehr stark die Melanomzelllinie SK-MEL-63 und die Leukämie MZ72-CML, jedoch nicht autologe EBV-transformierte B-Zellen. **Abbildung C-10** zeigt die Ergebnisse mit D41-CTL2/155 an einem Teil der getesteten Zelllinien.

Schlussfolgerung:

Die für das Screening der D41-cDNA-Bank ausgewählten CTL-Klone D41-CTL2/152 und 2/155 erkennen neben der autologen Melanomzelllinie, noch andere allogene HLA-A*0201-positive Zelllinien.

5 cDNA-Expressionsklonierung mit klonalen T-Zellen

Die CTL-Klone D41-CTL2/62 und D41-CTL2/155, welche bislang unbekannte Antigene in Assoziation mit HLA-A*0201 erkannten, wurden auf hohe Zellzahlen expandiert und für ein Screening der aus D41-Melanomzellen konstruierten cDNA-Bank eingesetzt.

5.1 D41-cDNA-Bank-Screening mit D41-CTL-Klonen

Um die Zielstrukturen der genetisch identischen T-Zell-Klone D41-CTL2/62 und CTL2/152 bzw. der genetisch identischen T-Zell-Klone D41-CTL2/155 und CTL2/121 zu identifizieren, wurde die D41-cDNA-Bank (Ansatz LRIV von BPassayII, siehe Material und Methoden Punkt **2.2.18** und **2.2.19**) in cDNA-Pools zu 100 Klonen je Testeinheit einer Mikrotiterplatte aufgeteilt. Insgesamt wurden auf diese Weise 14 Platten für das cDNA-Bank-Screening hergestellt (entsprechen $1,4 \times 10^5$ cDNA-Klonen). Die cDNA in diesen Platten und HLA-A*0201-Plasmid-cDNA wurden mit Hilfe von Lipofectamine 2000™ in COS-7-Zellen kotransfiziert. 20.000 COS-7-Zellen pro Testeinheit wurden mit 100 ng HLA-Plasmid-cDNA und ungefähr 300 ng Plasmid-cDNA der 100er Pools, d.h. pro cDNA-Klon ungefähr 3 ng Plasmid-cDNA, kotransfiziert. Nach 20 Stunden wurden die COS-7-Transfektanten im IFN- γ -ELISPOT-Assay auf Erkennung durch die T-Zell-Klone D41-CTL2/152 und CTL2/155 überprüft. Dazu wurden die T-Zell-Klone gepoolt, pro T-Zell-Klon und Testeinheit 10.000 Zellen eingesetzt und für weitere 20 Stunden mit den COS-7-Transfektanten koinkubiert. In einem zweiten Schritt wurden die potentiell positiven cDNA-Pools, bei denen die IFN- γ -Freisetzung der CTL-Klone um das zweifache höher war als gegenüber den nur mit HLA-Plasmid-DNA transfizierten COS-7-Zellen, separat auf Erkennung durch die beiden CTL-Klone im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Dabei zeigte sich, dass das Screening mit D41-CTL2/155 nicht zur Identifizierung eines antigenkodierenden cDNA-Klons führte. Die Antigenspezifität von D41-CTL2/155 konnte somit nicht ermittelt werden.

Hingegen war das Screening mit D41-CTL2/152 erfolgreich. Im Screening und auch in der Bestätigung des Screening (Daten nicht gezeigt), bei dem D41-CTL2/152 auf die COS-7-Transfektanten mit den im Screening positiven 100er Pools reagierte, wurde der 100er Pool #218 (**Abb. C-11 A**) mit knapper Spotzahl über Hintergrund durch das „computer associated video image analysis“-Verfahren (CVIA) als positiv identifiziert. Die Bakterien dieses als Glycerolstock eingefrorenen 100er Pools wurden neu ausgestrichen und die Kolonien zu Pools mit jeweils zehn Kolonien zusammengefasst.

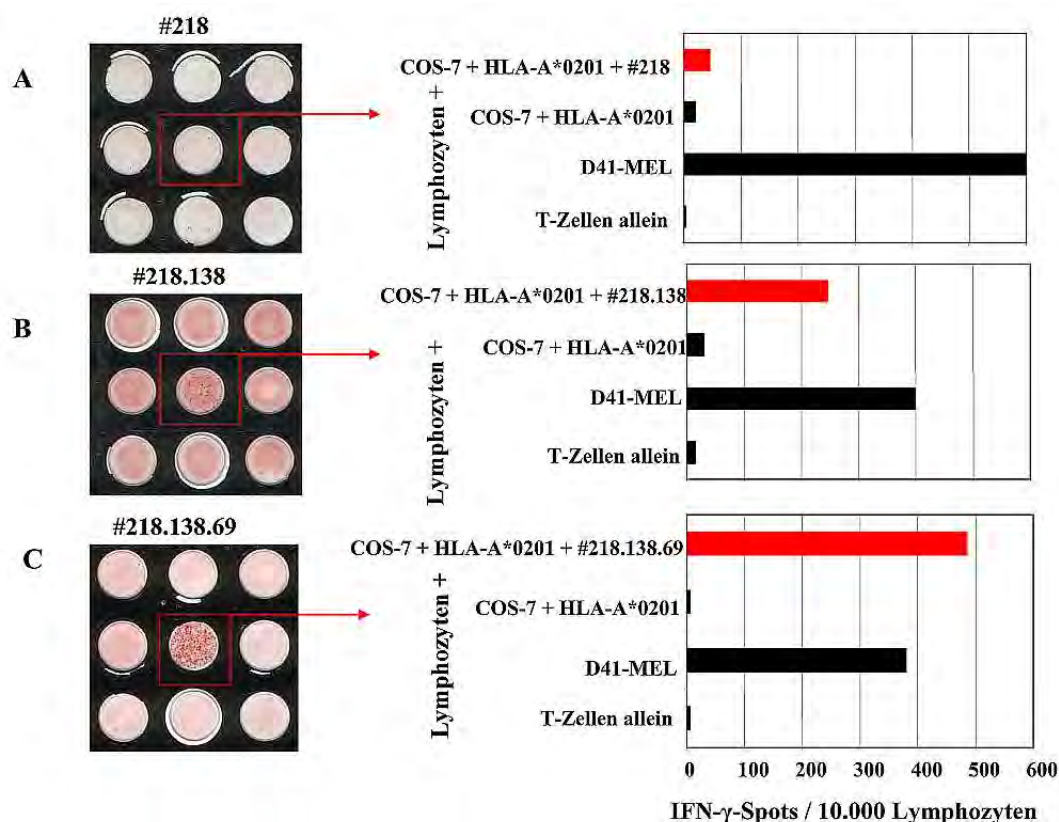


Abb. C-11: Identifizierung des von D41-CTL2/152 erkannten cDNA-Klons aus der D41-cDNA-Bank. Als APCs wurden COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) kotransfiziert mit den cDNA-Pools und HLA-A*0201.

A: Ausschnitt aus der ELISPOT-Platte mit den getesteten 100er-Pools #201-296. Ergebnis des Pools #218 im Vergleich zu den Kontrollen

B: Ausschnitt aus der ELISPOT-Platte mit den getesteten 10er-Pools, die aus Pool #218 hergestellt wurden. Ergebnis des Pools #218.138 im Vergleich zu den Kontrollen

C: Ausschnitt aus der ELISPOT-Platte mit den getesteten Klonen, die aus dem 10er-Pool # 218.138 hergestellt wurden. Ergebnis des cDNA Klons 218.138.69 im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Durchführung des IFN- γ -ELISPOT-Assays erfolgte, wie bei Material und Methoden unter Punkt 2.1.9 und 2.1.10 angegeben.

Die Plasmide der 10er Pools wurden wieder mit HLA-A*0201-cDNA in COS-7-Zellen kotransfiziert und mit D41-CTL2/152 im IFN- γ -ELISPOT-Assay auf Erkennung überprüft. Sieben von den insgesamt 192 aus dem 100er Pool #218 generierten und getesteten 10er Pools induzierten T-Zellerkennung. Von dem 10er Pool #218.138 (**Abb. C-11 B**) wurden 96 Einzelkolonien separiert und die Plasmid-cDNA dieser Einzelkolonien nach Transfektion auf Erkennung durch D41-CTL2/152 überprüft. Insgesamt neun Einzelkolonien induzierten Erkennung in Assoziation mit HLA-*0201. Eine Überprüfung der

Plasmid-DNA dieser Einzelkolonien mittels Restriktions-hydrolyse (**Anhang H**) zeigte, dass die neun Plasmide cDNA-Inserts derselben Basenlänge integriert hatten. Der cDNA-Klon #218.138.69 wurde für weitere Analysen verwendet (**Abb. C-11 C**).

Schlussfolgerung:

Das Screening der D41-cDNA-Bank mit D41-CTL2/155 führte nicht zu der Identifizierung eines antigenkodierenden cDNA-Klons. Die Antigenspezifität von D41-CTL2/155 konnte nicht ermittelt werden. Das Screening der D41-cDNA-Bank mit D41-CTL2/152 führte dagegen zu der Identifizierung des antigenkodierenden cDNA-Klons #218.138.69.

5.2 Sequenzidentifizierung eines antigenkodierenden cDNA-Klons

Die Sequenzierung der Plasmid-cDNA des cDNA-Klons #218.138.69 sowie ein anschließender Datenbank-Vergleich ergab, dass das cDNA-Insert für das Protein TSPY 1 kodierte (NCBI-Datenbankeinträge: XM_001126486, NM_003308 und NM_22573). Bei Vergleich mit den Datenbankeinträgen enthielt der cDNA-Klon #218.138.69 einen am 5'-Ende um 55 Nukleotiden verkürzten „*open reading frame*“ (ORF) und eine von den Datenbanksequenzen an wenigen Positionen abweichende untranslatierte 3'-Region. Der cDNA-Klon #218.138.69 kodierte für 267 Aminosäuren des TSPY 1-Proteins, das in vollständiger Länge 308 Aminosäuren umfasst [177;178]. Die Sequenz des ORFs vom cDNA-Klon #218.138.69 (**Anhang I**) war bis auf einen Basenaustausch an Position 948 (G → A) und der Deletion am 5'-Ende identisch zu der bei NCBI veröffentlichten Sequenz (XM_001126486). Der Basenaustausch führt zu einer stillen Mutation und trotz der Deletion war in der Sequenz des cDNA-Klons ein Startcodon vorhanden, das zumindest theoretisch zu einer „*in frame*“-Transkription führen konnte. In dem nicht translatierten 3'-Bereich unterschied sich die Sequenz des cDNA-Klons zu der veröffentlichten Sequenz XM_001126486 in folgenden Punkten:

- an Basenposition 1065 befand sich eine Insertion von Thymidin,
- an Basenposition 1109 eine Deletion von Adenin.

Das Gen TSPY 1 liegt auf dem Y-Chromosom und gehört zu einer heterogenen Genfamilie. Mehrere Genkopien von TSPY 1 sind auf sechs Orten des Y-Chromosoms lokalisiert. Die meisten Genkopien befinden sich dabei in der kritischen Region des Gonadoblastoma-Locus des Y-Chromosoms, welcher für die Entstehung des Gonadoblastoms verantwortlich gemacht wird [177-180].

Schlussfolgerung:

Der durch D41-CTL2/152 identifizierte antigenkodierende cDNA-Klon #218.138.69 kodiert für 267 Aminosäuren des TSPY 1-Proteins, das in vollständiger Länge 308 Aminosäuren umfasst.

5.3 Peptididentifizierung

Um die peptidkodierende Genregion von TSPY 1 zu identifizieren, wurden unterschiedlich lange TSPY 1-cDNA-Fragmente durch PCR amplifiziert und in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO kloniert. Der sense-Primer für die PCR-Amplifikation enthielt dabei das ATG-Translationsstartcodon, das im cDNA-Klon #218.138.69 durch Sequenzanalyse mit Datenbankabgleich identifiziert worden war. Dieser mit TSPY-69_sense bezeichnete Primer wurde in verschiedenen PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Antisense-Primern kombiniert, die in 3' → 5'-Richtung eingerückt und mit Stopcodons „in frame“ am Ende versehen waren. Als „template“ für die PCR-Reaktionen wurde der cDNA-Klon #218.138.69 in pcDNA3.1/DEST.#6 verwendet. **Abbildung C-12** zeigt das Schema der angewandten Fragmentierungsstrategie.

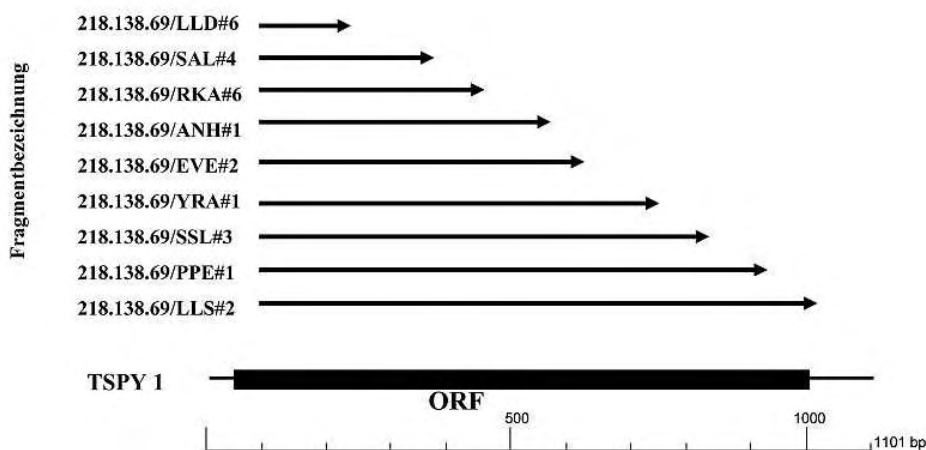


Abb. C-12: Schema der Fragmentierungsstrategie zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region von #218.138.69 (TSPY 1). Die Durchführung der Genfragmentierung erfolgte, wie bei Material und Methoden unter Punkt 2.2.16 angegeben. Die Primerbezeichnungen und -sequenzen sind in Material und Methoden unter Punkt 1.8.5 zu finden.

Die Fragmentklone wurden genauso wie die Antisense-Primer nach den letzten drei C-terminalen Aminosäuren bezeichnet. Insgesamt wurde der cDNA-Klon #218.138.69 mit einer Basenlänge von 1101 bp in neun Fragmente von unterschiedlicher Länge unterteilt. Die klonierten Plasmide wurden sequenziert, um PCR-Artefakte auszuschließen und die

Orientierung der Inserts zu überprüfen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA zusammen mit HLA-A*0201 in COS-7-Zellen transfiziert. Die Transfektanten wurden auf Erkennung der TSPY 1-Fragmente durch D41-CTL2/62 überprüft. **Abbildung C-13** zeigt die Testung der Fragmente auf Erkennung durch D41-CTL2/62. Nur das kürzeste Fragment wurde nicht von D41-CTL2/62 erkannt. Die peptidkodierende Region bzw. deren 3'-Ende befand sich zwischen Nukleotidposition 164 und 287 des ORF des cDNA-Klons #218.138.69.

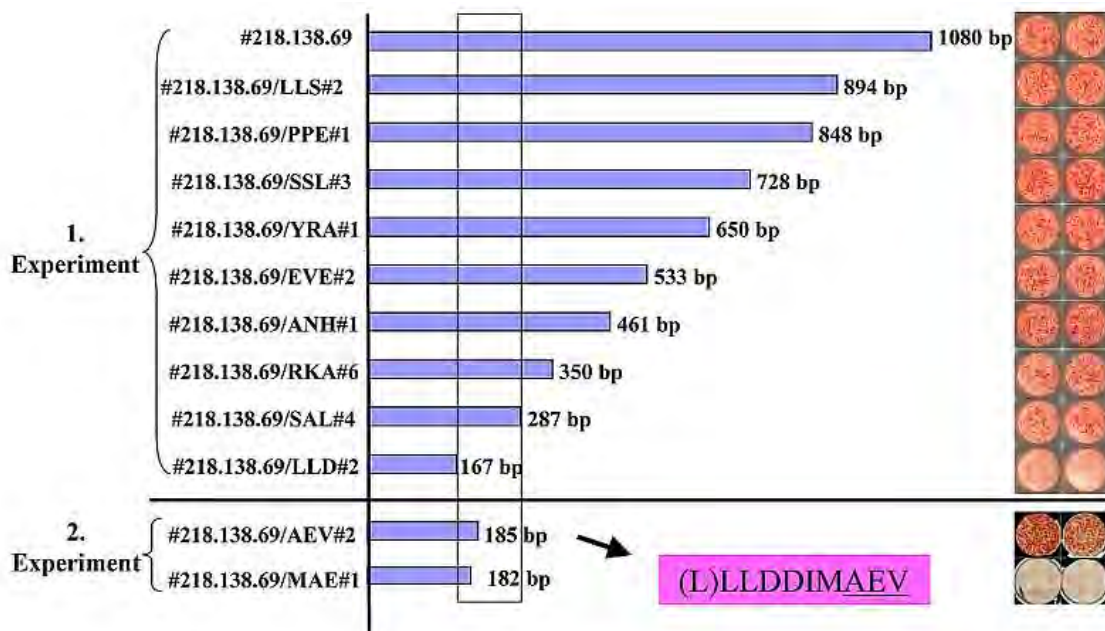


Abb. C-13: Identifizierung der peptidkodierenden Region von TSPY 1. Die Plasmid-cDNA der klonierten Fragmente wurde mit HLA-A*0201 in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) kotransfiziert. Als Effektorzellen wurden 10.000 Zellen von D41-CTL2/62 pro TE eingesetzt. Die Balkengrafik stellt die unterschiedlichen Fragmentlängen dar. Die Durchföhrung des IFN- γ -ELISPOT-Assays erfolgte, wie bei Material und Methoden unter Punkt 2.1.9 und 2.1.10 angegeben.

Für die Vorhersage von HLA-A*0201-bindenden Peptiden wurde ein im Internet frei verfügbarer Algorithmus (www.syfpepithi.de) verwendet. Die genetisch kodierte Aminosäuresequenz der eingegrenzten Region wurde nach Bindungsmotiven für HLA-A*0201 in neun oder zehn Aminosäuren langen Peptiden untersucht. Als wahrscheinlichste HLA-A*0201-bindende Peptide in dieser Region wurden LLLDDIMAEV (10mer, Aminosäureposition 65-73 des vollständigen ORF von TSPY 1) und LLDDIMAEV (9mer, Aminosäureposition 66-73 des vollständigen ORF von TSPY 1) vorhergesagt.

In einem nächsten Schritt wurden ausgehend von dem Fragment SAL zwei weitere Fragmente hergestellt, die mit der Aminosäure Valin (V, kodiert von Codon 32 des ORF von #218.138.69) bzw. Glutaminsäure (E, kodiert von Codon 31 des ORF von #218.138.69) vor einem Stopkodon endeten. Diese beiden Subfragmente wurden nach Verifizierung der Sequenz ebenfalls im IFN- γ -ELISPOT-Assay auf Erkennung durch den T-Zell-Klon D41-CTL2/62 getestet (**Abb. C-13** unten). Daraus ergab sich, dass Valin (V)

an Position 73 des kompletten ORF von TSPY 1 für die T-Zellerkennung unverzichtbar war und somit wahrscheinlich den C-Terminus des gesuchten Peptids darstellte.

Schlussfolgerung:

Das 3'-Ende der peptidkodierenden Region von TSPY 1 konnte durch Genfragmentierung auf die Region zwischen Nukleotidposition 164 und 287 des ORF des cDNA-Klons #218.138.69 eingegrenzt werden. Durch einem im Internet frei verfügbaren Algorithmus wurden als wahrscheinlichste HLA-A*0201-bindende Peptide in dieser Region das 10mer-Peptid LLLDDIMAEV und das 9mer-Peptid LLDDIMAEV vorhergesagt. Eine weitere Eingrenzung mit Fragmenten, die auf die letzte bzw. vorletzte Aminosäure dieser Peptide endeten, ergab, dass Valin (V) an Position 73 des kompletten ORF von TSPY 1 für die T-Zellerkennung unverzichtbar war und somit wahrscheinlich den C-Terminus des gesuchten Peptids darstellte.

5.4 Peptidtestung

Das 9mer-Peptid von TSPY 1 mit der Sequenz LLDDIMAEV (TSPY 1₆₆₋₇₃) und das 10mer-Peptid LLLDDIMAEV (TSPY 1₆₅₋₇₃) wurden synthetisiert und im IFN- γ -ELISPOT-Assay auf Erkennung durch D41-CTL2/62 getestet (Daten nicht gezeigt).

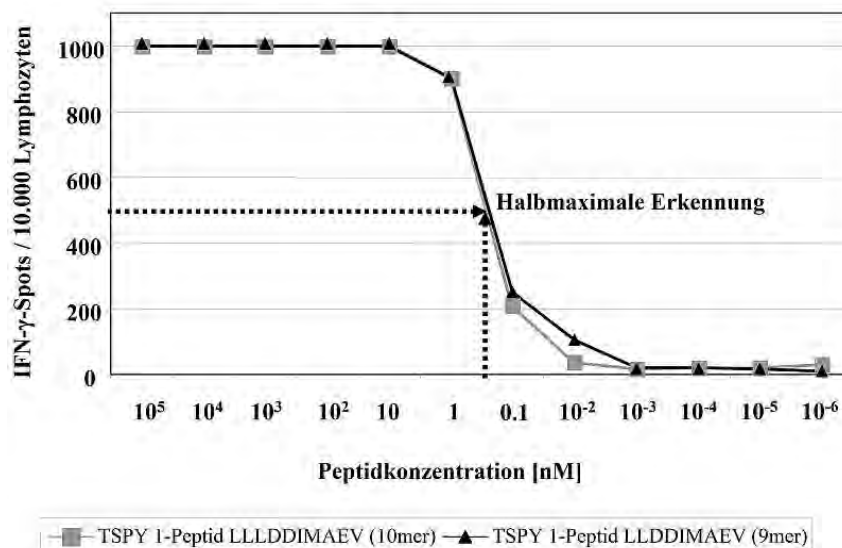


Abb. C-14: Titration der TSPY 1-Peptide im IFN- γ -ELISPOT-Assay mit D41-CTL2/62. Der an d4 nach letzter Stimulation kryokonservierte CTL-Klon wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 bei 37°C inkubiert (10.000 Lymphozyten/TE). Autologe, peptidbeladene EBV-B-Zellen wurden mit 75.000 Zellen pro Testeinheit als APCs eingesetzt. Die Durchführung des IFN- γ -ELISPOTassays erfolgte, wie bei Material und Methoden unter Punkt 2.1.13 angegeben.

Abb. C-14 zeigt, dass beide Peptide etwa gleich gut erkannt werden. Die halbmaximale Erkennung des CTL-Klons wurde für beide Peptide bei Konzentrationen zwischen 1 und

0,1 ng/ml erreicht. In nachfolgenden Experimenten wurde überwiegend das Nonamer (LLD) eingesetzt.

Die Erkennung des Peptids LLDDIMAEV durch D41-CTL2/62 wurde auch im Zytotoxizitätstest überprüft (**Abb. C-15**). Die halbmaximale Lyse lag nahe bei einer Peptidkonzentration von 1 pM. Autologe, mit dem an HLA-A*0201 bindenden CMV-Peptid NLVPMVATV beladene und auch unbeladene EBV-B-Zellen wurden nicht lysiert (Daten nicht gezeigt).

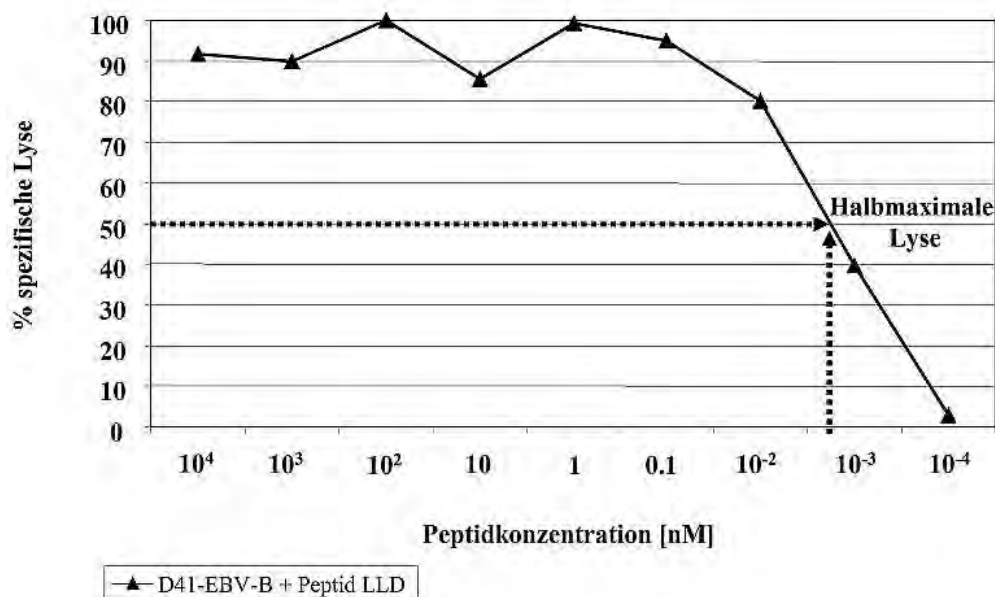


Abb. C-15: Lyse autologer, peptidbeladener EBV-B-Zellen durch D41-CTL2/62. EBV-B-Zellen (2000/TE) wurden nach Vorinkubation mit W6/32 chromiert und mit dem TSPY 1-LLD-Peptid in den angegebenen Konzentrationen beladen. Effektorzell- zu Targetzell-Verhältnis war 10:1. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Die Durchführung des Zytotoxizitätstestes erfolgte, wie bei Material und Methoden unter Punkt 2.1.12 und 2.1.13 angegeben.

Die Reaktivität der D41-MLTC 1 und 2 gegen TSPY 1 und beide TSPY 1-Peptide wurde ebenfalls überprüft. Dazu wurden 293T-Zellen transfiziert mit der Plasmid-DNA für HLA-A*0201 und mit den Peptiden beladen oder mit Plasmid-DNA vom cDNA-Klon #218.138.69 kotransfiziert. Anschließend wurden die Transfektanten auf Erkennung durch D41-MLTC 1 und 2 im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet. Die Reaktivität gegen die TSPY 1-Peptide war bei beiden D41-MLTCs vorhanden. Die Erkennung der mit den TSPY 1-Peptiden beladenen 293T-Zellen war bei D41-MLTC 2 stärker als bei D41-MLTC 1. Eine Reaktivität gegenüber den mit TSPY 1-Plasmid-DNA transfizierten 293T-Zellen war allerdings nur schwach in D41-MLTC 2 vorhanden (**Anhang E**).

Schlussfolgerung:

Der CTL-Klon D41-CTL2/62 zeigte starke Reaktivität gegen die TSPY 1-Peptide LLLDDIMAEV und LLDDIMAEV. Im IFN- γ -ELISPOT-Assay lag dabei die halbmaximale Erkennung des CTL-Klons für beide Peptide bei Konzentrationen zwischen 1 und 0,1 ng/ml. Die halbmaximale Lyse durch den CTL-Klon im Zytotoxizitätstest wurde bei einer Peptidkonzentration von 1 pM. erreicht. Eine Reaktivität der D41-MLTCs 1 und 2 gegen die TSPY 1-Peptide konnte im IFN- γ -ELISPOT-Assay ebenfalls nachgewiesen werden.

6 Expression des Antigens TSPY 1

TSPY 1, das „*testis specific protein Y-encoded*“, wird in fötalem und adulten Hodengewebe exprimiert, vor allem in Spermatogonien, Spermatozyten und der Basal lamina der Samenkanälchen [178;181;182]. In malignem Gewebe wurde es ebenfalls in Gonadoblastomen, testikulären Karzinomen wie z.B. Seminomen, in Prostatakarzinomen, Leberzellkarzinomen und Melanomen nachgewiesen [177;182-185]. TSPY 1 ist im Zytoplasma lokalisiert [181;184].

6.1 Expression von TSPY 1 in der Melanomzelllinie D41-MEL

Der T-Zell-Klon D41-CTL2/62 wies eine hohe Affinität zu dem HLA-A*0201-präsentierten Peptid von TSPY 1 auf und erkannte Zellen, die mit TSPY 1-cDNA transfiziert waren. Es wurde überprüft, ob die autologen Melanomzellen ebenfalls von dem T-Zell-Klon D41CTL2/62 erkannt wurden. Als Kontrolle wurden autologe EBV-B-Zellen eingesetzt. Wie aus **Abb. C-18** hervorgeht, wurden weder die Melanom- noch die EBV-B-Zellen auch bei hohem Effektorüberschuss kaum lysiert. Dies stand im Widerspruch zu der hohen Lyse von peptidbeladener, autologer EBV-B-Zellen (durchgeführter Test, s. **Abb. C-15**). Die Ursache für diese Diskrepanz wurde im Folgenden analysiert.

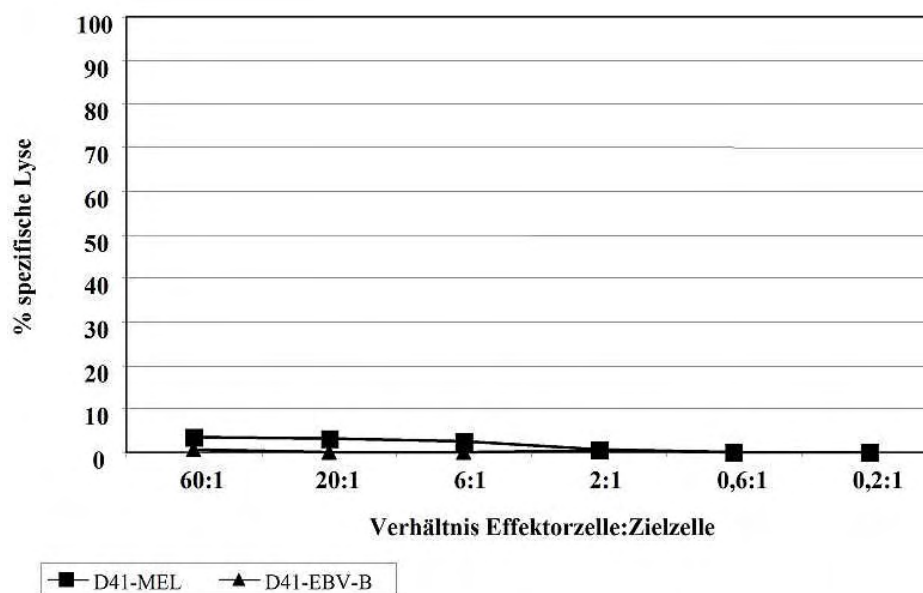


Abb. C-18: Erkennung von autologen Melanomzelllinien und EBV-B-Zellen durch D41-CTL2/62 im ^{51}Cr -Freisetzungstest. Targetzellen waren die autologe Melanomzelllinie D41-MEL und die autologe EBV-B-Zelllinie (2000 Zellen/TE). D41-CTL2/62-Lymphozyten wurden in den angegebenen Verhältnissen eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.12 beschrieben.

Zunächst wurde die Expression von TSPY 1 in der Zelllinie D41-MEL verifiziert. Mit Hilfe eines aus der Maus stammenden, gegen TSPY 1-gerichteten, monoklonalen IgG-Antikörpers (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Lau, Department of Medicine, VA Medical Center, University of California in San Francisco) wurden die D41-MEL-Zellen indirekt angefärbt. **Abbildung C-19** ist eine grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse. Die Analyse zeigte, dass der Anteil TSPY 1-exprimierender Zellen in der Melanomzelllinie D41-MEL bei 27,24% lag. Die Negativkontrolle mit IgG1 lag bei 0,19%. Eine unspezifische, intrazelluläre Bindung der IgG-Antikörper in D41-MEL konnte somit ausgeschlossen werden. Zwar korrelierte das Ergebnis mit der geringen Lyse von D41-MEL durch D41-CTL2/62, aber die Lyse der Melanomzelllinie war geringer als es der Anteil TSPY 1-exprimierender Zellen in der Zelllinie vermuten ließ.

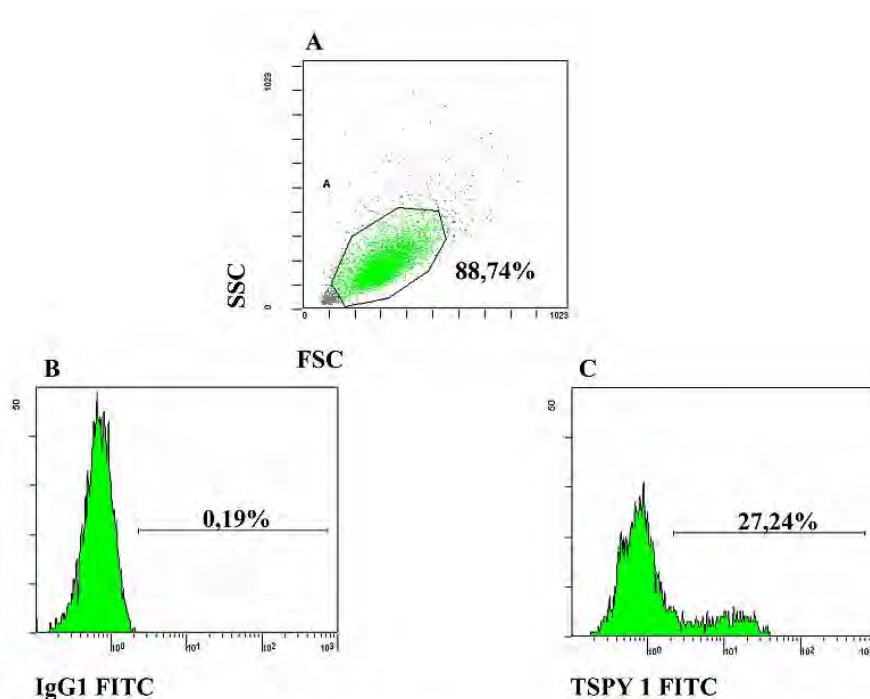


Abb. C-19: Durchflusszytometrische Analyse der TSPY 1-Expression in D41 Melanomzellen. Indirekte, intrazelluläre Färbung der Melanomzellen (**A**) mit Mouse-anti-IgG1- + Goat-anti-mouse-FITC-Antikörper (**B**) und mit Mouse-anti-TSPY 1- (1:2000) + Goat-anti-mouse-FITC-Antikörper (**C**). Die Durchführung der Durchflusszytometrie erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.14 angegeben.

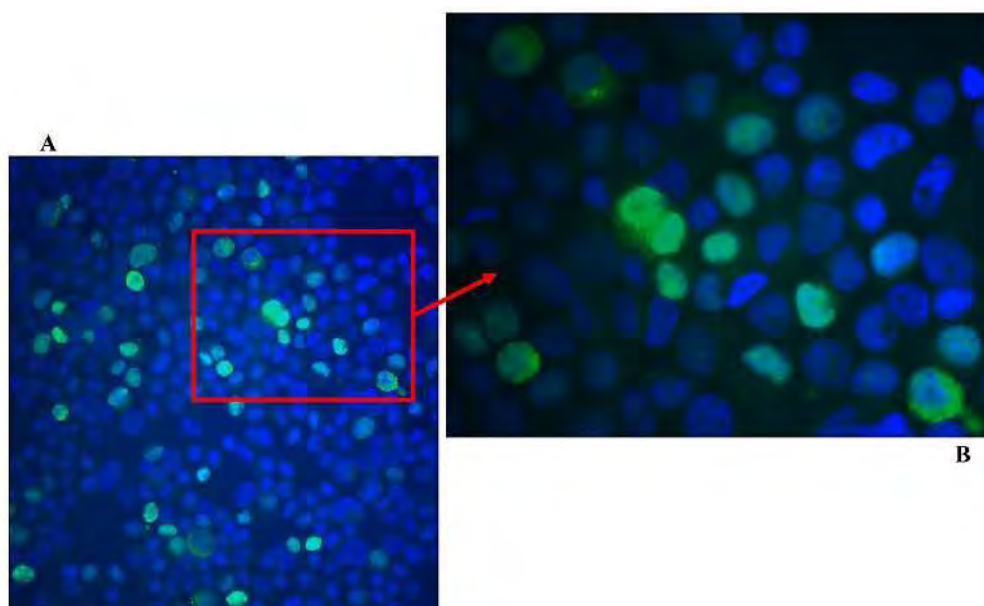


Abb. C-20: Cytospinfärbung von D41-MEL-Zellen. D41-MEL wurde indirekt, intrazellulär gefärbt mit Mouse-anti-TSPY 1- (1:2000) + Goat-anti-mouse-Alexa[®]fluor488-Antikörper (1:200). Die Zellen wurden mit Vectashield[®] Mounting Medium + DAPI eingedeckt. Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.14 angegeben.

Um einzelne TSPY 1-exprimierende Tumorzellen darzustellen, wurden die D41-Melanomzellen für immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen auf Objektträgern angefärbt. Die immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme ist in **Abb. C-20** dargestellt. Diese zeigt, dass TSPY 1 in einer Subpopulation der D41-Melanomzellen stark exprimiert wurde, während in anderen D41-Melanomzellen TSPY 1 nicht exprimiert wurde. Die

Nuklei der Zellen waren durch DAPI blau gefärbt und dadurch eindeutig vom Zytoplasma abzugrenzen. TSPY 1, durch Goat-anti-mouse-Alexa[®] fluor488-Antikörper grün gefärbt, war hauptsächlich im kernnahen Zytoplasma lokalisiert. Eine Lokalisation von TSPY in den Nuklei der Zellen war nicht sichtbar. Bei einer Überprüfung der TSPY 1-Expression in der Melanomzelllinie D41-MEL über den Zeitraum von acht Wochen blieb der Anteil TSPY 1-exprimierender Zellen konstant (Daten siehe **Anhang J**). Um herauszufinden, ob einzelne Zellen TSPY 1 stabil exprimierten bzw. ob die Expression von TSPY 1 in einzelnen Zellen bspw. abhängig von der Zellzyklusphase schwankte, wurde die Melanomzelllinie D41-MEL in einem Grenzverdünnungsverfahren kloniert.

Schlussfolgerung:

Die Lyse der autologen Melanomzellen durch D41-CTL2/62 ist stark vermindert. Ein möglicher Grund könnte sein, dass nur 27% der Zellen in der Melanomzelllinie TSPY 1 exprimieren. Die Cytospinfärbung zeigte einen Anteil an Zellen in der Melanomzelllinie, der TSPY 1 sehr stark exprimiert, während andere Zellen TSPY 1 gar nicht exprimierten. In der Zelle war TSPY 1 hauptsächlich im kernnahen Zytoplasma lokalisiert.

6.2 Klonierung der Melanomzelllinie D41-MEL

Die Zelllinie D41-MEL wurde in einem Grenzverdünnungsverfahren kloniert. Diese Klone sollten dann auf Erkennung durch den TSPY 1-spezifischen Klon D41-CTL2/62 und auf die TSPY 1-Expression getestet werden. Für die Klonierung wurde die Zellzahl so verdünnt, dass in sechs 96-Loch-Flachbodenplatten statistisch eine Zelle pro Loch und in sechs weiteren 96-Loch-Flachbodenplatten statistisch 0,3 Zelle pro Loch kultiviert wurde. Bei einer Klonierungseffizienz von 100% sollte jede Zelle einen Klon ergeben, wobei dann mit einer Ausbeute pro Platte von 96 Klonen bei einer Zelle pro Loch und 29 Klonen bei 0,3 Zelle pro Loch zu rechnen wäre. Allerdings ist eine Klonierungseffizienz von 100% in der Realität häufig nicht der Fall. Die Wahrscheinlichkeit, dass die proliferierten Klone jeweils monoklonal sind, ergibt sich aus der Poisson-Verteilung (siehe Material und Methoden **2.1.6**). Die Anzahl der Klone mit einer Zelle pro Loch lag zwischen 21 und 39 Klonen pro Platte. Die Klonierungseffizienz betrug 28% bei einer Zelle pro Loch und die Klonalitätswahrscheinlichkeit lag bei 58%. Aufgrund der geringen Klonalitätswahrscheinlichkeit bei einer Zelle pro Loch wurden die Klone ausgewählt, die auf den Platten mit 0,3 Zelle pro Loch gewachsen waren. Hierbei beträgt die Klonalitätswahrscheinlichkeit 86%. Bei den sechs Flachbodenplatten mit statistischen 0,3 Zelle pro Loch waren innerhalb von vier Wochen 27, 22, 17, 16 bzw. zwölf Klone pro Platte

gewachsen. Von den insgesamt 94 gewachsenen Klonen wären statistisch 81 Klone klonal und die restlichen 13 Klone bi- oder oligoklonal. Die Klonierungseffizienz lag mit 54% doppelt so hoch wie bei den Platten mit einer Zelle pro Loch. Somit sind von den 94 gewachsenen Klonen wahrscheinlich 26 Klone bi- oder oligoklonal. Insgesamt wurden 29 Klone expandiert und kryokonserviert, von denen statistisch acht Klone bi- oder oligoklonal gewesen sein konnten.

Schlussfolgerung:

Es konnten 29 Klone von der Melanomzelllinie D41-MEL isoliert, expandiert und kryokonserviert werden, von denen statistisch acht Klone bi- oder oligoklonal gewesen sein konnten.

6.3 Expression von TSPY 1 in D41-MEL-Klonen

Sechs Wochen nach Ansetzen der Klonierung und zweifacher Passagierung wurden 29 Klone von D41-MEL im IFN- γ -ELISPOT-Assay auf Erkennung durch D41-CTL2/62 und die Expression von TSPY 1 in den Zellen bei ausgewählten D41-MEL-Klonen durch indirekte, intrazelluläre Färbung überprüft. Alle Melanomzellklone wurden im IFN- γ -ELISPOT-Assay erkannt, zum Teil allerdings sehr schwach. Eine Spontanfreisetzung durch die Melanomzellklone im IFN- γ -ELISPOT-Assay erfolgte nicht. 34% der Klone (zehn von 29) wurden stärker erkannt als die Melanomzelllinie D41-MEL. **Abbildung C-21** zeigt die Erkennung ausgewählter Melanomzellklone im IFN- γ -ELISPOT-Assay und deren TSPY 1-Expression in der Durchflusszytometrie. Die TSPY 1-Expression der Melanomzellklone variierte sehr stark und korrelierte eindeutig mit ihrer Erkennung durch den CTL2/62 im IFN- γ -ELISPOT-Assay. Die Melanomzellklone unterschieden sich untereinander und im Vergleich zu D41-MEL nicht hinsichtlich der HLA-A*0201-Expression (durchflusszytometrische Daten nicht gezeigt). Sie lag bei den Klonen und der autologen Melanomzelllinie zwischen 70 – 95%.

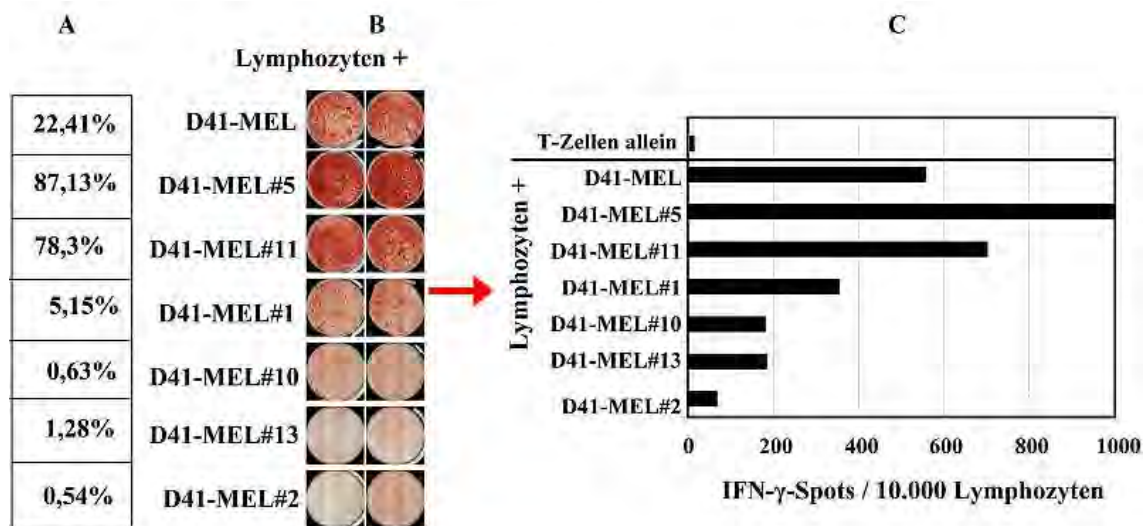


Abb. C-21: Erkennung ausgewählter D41-Melanomzellklone im IFN- γ -ELISPOT-Assay und der TSPY 1-Expression in der Durchflusszytometrie. **(A)** Prozent an TSPY 1-positiven Zellen der D41-MEL-Klone in der durchflusszytometrischen Analyse. **(B)** Im IFN- γ -ELISPOT-Assay wurden die D41-MEL Klone auf Erkennung durch D41-CTL2/62 getestet. Der an d4 kryokonservierte CTL-Klon wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 inkubiert (10.000 Lymphozyten / TE). Die Melanomzellen wurden mit 50.000 Zellen pro TE eingesetzt. Deren spontane Spotproduktion betrug maximal 10 Spots. **(C)** Auswertung des IFN- γ -ELISPOT-Assays. Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.10 und 2.1.14 angegeben.

Für weitere Experimente wurden drei repräsentative D41-MEL-Klone ausgewählt, D41-MEL#5 als Beispiel für einen Klon mit hohem Anteil TSPY 1-exprimierender Zellen (87,13%), D41-MEL#2 als Beispiel für einen Klon mit geringem Anteil TSPY 1-exprimierender Zellen (0,54%) und D41-MEL#1 mit einem Anteil von 5% TSPY 1-exprimierender Zellen. Über einen Zeitraum von acht Wochen wurde die Expression von TSPY 1 in diesen Melanomzellklonen in ein- bis zweiwöchigen Abständen longitudinal überprüft. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse der TSPY 1-Expression für D41-MEL#5 und #2 ist in **Abb. C-22** gezeigt. Der Anteil TSPY 1-exprimierender Zellen lag bei D41-MEL#5 während der acht Wochen dauernden Messung immer über 60%. Auch bei D41-MEL#2-Zellen war der Anteil TSPY 1-positiver Zellen über den Messzeitraum konstant. Er lag zwischen 0 und 1%. Analog hierzu zeigte die longitudinale Untersuchung von D41-MEL#1 ebenfalls keine deutlichen Unterschiede innerhalb des Messzeitraumes (Daten siehe **Anhang K**). Der Anteil TSPY 1-exprimierender Zellen lag zwischen 2 und 7%. Die Verifizierung der TSPY 1-Expression über den Zeitraum von acht Wochen zeigte keine eindeutigen Veränderungen in den Zelllinien der D41-MEL-Klone. Die untersuchten Klone wiesen einen stabilen TSPY 1-Phänotyp auf. Ein Zytotoxizitätstest zeigte zudem, dass eine Korrelation zwischen der TSPY 1-Expression und der Lyse durch D41-CTL2/152 bestand (s. **Abb. C-24** und **C-26**). D41-MEL#5 mit hoher TSPY 1-Expression wurde selbst bei niedrigen Effektor-zu-Targetverhältnissen lysiert. D41-MEL#2 mit geringer TSPY 1-Expression wurde durch den CTL-Klon nicht lysiert.

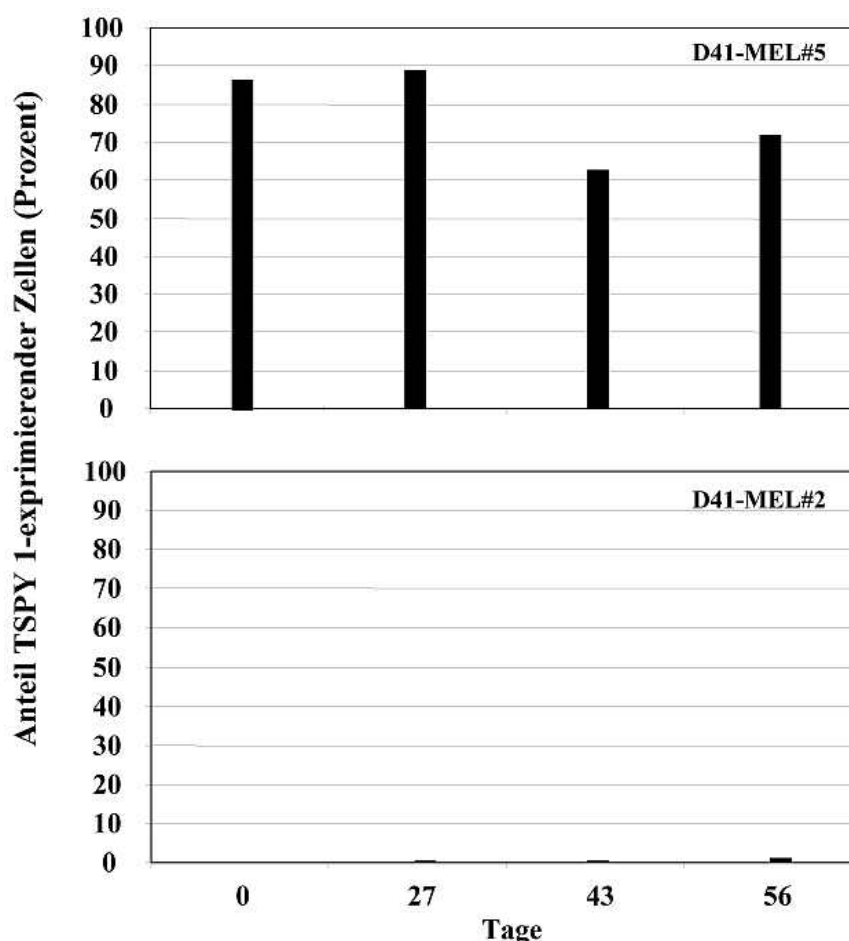


Abb. C-22: Durchflusszytometrische Analyse der TSPY 1-exprimierenden Zellen in D41-MEL#5 und #2 über einen Zeitraum von 56 Tagen. Die Melanomzellen wurden an den Tagen der FACS-Analyse ebenfalls mit 5×10^3 Zellen pro cm^2 passagiert.

Schlussfolgerung:

Die TSPY 1-Expression der Melanomzellklone variierte sehr stark und korrelierte eindeutig mit ihrer Erkennung durch den CTL2/62 im IFN- γ -ELISPOT-Assay, wobei alle Klone wenn auch zum Teil nur sehr schwach durch den CTL-Klon erkannt wurden. Desweiteren zeigte die Verifizierung der TSPY 1-Expression mittels Durchflusszytometrie über den Zeitraum von acht Wochen keine eindeutigen Veränderungen in den Zelllinien der D41-MEL-Klone. Die untersuchten Klone wiesen einen stabilen TSPY 1-Phänotyp auf.

6.4 Steigerung der TSPY 1-Expression in D41-Melanomzellen

Die Prozessierung von Proteinen führt zu Peptidfragmenten, die auf MHC-Klasse I-Molekülen den T-Zellen präsentiert werden. Der Abbau der Proteine erfolgt durch Proteasomen, deren Expression sich durch IFN- γ erhöhen lässt. Über eine IFN- γ -Vorbehandlung lässt sich ebenfalls die Zusammensetzung der aus mehreren Untereinheiten

bestehenden Proteasomen in Richtung sogenannter Immunproteasomen induzieren, woraus möglicherweise eine verbesserte T-Zellerkennung resultiert [186].

Für die TSPY 1-Genexpression ist eine Downregulation in späten Stadien von Melanomen beschrieben, welche sich auf die Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich zurückführen und durch eine 5-Aza-2'-deoxycytidine (DAC)-Vorbehandlung aufheben lässt [183]. Die Auswirkungen einer IFN- γ - und einer DAC-Behandlung von D41-MEL und D41-MEL-Klonen sollten deshalb in Bezug auf die Expression von TSPY 1, auf die spezifische Lyse durch den D41-CTL-Klon und auf die Erkennung im IFN- γ -ELISPOT-Assay untersucht werden.

6.4.1 IFN- γ -Vorbehandlung

D41-CTL2/62 reagierte im IFN- γ -ELISPOT-Assay stärker gegen Transfektanten kotransfiziert mit HLA-A*0201-Plasmid-DNA und der Plasmid-cDNA des Fragmentklones #218.138.69/AEV#2 (AEV#2), dessen Sequenz mit dem Codon für den C-Terminus des Peptides endet (s. Kapitel 5.3), als gegen Transfektanten, die mit dem cDNA-Bank-Klon #218.138.69 (#69), dessen Sequenz über das Stopcodon von TSPY 1 hinaus kodiert, kotransfiziert wurden (Daten nicht gezeigt). 293T-Zellen wurden dann über drei Tage mit 100 U/ml IFN- γ vorbehandelt und anschließend transfiziert. Die Zellen wurden kotransfiziert mit HLA-A*0201-Plasmid-DNA und Plasmid-DNA von AEV#2, #69 und des TSPY 1-ORF mit voller Länge (D41-TSPYfull length#24 in pcDNA3.1). Im IFN- γ -ELISPOT-Assay wurden die mit IFN- γ -behandelten und transfizierten 293T-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten, transfizierten 293T-Zellen durch D41-CTL-2/62 besser erkannt. Eine Reaktivität des CTL-Klons gegen untransfizierte, behandelte und unbehandelte 293T-Zellen war nicht vorhanden (Daten siehe **Anhang L**).

D41-MEL und die Klone D41-MEL#5, #2 und #1 wurden nach einer viertägigen Vorbehandlung mit 100 U/ml IFN- γ ebenfalls auf die Erkennung durch D41-CTL2/152 im IFN- γ -ELISPOT-Assay, sowie im Zytotoxizitätstest und auf die Expression von TSPY 1 durch eine intrazelluläre, indirekte Färbung überprüft. **Abbildung C-23** zeigt die Ergebnisse des IFN- γ -ELISPOT-Assays mit IFN- γ -behandelten und unbehandelten D41-MEL-Klonen und der Melanomzelllinie D41-MEL. Durch IFN- γ -Vorbehandlung wurde die Erkennung aller Melanomzellklone und der parentalen Melanomlinie durch CTL2/152 im IFN- γ -ELISPOT-Assay gesteigert. Aber auch nach IFN- γ -Vorbehandlung blieb die aufgrund der durchflusszytometrisch ermittelten TSPY 1-Expression (s. **Abb. C-21**) zu erwartende Erkennungsrelation erhalten.

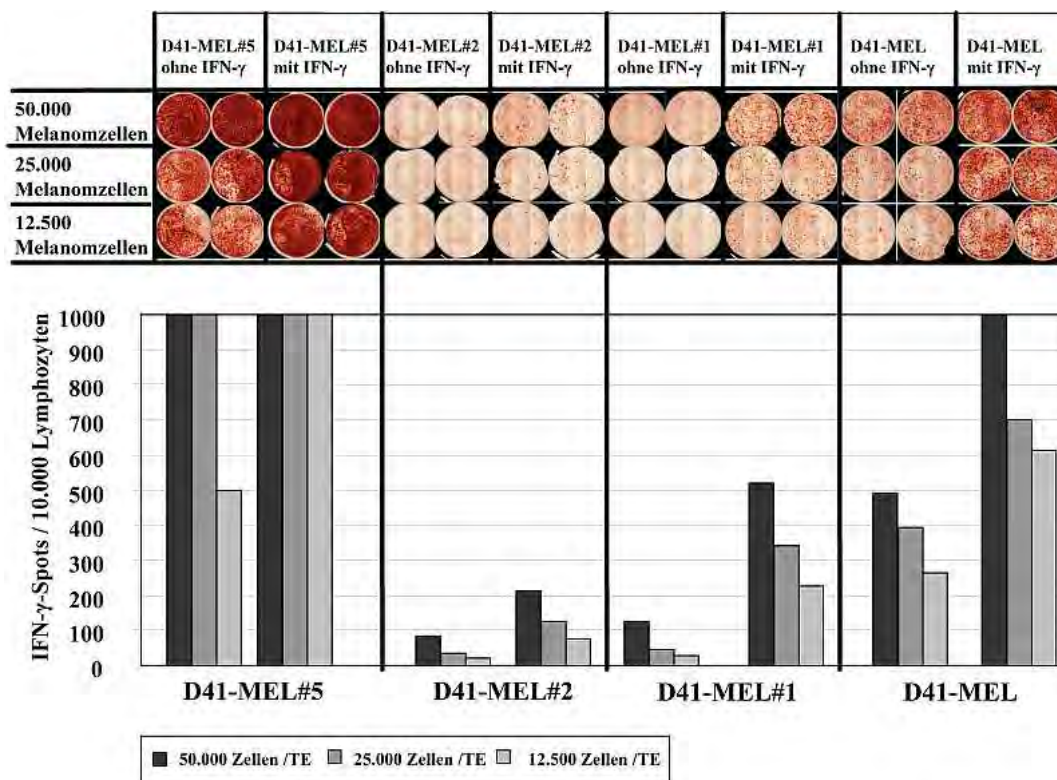


Abb. C-23: Einfluss von IFN- γ auf die Erkennung von D41-MEL, D41-MEL#1, D41-MEL#2 und D41-MEL#5 durch D41-CTL2/152 im IFN- γ -ELISPOT-Assay. Der an d4 kryokonservierte CTL-Klon wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 inkubiert (10.000 Lymphozyten/TE). Die Melanomzellen wurden mit 50.000 Zellen, 25.000 Zellen und 12.500 Zellen/TE eingesetzt. Die Durchführung erfolgte, wie unter Punkt 2.1.10 bei Material und Methoden beschrieben. Die Spontanfreisetzung des CTL-Klons betrug 19 IFN- γ -Spots. Die Auswertung des IFN- γ -ELISPOT-Assays erfolgte mittels CVIA (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen).

Abbildung C-24 zeigt die Ergebnisse des 4h- ^{51}Cr -Freisetzungstest, der mit IFN- γ -behandelten und unbehandelten Zellen der D41-MEL-Klone und der Melanomzelllinie D41-MEL wie im IFN- γ -ELISPOT-Assay (**Abb. C-23**) durchgeführt wurde. Nach Vorbehandlung mit IFN- γ wurde die parentale Linie D41-MEL, wenn auch eher bei hohen Effektor-zu-Target-Verhältnissen, im 4h- ^{51}Cr -Freisetzungstest lysiert. Unbehandelte D41-MEL-Zellen wurden nur sehr schwach lysiert. Der laut Durchflusszytometrie hoch TSPY 1-exprimierende Klon D41-MEL#5 wurde auch ohne IFN- γ -Vorbehandlung selbst bei niedrigen E:T-Verhältnissen lysiert. Seine Lyse konnte durch IFN- γ gesteigert werden.

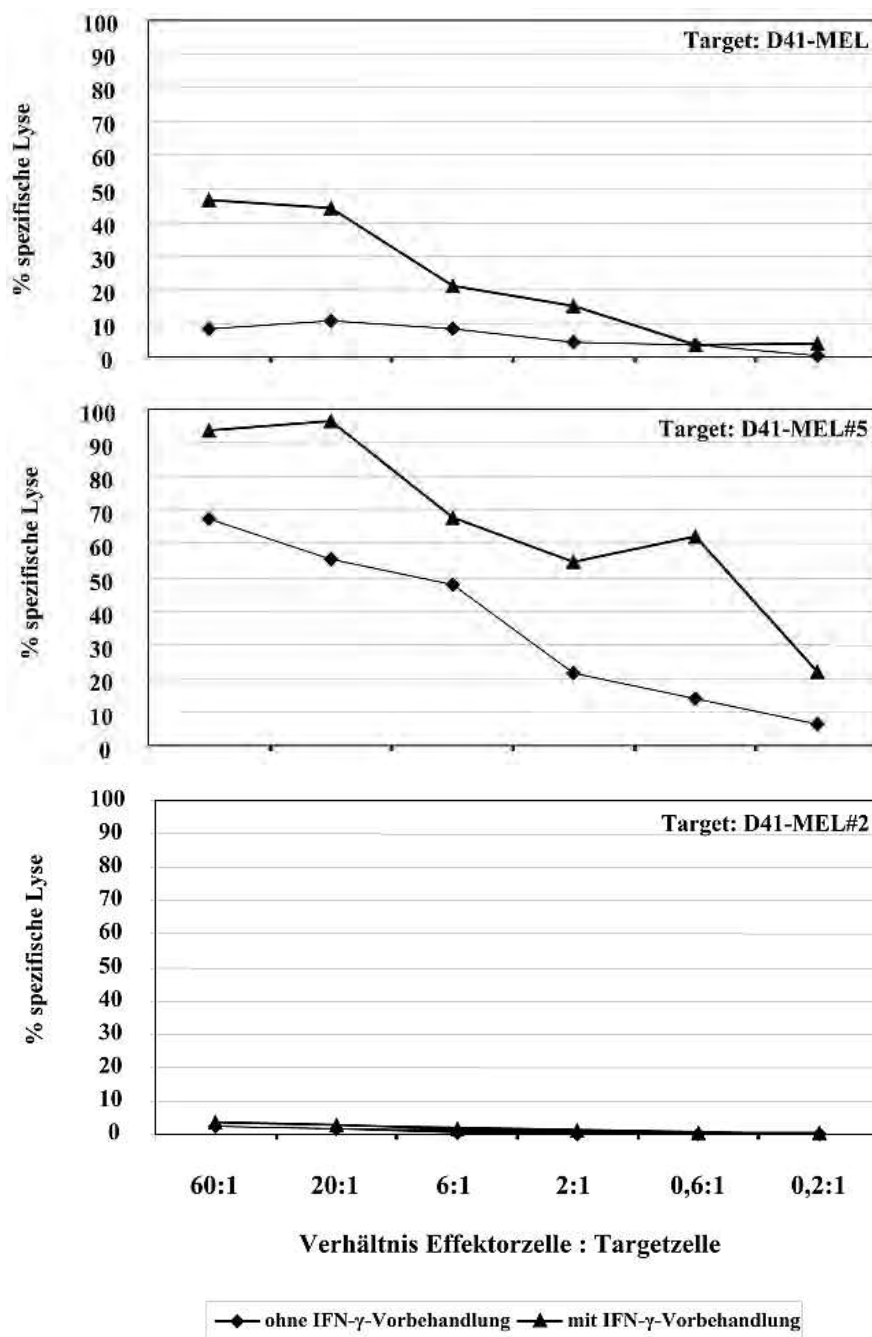


Abb. C-24: Spezifische Lyse der mit IFN- γ -vorbehandelten und nicht vorbehandelten Melanomzellen von D41-MEL sowie der Klone D41-MEL#5 und #2 durch D41-CTL2/152 bei den angegebenen Effektorzell- zu Targetzell-Verhältnissen (E:T-Verhältnisse) in einem 4h- ^{51}Cr -Freisetzungstest. Als Targetzellen wurden 1.000 chromierte Melanomzellen je Testeinheit eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.12 angegeben.

Der Klon D41-MEL#2 wurde im 4h- ^{51}Cr -Freisetzungstest auch nach IFN- γ -Vorbehandlung durch D41-CTL2/152 nicht lysiert. Die Expression von TSPY 1 bei diesem Klon war in der Durchflusszytometrie nicht messbar. **Tabelle C-5** zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse an D41-MEL und den ausgewählten D41-MEL-Klonen zur TSPY 1-Expression unter dem Einfluss von IFN- γ . Obwohl die Erkennung der D41-Melanomzellen und teilweise die Lyse durch TSPY 1-spezifische T-Zellen nach IFN- γ -

Vorbehandlung steigerbar war, ließ sich durchflusszytometrisch keine damit korrelierende TSPY 1-Expressionssteigerung verifizieren.

Melanomzellen	ohne IFN- γ	mit IFN- γ
D41-MEL#5	86,85 %	60,63 %
D41-MEL#2	0,22 %	2,86 %
D41-MEL#1	6,86 %	5,99 %
D41-MEL	19,33 %	22,10 %

Tab. C-5: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der TSPY 1-Expression in D41-MEL-Klonen und D41-MEL unter dem Einfluss von IFN- γ . Die Melanomzellen wurden dazu vier Tage mit IFN- γ (100U/ml) vorbehandelt. Der Mouse-anti-TSPY 1-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000, der Goat-anti-mouse-FITC-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Als Negativkontrolle diente eine intrazelluläre, indirekte Anfärbung mit einem Mouse-anti-IgG₁-Antikörper (Daten nicht gezeigt). Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.14 angegeben.

Eine IFN- γ -Vorbehandlung der allogenen, HLA-A*0201-positiven Melanomzelllinie SK-MEL-29#1, die im Kreuzreaktivitätstest (unter Punkt 4.3.2) von D41-CTL2/62 nicht erkannt worden ist, führte nicht zu einer Erkennung durch den CTL-Klon im IFN- γ -ELISPOT-Assay (**Anhang M**). Ebenfalls konnte keine Expression von TSPY durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Eine TSPY 1-Expression wurde bei dieser Melanomzelllinie nicht induziert.

Schlussfolgerung:

Die Erkennung der D41-Melanomzellen und teilweise die Lyse durch TSPY 1-spezifische T-Zellen ließ sich durch eine IFN- γ -Vorbehandlung steigern. Eine Korrelation dieser Steigerung zur TSPY 1-Expression ist durchflusszytometrisch nicht zu messen.

6.4.2 5-Aza-2'-deoxycytidine (DAC)- Behandlung

D41-MEL und die Klone D41-MEL#5, D41-MEL#2 und D41-MEL#1 an d0 in einer Dichte von $1-2 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 kultiviert. Nach einer achttägigen Vorbehandlung, bei der an jedem zweiten Tag 5-Aza-2'-deoxycytidine (DAC) in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ dazugegeben und an den übrigen Tagen das Medium durch frisches Medium ohne DAC gewechselt wurde, wurde die Erkennung der Zellen durch D41-CTL2/152 im IFN- γ -ELISPOT-Assay bzw. im Zytotoxizitätstest und die Expression von TSPY 1 durch eine intrazelluläre, indirekte Färbung überprüft. **Abbildung C-25** zeigt die Ergebnisse des IFN- γ -ELISPOT-Assays mit DAC-behandelten und mit unbehandelten Melanomzellen. Durch die DAC-Behandlung wurde die Erkennung aller Melanomzellklone und der parentalen Melanomlinie durch CTL2/152 im IFN- γ -ELISPOT-Assay gesteigert. Aber auch nach DAC-Vorbehandlung blieb die aufgrund der durchfluss-

zytometrisch ermittelten TSPY 1-Expression (s. **Abb. C-21**) zu erwartende Erkennungsrelation erhalten.

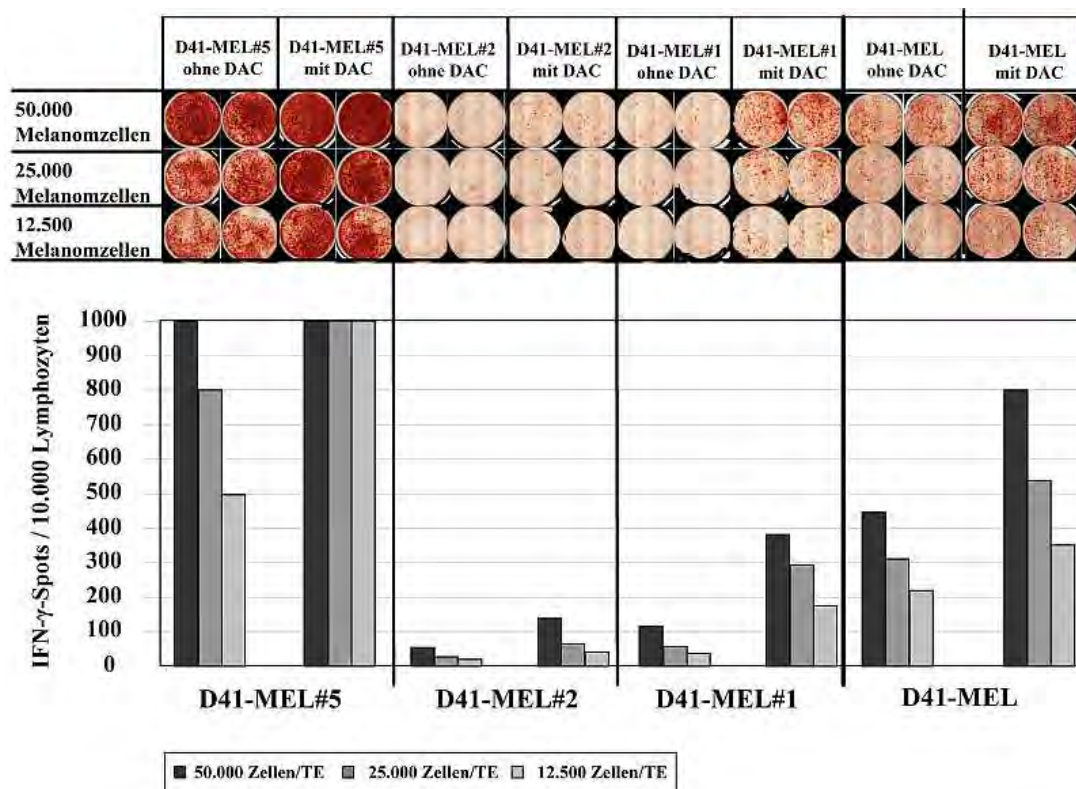


Abb. C-25: Einfluss von DAC auf die Erkennung von D41-MEL#5, #2, #1 und D41-MEL durch D41-CTL2/152 im IFN- γ -ELISPOT-Assay. Der an d4 kryokonservierte CTL-Klon wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 inkubiert (10.000 Lymphozyten/TE). Die Melanomzellen wurden mit 50.000 Zellen, 25.000 Zellen und 12.500 Zellen/TE eingesetzt. Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.10 angegeben. Die Auswertung des IFN- γ -ELISPOT-Assays erfolgte mittels CVIA (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen).

Abbildung C-26 zeigt die Ergebnisse des $4\text{h-}^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest, der mit denselben DAC-behandelten und unbehandelten Zellen von D41-MEL und der Klone D41-MEL#5 und #2 wie im IFN- γ -ELISPOT-Assay (**Abb. C-25**) durchgeführt wurde. Nach Vorbehandlung mit DAC wurden D41-MEL-Zellen durch D41-CTL2/152 lysiert. Die Lyse erfolgte bei hohen Effektor-zu-Targetzellverhältnissen. Die unbehandelten Zellen wurden nur sehr schwach lysiert. Die Lyse des hoch TSPY 1-exprimierenden D41-MEL-Klon#5 durch D41-CTL2/152 war durch eine DAC-Behandlung nicht steigerbar und blieb im Vergleich zu den unbehandelten Zellen des Klons unverändert. Der Klon D41-MEL#2, dessen TSPY 1-Expression mittels der Durchflusszytometrie nicht messbar ist, wurde nicht lysiert und die Lyse wurde durch die DAC-Behandlung nicht beeinflusst.

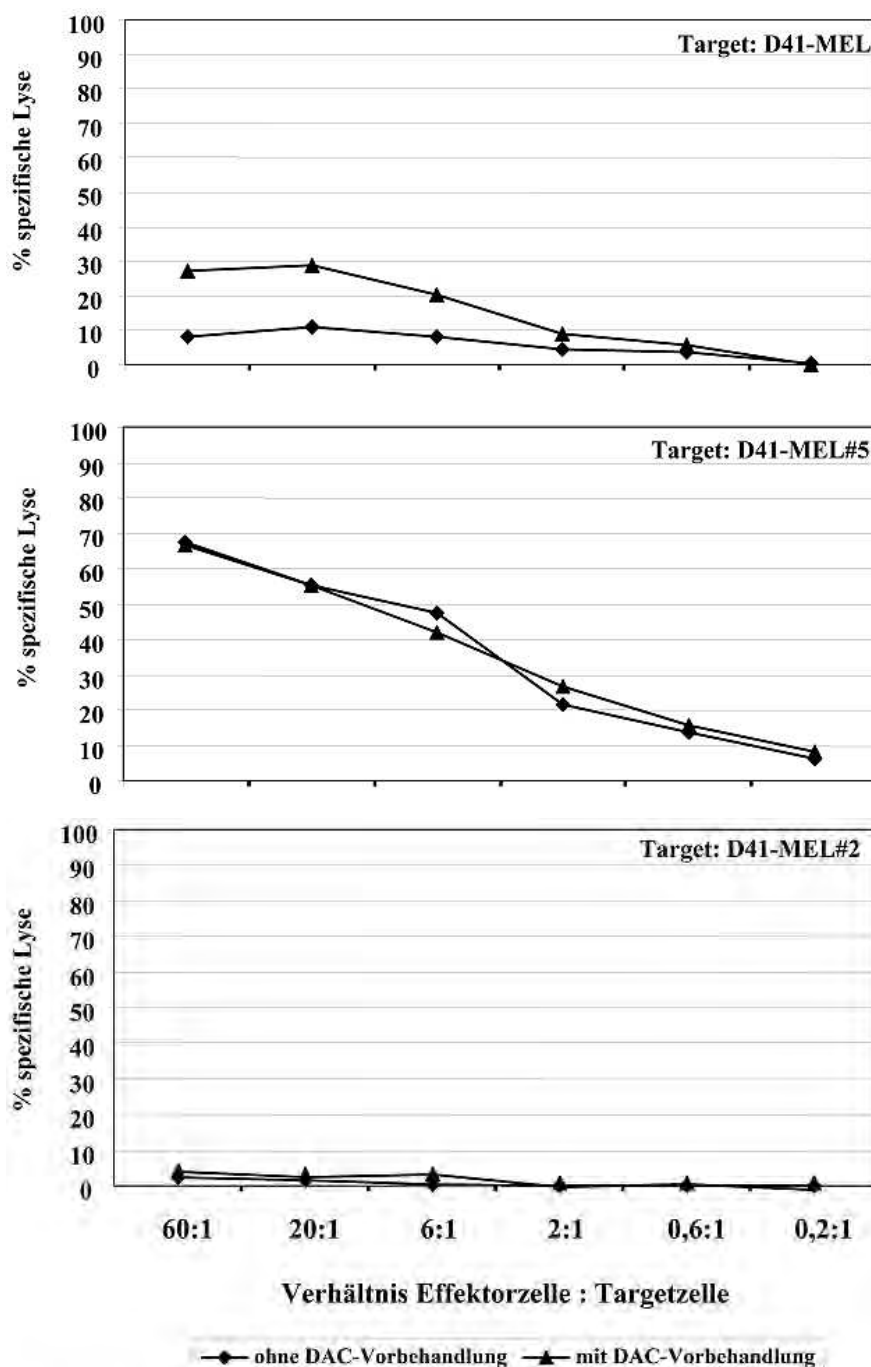


Abb. C-26: Spezifische Lyse der mit DAC-vorbehandelten und unbehandelten Zellen von D41-MEL, D41-MEL#5 und D41-MEL#2 durch D41-CTL2/152 bei den angegebenen Effektorzell-zu-Targetzell-Verhältnissen in einem $4\text{h-}^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest. Als Targetzellen wurden 1.000 chromierte Melanomzellen je Testeinheit eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.12 beschrieben.

Tabelle C-6 zeigt die Resultate der durchflusszytometrischen Analyse an D41-MEL und den ausgewählten Klonen zur TSPY 1-Expression unter dem Einfluss von DAC. Obwohl sich die Erkennung der D41-Melanomzellen durch TSPY 1-spezifische T-Zellen nach DAC-Behandlung steigern ließ, wurde die Lyse durch diese T-Zellen nur bei der parentalen Linie D41-MEL gesteigert während die Lyse der beiden Klone D41-MEL#5 und #2 unbeeinflusst blieb. Eine Expressionssteigerung von TSPY 1 war durch durchflusszytometrische Analysen für D41-MEL und D41-MEL#1 nachweisbar.

Melanomzellen	ohne DAC	mit DAC
D41-MEL#5	93,07 %	80,75 %
D41-MEL#2	0,69 %	2,36 %
D41-MEL#1	7,14 %	16,95 %
D41-MEL	22,03%	26,66%

Tab. C-6: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der TSPY 1-Expression in D41-MEL Klonen und D41-MEL unter dem Einfluss von DAC. Den Melanomzellen wurde über acht Tage lang jeden zweiten Tag DAC in das Medium gegeben. An den übrigen Tagen wurde das DAC-Medium durch frisches Medium ohne DAC ersetzt. Der Mouse-anti-TSPY-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000, der Goat-anti-mouse-FITC-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Als Negativkontrolle diente eine intrazelluläre, indirekte Anfärbung mit einem Mouse-anti-IgG₁-Antikörper (Daten nicht gezeigt). Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.14 angegeben.

Schlussfolgerung:

Die Erkennung der D41-Melanomzellen ließ sich durch eine DAC-Vorbehandlung steigern. Nur die Lyse der parentalen Linie D41-MEL durch TSPY 1-spezifische T-Zellen ließ sich ebenfalls durch eine DAC-Vorbehandlung steigern. Eine Steigerung der TSPY 1-Expression war durchflusszytometrisch nachweisbar.

6.5 Expression von TSPY 1 in allogenen, HLA-A*0201-positiven Zelllinien

Im Kreuzreaktivitätstest (Punkt 4.3) zeigte sich neben der Erkennung der autologen Melanomzelllinie, die Erkennung der autologen EBV-B-Zelllinie und der allogenen Melanomzelllinie MZ9-MEL durch D41-CTL2/62. Zudem ist in der Literatur die Expression von TSPY 1 für Gonadoblastomen, testikulären Karzinomen, wie z.B. Seminomen und Carcinoma in situ, Prostatakarzinomen, Leberzellkarzinomen und Melanomen beschrieben [177;182-185]. Für Melanome ist eine Induzierung der Expression von Cancer/Testis-Antigenen durch DAC-Behandlung [187;188] sowie die Herunterregulierung bzw. der Verlust von TSPY 1 aufgrund von Hypermethylierung des TSPY 1-Promotors in späten Stadien bzw. Metastasen des Melanoms beschrieben [183]. Durch eine DAC-Behandlung wurde bei allogenen, HLA-A*0201-positiven Tumor- und EBV-B-Zelllinien von männlichen Personen versucht, TSPY 1-Expression zu induzieren. Dazu wurden die Zelllinien mit DAC vorbehandelt und an Tag acht auf Erkennung durch D41-CTL2/62 im IFN- γ -ELISPOT-Assay getestet, sowie Total-RNA aus mit DAC-behandelten und unbehandelten Zellen isoliert. Getestet wurden neben der autologen Melanom- und EBV-B-Zelllinie, neun Melanomzelllinien, eine Leberzellkarzinomzelllinie, zwei Pankreaskarzinomzelllinien, drei Kolonkarzinomzelllinien und vier weitere EBV-B-Zelllinien. Als Kontrollen dienten die HLA-A*0201-positive Melanomzelllinie einer Frau

(SK-MEL-63) und die HLA-A*0201-positive Kolonkarzinomzelllinie SW480 mit dem Haplotypverlust des Y-Chromosoms [189].

6.5.1 Wirkung einer 5-Aza-2'-deoxycytidine(DAC)-Behandlung

Die DAC-Behandlung bewirkte bei allen getesteten Zelllinien eine Verlangsamung des Wachstums (Daten nicht gezeigt). **Abbildung C-25** zeigt die Ergebnisse des IFN- γ -ELISPOT-Assays mit DAC-behandelten und mit unbehandelten Zelllinien.

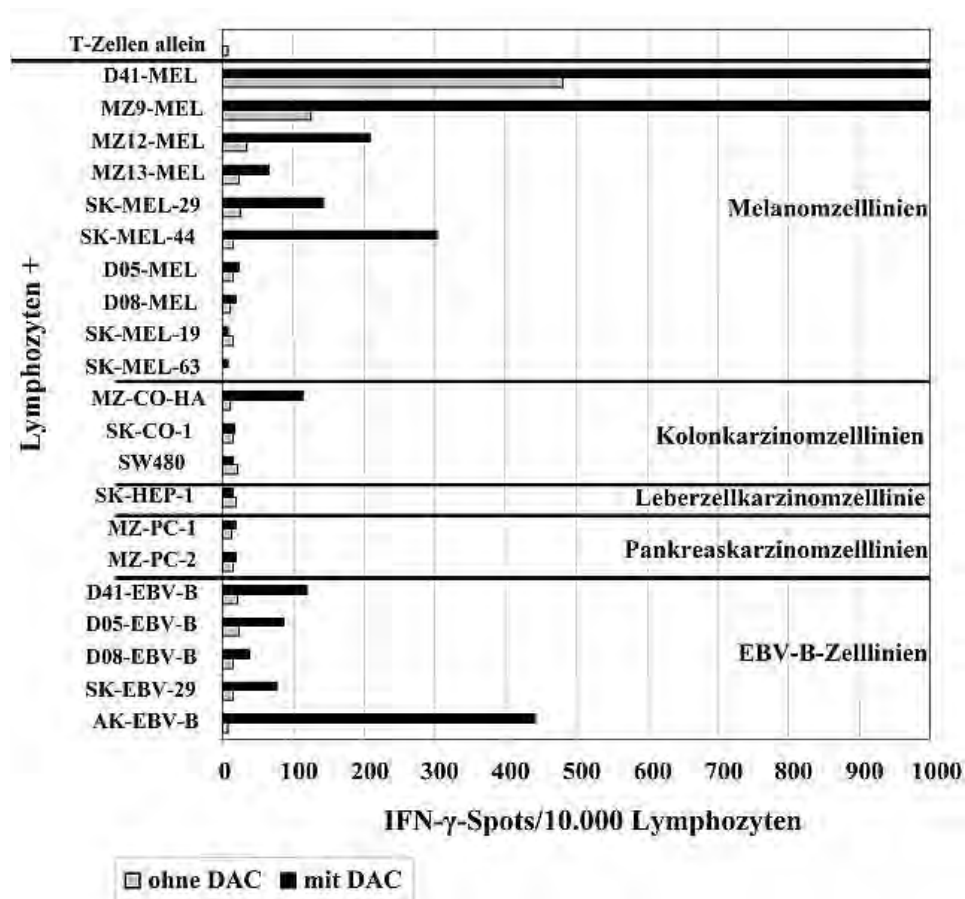


Abb. C-26: Einfluss von DAC auf die Erkennung von HLA-A*0201-positiven, allogenen Zelllinien durch D41-CTL2/62 im IFN- γ -ELISPOT-Assay. Der an d4 kryokonservierte CTL-Klon wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 inkubiert (10.000 Lymphozyten/TE). Die DAC-Behandlung der Zelllinien erfolgte wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.2 angegeben. Die Zellen wurden eingesetzt mit 50.000 Tumorzellen und 75.000 EBV-B-Zellen. Die Durchführung des IFN- γ -ELISPOT-Assays erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.10 angegeben. Die Auswertung des IFN- γ -ELISPOT-Assays erfolgte mittels CVIA (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen). Die spontane IFN- γ -Freisetzung der Targetzellen betrug zwischen 2 und 30 Spots und war geringer oder gleich der Spotzahl von Target ohne DAC + Lymphozyten.

Die Erkennung durch D41-CTL2/62 war bei einer Reihe von Zelllinien durch die DAC-Behandlung steigerbar. Es konnten drei Erkennungsmuster unterschieden werden. Die Erkennung der Zelllinien, die bereits ohne DAC-Behandlung durch den CTL-Klon erkannt wurden, war durch die DAC-Behandlung steigerbar (D41-MEL, MZ9MEL, MZ12-MEL). Bei weiteren Zelllinien kam es nach der DAC-Behandlung zu einer Erkennung durch den CTL-Klon (MZ13-MEL, SK-MEL-29, SK-MEL-44, MZ-CO.HA, alle EBV-B-Zelllinien).

Allerdings war bei MZ13-MEL die Erkennung der Zellen ohne DAC-Behandlung nicht eindeutig negativ. Bei allen übrigen Zelllinien war eine Erkennung durch den CTL-Klon auch nach der DAC-Behandlung nicht vorhanden. Zu diesen Zelllinien gehörten auch die Negativkontrollen SK-MEL-63 und SW480.

Eine Amplifikation von TSPY 1 aus cDNA dieser Zelllinien sollte die Expression von TSPY 1 in den Zellen zeigen. Für die Amplifikation von TSPY 1 aus mit DAC-behandelten und unbehandelten Zellen wurde aus 5 Millionen Zellen Total-RNA isoliert und 5 µg dieser Total-RNA in cDNA umgeschrieben. **Abbildung C-27** zeigt ein einprozentiges Agarosegel mit den aufgetragenen PCR-Produkten der TSPY 1-Amplifikation von den Zelllinien, die im IFN-γ-ELISPOTassay getestet wurden. Die Qualität der cDNA wurde, um eine Degradierung auszuschließen, mit einer Amplifikation von Aktin überprüft (Daten siehe **Anhang N**). Das Ergebnis korrelierte bis auf wenige Ausnahmen mit dem Ergebnis des IFN-γ-ELISPOT-Assays (**Abb. C-26**).

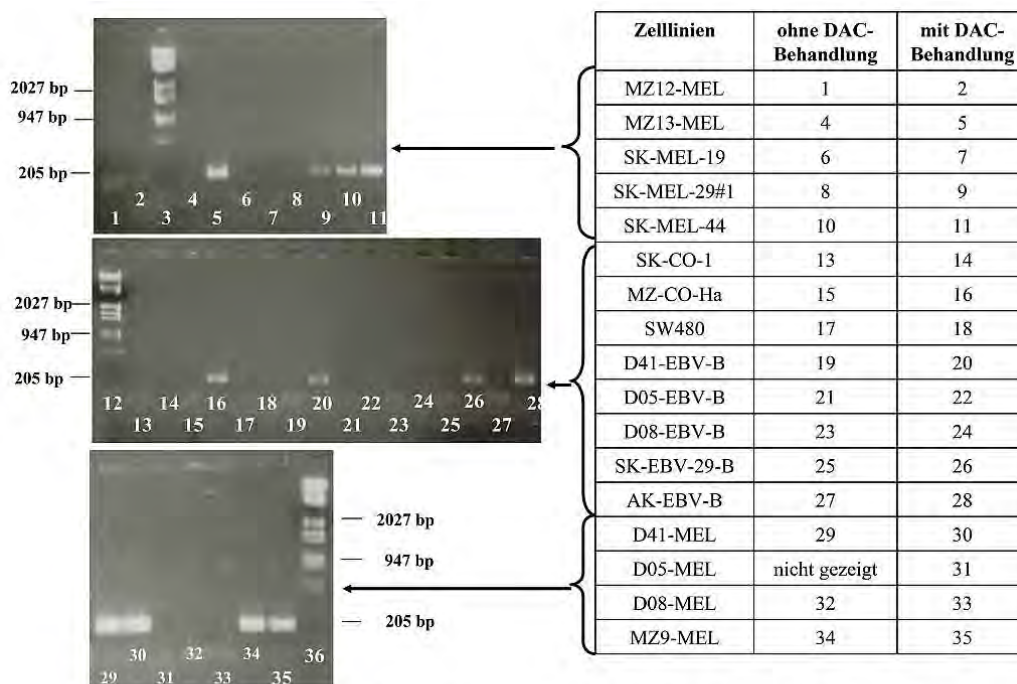


Abb. C-27: Nachweis von TSPY 1 bei DAC-behandelten und unbehandelten Zellen mittels PCR. Amplifiziert wurde TSPY 1 mit den Primern TSPY-F und TSPY-A wie sie auch in den Lightcycler-Experimenten (Punkt 7.4.2) eingesetzt wurden. Als Längenstandard wurde der Marker III der Firma Roche (Lane 3, 12 und 36), übrige Banden (siehe Tabelle). Die erwartete Amplikongröße betrug 205 bp. Als Qualitätskontrolle der cDNA diente die Amplifikation von Aktin (**Anhang N**). Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.2.14 angegeben.

Bei den im IFN-γ-ELISPOT-Assay ohne DAC- und mit DAC-Behandlung eindeutig negativen Zelllinien war TSPY 1 mittels PCR ebenfalls nicht nachzuweisen (SK-MEL-19, SK-MEL-63, SW480). Bei den Zelllinien, die ohne DAC-Behandlung erkannt wurden und deren Erkennung durch DAC gesteigert wurde, war TSPY 1 durch RT-PCR sowohl in den mit DAC behandelten als auch den unbehandelten Zellen nachweisbar (D41-MEL, MZ9-MEL, MZ12-MEL). In den meisten Zelllinien deren Erkennung im IFN-γ-ELISPOT-Assay

durch DAC induziert wurde, konnte TSPY 1 mittels PCR nur in den mit DAC behandelten Zellen nachgewiesen werden (SK-MEL-29, MZ-CO.HA, alle EBV-B-Zelllinien). Bei den unbehandelten Zellen der Melanomzelllinie MZ13-MEL konnte eine TSPY 1-Expression mittels RT-PCR nur in den DAC-behandelten Zellen nachgewiesen werden. Bei dieser Zelllinie war die Erkennung der unbehandelten Zellen nicht eindeutig negativ. Bei der Zelllinie SK-MEL-44 konnte TSPY 1 mit RT-PCR sowohl in den mit DAC behandelten als auch in den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden, obwohl die Erkennung der unbehandelten Zellen durch D41-CTL2/62 negativ war. Bei den Zelllinien D05-EBV-B und D08-EBV-B war die RT-PCR für TSPY 1 sowohl bei den mit DAC behandelten Zellen als auch bei den unbehandelten Zellen negativ, obwohl die mit DAC behandelten Zellen durch den CTL-Klon eindeutig erkannt wurden.

Schlussfolgerung:

Durch die DAC-Behandlung konnte die Erkennung und TSPY 1-Expression bei einer Reihe von Zelllinien verstärkt bzw. induziert werden. Dabei konnte mittels PCR bei den in der Erkennung eindeutig positiven Zelllinien TSPY 1-Expression nachgewiesen werden. Die in der Erkennung eindeutig negativen Zelllinien waren auch negativ beim Nachweis von TSPY 1 mittels PCR.

6.6 Quantifizierung der TSPY 1-mRNA-Expression und Ermittlung des Schwellenwertes für die T-Zellerkennung im IFN- γ -ELISPOT-Assay

Bei einer Reihe von Zelllinien, die mit DAC behandelt wurden, konnte die T-Zellerkennung durch D41-CTL2/62 verstärkt oder induziert werden (s. Kapitel 6.5.1). In Korrelation stand bei den meisten dieser Zelllinien dazu der Nachweis der TSPY 1-Expression mittels PCR (D41-MEL, MZ9-MEL, MZ12-MEL, MZ-CO-HA, D41-EBV-B, SK-EBV-29-B, AK-EBV-B). Bei anderen Zelllinien war keine direkte Korrelation zwischen der TSPY 1-Expression und der T-Zellerkennung bei den mit DAC behandelten oder unbehandelten Zellen vorhanden (MZ13-MEL, SK-MEL-29, SK-MEL-44, D05-EBV-B, D08-EBV-B). Die Expression von TSPY 1 sollte anhand der Anzahl der mRNA-Molekülen in Korrelation zu der IFN- γ -Spotzahl gesetzt werden, um einen Schwellenwert für die Erkennung von TSPY 1-exprimierenden Zellen durch TSPY 1-spezifische CTL-Klone im IFN- γ -ELISPOT-Assay zu ermitteln. In einer quantitativen PCR wurde TSPY 1 von der unter Punkt 7.4.2 verwendeten cDNA amplifiziert. Die Durchführung ist in Material und Methoden unter Punkt 2.2.14.2 beschrieben. Als externer Standard für eine absolute Quantifizierung und zur Berechnung der einzelnen TSPY 1-

Kopien in der Zelle wurde das Plasmid D41-TSPYfull, welches als Insert den vollständigen ORF des TSPY 1-Gens enthält, linearisiert und in der quantitativen PCR verwendet. Von dem externen Standard wurde anhand der „Crossing Points“ (CP) eine Standardkurve hergestellt (Daten nicht gezeigt), aufgrund derer die Anzahl der TSPY 1-mRNA-Kopien pro Zelle bestimmt werden konnte. **Abbildung C-28** zeigt die Anzahl der TSPY 1-mRNA-Kopien pro Zelle der im IFN- γ -ELISPOT-Assay durch D41-CTL2/62 erkannten Zelllinien. Das Ergebnis der quantitativen PCR stand in Korrelation zu dem Ergebnis des IFN- γ -ELISPOT-Assays. Eine Zunahme der TSPY 1-Kopienzahl unter DAC-Behandlung konnte bei allen in **Abb. C-28** gezeigten Zelllinien nachgewiesen werden.

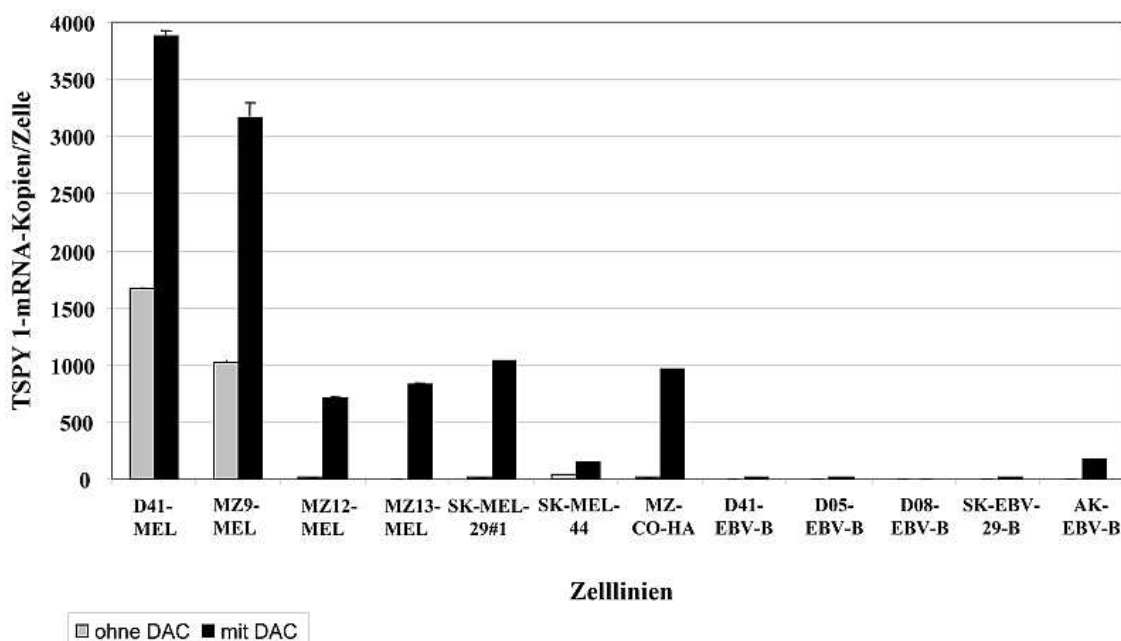


Abb. C-28: Resultat der quantitativen PCR mit cDNA von DAC-behandelten Zelllinien. TSPY 1 wurde aus der cDNA von mit DAC-behandelten und unbehandelten Zelllinien amplifiziert (Kapitel 7.4.2). Die Anzahl der TSPY 1-Kopien wurde auf die Gesamtzahl der Zellen umgerechnet. Dargestellt ist das Ergebnis für die durch D41-CTL-2/62 im IFN- γ -ELISPOT-Assay erkannten Zelllinien. Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.2.14.1 angegeben.

Die Zunahme stand dabei in Korrelation zu der Zunahme der IFN- γ -Freisetzung durch D41-CTL2/62 nach DAC-Behandlung. Bei den Zelllinien, die auch ohne DAC-Behandlung durch D41-CTL2/62 im IFN- γ -ELISPOT-Assay erkannt wurden, konnte die Expression von TSPY 1, gemessen als die Anzahl der mRNA-Kopien, nachgewiesen werden und war unter DAC-Behandlung steigerbar. Bei den Zelllinien, deren Erkennung durch eine DAC-Behandlung induziert wurde, lag die Anzahl der TSPY 1-mRNA-Kopien mit Ausnahme von SK-MEL-44 unter zehn und war durch DAC steigerbar. Bei den in der Erkennung durch den CTL-Klon negativen Zelllinien war die Anzahl der TSPY 1-mRNA-Kopien null sowohl mit DAC-Behandlung als auch ohne. **Tabelle C-7** zeigt den Vergleich zwischen der IFN- γ -Spotzahl, der Anzahl der mRNA-Kopien und dem Nachweis von TSPY 1 mittels PCR.

	Erkennung im IFN- γ -ELISPOT-Assay		Anzahl TSPY 1-mRNA-Kopien/Zelle		RT-PCR	
	Ohne DAC	Mit DAC	Ohne DAC	Mit DAC	Ohne DAC	Mit DAC
D41-MEL	++	+++	1667	3876	++	++
MZ9-MEL	++	+++	1026	3167	++	++
MZ12-MEL	(+)	++	10	711	+	+
MZ13-MEL	(+)	+	5	831	-	++
SK-MEL-29	-	++	12	1028	-	+
SK-MEL-44	-	++	37	140	+	++
MZ-CO-HA	-	++	9	956	-	+
D41-EBV-B	-	++	0	14	-	+
D05-EBV-B	(+)	+	0	8	-	-
D08-EBV-B	-	+	0	1	-	-
SK-EBV-29-B	-	+	0	13	-	+
AK-EBV-B	-	++	2	174	-	+

Tab. C-7: Ergebnis des IFN- γ -ELISPOT-Assay, der quantitativen PCR und einer RT-PCR für den Nachweis von TSPY 1 im Vergleich. Die Zelllinien wurden achttägig mit DAC behandelt (wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.2 beschrieben). Die Ergebnisse des IFN- γ -ELISPOT-Assays und der RT-PCR sind aus Kapitel 6.5 entnommen. Die spontane IFN- γ -Freisetzung der Targetzellen lag zwischen 2 und 19 Spots und war geringer oder gleich der Spotzahl von Targetzellen ohne DAC + Lymphozyten. Die Bestimmung der Anzahl der TSPY 1-mRNA-Kopien erfolgte durch quantitative PCR mit einem externen Standard wie in Material und Methoden beschrieben.

Der Schwellenwert für die Erkennung der unbehandelten Zellen im IFN- γ -ELISPOT-Assay durch D41-CTL2/62 lag bei 10 TSPY 1-mRNA-Kopie (MZ12-MEL). Allerdings wurden die Zellen von MZ13-MEL und SK-MEL-44 mit über 10 mRNA-Kopien nicht erkannt. Die Nachweisgrenze für unbehandelte Zellen lag somit zwischen zehn und 37 mRNA-Kopien pro Zelle, sowohl für die Erkennung durch D41-CTL2/62 als auch für die Detektion mittels PCR. Für die mit DAC behandelten Zellen lag der Schwellenwert für die Erkennung der Zellen durch den CTL-Klon im IFN- γ -ELISPOT-Assay bei einer TSPY 1-mRNA-Kopie pro Zelle (D08-EBV-B). Während die Expression von TSPY 1 in der PCR erst ab einer mRNA-Kopienzahl von dreizehn nachgewiesen werden konnte. Der Schwellenwert für die Erkennung der Zellen im IFN- γ -ELISPOT-Assay ist unter DAC-Behandlung niedriger.

Schlussfolgerung:

Die Anzahl der TSPY 1-mRNA-Kopien wurde unter DAC-Behandlung gesteigert und stand in Relation zu der Erkennung der Zellen im IFN- γ -ELISPOT-Assay. Der Schwellenwert für die Erkennung der unbehandelten Zellen durch D41-CTL2/62 im IFN- γ -ELISPOT-Assay lag zwischen zehn und 37 TSPY 1-mRNA-Kopien pro Zelle. Nach DAC-Behandlung war der Schwellenwert für die Erkennung niedriger und lag bei einer mRNA-Kopie pro Zelle.

6.7 Koexpression von TSPY 1 mit CD133

In der Literatur hypothetische „*Cancer initiating cells*“ (CIC) beschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass nicht alle Zellen des Tumors beliebig proliferieren können, sondern dass sich der Tumor aus einer begrenzten Anzahl von Zellen, den sogenannten CICs, erneuert. CICs verfügen über bestimmte Eigenschaften in der Proliferation und der Differenzierung. Die restlichen Zellen der Tumormasse verlieren mit steigender Generationszahl die Eigenschaften der CICs, differenzieren und können schließlich sogar apoptotisch werden [190].

Das Oberflächenmolekül CD133 wird auf der Zelloberfläche von Stammzellen neuroepithelialen Ursprungs, die fähig sind, „*in vitro*“ in neuronale Zellen und *in vivo* in Endothelien und Astrozyten auszdifferenzieren, exprimiert [191;192]. Im normalen Gewebe ist CD133 zudem auf der Oberfläche von hämatopoetischen Stammzellen, endothelialen Vorläuferzellen und Zellen des fötalen Gehirns exprimiert, während für maligne Erkrankungen die Expression von CD133 für akute und chronisch myeloide Leukämie sowie lymphatische Leukämie beschrieben ist [193]. In einer Studie an Glioblastomen konnte gezeigt werden, dass CD133-positive Zellen in der Lage waren, eine Tumorentstehung bei Mäusen zu bewirken [194]. Die Koexpression von CD133 und ABCB5, ein neuer Stofftransporter und eine vermutete Ursache für Chemotherapie-Resistenz bei Melanomen [195], sowie ABCG2 [196] ist von Bedeutung, da beide in Zusammenhang mit Zellen gebracht werden, die über Stammzeleigenschaften bzw. bei malignen Zellen über eine höhere Tumorigenität verfügen [195;196].

Eine Koexpression von TSPY 1 mit CD133 sollte zeigen, ob es sich bei TSPY 1 ebenfalls um einen potentiellen Marker für Zellen mit erhöhter Tumorigenität oder Stammzeleigenschaften im Zusammenhang mit CICs handeln könnte. Dies wurde für die Zellen der Melanomzelllinie D41-MEL und der D41-MEL-Klone #5 und #2 durchflusszytometrisch überprüft. In **Abb. C-29** ist das Ergebnis für die Melanomzelllinie D41-MEL, den D41-MEL#5 und den D41-MEL#2 dargestellt. Der Anteil an CD133-exprimierenden Zellen war am höchsten in Zellpopulation von D41-MEL#2. Der Anteil dieser Zellen bei D41-MEL und D41-MEL#5 war gleich hoch. Der Anteil der sowohl für CD133 als auch für TSPY 1 positiven Zellen war bei D41-MEL#5 am höchsten. Eine direkte Korrelation zwischen der CD133-Expression und der TSPY 1-Expression bestand allerdings bei keiner der Zellpopulationen.

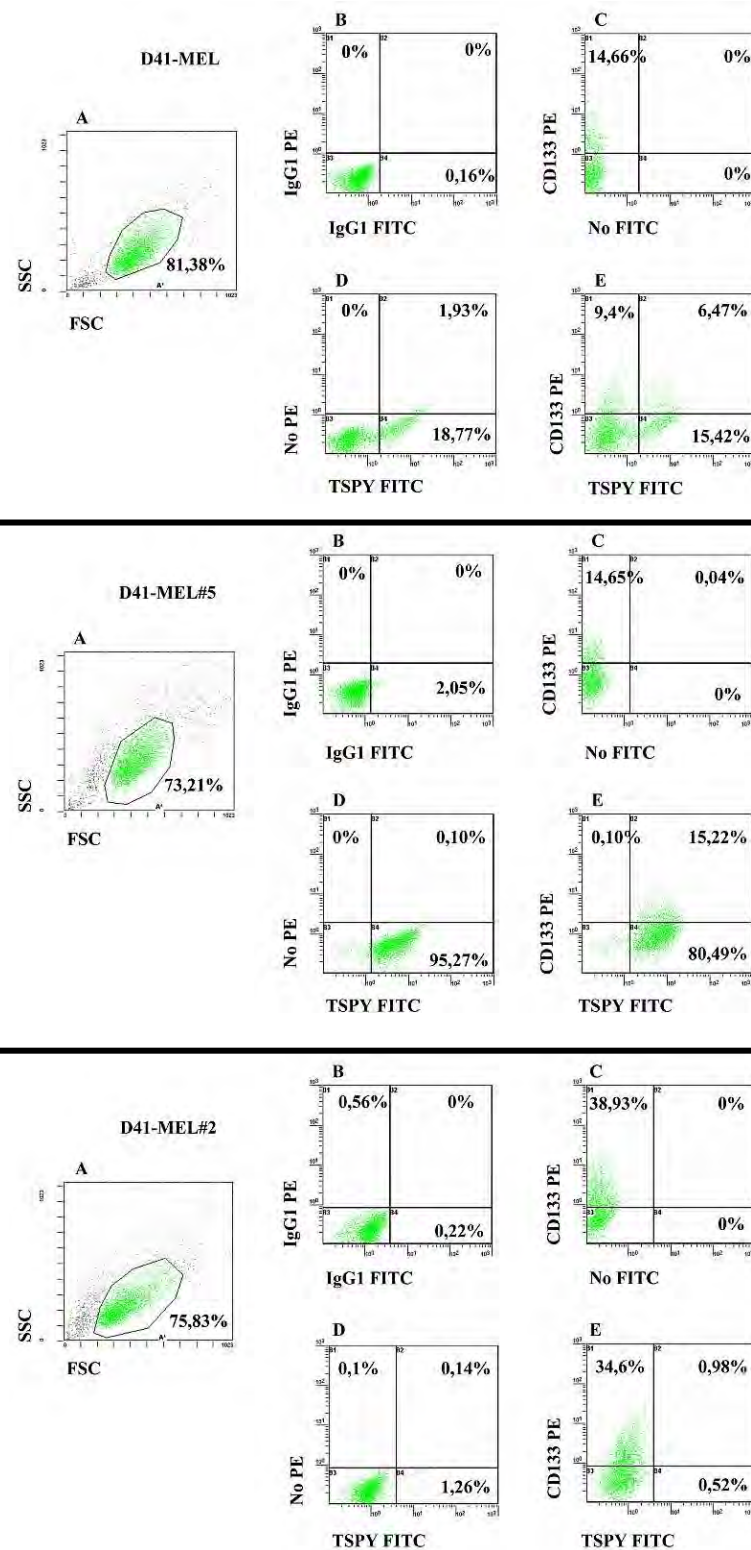


Abb. C-29: Durchflusszytometrische Analyse der TSPY 1- und CD133-Expression in D41-MEL, D41-MEL#5 und D41-MEL#2. Färbung der Melanomzellen (**A**) mit Mouse-anti-IgG1-Antikörper + Goat-anti-mouse-FITC- bzw. Goat-anti-mouse-PE-Antikörper (1:200) (**B**), mit Mouse-anti-CD133-PE-Antikörper (**C**), mit Mouse-anti-TSPY 1-Antikörper (1:2000) + Goat-anti-mouse-FITC-Antikörper (**D**) und mit Mouse-anti-CD133-PE-/ Mouse-anti-TSPY 1- + Goat-anti-mouse-FITC-Antikörper (**E**). Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt

Schlussfolgerung:

Der Anteil an CD133-exprimierenden Zellen war am höchsten in Zellpopulation von D41-MEL#2. Eine direkte Korrelation zwischen der CD133-Expression und der TSPY 1-Expression bestand bei keiner der Zellpopulationen.

7 Reaktivität gegen TSPY 1 bei Patienten mit testikulären Tumoren

TSPY 1 ist ein Gen des Y-Chromosoms, das Gonadoblastomen sehr stark exprimiert wird und mit ihrer Entstehung in Zusammenhang gebracht wird [180;197]. In physiologischem Gewebe wird TSPY 1 in den Spermatozyten und Spermatogonien sowie in der Basallamina der Samenkanälchen exprimiert [181]. In weiteren Keimzelltumoren, neben dem Gonadoblastom, ist TSPY 1 in Vorstufen für Keimzelltumoren und in Seminomen hochexprimiert. Dagegen ist TSPY 1 nur sehr gering oder nicht exprimiert in nicht-seminomatösen Keimzelltumoren, einschließlich Teratokarzinom, Chorionkarzinom und embryonalem Karzinom [197;198]. Die Expression von TSPY 1 wurde auch in anderen Tumorentitäten detektiert, wie z.B. in Prostatakarzinomen, Leberzellkarzinomen und Melanomen [180;183;185].

Im Melanommodell D41 ist TSPY 1 immunogen. Um zu klären, inwiefern TSPY 1 bei Patienten mit Hodentumoren unterschiedlicher Epidemiologie immunogen ist, wurden reife dendritische Zellen (DC) ausgewählter Patienten mit „*in vitro*“-transkribierter mRNA (IVT-RNA) für TSPY 1 transfiziert und für die Stimulation von autologen CD8⁺ T-Zellen eingesetzt. An Tag 0 und Tag 7 wurden CD8⁺ T-Zellen (1×10^6 Zellen) mit mRNA-transfizierten DCs ($0,1 \times 10^6$ Zellen) und bestrahlten CD8⁺ Lymphozyten stimuliert. An Tag 12 wurde im IFN- γ -ELISPOT-Assay die Reaktivität der CD8⁺ T-Zellen gegen die transfizierten DCs bzw. 293T-Transfektanten überprüft. Für die Herstellung TSPY 1-kodierender mRNA wurde der gesamte ORF von TSPY 1 aus D41-MEL mittels RT-PCR amplifiziert und in pcDNA3.1 kloniert. Anschließend wurde nach Sequenzüberprüfung das linearisierte Plasmid als „*template*“ für die Synthese der IVT- RNA verwendet. Die Überprüfung der mRNA-Qualität erfolgte durch die Erkennung von mit TSPY 1-IVT-RNA transfizierten, HLA-A*0201 positiven DCs durch D41-CTL2/62 (Daten nicht gezeigt). Bei fünf Patienten wurde versucht, eine Reaktivität gegen TSPY 1 zu stimulieren. **Tabelle C-8** gibt einen Überblick über die untersuchten Patienten.

Bezeichnung	Typ des testikulären Karzinoms	HLA-A*02 positiv	Testung auf CMV-Reaktivität
HT-BT-1	Seminom	+	+
HT-CK-1	Seminom	-	n.t.
HT-FE-1	Teratokarzinom	-	n.t.
HT-IH-1	Teratokarzinom	+	-
HT-SN-1	Seminom	+	n.t.

Tab. C-8: Auflistung der auf Reaktivität gegen TSPY 1 getesteten Patientenproben. Angegeben ist die Probenbezeichnung, der histologisch bestimmte Typ des Karzinoms, ob der Patient positiv für das HLA-A*0201-Allel ist und das Ergebnis einer „ex vivo“-Testung auf pp65-Reaktivität (CMV).

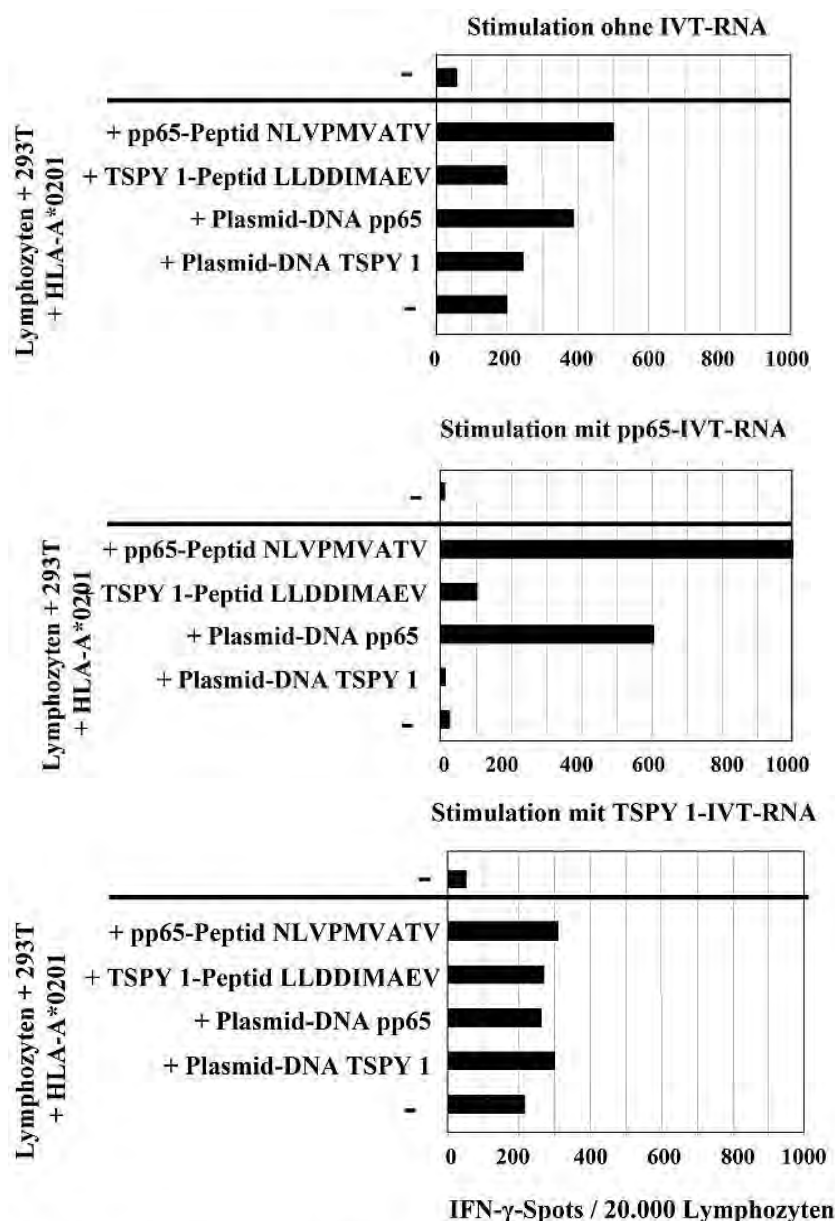


Abb. C-30: Versuch der Stimulation TSPY 1-reaktiver CD8⁺ T-Zellen aus dem Blut des Patienten HT-BT-1. CD8⁺ T-Zellen aus dem Blut des Patienten HT-BT-1 (s. **Tab. C-8**) wurden mit autologen FAST-DCs (s. Material und Methoden Punkt 2.1.7 und 2.1.8). Parallel wurden Stimulationen gegen FAST-DCs, FAST-DCs transfiziert mit pp65-IVT-RNA und FAST-DCs transfiziert mit TSPY 1-IVT-RNA durchgeführt. Responderlymphozyten (20.000 Zellen/TE) der drei Stimationsansätze wurden in einem 20h-IFN-γ-ELISPOT-Assay getestet auf die Erkennung von 293T-Zellen, die mit HLA-A*0201-Plasmid-DANN transfiziert sowie entweder mit den angegebenen Peptiden beladen bzw. mit den angegebenen antigen-kodierenden Plasmiden kotransfiziert waren. Die Durchführung des IFN-γ-ELISPOT-Assays erfolgte wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.9 angegeben.

Abbildung C-30 zeigt beispielhaft die Ergebnisse mit Blutlymphozyten des Patienten HT-BT-1. Als Stimulationskontrolle wurde pp65-PolyA⁺-RNA mitgeführt, da vorab bei HT-BT-1 eine „ex vivo“-CMV-Reaktivität nachgewiesen worden war (Daten nicht gezeigt). Der IFN- γ -ELISPOT-Assay zeigte eine erhöhte Reaktivität gegen pp65-Peptid und die Plasmid-DNA von pp65 bei den CD8⁺ T-Zellen von HT-BT-1, die mit pp65-IVT-RNA transfizierten DCs stimuliert worden waren. Eine erhöhte Reaktivität bei den CD8⁺ T-Zellen, die mit TSPY 1-IVT-RNA transfizierten DCs stimuliert worden waren, war nicht nachzuweisen. Auch „ex vivo“ war eine Reaktivität gegen TSPY 1 nicht nachweisbar gewesen (Daten nicht gezeigt). Bei den Blutlymphozyten der anderen Patienten konnten ebenfalls keine gegen TSPY 1- oder pp65-reaktiven CD8⁺ T-Zellen stimuliert werden.

Schlussfolgerung:

Reife dendritische Zellen (DC) von fünf Patienten wurden mit „in vitro“-transkribierter mRNA (IVT-RNA) für TSPY 1 transfiziert und für die Stimulation von autologen CD8⁺ T-Zellen eingesetzt. Bei den Blutlymphozyten der Patienten konnten keine gegen TSPY 1-reaktiven CD8⁺ T-Zellen stimuliert werden.

D Diskussion

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung von tumorassoziierten, durch T-Zellen erkannten Antigenen im Melanommodell D41. Die Melanomzelllinie D41-MEL wurde vom Queensland Institute of Medical Research in Brisbane genauso wie die autologen, kryokonservierten PBLs freundlicherweise zur Verfügung gestellt [152]. Von den kryokonservierten PBLs des Patienten wurden in dieser Arbeit drei verschiedene, tumorreaktive MLTCs durch Stimulation mit der autologen Melanomzelllinie D41-MEL generiert. Zusätzlich wurde aus D41-MEL-Zellen eine Tumor-cDNA-Bank konstruiert. Dadurch waren die Voraussetzungen für die Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen mittels T-zellvermittelter cDNA-Expressionsklonierung gegeben. Für den Nachweis von tumorreaktiven T-Zellen in den MLTCs wurde als Detektionsverfahren der IFN- γ -ELISPOT-Assay gewählt [172;199]. Mittels des IFN- γ -ELISPOT-Assays wurde die Anreicherung tumorspezifischer T-Zellen in allen D41-MLTCs nachgewiesen. Mittels des Antigenpaneltests und des cDNA-Bank-Expressionsscreenings wurden die Zielantigene dieser T-Zellen identifiziert.

1 Antitumorale T-Zellantworten im Melanommodell D41

Bisherige Vakzinierungsstudien erfüllten nicht die in sie gesetzten Erwartungen [200-203;203]. Dabei korrelierten die Induktion vakzine-reaktiver T-Zellantworten nicht oder nur selten mit den klinischen Antworten [204]. Im Melanommodell D41 entwickelte der Patient unter Vakzinierung mit einem Gemisch aus autologen Tumorzellen und DCs eine komplette Remission [152]. Durch die Analyse der individuellen, antitumoralen Immunantwort des Patienten zu bestimmten Zeitpunkten der Vakzinierungsstudie bot sich die Chance, die Korrelation zwischen Vakzinierung und klinischem Erfolg zu untersuchen.

Zur Verbesserung der aktiven, antigenspezifischen Immuntherapie stellt die Identifizierung von Zielstrukturen der T-Zellen neben der generellen Erforschung der Mechanismen der Tumorabwehr eine Grundvoraussetzung dar. Die zelluläre Immunantwort, vermittelt durch CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, ist dabei ausschlaggebend für eine effektive Abwehrreaktion gegenüber Tumorzellen. Zahlreiche Untersuchungen belegten, dass tumorspezifische T-Zellen bei vielen malignen Erkrankungen spontan entstanden [205-208]. Mehrere Faktoren entscheiden in ihrer Summe über die Effektivität einer Immunantwort gegen Antigene, und ob es zu einer produktiven T-Zellantwort oder zu

Tumortoleranz bzw. Anergie kommt [81-83]. Dabei zu nennen wären u.a. die Qualität der Antigenpräsentation, welche die HLA-Expression und die Antigenprozessierung der Zelle einschließt, die Kostimulation durch antigenpräsentierende Zellen und die Affinität der T-Zellen zum Peptid-HLA-Komplex. In dieser Arbeit zeigte sich, ebenso wie bereits im Rahmen der Analyse anderer Patienten [94-96], dass die individuelle antitumorale T-Zellantwort des Patienten D41 bestimmt wurde durch:

1. den individuellen HLA-Phänotyp,
2. das individuelle T-Zellrepertoire und
3. die Antigenexpression bzw. -präsentation des Tumors.

Ein wichtiges Indiz für eine erfolgreiche Immunisierung ist dabei eine massive Proliferation von T-Zellen [209]. Powell und Rosenberg berichteten von einer Frequenz gp100-epitopspezifischer T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten von durchschnittlich 4,8%, die nach der Immunisierung auf durchschnittlich 38,1% anstiegen [210]. In anderen Fällen werden Frequenzen von tumorspezifischen T-Zellen im Blut von Patienten zwischen 0,03% und 3% berichtet [211;212]. Für die Generierung von tumorreaktiven CD8⁺-T-Zellen in Form von MLTCs wurden in dieser Arbeit PBMCs dreier Blutproben verwendet, die dem Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten der Vakzinierungsstudie entnommen wurden. Die Lymphozyten wurden wöchentlich mit bestrahlten, autologen Melanomzellen stimuliert. Drei verschiedene MLTCs wurden so im Modell D41 generiert. D41-MLTC 1 und 2 wurden über einen Zeitraum von 24 Tagen, D41-MLTC 3 über 43 Tage expandiert (s. Kapitel C-3.1). Mit Daten der Stimulation antiviraler T-Zellen, wie sie in der Literatur angegeben werden [213;214], war die Expansion der MLTCs nicht zu vergleichen. D41-MLTC 1, angesetzt mit PBMCs vor Impfung des Patienten, expandierte um das Sechsfache. D41-MLTC 2 war aus PBMCs angesetzt worden, die direkt vor der 8. Impfung zum Zeitpunkt der kompletten Remission dem Patienten entnommen worden waren. Diese MLTC proliferierte um das 25-fache. Die beobachteten Proliferationseigenschaften könnten ein Indiz für die erfolgreiche Immunisierung des Patienten gegenüber seiner Tumorerkrankung sein. D41-MLTC 3 zeigte nur eine sehr geringe Proliferation. Die Zellzahl nahm nach dreiwöchiger Stimulation um das dreifache und nach fünfwöchiger Stimulation um das fünffache bei dieser MLTC zu (**Abb. C-4**). D41-MLTC 3 wurde angesetzt mit PBMCs vor der 15. Impfung und zwei Jahre nach Auftreten der kompletten Remission. Experimente in Mäusen zeigten, dass die Expansion und Aktivierung antitumoraler CTLs durch DCs transient waren und diese sich nach wiederholten Immunisierungen verringerten [215]. In Menschen, mit einigen seltenen Ausnahmen [216;217], führte die wiederholte

Vakzinierung mit DCs zu einer transienten Immunantwort mit einem Rückgang der melanomreaktiven, peptidspezifischen T-Zellen [218-222]. Die geringe Proliferation der D41-MLTC 3 könnte mit dieser Beobachtung korrelieren. Zum Zeitpunkt der PBL-Entnahme, mit denen die D41-MLTC 3 angesetzt worden war, war der Patient bereits zwei Jahre krankheitsfrei, wurde aber weiterhin geimpft. Das Verschwinden tumorspezifischer T-Zellen aus dem peripheren Blut des Patienten könnte durch die Migration der T-Zellen in das Tumorgewebe oder in andere Gewebe wie z.B. Lymphknoten begründet sein [223;224]. Andererseits könnte die Stimulation von lytisch aktiven T-Zellen am Höhepunkt ihrer Expansion bzw. Aktivierung mit ungenügendem, weiteren Kontakt zu Fremdanigenen den AICD ausgelöst haben [225;225]. Einige der aktivierten T-Zellen dagegen könnten zu T-Memory-Zellen mit einer hohen Lebensdauer differenziert sein [88], was ebenfalls eine noch messbare Tumorreaktivität in D41-MLTC 3 erklären würde, zumal ein „*in vitro*“-Priming der T-Zellen in der Kultur nicht anzunehmen ist. Dafür spricht, dass die in den unterschiedlichen D41-MLTCs gefundenen Reaktivitäten gegen dieselben Antigene gerichtet waren. Desweiteren zeigten andere Arbeiten, dass durch kurzfristige „*in vitro*“-Stimulationen von PBMCs keine Generierung tumorspezifischer T-Zellen aus dem Pool der naiven T-Zellen stattfindet und dass die detektierten, tumorspezifischen T-Zellen aus dem Pool der Memory-T-Zellen der Patienten stammen [226]. Allerdings hängen „*in vitro*“-Proliferationseigenschaften von vielen exogenen Faktoren ab. Aufschlussreicher wären „*ex vivo*“-Frequenzmessungen antigenspezifischer T-Zellen. Diese Analyse konnte aufgrund von fehlendem PBMC-Material nicht durchgeführt werden.

In allen drei MLTCs konnten durch die Stimulation mit den autologen Melanomzellen tumorreaktive T-Zellen angereichert werden (**Abb. C-5**). Die Anreicherung tumorreaktiver T-Zellen in D41-MLTC 1 durch kurzzeitige Stimulation mit autologen Melanomzellen zeigte dabei eine bereits vorhandene Immunantwort des Patienten gegenüber dem autologen Tumor vor Beginn der Vakzinierungsstudie. Diese Beobachtung korrelierte mit Untersuchungen, die belegen, dass tumorspezifische T-Zellen bei malignen Melanomen spontan entstehen [206].

Die generelle Restriktion der Reaktivitäten aller drei D41-MLTCs über MHC-Klasse-I-Moleküle konnte in Antikörperblockadeexperimenten nachgewiesen werden. Eine vollständige Blockade durch den monoklonalen Antikörper W6/32 und eine fast vollständige Blockade der Reaktivität durch einen Anti-HLA-A*02-Antikörper (**Abb. C-5**) ließ erwarten, dass die erkannten, tumorassoziierten Antigene hauptsächlich über HLA-A*0201 restringiert waren. Eine Restriktion der D41-MLTCs über das HLA-B- oder HLA-Cw-

Allel des Patienten war dagegen nicht vorhanden. Die Resultate der durchflusszytometrischen Analyse der Melanomzelllinie D41-MEL zeigten keine messbare Expression der HLA-B*0801- und HLA-Cw*0701-Moleküle. Die HLA-Klasse I-Genotypisierung der Melanomzelllinie zeigte im Vergleich zu der autologen EBV-B-Zelllinie, dass sowohl die D41-EBV-B-Zelllinie als auch die D41-Melanomzelllinie homozygot für das HLA-B- und das HLA-C-Allel sind. Somit lag bei der Melanomzelllinie D41-MEL kein Haplotyp- oder Allelverlust vor. Unter IFN- γ -Behandlung stieg die Expression dieser HLA-Moleküle an (**Abb.C-1**). Dieses Ergebnis könnte als Erklärung für eine nicht nachweisbare Restriktion der D41-MLTCs (**Abb. C-5**) über HLA-B*0801 und HLA-Cw*0701 dienen. Eine Erklärung wäre, dass durch die fehlende Expression eine Stimulation der über HLA-B*0801 und HLA-Cw*0701 restringierten T-Zellen unterbleibt und es sich hierbei um einen „*tumor escape*“-Mechanismus handelt. Die verringerte Expression oder der Verlust von HLA-Molekülen wurde bereits in der Literatur als „*immune escape*“-Mechanismus von Tumoren beschrieben [165;166;227]. Eine nicht messbare Expression von HLA-Molekülen in der durchflusszytometrischen Analyse muss allerdings nicht zwangsläufig eine fehlende Stimulation von zytotoxischen T-Zellen erklären, da hoch affine T-Zellen sehr sensitiv sein können. In der Literatur wurde zudem beschrieben, dass bei manchen hoch affinen T-Zellen statistisch ein Peptid-HLA-Komplex pro Zelle zur Erkennung und somit vermutlich zur Stimulation ausreichend ist [228]. Die HLA-Expression des HLA-B- und HLA-Cw-Alles kann, wie auch die Resultate gezeigt haben (**Abb. C-1**), durch IFN- γ hochreguliert werden [169;229;230]. IFN- γ ist ein Effektormolekül von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. Eine weitere Möglichkeit wäre ein vollständiges Fehlen HLA-B*0801 oder HLA-Cw*0701 restringierter, tumorreaktiver T-Zellen im T-Zellrepertoire des Patienten aufgrund von zentralen oder peripheren Toleranzmechanismen [231-233]. Zur Klärung dieser Frage könnte die Stimulation von PBMCs mit IFN- γ -vorbehandelten D41-Melanomzellen beitragen, da die Expression von HLA-B- und HLA-Cw-Allelen durch IFN- γ und somit auch die Antigenpräsentation über diese HLA-Moleküle gesteigert wurde. Diese Stimulation konnte allerdings aufgrund von fehlendem PBMC-Material nicht durchgeführt werden.

Um zu ermitteln, inwiefern sich die T-Zellantworten der D41-MLTCs gegen die Melanomzelllinie D41-MEL aus Immunantworten gegen bereits bekannte Antigene zusammensetzten, wurde mit den D41-MLTCs ein Antigenpaneltest durchgeführt (s. Kapitel **C-3.2.2**). Dabei zeigte sich eine starke Repräsentation von HLA-A*0201-restringierten T-Zellen gegen Melan-A und NY-ESO-1 in den unabhängigen D41-MLTCs.

Dies bestätigte die Erwartungen, dass die tumorassoziierten Antigene im Modell D41 hauptsächlich über HLA-A*0201 restringiert waren. Eine schwache Reaktivität der MLTCs konnte gegenüber MAGE-A10 in Assoziation mit HLA-A*0201 und gegenüber MAGE-A3 bzw. MAGE-A6 nachgewiesen werden (**Abb. C-6, C-7, C-8**). Zudem zeigte sich, dass D41-MLTC 1 gegenüber Melan-A stärker reagierte als gegenüber NY-ESO-1, während D41-MLTC 2 stärker reaktiv gegenüber NY-ESO-1 als gegenüber Melan-A war. Die starke Reaktivität gegen Melan-A, restringiert über HLA-A*0201, war nicht weiter überraschend, zumal in der Literatur Melan-A als stark repräsentiertes Antigen in HLA-A*0201-positiven Melanompatienten beschrieben ist. So ist Melan-A/MART-1 generell häufig exprimiert in Melanomen [175;234;234] und 90% der isolierten TILs von HLA-A*0201-positiven Melanompatienten erkennen Melan-A [175].

Die D41-MLTCs waren aufgrund der starken Reaktivität gegen Melan-A und NY-ESO-1 für ein Screening der D41-cDNA-Bank und somit die Identifizierung unbekannter TAA ungeeignet, da davon auszugehen war, dass Melan-A und NY-ESO-1 in der Bank überwiegend durch die MLTCs identifiziert werden würden. Mittels des Grenzverdünnungsverfahrens wurden deshalb T-Zell-Klone etabliert. Die Etablierung von T-Zell-Klonen und die T-Zell-Klonspezifitäten spiegeln allerdings nicht die „*in vivo*“-Situation wieder. Bei der Generierung von MLTCs konkurrieren „*in vitro*“ hoch avide mit niedrig aviden T-Zellen u.a. um das Zytokinmilieu, die APCs und um die MHC-Peptid-Komplexe auf der Zelle. Im Gegensatz zur viral-induzierten Immunität, die sich häufig aus hoch aviden T-Zellen zusammensetzt [235;236], sind die Immunantworten gegenüber Tumoren häufig schwach und begründet durch niedrig avide CTLs, besonders dann, wenn das Spektrum der Tumorantigene aus Autoantigenen besteht [237;238]. Die Avidität von T-Zellen kann definiert werden durch die Antigenkonzentration, die eine T-Zellantwort gegen mit dem Antigen beladene Targetzellen auslöst. Avidität beschreibt dabei die Stärke der Interaktion zwischen T-Zellen und den Targetantigenen und korreliert mit der Effizienz der Tumorerkennung durch T-Zellen. Dies wurde bereits für andere Antigene demonstriert [239;240]. Für die Tumorabstoßung ist die Stärke der Avidität ein Hauptfaktor [241;242]. Sie setzt sich zusammen aus der Summe mehrerer Faktoren, wie dem Expressionslevel des TCR, der TCR/Peptid/MHC-Bindungsaffinität, Expression kostimulatorischer Moleküle und dem Mikromilieu. Hoch avide T-Zellen benötigen weniger Antigen (mit < 1 nM Peptid beladene APCs) als moderat avide (mit 1–100 nM Peptid beladene APCs) oder niedrig avide (mit >100 nM Peptid beladene APCs) [242]. Hoch avide T-Zellen dominieren niedrig avide. Allerdings kann es später zu einem Verlust der hoch aviden T-Zellen durch den AICD kommen, der bei lytisch aktiven T-Zellen auf dem Höhepunkt der

Aktivierung mit ungenügendem Kontakt zum Fremdanigen ausgelöst wird [225]. Hoch avide T-Zellen können niedrig avide T-Zellen dominieren, indem sie die APCs schneller lysieren und es bei limitierter Anzahl von APCs nicht zu einer Aktivierung subdominanter T-Zellen kommt [243] oder indem sie schneller proliferieren bzw. Vorteile bei Effektorfunktionen haben [244;245]. Bei einer T-Zellklonierung kommt es nicht zu einer Konkurrenz von T-Zellen, so dass auch niedrig avide T-Zellen bei einer Klonierung stabil etabliert werden können. MLTCs geben dabei wahrscheinlich ein zutreffenderes Bild der „in vivo“-Situation wieder als stabil etablierte T-Zell-Klone, weil sie nur kurzzeitig stimuliert waren und gegenüber einzelner CTL-Klone in weit geringerem Maße durch die Kulturbedingungen selektioniert wurden.

Aus D41-MLTC 1 und 2 konnten insgesamt 41 T-Zell-Klone etabliert werden. Die einzelnen T-Zell-Klone wiesen die Antigenspezifitäten Melan-A, NY-ESO-1 und MAGE-A10 in Assoziation mit HLA-A*0201 sowie MAGE-A3 und MAGE-A6 in Assoziation mit HLA-A*0101 auf. Die Melan-A-reaktiven T-Zell-Klone waren die am stärksten repräsentierte Gruppe bei den aus D41-MLTC 2 isolierten Klonen (**Abb. C-9**). Bei den aus D41-MLTC 3 isolierten T-Zell-Klonen konnte dagegen kein Melan-A-reaktiver Klon nachgewiesen werden. Die bei diesen Klonen am stärksten vertretene Gruppe war neben den HLA-A*0201-restringierten T-Zellen, bei denen die Antigenspezifität unbekannt war, die gegen MAGE-A4/MAGE-A10-reaktiven T-Zellen. T-Zell-Klone, die MAGE-A4/MAGE-A10 in Assoziation mit HLA-A*0201 erkannten, konnten aus D41-MLTC 2 nicht isoliert werden. T-Zell-Klone, die NY-ESO-1 in Assoziation mit HLA-A*0201 erkannten und jene, die HLA-A*0101 restringiert waren, waren sowohl bei den aus D41-MLTC 2 als auch bei den aus D41-MLTC 3 isolierten Klonen nur gering repräsentiert. Stark repräsentiert bei den aus D41-MLTC 2 isolierten T-Zell-Klonen war ebenfalls die Gruppe der HLA-A*0201-restringierten T-Zell-Klone, deren Antigenspezifität unbekannt war. Aufgrund der geringen Proliferation der aus D41-MLTC 3 isolierten T-Zell-Klone konnten die Antigenspezifitäten der Klone nicht vollständig aufgeklärt werden. Die geringe Proliferation der T-Zell-Klone stand dabei in Korrelation zu der geringen Proliferation der D41-MLTC 3. Dies und die unterschiedliche Verteilung der T-Zell-Klonspezifitäten zwischen den T-Zell-Klonen beider MLTCs könnte ein Indiz für die Konkurrenz von hoch aviden und niedrig aviden T-Zellen und anschließendem AICD der hoch aviden T-Zellen sein, aber auch ein Indiz für das Verschwinden tumorspezifischer T-Zellen aus dem peripheren Blut des Patienten durch Migration. Im Falle einer Konkurrenz von hoch aviden und niedrig aviden T-Zellen müssten die aus D41-MLTC 3 isolierten T-Zell-Klone niedrig avide. Aufgrund der

geringen Proliferation der Klone konnte die Affinität, die neben der Proliferation ein Indiz für die Avidität von T-Zellen ist, allerdings nicht überprüft werden. Unabhängig davon könnte die Etablierung dieser T-Zell-Klone auch in Zusammenhang mit den Kulturbedingungen stehen.

Die Melan-A-reaktiven T-Zell-Klone aus D41-MLTC 2 proliferierten zum Teil sehr stark, waren allerdings, wie die Peptidtitration im IFN- γ -ELISPOT-Assay zeigte, niedrig affin (**Anhang C**). 13 CTL-Klone mit einer Diversität von fünf TCR-V β -Ketten erkannten das Peptid EAAGIGILTV von Melan-A und waren mit halbmaximaler Erkennung bei einer Peptidkonzentration zwischen 1 und 0,1 μ M Peptid niedrig affin. In der Literatur wurde bereits bei anderen Studien eine hohe Diversität des Melan-A-reaktiven T-Zellrepertoires beschrieben [246;247]. Die geringe Affinität Melan-A-spezifischer T-Zellen war zu erwarten, da es sich bei Melan-A um ein Differenzierungsantigen und somit um ein Autoantigen handelt. Melan-A wird ebenfalls in Melanozyten exprimiert, wodurch es als Kandidatenantigen für die Vitiligo betrachtet wird [248]. T-Zellen, die gegen Autoantigene reagieren, unterliegen den zentralen und peripheren Toleranzmechanismen [231-233]. Diesen können sie nur bei entsprechend geringer Affinität entkommen [249]. Am Beispiel von Melan-A ist dieser Umstand in der Literatur gezeigt worden [250].

Die HLA-A*0201-restringierten CTL-Klone, deren Antigenspezifität unbekannt war, wiesen eine Diversität von mindestens drei TCR-V β -Ketten. Bei zwei von den sechs CTL-Klonen handelte es sich um identische Klone mit der V β -Kette 6 (D41-CTL2/121 und D41-CTL2/155), bei zwei weiteren Klonen um identische Klone mit der V β -Kette 22 (D41-CTL2/62 und D41-CTL2/152). Bei den restlichen beiden CTL-Klonen konnte die V β -Kette nicht bestimmt werden. Als restringierendes HLA-Allel wurde in einem Antikörperblockadeexperiment für alle vier CTL-Klone HLA-A*0201 bestimmt. Diese vier verschiedenen CTL-Klone wiesen auch nach Paneltestung keine bekannte Antigenspezifität auf. Für ein Screening mussten die CTL-Klone auf möglichst hohe Zellzahlen expandiert werden. Dies gelang für D41-CTL2/152 und D41-CTL2/155. Beide CTL-Klone wurden in einem Screening der D41-cDNA-Bank eingesetzt. Desweiteren zeigte sich, dass beide CTL-Klone neben der autologen Melanomzelllinie auch allogene Tumorzelllinien erkannten. D41-CTL2/155 erkannte neben D41-MEL auch eine allogene Melanomzelllinie und Zellen einer chronisch myeloische Leukämie. D41-CTL2/152 dagegen erkannte neben der autologen Melanomzelllinie eine weitere Melanomzelllinie und schwach die autologe EBV-B-Zelllinie. Die Erkennung der allogeen Zelllinien ließ annehmen, dass die von den CTL-Klonen erkannten Antigene nicht mutiert waren. Obwohl

häufig auch mutierte Antigene in Tumormodellen vorhanden sind [95;96;251;252], konnten im Modell D41 keine mutierten, tumorassoziierten Antigene identifiziert werden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die etablierten T-Zell-Klone, die nicht zu hohen Zellzahlen expandiert werden konnten und somit für ein cDNA-Expressionscreening nicht in Frage kamen, mutierte Antigene erkennen. Hierbei zeigte sich ein Nachteil des T-zellvermittelten cDNA-Expressionscreenings, da dieses bei ungenügender Expansion der T-Zellen nicht durchzuführen ist.

2 Identifizierung tumorassoziierter Antigene durch T-zellvermitteltes cDNA-Expressionscreening

Die T-zellbasierten Techniken zur Identifizierung von tumorassoziierten oder tumorspezifischen Antigenen basieren auf der Verfügbarkeit von tumorreaktiven T-Zellen [96;253]. Durch die Generierung von tumorspezifischen T-Zellen im Modell D41 war die erste Voraussetzung für die Identifizierung von Tumorantigenen gegeben. Die beiden CTL-Klone D41-CTL2/152 und D41-CTL2/155 konnten auf ausreichend hohe Zellzahlen expandiert werden und wurden beide für die Identifizierung von neuen TAAs eingesetzt. Durch T-Zellen erkannte Tumorantigene können durch eine Reihe von molekularbiologischen und immunologischen Methoden identifiziert werden (**siehe Kapitel A-2.4**). In dieser Arbeit wurde für die Identifizierung neuer, tumorassoziierter Antigene das T-zellvermittelte cDNA-Expressionscreening gewählt [2]. Mittels dieser Methode wurden bereits zahlreiche T-zellerkannte, tumorassoziierte Antigene identifiziert [28;95;96;113;254;255]. Durch das T-zellbasierte cDNA-Expressionscreening ist die Entdeckung auch schwach exprimierter, strukturell normaler und mutierter, posttranslational modifizierter und unmodifizierter Antigene möglich. Somit ist diese Methode vergleichsweise wenig eingeschränkt. Dabei werden Transfektanten, die mit einer cDNA-Bank transfiziert sind, auf Erkennung durch tumorspezifische T-Zellen überprüft. Die hohe Sensitivität der T-Zellen erlaubt auch die Identifizierung von Proteinen seltener Transkripte. In dieser Arbeit wurden die xenogenen COS-7-Zellen, sowie die humanen 293T-Zellen, die die HLA-Allele HLA-A02, -B08 und -Cw07 exprimieren, als cDNA-Rezipienten verwendet. Diese Methode setzt allerdings voraus, dass das transfizierte, genetische Material in den Transfektanten exprimiert und prozessiert sowie zusammen mit HLA-Molekülen auf deren Oberfläche gelangt. Das genetische Material war dabei zuvor in Expressionsvektoren kloniert worden, welche in den mit dem SV-40 „Large T“ Antigen

transfizierten COS-7- oder 293T-Zellen episomal amplifiziert und exprimiert werden können [127;128;163].

Als Quelle für das Screening nach tumorassoziierten Antigenen diente von der Melanomzelllinie D41-MEL isolierte Poly-A⁺-RNA, welche das Transkriptom und somit das gesamte Proteinspektrum der Zelle repräsentiert. Die Poly-A⁺-RNA der D41-Melanomzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels der Gateway[®]-Methode in den Expressionsvektor pcDNA3.1/RfA/Dest.#6 kloniert (s. Kapitel C-2). Die Klonierungseffizienz für die cDNA lag bei 87,5%. In der Restriktionsanalyse der Plasmid-cDNA konnten nur Fragmente mit einer Länge von 4 kb detektiert werden (**Abb. C-2**). Eine Limitierung der Länge der cDNA-Inserts war hierbei durch die Effizienz der PCR gegeben. Die Ausbeute der cDNA-Bank lag bei 550000 Klonen, von denen jede cDNA des Transkriptoms nach der Poisson-Verteilung mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% bei einer maximalen Größe von 4 kb der klonierten cDNA zumindest einmal vorkommen sollte.

Der Erfolg des cDNA-Expressionsscreenings ist u.a. abhängig von der Qualität der cDNA-Bank. Diese kann durch 5'-Deletionen oder Frameshifts in der antigenkodierenden cDNA beeinträchtigt sein. Eine 5'-Deletion sollte allerdings aufgrund der Klonierung nach der Gateway[®]-Methode minimiert sein, da der „*First strand*“ der cDNA mittels spezieller Primer für das 5'-Ende und das 3'-Ende synthetisiert wird. Der 5'-Primer bindet an das Startcodon ATG und den 5'-Cap, während der 3'-Primer an den Poly-A-Schwanz der Poly-A⁺-RNA bindet. Allerdings könnte es aufgrund der Transkription und Translation der cDNA durch ein zweites Startcodon innerhalb der kodierenden Sequenz zu einem Frameshift oder einer 5'-Deletion und dadurch zu einem Fehlen des von T-Zellen erkannten Epitops kommen. Die Qualitätskontrolle der D41-cDNA-Bank erfolgte durch ein Screening von 100er cDNA-Pools auf funktionell intakte HLA-A*0201-cDNA. Die Identifizierung von HLA-A*0201 erfolgte durch die Erkennung von COS-7-Transfektanten kotransfiziert mit für CDK4^{mut} kodierender Plasmid-DNA und den 100er Pools, durch SK29-CTL14/35 (**Abb. C-3**). Die Erkennung von zwei 100er cDNA-Pools durch den CTL-Klon zeigte, dass durch ein Screening transkribierte und translatierte cDNA aus der D41-cDNA-Bank durch CTL-Klone identifiziert werden konnte. Eine Bestätigung der Qualitätskontrolle war die Identifizierung von Melan-A und NY-ESO-1 durch die D41-MLTC 2 in der cDNA-Bank (Daten nicht gezeigt).

Eine Identifizierung unbekannter Antigene erfolgte mittels des cDNA-Expressionsscreenings durch die T-Zell-Klone D41-CTL2/152 und D41-CTL2/152. Die Antigenspezifität des CTL-Klons D41-CTL2/155 konnte trotz eines cDNA-Screening mit

$1,4 \times 10^5$ cDNA-Klonen nicht geklärt werden. Möglicherweise könnte es aufgrund der Transkription und Translation der für das von D41-CTL2/155 erkannte Antigen kodierende cDNA durch ein zweites Startcodon in der Poly-A⁺-RNA-Sequenz zu einem Frameshift oder einer 5'-Deletion und dadurch zu einem Fehlen des vom CTL-Klon erkannten Epitops kommen. Diese Möglichkeit würde allerdings einschließen, das es sich bei dem von D41-CTL2/155 erkannten Antigen um ein sehr seltenes Transkript handelt, dass im Transkriptom nicht häufig vertreten ist und somit auch nicht effizient in cDNA umgeschrieben wurde. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die antigen-kodierende cDNA größer als 4 kb ist, da die Länge der cDNAs durch die Effizienz der PCR begrenzt ist. Somit sind in der D41-cDNA-Bank cDNAs mit einer Länge größer als 4 kb unterrepräsentiert und schwerer zu identifizieren. Es könnte ebenfalls sein, dass aufgrund einer posttranslationalen Modifikation, die COS-7-Zellen nicht möglich wäre, das Antigen vom CTL-Klon nicht erkannt wurde.

Das Screening mit D41-CTL2/152 war hingegen erfolgreich. D41-CTL2/152 erkannte den cDNA-Klon #218.138.69 (**Abb. C-11**). Dieser kodierte für das TSPY 1-Protein. Bei Vergleich mit den Datenbankeinträgen enthielt der cDNA-Klon #218.138.69 einen am 5'-Ende um 55 Nukleotiden verkürzten „*open reading frame*“ (ORF). Aufgrund eines in der Sequenz zweiten, vorhandenen ATGs konnte es zu einer „*in frame*“-Transkription mit einem prozessiertem Epitop in den Transfektanten kommen.

3 TSPY 1 als T-Zell-erkanntes Antigen

TSPY 1 wurde als eines der ersten transkribierten Gene auf dem menschlichen Y-Chromosom mit einer strikten Expression in den Hodengeweben identifiziert. Es ist beim Menschen als tandemartig repetitive Genfamilie mit einer Varianz von 30 bis 60 Kopien zwischen einzelnen Individuen organisiert [256;257]. Diese heterogene Genfamilie mit einer Varianz von 1% in der 5'-flankierenden und der kodierenden Genregion ist in sechs Clustern auf dem Y-Chromosom lokalisiert [179], wobei sich die meisten Genkopien in der kritischen Region des Gonadoblastoma-Locus des Y-Chromosoms (GBY) befinden [179;258]. Der GBY wird für die Entstehung des Gonadoblastoms verantwortlich gemacht.

Jede Genkopie von TSPY besteht aus etwa 2,8 kb und umfasst sechs Exons und fünf Introns [182]. Da die meisten funktionellen Genkopien des TSPY 1 im GBY lokalisiert sind und Expressionsanalysen eine hohe Expression von TSPY 1 in Gonadoblastomen demonstrierten, wird TSPY 1 als potentiell Onkogen beim Menschen angesehen [180]. TSPY 1 wird in fötalem und adultem Hodengewebe exprimiert, vor allem in

Spermatogonien, Spermatozyten und der Basallamina der Samenkanälchen [178;181]. Eine hohe Expression wurde in den Spermatogonien und eine geringere in den primären Spermatozyten nachgewiesen. Eine Funktion des TSPY-Proteins bei der Differenzierung in der frühen Spermatogenese wird deshalb diskutiert [181;182]. In malignem Gewebe wurde TSPY 1 neben Gonadoblastomen ebenfalls in Hodentumoren, in Prostatakarzinomen, Leberzellkarzinomen und Melanomen nachgewiesen [177;183-185]. Bei Patienten mit Leberzellkarzinomen wurde zudem eine humorale Immunantwort gegen TSPY 1 detektiert [185]. Dies und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass TSPY 1 „*in vivo*“ immunogen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde TSPY 1 als neues, tumorassoziiertes Antigen identifiziert, das zumindest vom melanomreaktiven T-Zellen in Assoziation mit HLA-A*0201 erkannt wird (**Abb. C-11**). Der vom D41-CTL2/152 erkannte D41-cDNA-Bank-Klon #218.138.69 kodierte für 267 Aminosäuren des TSPY 1-Proteins, das mit vollständiger Länge 308 Aminosäuren umfasst [178;259]. Dabei enthielt der cDNA-Klon #218.138.69 den ORF für das Gen mit einer Deletion von 55 Nukleotidbasen am 5'-Ende und mit einem am 3'-Ende nicht translatierten Bereich. Die Sequenz des ORFs war bis auf einen stillen Basenaustausch identisch zu der bei NCBI veröffentlichten Sequenz. In dem nicht translatierten 3'-Bereich waren gegenüber der publizierten Sequenz Varianzen vorhanden, die zu einer Insertion von Thymidin und einer Deletion von Adenin führten.

Trotz der 5'-Deletion konnte der cDNA-Klon in einem Screening der cDNA-Bank als antigenkodierend identifiziert werden, da ein alternatives Startcodon eine „*in frame*“-Transkription ermöglichte. Aus dem durch den angenommenen ORF kodierten Protein wurden mit Hilfe der öffentlichen Datenbank SYFPEITHI sechs nonamere HLA-A*0201-bindende Peptide mit einem Score von 16 bis 23 und zwei decamere Peptide mit einem Score von 17 und 20 vorhergesagt. Generell ist für HLA-A*0201-bindende Peptide dabei ein maximaler Score von 36 bei der Vorhersage möglich [144;260]. Die Datenbank beinhaltet eine Kollektion von MHC-I- und MHC-II-Epitopen von Menschen und anderen Spezies. Die motivbasierte Vorhersage ergibt sich dabei aus einer Liste von Peptiden, welche eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Präsentation durch ein vorgegebenes MHC-Molekül haben. Den Aminosäuren in den Peptiden wurden dabei Werte zugeordnet, die sich aus den Vorteilen und Nachteilen der Position im Peptid ergeben. Diese Werte werden zu einem Gesamtscore des vorhergesagten Peptides zusammengefasst. Das optimale, Peptid wird dabei üblicherweise unter den Peptiden mit den zehn höchsten Scores erwartet [144]. Dies bedeutet allerdings nicht, dass die Peptide durch die Zelle auch prozessiert und präsentiert werden. Selbst bei Beschränkung auf die höchsten Scores wurden mit Hilfe der

Datenbank für das gesamte TSPY 1-Protein 30 nonamere Peptide und 34 decamere Peptide vorhergesagt. Eine Synthese und Überprüfung aller vorhergesagten Peptide war aufgrund des Kosten- und Zeitaufwandes der Synthese nicht sinnvoll. Deshalb wurde, um die Anzahl der Peptidkandidaten zu begrenzen, eine 3'-Fragmentierung des cDNA-Klons durchgeführt. Dabei wurde das exakte C-terminale Ende des HLA-bindenden Peptides bestimmt (**Abb. C-13**). Der C-Terminus des vom CTL-Klon erkannten Peptides endete auf die Aminosäure Valin. Eine weitere Peptidvorhersage ergab als wahrscheinliches, HLA-A*0201-bindendes Peptid in dieser Region das decamere Peptid LLLDDIMAEV (TSPY 1₆₅₋₇₃) und das nonamere Peptid LLDDIMAEV (TSPY 1₆₆₋₇₃). Beide Peptide wurden synthetisiert und im IFN- γ -ELISPOT-Assay durch den CTL-Klon D41-CTL 2/152 erkannt. Die TSPY 1-reaktiven CTL waren hoch avide T-Zellen, da sie die Peptide noch in einer Konzentration von 0,01 nM erkannten (**Abb. C-14**). Hoch avide T-Zellen benötigen weniger Antigen (mit < 1 nM Peptid beladene APCs) als moderat avide (mit 1–100 nM Peptid beladene APCs) oder niedrig avide (mit >100 nM Peptid beladene APCs) [242]. Avidität beschreibt dabei die Stärke der Interaktion zwischen T-Zellen und den Targetantigenen und korreliert mit der Effizienz der Tumorerkennung durch T-Zellen. Dies wurde bereits für andere Antigene demonstriert [239;240]. In der Literatur ist beschrieben, dass die Avidität gegen Neoepitope von mutierten Antigenen die Stärke der Avidität von T-Zellen gegen virale Antigene erreicht [96]. Mutierte Antigene sind von besonderem Interesse in der Immuntherapie von Tumoren. Es handelt sich bei ihnen um tumorspezifische Neoepitope, die zumindest nicht den zentralen Toleranzmechanismen unterliegen sollten [261]. Zudem ist die Expression dieser Antigene häufig während der Progression der Krankheit stabil, da diese Gene oft an der onkogenen Transformation beteiligt sind. Ein Nachteil der mutierten Neoepitope ist allerdings, dass sie nicht nur tumorspezifisch, sondern auch patientenspezifisch sind. Bei TSPY 1 handelt es sich nicht um ein mutiertes Neoepitop, sondern um ein Antigen, das aufgrund seines Expressionsprofils in die Gruppe der Cancer/Testis-Antigene (CTA) kategorisiert werden kann. Trotzdem erreicht die Affinität der TSPY-spezifischen T-Zellen im Modell D41 die Stärke der Affinität von T-Zellen, welche gegen mutierte oder virale Antigene gerichtet sind. Kriterien für die Einordnung eines Gens in die Familie der CTA sind neben der Immunogenität [262;263]:

- (a) die predominante Expression des Gens in Hodengewebe und keine Expression in anderen somatischen Geweben, außer der gelegentlichen Expression in den weiblichen Fortpflanzungsorganen
- (b) Expression in einem Anteil von malignen Tumoren verschiedener Histologie

- (c) Expression in bösartigen, schlecht differenzierter Tumoren
- (d) gonosomale Lokalisation des Gens
- (e) häufige Zugehörigkeit zur Multigenfamilie

CTAs sind attraktive Targets für die Immuntherapie, da sie zwar häufig tumorspezifisch, aber im Gegensatz zu mutierten Antigenen nicht patientenspezifisch sind und in zahlreichen Tumorentitäten vorkommen. Dabei variiert die Expression von CTAs zwischen den Tumorentitäten stark. Gemäß RT-PCR-Analyse exprimieren Blasenkarzinome, Lungenkarzinome, Ovarialkarzinome, Hepatozellularkarzinome und Melanome sehr häufig und hoch CTAs [112]. Normalerweise ist die Expression in normalem Gewebe beschränkt auf die Zellen der Keimbahn, wie Plazenta, Eierstöcke oder Hoden. Auch die Expression von TSPY 1 ist ausschließlich beschränkt auf das Hodengewebe [178;181;182]. In diesem Zusammenhang wird für TSPY 1 eine mögliche Funktion in der Proliferation und/oder Differenzierung von Keimzellen vermutet [181;182]. Zusätzlich wurde die TSPY 1-Expression für einige Tumorentitäten beschrieben (s. oben). Das Gen ist zudem gonosomal lokalisiert und kann damit in die Familie der non-X-CTA eingeordnet werden [264].

CTA wurden bezüglich ihrer Rolle in der Onkogenese untersucht. Obwohl das Wissen über die Funktion von CTA sowohl in normalem als auch malignem Gewebe noch rudimentär ist, ist aufgrund zahlreicher Untersuchungen klar, dass Proteine dieser Gene eine Vielzahl zellulärer Prozesse beeinflussen, wie Signalwege innerhalb der Zelle, Transkription, Translation und chromosomale Rekombination. Das diesbezüglich am besten untersuchte CTA ist MAGE-A1. Der Transkriptionsfaktor SKI *interacting protein* (SKIP) wurde in Yeast-two-hybrid-Assays als Bindungspartner für MAGE-A1 identifiziert. MAGE-A1 kann dadurch als Faktor für die Unterdrückung von Transkription agieren [265]. Die vollständige Funktion von MAGE-A1 in Keimzellen ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Es wird nur vermutet, dass der SKIP-Pathway involviert ist. Wahrscheinlich unterdrückt MAGE-A1 die Expression von Genen für die Differenzierung, zumal es in Spermatogonien, aber nicht in späteren Entwicklungsstadien der Spermatogenese exprimiert ist. Die Funktion der Inhibition der Gene für die zelluläre Differenzierung in Tumorzellen könnte einen wichtigen Beitrag bei der Tumorgenese leisten. Die Entdeckung der aberranten Expression von Genen der Keimbahn in Tumoren führte zu dem Ergebnis, dass das Konzept der genetischen Alteration von Tumorzellen in eine Reaktivierung der normalerweise stillen Expressionsprogramme von Keimzellen münden kann. Diese Expression verleiht den Tumorzellen einige der zentralen

Eigenschaften der Malignität, wie Immortalität, Invasivität, Hypomethylierung und Metastasierungspotential [263;266].

TSPY 1 ist aufgrund der SET/NAP-homologen Domäne des Proteins ein Mitglied der TSPY/TSPY-like/SET/NAP(TTSN)-Protein-Superfamilie. Einige Mitglieder dieser Proteinfamilie sind durch den Besitz einer Cyclin B-bindenden und/oder Histon-bindenden SET/NAP-Domäne gekennzeichnet und an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Die Regulation des Zellzyklus erfolgt an Kontrollpunkten zwischen den vier Phasen M, G₁, S und G₂ durch Protein-Kinase-Komplexe, die aus der aktivierenden Untereinheit Zyklin und der katalytischen Untereinheit CDK (zyklinabhängige Kinase) bestehen. Sowohl die Zykline als auch die CDK's unterliegen der Kontrolle durch aktivierende und hemmende Proteine [267]. „*In vitro*“ konnte nachgewiesen werden, dass das Protein SET an den Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1} und Cyclin B binden kann [268-270]. Diese Ergebnisse zeigen einen möglichen Einfluss des SET-Proteins in der Regulation des Übergangs von der G₂-Phase zur M-Phase. Auch für TSPY 1 wird eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus und/oder DNA-Replikation aufgrund der SET/NAP-homologen Domäne des Proteins diskutiert [258].

Die zentrale Frage für die Rolle der CTA ist allerdings, ob ihre Expression relevant für die Tumorgenese ist oder lediglich ein Nebenprodukt der genetischen Alteration [263]. Obwohl diese Frage noch nicht geklärt ist, erfüllen CTAs einige der Eigenschaften eines idealen tumorassoziierten Antigens für die Immuntherapie [271]. Ihre Expression ist im Vergleich zu somatischem Gewebe nahezu spezifisch für das Malignom und in einem substantiellen Anteil von Tumoren exprimiert. Von einer Vielzahl von CTA sind immunogene Peptide bekannt. Immunhistochemische Analysen zeigten allerdings, dass CTA selten homogen innerhalb eines Tumors exprimiert werden [272]. Häufig war die Expression nur in einem relativ geringen Anteil der Tumorzellen zu finden. Diese Varianz in der Expression kann allerdings auch ein Argument gegen eine Verwendung von CTA in der Immuntherapie sein. In einigen Studien wurden CTA für die peptid-basierte Immuntherapie eingesetzt und trotz Heterogenität Tumorregression beobachtet [273-275].

In MLTC aus zwei unabhängigen Blutproben des Patienten D41 wurden TSPY 1-reaktive T-Zellen angereichert. Beide Responderlymphozyten erkannten dabei sowohl das oben erwähnte Nonamer als auch das Dekamer in Assoziation mit HLA-A*0201. Die Reaktivität der D41-MLTC 1, die mit PBL vor Vakzinierung angesetzt wurde, bewies, dass bereits vor Vakzinierung mit autologen Tumorzellen eine Immunantwort gegen TSPY 1 vorhanden war. HLA-A02 ist mit nahezu 50% ein verbreitetes HLA-Allel in der kaukasischen Bevölkerung (www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/mutation.htm),

[276;277]. Dabei ist HLA-A*0201 mit einem Anteil von 98% unter den HLA-A02-Allelen vertreten. Aufgrund der Existenz eines HLA-A*0201-gebundenen Peptides und der Expression in verschiedenen Tumorentitäten ist TSPY 1 ein attraktives Target für die Immuntherapie.

Aufgrund der hohen Expression des TSPY 1-Proteins in Seminomen bzw. dessen Vorstufen wurde die Immunogenität von TSPY 1 bei drei Patienten mit Seminom und zwei Patienten mit Teratokarzinom untersucht. Dazu wurden reife DCs der Patienten „*in vitro*“-transkribierter mRNA (IVT-RNA) für TSPY 1 transfiziert und für die Stimulation von autologen CD8⁺ T-Zellen eingesetzt (s. **Kapitel C-8**). Die Überprüfung der mRNA-Qualität durch die Erkennung von mit TSPY 1-IVT-RNA transfizierten, HLA-A*0201 positiven DCs durch D41-CTL2/62 zeigte, dass DCs in der Lage sind, TSPY 1 zu prozessieren und das HLA-A*0201-gebundene Peptid zu präsentieren. Trotz der prinzipiellen Möglichkeit, RNA-transfizierte DCs an Stelle von Tumorzellen für die Stimulation von CD8⁺ T-Zellen zu nutzen, war es nicht möglich, in dieser Arbeit TSPY 1-reaktive CD8⁺ T-Zellen der vier Patienten zu stimulieren. Die Anfärbung von Gewebeproben der Tumore dieser Patienten ergab, dass die Tumore der drei Patienten mit Seminom zumindestens teilweise positiv für TSPY 1 waren (**Anhang O**). Bei den Patienten mit Teratokarzinom zeigten die Teratokarzinom-Anteile des Tumors keine Expression von TSPY 1. Bei einem dieser Patienten zeigte der Gewebeanteil mit Vorstufen des Teratokarzinoms TSPY 1-Expression. Eine Reaktivität gegen TSPY 1 wäre somit bei den Seminom-Patienten und einem Patient mit Teratokarzinom zu erwarten gewesen.

Der Hoden des Menschen ist neben dem Auge und dem ZNS eines der wenigen, immunprivilegierten Organe [278;279]. Als Mechanismen zur Aufrechterhaltung des immunprivilegierten Status spielen neben mechanischen Barrieren wie der Blut-Hoden-Schranke [280], die funktionelle Inaktivierung einwandernder Lymphozyten durch periphere Toleranzmechanismen [278], Apoptose von T-Lymphozyten durch das FAS/FAS-L-System [281], Suppression von T-Zellantworten durch lokale Mediatoren wie z.B. Zytokinen [282] auch eine verminderte Antigenpräsentation durch eine eingeschränkte Expression von MHC-Molekülen [283], eine Rolle. Eine fehlende Aktivierung MAGE-A1 und MAGE-A3 reaktiver T-Zellen in der Population der TILs von Seminom- und Nonseminompatienten wurde bereits beschrieben [284;285]. Als Gründe für eine fehlende Aktivierung der T-Zellen konnten bei den Patienten niedrige Frequenzen der HLA-Moleküle in der Tumorzellpopulation, der Verlust von HLA-Klasse-I-Allelen sowie die trotz hoher Expression geringe Präsentation von MAGE-A1 und MAGE-A3 prozessierten Peptiden angegeben werden [285]. Die Expression der HLA-Moleküle war zwar in den in

dieser Arbeit untersuchten Proben nicht bestimmt worden, könnte aber möglicherweise einen limitierenden Faktor darstellen, zumal diese häufig bei Seminomen negativ ist [108;286]. Eine Kreuzpräsentation durch DCs ist nicht auszuschließen. Zumal es zu einer generellen Einschränkung immunologischer Abwehrreaktionen im Hoden nicht kommt [287]. Ferner wurden in Seminomen DCs und tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) nachgewiesen [284;288;289]. Um zu sehen, ob und in welchem Prozentsatz an Patienten TSPY 1-reaktive T-Zellen nachgewiesen werden könnten, müssten mehr Proben untersucht werden.

4 Heterogenität der TSPY 1-Expression

Um die Effektor-Funktion des TSPY 1-reaktiven D41-T-Zell-Klons zu testen, wurde in einem Chrom-Release-Assay dessen Fähigkeit untersucht, die mit dem nonameren Peptid von TSPY 1 beladenen, autologen EBV-B-Zellen zu lysieren. Dabei zeigte die halbmaximale Lyse, wie schon die halbmaximale Reaktivität beim IFN- γ -ELISPOT-Assay, eine hohe Avidität des CTL-Klons zum Peptid. Die Lyse der autologen Melanomzellen durch den CTL-Klon war überraschenderweise mit unter 10% sehr gering (**Abb. C-18**). Die durchflusszytometrische Analyse der HLA-A*0201-Expression in der Melanomzelllinie lag bei etwa 90% HLA-A*0201-exprimierender Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine fehlende Expression von HLA-A*0201 konnte als Ursache für die geringe Lyse ausgeschlossen werden. Diese könnte bspw. durch eine unzureichende Prozessierung und somit auch unzureichende Präsentation des Peptides bedingt sein. Darüber hinaus war es denkbar, dass nicht alle D41-Melanomzellen TSPY 1 exprimierten. Die Anfärbung der D41-Melanomzellen mit einem Anti-TSPY 1-Antikörper zeigte, dass nur 27% der Zellen in der Population TSPY 1 exprimierten. Weitere Färbungen zeigten, dass der Anteil der TSPY 1-exprimierenden Population in der Zelllinie D41-MEL mehrere Kultivierungen lang konstant blieb.

Aufgrund der heterogenen Expression von TSPY 1 in der D41-Melanomzelllinie und der sich aus der Literatur ergebenden Daten ließen sich zwei Hypothesen annehmen. Eine Hypothese für die heterogene Expression von TSPY 1 in D41-MEL wäre ein Zusammenhang zwischen der Expression des TSPY 1-Proteins und einer möglichen Rolle in der Zellzyklusregulation. Eine weitere wäre, dass aufgrund von Tumorgenese und –progression das Expressionsprofil von TSPY 1 in D41-MEL heterogen ist und lediglich einzelne Zellklone TSPY 1 exprimieren. TSPY 1 könnte dadurch eventuell in

Zusammenhang mit sogenannten „cancer initiating cells“ (CIC oder „cancer stem cells“ (CSC) stehen [290].

Bisher wurde die Expression von TSPY 1 im Zytoplasma der Spermatogonien nachgewiesen, wobei Spermatogonien-Paare mit gleichwertiger TSPY 1-Konzentration auftraten. Dieses paarweise Auftreten könnte möglicherweise eine Beteiligung von TSPY 1 in der spermatogonialen Proliferation anzeigen. In einer geringen Anzahl von Spermatozyten konnte ebenfalls eine schwache Expression von TSPY 1 detektiert werden. Falls die geringe Konzentration von TSPY 1 in den Spermatozyten den spermatogonialen Ursprung dieser Spermatozyten anzeigen würde, könnte die Expression des TSPY 1-Proteins den Knotenpunkt zwischen mitotischer Proliferation und meiotischer Differenzierung darstellen [181]. Die Bindung der TSPY 1-Expression an die mitotische Teilung der frühen Keimzellen wird ebenfalls durch die vorhandene Expression in Cancer in Situ(CIS)-Zellen des Hodens und in Seminomzellen demonstriert. Es wird angenommen, dass der Ursprung der CIS-Zellen von noch im Hoden vorhandenen, embryonischen Keimzellen ausgeht. Diese Annahme wird unterstützt durch die Präsenz von mit spezifischen Antikörpern anfärbbaren, embryonalen Antigenen [291;292]. Die Expression von TSPY 1 in diesen Tumoren ist als homogen beschrieben worden [198]. Auch die Expression von TSPY 1 in den Tumorproben der Seminompatienten in dieser Arbeit war homogen (**Anhang O**). Bei Gonadoblastomen ist TSPY 1 vorzugsweise in den proliferierenden Keimzellen innerhalb des Tumors exprimiert [184]. Desweiteren wurde für eine Melanomzelllinie und zwei weitere, von ihr abgeleitete Zelllinien eine heterogene Expression von TSPY 1 beschrieben. Die Parentalzelllinie exprimiert dabei TSPY 1, während die abgeleiteten Zelllinien aufgrund einer Hypermethylierung des Promotors TSPY 1 nicht exprimierten [183]. Wie bereits in Kapitel 3 diskutiert, wird zudem die Funktion von TSPY 1 aufgrund der Zugehörigkeit zur „TTSN“-Familie in Zusammenhang mit der Zellzyklus-Regulation und/oder DNA-Replikation gebracht [258]. Ob und in welcher Weise TSPY 1 dabei in den Zellzyklus eingreift, ist nicht bekannt. Einige Experimente zeigten, dass die TSPY 1-Expression die Zellproliferation „*in vitro*“ und die Tumorgenese „*in vivo*“ steigert. Eine ektopische Expression in HeLa-Zellen resultierte in einem geringeren Anteil von Zellen, die sich in der G₂/M-Phase des Zellzyklus befanden. Zellsynchronisationstechniken zeigten dabei, dass die Expression von TSPY 1 zu einer schnelleren Passage der Zellen durch die G₂/M-Phase führte. Desweiteren zeigten Microarray-Analysen, dass zahlreiche Gene, die in den Zellzyklus und der Apoptose involviert sind, unter ektopischer TSPY 1-Expression in HeLa-Zellen hochreguliert waren [293]. Diese gesteigerte Expression betraf vor allem Gene, die sich auf dem Chromosom

12p13 befinden, und ebenfalls in Tumorproben von CIS/ITGCNU und TGCT hochreguliert waren [294;295]. Die heterogene TSPY 1-Expression in der D41-Melanomzelllinie könnte im Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation stehen. Dies würde bedeuten, dass zwar alle Zellen der Population TSPY 1 exprimieren könnten, aber dass das Protein nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus, eventuell beim Übergang G₂/M, exprimiert wird.

Falls lediglich einzelne Zellklone TSPY 1 exprimierten, wäre eine mögliche Erklärung der Zusammenhang zwischen heterogener TSPY 1-Expression und Tumorgenese bzw. –progression. Tumorgenese und –progression beim Melanom werden als Prozess der Dedifferenzierung von transformierten, ausgereiften Melanozyten beschrieben, wobei es zu einer schrittweisen Metamorphose vom Nävus über „Radial Growth Phase“(RGP)- zum „Vertical Growth Phase“(VGP)-Melanom und schließlich zur metastasierten Erkrankung kommt [296-298]. Dieser Prozess ist gekennzeichnet durch eine Akkumulation von genetischen Alterationen, wobei Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen zu Selektionsvorteilen der Zelle führen. Diese Selektionsvorteile erlauben der Zelle eine ungehinderte Proliferation infolge von Wachstumsvorteilen und der Unterbindung der Zellregulation [299], was letztendlich in die Konversion einer normalen Zelle in eine maligne Tumorzelle endet [5;6]. Im Verlauf der Progression des Melanoms kommt es zu weiteren Akkumulationen von Mutationen, so dass das Expressionsprofil einzelner Zellklone heterogen sein kann [300].

Die Klonierung der Melanomzelllinie D41-MEL sollte zeigen, ob TSPY 1 in einzelnen Klonen oder in den Zellen der gesamten Population exprimiert wurde. Dazu wurde D41-MEL nach dem Grenzverdünnungsverfahren kloniert. Es konnten 29 Klone aus der Melanomzelllinie D41-MEL isoliert, expandiert und kryokonserviert werden. Nach den Gesetzen der Poisson-Verteilung lag die Wahrscheinlichkeit, dass die aus der Klonierung hervorgegangenen D41-MEL-„Klone“ tatsächlich monoklonal waren, bei 86%. Die mittels Durchflusszytometrie gemessene TSPY 1-Expression der Melanomzellklone variierte sehr stark und korrelierte eindeutig mit ihrer Erkennung durch den D41-CTL2/62 im IFN- γ -ELISPOT-Assay. Anhand der Erkennung ließen sich die D41-MEL-„Klone“ in drei Kategorien einteilen. 34% der „Klone“ wurden durch den TSPY 1-spezifischen CTL-Klon sehr stark erkannt (stärker als die Parentalzelllinie). 27% der D41-MEL-Klone wurden mittelstark erkannt. Die Erkennung lag im Bereich der Erkennung der Parentalzelllinie durch den CTL-Klon. 34% der D41-MEL-Klone wurden nur sehr schwach durch den TSPY 1-spezifischen CTL-Klon erkannt. Für weitere Experimente wurden drei repräsentative D41-MEL-„Klone“ ausgewählt, D41-MEL#5 als Beispiel für einen „Klon“

mit hohem Anteil TSPY 1-exprimierender Zellen (87,13%) und starker Erkennung durch den TSPY 1-spezifischen CTL-Klon, D41-MEL#2 als Beispiel für einen „Klon“ mit geringem Anteil TSPY 1-exprimierender Zellen (0,54%) und sehr schwacher Erkennung durch den CTL-Klon und D41-MEL#1 mit einem Anteil von 5% TSPY 1-exprimierender Zellen und mittelstarker Erkennung (**Abb. C-21**). Ein Zytotoxizitätstest zeigte zudem, dass eine Korrelation zwischen der TSPY 1-Expression und der Lyse durch den TSPY 1-spezifischen CTL-Klon bestand. Zudem wiesen die untersuchten „Klone“ einen stabilen TSPY 1-Phänotyp auf (**Abb. C-22**). Damit zeigte sich, dass die TSPY 1-Expression eine klonale Eigenschaft innerhalb der D41-Melanomzelllinie war und nicht im Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation stand.

Kürzlich wurde nachgewiesen, dass einige CTAs, wie NY-ESO-1, MAGE-A1 und SSX, in den mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks exprimiert werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass CTAs nicht nur in die Gametogenese, sondern auch in die Differenzierung von Stammzellen involviert sind [112;301]. Da CTAs normalerweise nicht oder nur in einem sehr geringen Ausmaß in normalem, ausdifferenziertem Gewebe exprimiert werden, wird vermutet, dass CTAs eventuell auch nur in den Zellen des Tumors exprimiert werden, die undifferenziert sind und Stammzeleigenschaften aufweisen. Physiologische Stammzellen sind typischerweise undifferenziert, teilen sich selten und verbleiben normalerweise ruhend, bis eine Geweberegeneration nötig ist [299]. Sie besitzen zwei charakteristische Eigenschaften:

- bei jeder Teilung entsteht auch eine neue Stammzelle und
- die Tochterzelle kann in verschiedene Zelltypen ausdifferenzieren [302].

Mehrere Hinweise deuten darauf hin, dass bei einer malignen Erkrankung die Beständigkeit des Tumors lediglich auf einer kleinen Population von Zellen beruht, den sogenannten „cancer initiating cells“ (CIC) oder „cancer stem cells“ (CSC) [290;303-305]. Dieses Konzept basiert darauf, dass die Mehrheit der Tumorzellen nur ein limitiertes Proliferationpotential besitzt (**Abb. D-1**). Eine kleine Zellpopulation (CIC) innerhalb des Tumors dagegen besitzt die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur unbegrenzten Proliferation. Dadurch können die CICs die Tumorzellmasse aufrechterhalten [305]. Nach diesem Modell wären Tumore eine Erkrankung deregulierter Selbsterneuerung von Stammzellen [306-309] und das Auftreten von Rezidiven und Metastasen eine Folge auf übriggebliebene, möglicherweise chemotherapie-resistente Stammzellen zurückzuführen [310]. Interessanterweise werden CTAs häufig nur in einer Subpopulation der Tumorzellen exprimiert, was ebenfalls ein Hinweis auf die Expression in CICs sein könnte. Möglicherweise sind CTAs Merkmale von CICs und würden damit ausgezeichnete Ziele in

der Immuntherapie darstellen, um Rezidive und Metastasierungen zu verhindern bzw. zu behandeln [305]. Die Expression von CTAs in Stammzellen wäre dabei abhängig von einem undifferenzierten Phänotyp und möglicherweise haben Tumorzellen, in welchen CTAs exprimiert werden, die Fähigkeit zur Differenzierung verloren [305].

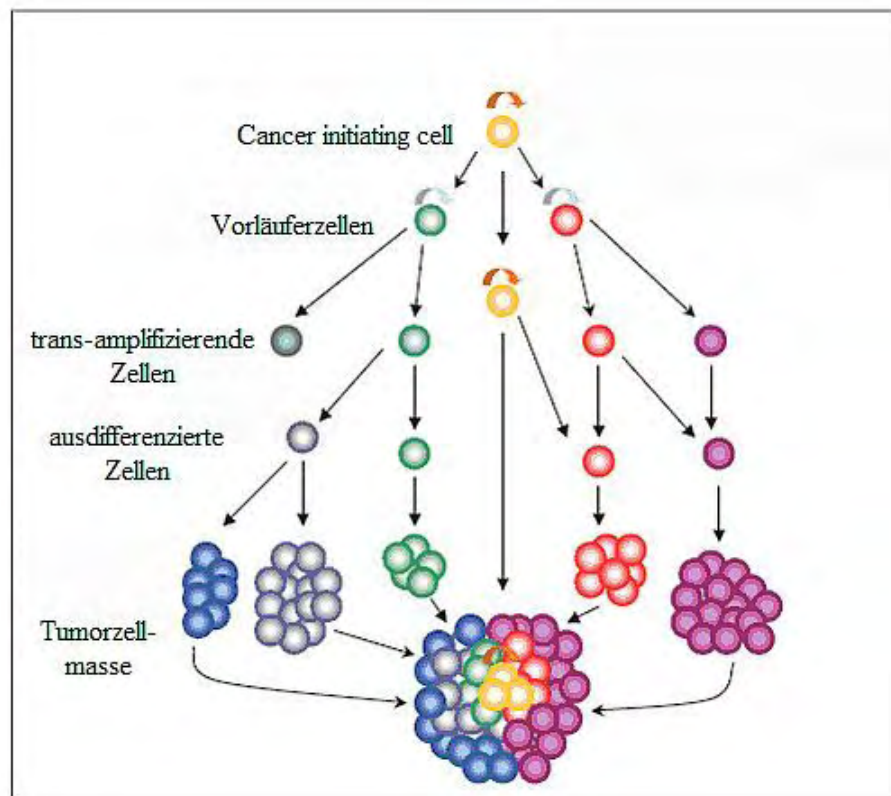


Abb. D-1: Stammzell-Modell des Melanoms nach Zabierowski und Herlyn (2008). Die Heterogenität des Melanoms wird durch „cancer initiating cells“ hervorgerufen. Diese setzen die Zellpopulation der Stammzellen innerhalb des Melanoms fort und führen zu Vorläuferzellen, welche eventuell ebenfalls die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen. Aus den Vorläuferzellen und trans-amplifizierenden Zellen entstehen ausdifferenzierte Zellklone mit unterschiedlicher Dominanz in der Tumorphosphopulation. Aus: [199]

CICs wurden bereits sowohl durch bekannte und neue Stammzellmarker als auch durch verschiedene Assays in zahlreichen Tumorentitäten identifiziert [303;304;311-316]. Die Isolation von Zellen mit Stammzeleigenschaften wurde kürzlich auch für Melanome beschrieben [290;317;318]. Mehrere Ergebnisse unterstützen dabei die Annahme, dass CICs für die Tumorgenese und –progression sowie die Chemotherapieresistenz und die therapeutischen Fehlschlägen bei der Behandlung des malignen Melanoms verantwortlich sein könnten [290;319-321]. Die genaue biologische und molekulare Charakterisierung von CICs für das Melanom steht allerdings noch aus. Trotz der zahlreichen Hinweise auf eine Subpopulation von Zellen mit Stammzeleigenschaften in Melanomen fehlen molekulare Marker, die diese Population näher eingrenzen könnten [322]. Ebenfalls ist nicht gekärt, welche Zellen den Ursprung der CICs für das Melanom darstellen könnten. Obwohl das CIC-Modell die im Moment vorherrschende Hypothese bildet, zeigen

verschiedene Ergebnisse, dass auch andere Ereignisse die Präsenz einer kleinen Zellpopulation mit Stammzeleigenschaften innerhalb der Tumorzellen erklären könnten. So wurde gezeigt, dass nicht notwendigerweise Stammzellen den Ursprung von CICs bilden müssen. Auch weiter ausdifferenzierte Zellen können durch onkogene Transformation [323;324] oder durch Fusion mit normalen Stammzellen [325;326] Stammzeleigenschaften erwerben.

Das Modell der CICs setzt zudem voraus, dass im Tumor eine Hierarchie aus Stammzellen, teils determinierten sowie proliferierenden Zellen und ausdifferenzierten somatischen Zellen besteht (**Abb. D-1**) [299;327;328]. Die vergleichsweise kleine Subpopulation der CICs ist dabei vollständig für die Tumorigenität verantwortlich. Ähnlich den physiologischen Geweben bestehen Melanome dabei aus phänotypisch heterogenen Zellpopulationen [290;329]. Hoch aggressive Zellpopulationen von Melanomen sind häufig mit molekularen Markern assoziiert, die denen von pluripotenten Stammzellen ähneln [329;330]. Zusätzlich wurden in Melanomen mit Stammzellen oder teildeterminierten Zellen assoziierte Proteine nachgewiesen, wie CTAs [112], BMP [331], Notch-Rezeptoren [332], Wnt-Proteine [333] oder ABCB5, CD133, CD166, CD34, Nestin und c-kit-Stammzellantigene [318;329;334]. Ausserdem sind einige der für die Homöostase der Stammzellen wichtigen Stoffwechselwege bei manchen Tumorentitäten dereguliert [306;335-337].

In Geweben und Zelllinien des malignen Melanoms wurden kürzlich Zellen mit exprimierten Stammzellmarkern und/oder Stammzeleigenschaften identifiziert. Diese Zellen besaßen einige Eigenschaften von CICs wie die Möglichkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in verschiedene, mesenchymale Zelllinien sowie erhöhte Tumorigenität. Dabei wurden vier Subpopulationen von Zellen unterschieden: CD20⁺, CD133⁺, „label-retaining“ Zellen und Zellen, die mittels „flow cytometry-based side population“ (SP) Technik [338] isoliert wurden [290;318;319;339]. Ob es sich dabei um klar abgrenzbare oder um überlappende Zellpopulationen handelte, konnte noch nicht definitiv geklärt werden.

CD133 ist ein Transmembran-Glykoprotein, bekannt als Prominin-1. Es wird auf der Zelloberfläche von Stammzellen neuroepithelialen Ursprungs, die fähig sind, „in vitro“ in neuronale Zellen und *in vivo* in Endothelien und Astrozyten auszdifferenzieren, exprimiert [191;192]. Der Nachweis von Tumorstammzellen erfolgte bei Hirn-, Prostata- und Bauchspeicheldrüsentumoren mittels CD133. Ebenfalls wurde die Expression von CD133 in Melanomen und primären Melanozyten nachgewiesen [318;340]. Klein et al. [318] beobachtete eine signifikant erhöhte Expression von CD133, CD166 und Nestin in

primären und metastasierenden Melanomen im Vergleich zu Nävi. Eine hohe Expression dieser Marker korrelierte dabei häufig mit einer höheren Malignität des Melanoms. Monzani et al. [196] stellte fest, dass weniger als 1% der Zellen in einem metastasierenden Melanom CD133 exprimieren. Zudem induzierte nur die CD133⁺ Zellpopulation in NOD/SCID Mäusen einen Tumor, während die CD133⁻ Population nur zu einem sehr geringen Prozentsatz tumorauslösend war. CD133 ist koexprimiert mit ABCB5, ein dem ABCB1 ähnlichen ATP-abhängigen Stofftransporter, auf Vorläuferzellen der epidermalen Melanozyten und in einer Melanomzelllinie [195]. Bei den ABC-Transportern handelt es sich um eine Proteinfamilie mit mehr als 30 Mitgliedern, welche hydrophile und hydrophobe Moleküle durch die Zellmembran transportieren und so die Zelle vor exogenen Schadstoffen schützen können [341]. Die ABC-Transporter werden dabei in Zusammenhang mit einer erhöhten Chemotherapieresistenz von Tumorzellen gebracht [340], welche eine vermutete Eigenschaft von CICs darstellt [310]. Durch die hohe Expression von CD133 auf ABCB5⁺ Zellen, könnte eventuell eine Identifizierung von Melanomstammzellen ermöglichen werden [340]. Eine Koexpression von CD133 mit dem Transporter ABCG2 wurde ebenfalls nachgewiesen [196;342]. Aufgrund des Zusammenhangs von CD133 mit der Expression von Stofftransportern und Stammzellen sollte eine durchflusszytometrische Analyse die Koexpression von CD133 und TSPY 1 in D41-Melanomzellen und den Zusammenhang zwischen der TSPY 1-Expression und potentiellen Stammzeleigenschaften näher charakterisieren. Dazu wurden die Zellen von D41-MEL#5, #2 und #1 sowie der parentalen Linie D41-MEL mit Antikörpern gegen CD133 und TSPY 1 auf Koexpression untersucht. Der Anteil an CD133-exprimierenden Zellen war am höchsten in der Zellpopulation von D41-MEL#2. Eine direkte Korrelation zwischen der CD133-Expression und der TSPY 1-Expression bestand bei keiner der Zellpopulationen. Stammzeleigenschaften in Zusammenhang mit der TSPY 1-Expression können allerdings durch dieses Ergebnis nicht ausgeschlossen werden. Zumal die genaue biologische und molekulare Charakterisierung von CICs für das Melanom noch aussteht. Über dies hinaus könnte eine Korrelation mit den Markern CD20, CD166 und Nestin gesucht werden, da diese ebenfalls vermutete Stammzellmarker sind [290;318]. Eine durchflusszytometrische Ko-Färbung mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Ki-67 und gegen Cyclin B sowie gegen Melan-A und gp-100 könnten die Proliferationseigenschaften und den Differenzierungsgrad der TSPY 1-exprimierenden Zellpopulation aufzeigen. Eine Analyse der Tumorigenität der TSPY 1 exprimierenden, im Vergleich mit den TSPY 1-negativen bzw. niedrig exprimierenden D41-MEL-Klonen nach Xenotransplantation, wäre ebenfalls eine Möglichkeit, die Stammzeleigenschaften in

Korrelation mit der TSPY 1-Expression zu erfassen. Allerdings ist zu bedenken, dass möglicherweise die limitierte Kapazität des Tumorwachstums nach Xenotransplantation weniger ein Beweis für die Existenz von CICs als eher ein Ausdruck der Anpassung in einem fremden Milieu ist [302].

5 Einfluss von IFN- γ und DAC auf die Expression und T-Zellerkennung von TSPY 1

5.1 Einfluss von IFN- γ

IFN- γ ist ein von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen sezerniertes, pleiotropes Zytokin mit einem regulierenden Effekt für eine Vielfalt von Immunzellen [343]. Durch IFN- γ können mehrere Komponenten der MHC-Klasse I-Antigenprozessierung beeinflusst werden. Neben der Expression von MHC-Klasse I-Molekülen [168;169] zählen hierzu ebenfalls die beiden Untereinheiten des TAP-Transporters [344], der Proteasom-Regulator PA28 [345], die IFN- γ induzierbaren β -Untereinheiten der 20S-Untereinheit des Proteasoms [346-349], die Leucin-Aminopeptidase [350;351] und die Zink-Metalloproteinase ERAP1 [65;66]. IFN- γ führt bei der Neusynthese des Proteasoms in der Zelle zu einem Austausch der drei proteolytisch aktiven β -Untereinheiten mit den induzierbaren Untereinheiten LMP-2, MECL-1 und LMP-7. Der Einbau dieser Untereinheiten führt zu der Bildung des Immunoproteasoms und zu einer Änderung der proteolytischen Spezifität [346-349;352]. Dadurch verändert sich die Zusammensetzung der auf der Zelloberfläche präsentierten Peptide [353;354]. Der Einbau der LMP-2-Untereinheit zeigt eine Reduzierung der caspase-ähnlichen Aktivität und eine Steigerung der chymotrypsin-ähnlichen Aktivität. Für die Generierung einiger Epitope kann die Expression der Untereinheiten LMP-2 und LMP-7 ausschlaggebend sein. Für virale Epitope wurde berichtet, dass die C-Termini dieser Epitope bevorzugt durch das Immunoproteasom gebildet werden und dass sogar die Präsentation einiger Epitope vollständig vom Immunoproteasom abhängig ist [355-357]. Auch für einige andere Epitope wurde eine ineffiziente oder nicht vorhandene Generierung in Abwesenheit von LMP-2 [358;359] oder LMP-7 [355-357;360-362] beschrieben. Für einige Epitope von Tumorantigenen dagegen wurde berichtet, dass diese bei einer hohen Expression von LMP-2 und LMP-7 abgebaut wurden [363]. Andere Epitope wiederum erfahren keine Unterschiede in der Präsentationseffizienz [364].

Der Proteasomregulator PA28 ist ebenfalls IFN- γ induzierbar [345]. PA28 kann die Präsentation einiger viraler Epitope verstärken [354;364;365], wobei diese Beeinflussung

unabhängig von der Expression des Immunoproteasoms ist [366]. Studien zeigten allerdings auch, dass PA28 die Affinität des Proteasoms zu manchen Substraten verstärkt. Allerdings wurde die maximale Geschwindigkeit der Reaktion nicht verändert, so dass dieser Effekt eventuell auf einer Verstärkung der Aufnahme der Substratmoleküle oder der Abgabe der Produkte beruht [367].

Eine Vorbehandlung von D41-MEL, D41-MEL#5, D41-MEL#2 und D41-MEL#1 mit IFN- γ sollte zeigen, ob die Präsentation des HLA-A*0201 bindenden TSPY 1-Peptides bzw. ob die Expression von TSPY 1 durch IFN- γ beeinflusst wird. Die D41-MEL-„Klone“ wurden wie bereits weiter vorne erwähnt aufgrund ihrer unterschiedlichen TSPY 1-Expression und der unterschiedlichen Erkennung durch den TSPY 1-spezifischen CTL-Klon ausgesucht. Durchflusszytometrische Voruntersuchungen ließen keine relevante Steigerung der HLA-A*0201-Expression unter IFN- γ bei den Melanomzellen erkennen (Daten nicht gezeigt und **Abb. C-1**). Durch IFN- γ -Vorbehandlung wurde die Erkennung aller Melanomzellklone und der parentalen Melanomzelllinie durch den TSPY 1-spezifischen CTL-Klon im IFN- γ -ELISPOT-Assay gesteigert, wobei die durch die TSPY 1-Expression zu erwartende Erkennungsrelation erhalten blieb (**Abb. C-23**). Die Lyse der parentalen Melanomzelllinie und des „Klons“ D41-MEL#5 durch den CTL-Klon wurde durch die IFN- γ -Vorbehandlung ebenfalls gesteigert. Der „Klon“ D41-MEL#2 dagegen wurde auch nach IFN- γ -Vorbehandlung nicht lysiert (**Abb. C-24**). Der Unterschied in der Auswirkung auf die IFN- γ -Freisetzung und die spezifische Lyse könnte durch die unterschiedlichen Testbedingungen erklärt werden. Im IFN- γ -ELISPOT-Assay werden je Testeinheit 50.000 Targetzellen eingesetzt, während beim Zytotoxizitätstest je Testeinheit nur 1.000 Targetzellen eingesetzt werden. Geringfügige Unterschiede sind deshalb im IFN- γ -ELISPOT-Assay aufgrund der höheren Zellzahl besser zu detektieren als im Zytotoxizitätstest, da bei einer Gesamtzahl von 2% TSPY 1-exprimierenden Zellen im Zytotoxizitätstest 20 Zellen nicht zu detektieren sind. Eine mit der gesteigerten Erkennung im IFN- γ -ELISPOT-Assay und der gesteigerten Lyse korrelierende TSPY 1-Expressionssteigerung war bei den Melanomzellen durchflusszytometrisch nicht messbar (**Tab. C-5**). Dieses Ergebnis wies auf eine Beteiligung der IFN- γ induzierbaren Komponenten der MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung an der Prozessierung und somit Präsentation des HLA-A*0201-bindenden TSPY 1-Peptids hin. Die Erkennung der unbehandelten Melanomzellen zeigte allerdings auch eine nicht vollständig durch IFN- γ induzierbare Antigenpräsentation wie für einige Epitope, bei einer vom Immunproteasom abhängigen Antigenpräsentation beschrieben [356;359;362]. Sowohl die erhöhte IFN- γ -Freisetzung im IFN- γ -ELISPOT-Assay als auch die erhöhte Lyse könnten aber ein Indiz

für eine effizientere Antigenpräsentation infolge einer verstärkten Antigenprozessierung sein.

Der IFN- γ induzierbare Proteasomregulator PA28 kann die Präsentation einiger viraler Epitope verstärken [354;364;365], wobei diese Beeinflussung unabhängig von der Expression des Immunoproteasoms ist [366]. Die verringerte TSPY 1-Proteinmenge nach IFN- γ -Behandlung in den Zellen von D41-MEL#5 (**Tab. C-5**) könnte ein Hinweis für den Abbau des Proteins infolge einer verstärkten Antigenprozessierung sein. Studien zeigten bereits, dass aufgrund der Induzierbarkeit von PA28 durch IFN- γ die Affinität des Proteasoms zu manchen Substraten verstärkt wird. Angenommen wird dabei, dass der Effekt eventuell auf einer Verstärkung der Aufnahme der Substratmoleküle oder der Abgabe der Produkte beruht [367].

Die chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms hydrolysiert Proteine bevorzugt an hydrophoben Aminosäuren. Sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende des TSPY 1-Epitops endet auf hydrophobe Aminosäuren. Am N-terminalen Ende befindet sich die Aminosäure Leucin, die eine Präferenz der chymotrypsin-ähnlichen Aktivität darstellt [60;61]. Am C-terminalen Ende des Epitops befindet sich die hydrophobe Aminosäure Valin. Frei im Internet verfügbare Algorithmen (www.paproc.de und www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/) für die bevorzugten Schnittstellen des Proteasoms sagten voraus, dass das TSPY 1-Epitop durch das konstitutive Proteasom prozessiert wird. Eine signifikante Schnittstelle wurde dabei für die Position 74 Valin des Proteins angegeben, die sich tatsächlich als das C-terminale Ende des HLA-A*0201-bindenden TSPY 1-Peptids herausstellte. Bei den Positionen 64, 65 und 66 des Proteins befanden sich laut Vorhersage ebenfalls Schnittstellen des Proteasoms. Die Position 65 bildet mit der Aminosäure Leucin das N-terminale Ende des decameren, T-zellerkannten Peptids von TSPY 1. Die Position 66 ist dagegen ebenfalls mit der Aminosäure Leucin das N-terminale Ende des nonameren Epitops von TSPY 1. Damit könnten durch das Proteasom theoretisch drei unterschiedlich lange Peptide mit neun, zehn und elf Aminosäuren gebildet werden, von denen sowohl das nonamere als auch das decamere Peptid von T-Zellen erkannt wurde. Eine stärkere Proteolyse durch das Proteasom aufgrund einer verstärkten Aufnahme des Peptidvorläufers und eine effizientere Hydrolyse durch die verstärkte chymotrypsin-ähnliche Aktivität würden zu einer gesteigerten Bildung des nonameren und decameren Peptids von TSPY 1 führen.

Nach der Degradation der Proteine durch das Proteasom sind allerdings ungefähr 60% der Peptide zu klein für die Bindung an MHC-Klasse I-Moleküle, ungefähr 15% besitzen die korrekte Länge und die weiteren 25% sind zu lang für eine Bindung an MHC-

Klasse I-Moleküle [62]. Für eine Bindung der längeren Peptide müssten diese im Zytosol oder endoplasmatischen Retikulum (ER) verkürzt werden. Es wird angenommen, dass nur N-terminal verlängerte Peptide durch Aminopeptidasen zu MHC-Klasse I-Liganden verkürzt werden können, da bisher keine zytosolische oder ER-residente Carboxypeptidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Es wurden bereits mehrere Peptidasen beschrieben, die Peptide N-terminal verkürzen [52;63;64]. IFN- γ -induzierbare Aminopeptidasen sind die Leucin-Aminopeptidase [350;351], welche bevorzugt die hydrophoben Aminosäuren hydrolysiert, und die im ER lokalisierte Aminopeptidase ERAP1 [65;66].

Zusätzlich könnte die verstärkte Antigenprozessierung von TSPY 1 auch durch das Immunoproteasom beeinflusst sein, zumal das Immunoproteasom eine verstärkte chymotrypsin-ähnliche Aktivität im Vergleich zum konstitutiven Proteasom hat [346;348;352]. Laut Vorhersage proteasomaler Schnittstellen werden die nonameren und decameren TSPY 1-Peptide vom konstitutiven Proteasom gebildet und sind somit keine Peptide, deren Bildung vollständig vom Immunoproteasom abhängig ist. Trotzdem ist die Effizienz der Prozessierung von TSPY 1 durch IFN- γ beeinflussbar, was durch eine erhöhte Aufnahme des Proteins durch das Proteasom sowie eine effizientere Proteolyse durch das Immunoproteasom und durch Aminopeptidasen erklärt werden kann.

5.2 Einfluss von DAC

Die Steigerung und Induktion der Expression von CTAs ist für die Behandlung mit der Promotor demethylierenden Substanz 5-Aza-2'-deoxycytidin (DAC) beschrieben worden [106;187;188;368;369]. DAC ist ein Analogon zu der Nukleotidbase Cytosin und wird an deren Stelle bei der Replikation in die DNA eingebaut. Durch eine fehlende OH-Gruppe am 5. Kohlenstoffatom kann DAC nicht methyliert werden. Die Methylierung ist dabei ein biochemischer Prozess, bei dem durch die DNA-Methylase eine Methylgruppe an das 5. Kohlenstoffatom der Base Cytosin angelagert und 5-Methylcytosin gebildet wird. Es wird zwischen der postreplikativen Methylierung von hemi-methylierter DNA und der „*de novo*“-Methylierung von nicht-methylierter DNA unterschieden [370;371]. Die DNA-Methylierung ist ein ubiquitärer Prozess im menschlichen Genom und spielt eine Rolle bei der X-chromosomalen Inaktivierung, der genomischen Prägung (*Imprinting*), der genetischen Inaktivierung von repetitiven Elementen und der gewebespezifischen Regulation der Genexpression [372-374]. Methylierung ist dabei verantwortlich für Gen-Silencing aufgrund des Effektes auf die Chromatinstruktur und die Bindung von

Transkriptionsfaktoren [375]. Zusätzlich inhibiert DAC die DNA-Methylase durch Komplexbildung, was eine genomweite Demethylierung und eine Lösung eventueller Transkriptionsblockaden zur Folge haben kann [376-378]. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß eine Veränderung des Methylierungsstatus mit einer Transformation der Zelle einhergeht. Da Hypomethylierung mit Genaktivierung, Hypermethylierung jedoch mit Geninaktivierung assoziiert ist, untersuchte man diese Phänomene an Onkogenen bzw. Tumor-Suppressor-Genen, deren Aktivierung bzw. Inaktivierung maßgeblich an der Tumorigenese beteiligt ist [379;380].

Veränderungen im DNA-Methylierungsstatus zählen, neben der Alkylierung von Histonen, zu den häufigsten in der Karzinogenese involvierten, epigenetischen Modifikationen [381;382]. Dabei kann sowohl die globale Verminderung der DNA-Methylierung (Hypomethylierung) als auch eine meist auf die Promotorregionen bezogene Erhöhung der Methylierung (Hypermethylierung) nachgewiesen werden. Häufig sind in Tumoren von einer Hypermethylierung Gene der DNA-Reparatur, der Detoxifizierung, der Zellzyklusregulation und der Apoptose betroffen [379;383;384]. Ein direkter Zusammenhang wurde dabei zwischen der verminderten Expression von Tumorsuppressorgenen durch Hypermethylierung und der Entstehung maligner Tumore beschrieben [385]. Weniger erforscht ist das Phänomen der Hypomethylierung, welche sowohl in alternden Zellen als auch in malignen Tumoren auftritt [380;386]. Der genaue Mechanismus ist dabei nicht bekannt. Allerdings werden als Auswirkungen für die Tumorentstehung die Aktivierung der Transkription von Onkogenen, der Verlust des genomischen *Imprintings* und die genomische Instabilität, welche durch den Verlust von Methylierungen innerhalb repetitiver Sequenzen entsteht, diskutiert [387-389].

Die epigenetische Reprogrammierung besteht sowohl aus einer Veränderung der DNA-Methylierung als auch aus der Chromatin-Restrukturierung. Sie tritt in zwei Phasen des menschlichen Lebenszyklus auf: zum einen in der Gametogenese und zum anderen in der frühen Embryogenese [390]. Ein Schlüsselement für die Expression der CTAs während der Spermatogenese scheint die Demethylierung der jeweiligen Promotoren zu sein [391-393]. In normalen, somatischen Geweben sind die meisten CTAs aufgrund von methylierten CpG-Inseln in der Promotorregion inaktiviert (Gen-Silencing). Eine induzierte oder verstärkte Expression nach DAC-Behandlung wurde bereits für einige Mitglieder der MAGE-Familie [391;392;394;395], für LAGE-1 [391;396], für SSX-2 [369;397], für NY-ESO-1 und für GAGE [369] beschrieben. Für MAGE-A1 wurde gezeigt, dass der Expressionslevel mit dem Methylierungsstatus des Promotors zusammenhängt [398;399]. Trotzdem kann Hypomethylierung nicht als der einzige Faktor

für die Genregulation bei CTAs gesehen werden, da trotz globaler Hypomethylierung der DNA in Kolonkarzinomen die Expression von CTAs in diesem Tumortyp selten ist [400].

Kennzeichnende Merkmale der Gametogenese, wie die Expression von CTAs, globale Hypomethylierung, zelluläre Immortalität und Migration, lassen eine starke Parallelität zwischen Tumorgenese und Gametogenese vermuten [263]. Eine Studie demonstrierte, dass in Tumoren globale, genomische Hypomethylierung, die Hypomethylierung repetitiver DNA-Sequenzen und die Hypomethylierung von Promotoren der MAGE-Gene zusammenhängen. Allerdings sind diese Vorgänge unabhängig von der Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen [401].

Aufgrund der Lokalisation der meisten funktionellen Genkopien des TSPY 1 im GBY und der hohen Expression von TSPY 1 in Gonadoblastomen, wird ein Zusammenhang zwischen der Entstehung des Gonadoblastoms und TSPY 1 angenommen und TSPY 1 als potentiell Onkogen beim Menschen angesehen [180]. Für TSPY 1 wird eine putative Funktion in der Spermatogenese beschrieben [258]. Die Klonierung der parental Melanomzelllinie D41-MEL und die Charakterisierung der TSPY 1-Expression der Melanomzellen zeigten, dass die D41-MEL-„Klone“ einen stabilen TSPY 1-Phänotyp aufwiesen. Die TSPY 1-Expression der Melanomzellklone variierte sehr stark und korrelierte mit ihrer Erkennung durch den TSPY 1-reaktiven T-Zell-Klon im IFN- γ -ELISPOT-Assay, wobei alle Klone wenn auch zum Teil nur sehr schwach durch den CTL-Klon erkannt wurden.

Mit einer DAC-Behandlung sollte untersucht werden, ob sich die TSPY 1-Expression in den Zelllinien D41-MEL, D41-MEL#5, D41-MEL#2 und D41-MEL#1 induzieren bzw. verstärken liess. Gerade für CTAs mit spezifischer Expression in männlichen Keimzellen, wie MAGE-A1, wurde ein hoher Level von Promotormethylierung in normalem somatischem Gewebe gezeigt wurde [391]. Da auch TSPY 1 spezifisch in Spermatogonien und Spermatozyten exprimiert wird, kann angenommen werden, dass der grundlegende Kontrollmechanismus der Transkription ebenfalls die Promotorregulierung durch Methylierung ist. TSPY 1 gehört zu einer heterogenen Genfamilie mit 35 bis 60 vorhandenen Genkopien auf dem Y-Chromosom [179;256;257]. Es ist nachgewiesen, dass viele dieser Gene eigene Promotoren haben [178;179], so dass jeder einzelne Promotor für eine Inaktivierung methyliert sein könnte. Die Inaktivierung eines Promotors ist dabei abhängig von der Stärke des Promotors, bedingt durch regulatorische Sequenzen und Bindungsstellen für Enhancer sowie dem Methylierungsgrad der Promotorregion und der Gensequenz [402-405]. Starke Promotoren benötigen dabei einen höheren Methylierungsgrad als schwache Promotoren für eine Inaktivierung der Transkription

[404]. Für MAGE-A3 wurde berichtet, dass die klonale Heterogenität der Expression mit dem Methylierungsstatus von spezifischen CpG-Nukleotiden innerhalb der Promotorregion korrelierte. In dieser Studie wurde gezeigt, dass MAGE-A3 in 5 von 14 Klonen einer Melanomzelllinie nicht exprimiert wurde und dass in den anderen 9 Klonen die Expression von MAGE-A3 sehr heterogen war [368]. Auch für andere CTAs wurde eine heterogene Verteilung in unterschiedlichen Tumorentitäten beschrieben [272;406;407].

Die Erkennung der D41-Melanomzellen ließ sich durch eine DAC-Vorbehandlung steigern. Während die Lyse von D41-MEL#5 und D41-MEL#2 unverändert blieb, ließ sich die Lyse der parentalen Linie D41-MEL durch TSPY 1-spezifische T-Zellen steigern. Eine Steigerung der TSPY 1-Expression war durchflusszytometrisch für die parentale Linie D41-MEL und für D41-MEL#1 nachweisbar. Die im Gegensatz zur Erkennung nicht steigerbare Lyse der „Klone“ D41-MEL#5 und D41-MEL#2 kann durch die unterschiedlichen Testbedingungen erklärt werden. Geringfügige Unterschiede sind im IFN- γ -ELISPOT-Assay aufgrund der höheren Zellzahl besser zu detektieren als im Zytotoxizitätstest. Eine gesteigerte TSPY 1-Expression dieser beiden „Klone“ durch die DAC-Behandlung war durchflusszytometrisch nicht messbar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Regulation der TSPY 1-Expression durch Promotormethylierung in D41-MEL#5 fast vollständig aufgehoben ist, so dass eine weitere Demethylierung keine Auswirkungen auf die TSPY 1-Expression hätte. Bei D41-MEL#2 läge dementsprechend eine starke Methylierung der Promotoren vor und die Expression von TSPY 1 wäre durch DAC am geringsten zu verstärken. Es könnten zusätzlich noch andere Mechanismen an der TSPY 1-Genregulation beteiligt, die nicht durch DAC zu beeinflussen sind. Bei D41-MEL und D41-MEL#1 zeigten sich nach DAC-Behandlung eine gesteigerte TSPY 1-Expression und eine gesteigerte Erkennung durch TSPY 1-reaktive T-Zellen. Aufgrund der Ergebnisse der DAC-Behandlung kann angenommen werden, dass es sich bei den D41-MEL-Klonen auch epigenetisch um verschiedene Phänotypen handelt. Der Methylierungsstatus der Melanomzelllinie D41-MEL und der abgeleiteten Klone wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, könnte aber weitere Hinweise auf die Abhängigkeit der TSPY 1-Expression von der Methylierung der Genregion und auf den epigenetischen Phänotyp der „Klone“ geben.

Eine DAC-Behandlung der Melanomzelllinie D41-MEL im Vergleich mit allogenen Zelllinien, auch einer Kolonkarzinomzelllinie, sollte weitere Hinweise geben, inwiefern sich die Expression von TSPY 1 durch Demethylierung mit DAC beeinflussen lässt. Im Kreuzreaktivitätstest zeigte sich neben der Erkennung der autologen Melanomzelllinie, die Erkennung der autologen EBV-B-Zelllinie und der allogenen Melanomzelllinie MZ9-MEL

durch den TSPY 1-reaktiven T-Zell-Klon. Durch eine DAC-Behandlung wurde bei weiteren, u.a. im Kreuzreaktivitätstest negativen, allogenen, HLA-A*0201-positiven Tumor- und EBV-B-Zelllinien von männlichen Personen versucht, TSPY 1-Expression zu induzieren. Getestet wurden neben der autologen Melanom- und EBV-B-Zelllinie, neun Melanomzelllinien, eine Leberzellkarzinomzelllinie, zwei Pankreaskarzinomzelllinien, drei Kolonkarzinom-zelllinien und vier weitere EBV-B-Zelllinien. Als Kontrollen dienten die HLA-A*0201-positive Melanomzelllinie einer Frau (SK-MEL-63) und die HLA-A*0201-positive Kolonkarzinomzelllinie SW480 mit dem Haplotypverlust des Y-Chromosoms [189]. Durch die DAC-Behandlung konnte die Erkennung und TSPY 1-Expression bei einer Reihe von Zelllinien verstärkt bzw. induziert werden. Die allogene Melanomzelllinie SK-MEL-63 und die Kolonkarzinomzelllinie wurden nicht erkannt. Mittels PCR konnte bei den in der Erkennung eindeutig positiven Zelllinien TSPY 1-Expression nachgewiesen werden. Die in der Erkennung eindeutig negativen Zelllinien waren auch negativ beim Nachweis von TSPY 1 mittels PCR. Bei einer Reihe von Zelllinien, die nach DAC-Behandlung von dem CTL-Klon erkannt wurden, konnte TSPY 1 mittels PCR erst nach der DAC-Behandlung nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass sich die TSPY 1-Expression in sechs von neun mit DAC-behandelten Melanomzelllinien, in einer von drei Kolonkarzinomzelllinien und in fünf von fünf EBV-B-Zelllinien induzieren bzw. hochregulieren ließ.

Die Expression von TSPY 1 sollte anhand der Anzahl der mRNA-Molekülen in Korrelation zu der IFN- γ -Spotzahl gesetzt werden, um einen Schwellenwert für die Erkennung von TSPY 1-exprimierenden Zellen durch TSPY 1-spezifische CTL-Klone im IFN- γ -ELISPOT-Assay zu ermitteln. Dazu wurde in dieser Arbeit eine PCR zur quantitativen Messung der TSPY 1-mRNA-Kopien entwickelt. Die Durchführung ist in Material und Methoden unter Punkt **2.2.14.2** beschrieben. Die Anzahl der TSPY 1-mRNA-Kopien wurde unter DAC-Behandlung gesteigert und stand in Relation zu der Erkennung der Zellen im IFN- γ -ELISPOT-Assay. Der Schwellenwert für die Erkennung der unbehandelten Zellen durch den TSPY 1-reaktiven T-Zell-Klon im IFN- γ -ELISPOT-Assay lag zwischen zehn und 37 TSPY 1-mRNA-Kopien pro Zelle. Nach DAC-Behandlung war der Schwellenwert für die Erkennung niedriger und liegt bei einer mRNA-Kopie pro Zelle. Es ist bekannt, dass demethylierende Reagenzien die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen des Immunsystems hochregulieren können [369]. Desweiteren wurde gezeigt, dass DAC die Expression von Proteasen ebenfalls hochregulieren kann [408]. Dies würde die Absenkung des Schwellenwertes nach DAC-Behandlung erklären. In der Literatur ist ein Schwellenwert für die T-Zellerkennung von

MAGE-A1 bei unbehandelten Zellen von 10 mRNA-Kopien pro Zelle berichtet worden [409]. In dieser Arbeit konnte nur ein ungefährender Schwellenwert festgelegt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können nur teilweise mit den Ergebnissen der Literatur verglichen werden. Gründe hierfür sind die verschiedenen Antigene, die unterschiedlichen Zelllinien und die T-Zell-Klone mit unterschiedlicher Avidität. Die Spannweite des Schwellenwertes zwischen zehn und 37 mRNA-Kopien könnte ebenfalls an Messungenauigkeiten liegen.

IFN- γ -Freisetzung	TSPY 1-mRNA-Kopien
+++	> 3000
++	14 -2000
+	1-850

Tab. D-1: Schema zur Korrelation zwischen IFN- γ -Freisetzung durch den TSPY 1-reaktiven CTL-Klon im IFN- γ -ELISPOT-Assay und der Anzahl der TSPY 1-mRNA-Kopien in den Zellen.

Es bestand kein linearer Zusammenhang zwischen der Zunahme an mRNA-Kopien von TSPY 1 in den behandelten und der Ausgangsmenge der mRNA-Kopien in den unbehandelten Zellen. Ebenfalls konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der IFN- γ -Freisetzung und der Anzahl der mRNA-Kopien erkannt werden (**Tab. D-1**). Lediglich hohe Mengen an mRNA-Kopien führten auch zu einer deutlich hohen IFN- γ -Freisetzung. Bei geringen und mittleren Mengen an mRNA bestand keine lineare Korrelation zu der IFN- γ -Freisetzung. Dieses Ergebnis genauso wie die Absenkung des Schwellenwertes der T-Zellerkennung nach DAC-Behandlung lässt annehmen, dass die Anzahl der mRNA-Kopien ein wichtiger Faktor bei der T-Zellerkennung ist aber nicht der einzige.

Die Möglichkeit mit einer DAC-Behandlung die Expression von TSPY 1 in Zelllinien und auch Klonen zu induzieren, lässt die Annahme zu, dass vor allem epigenetische Veränderungen zu der Heterogenität in der TSPY 1-Expression führen und dass es sich bei den D41-MEL-Klonen auch epigenetisch um verschiedene Phänotypen handelt. Bisher wurde immer angenommen, dass der Prozess der Tumorgenese beim Melanom ein Prozess der Dedifferenzierung von transformierten, ausgereiften Melanozyten ist, wobei es zu einer schrittweisen Metamorphose vom Nävus über „Radial Growth Phase“(RGP)- zum „Vertical Growth Phase“(VGP)-Melanom und schließlich zur metastasierten Erkrankung kommt [296-298]. Im Verlauf der Progression des Melanoms kommt es zu weiteren Akkumulationen von Mutationen, so dass das Expressionsprofil einzelner Zellklone heterogen sein kann [300]. Auch Veränderungen der Epigenetik der Zellen wären Mutationen. Die Heterogenität der TSPY 1-Expression in D41-MEL könnte ein Hinweis für dieses Modell sein. Ebenso widerlegt die TSPY 1-Expression in D41-MEL

und den „Klonen“ D41-MEL#1, #2 und #5 nicht das Modell der CICs. Dieses Modell geht davon aus, dass eine kleine Zellpopulation mit Stammzeleigenschaften (CIC) innerhalb des Tumors die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur unbegrenzten Proliferation. Dadurch können die CICs die Tumorzellmasse aufrechterhalten [305]. Beide Modelle nehmen an, dass die metastasierende Ausbreitung eines Tumors ein spätes Ereignis in der Tumorerkrankung sei. Die Möglichkeit der Tumorzellen vom Primärtumor zu migrieren und in anderer Umgebung zu überleben, wurde als ein letzter, selektiver Schritt in der Tumorprogression beschrieben. Dabei wurde bisher vermutet, dass die metastasierenden Zellen aus einer Subpopulation des Primärtumors hervorgehen. Neuere Ergebnisse zeigten jedoch, dass phänotypisch normale, epitheliale Mausbrustzellen nach Injektion in einen Rezipienten an ektopischer Stellen wie der Lunge überleben können und nach Aktivierung von Onkogenen an dieser Stelle proliferieren und kolonialisieren [410]. Hüsemann et al. [411] demonstrierte, dass die Aktivierung von Onkogenen in Mausbrustzellen ein genetisches Programm, möglicherweise geregelt durch den Transkriptionsfaktor Twist, auslöste. Dieses Programm ermöglicht die Ausbreitung von premalignen Mausbrustzellen zu anderen Geweben wie der Lunge und des Knochenmarks vor dem Auftreten eines Brusttumors. Diese Ergebnisse zeigen, dass möglicherweise Eigenschaften, welche in normalen Zellen vorkommen, ausreichend für den Ablauf eines erheblichen Teils der metastasenbildenden Cascade sind. Die frühe Metastasierung könnte ebenfalls eine Erklärung für das Phänomen des „cancer of unknown primary“ (CPU) geben, welche eine der zehn häufigsten Krebsdiagnosen ist [412]. Diese Berichte unterstützen die Hypothese, dass die Metastasierung ein sehr frühes Ereignis in der Tumorentwicklung sein und noch vor dem Auftreten eines Primärtumors erfolgen kann. **Abb. D-2** zeigt ein Schema des Modells der späten Metastasierung im Vergleich zu dem Modell der frühen Metastasierung nach Klein (2008) [413]. Der zentrale Aspekt bei dem Vergleich beider Modelle ist dabei nicht „frühe versus späte“ Metastasierung, sondern der Ort der Selektion der Klone. Rückschlüsse und Hypothesen, welche auf dem Modell der späten Metastasierung basieren, müssen mit Vorsicht betrachtet werden, insbesondere dann, wenn sie auf Untersuchungen mit Zelllinien von fortgeschrittenen Tumoren basieren. Bei einer frühen Metastasierung akkumulieren die Metastasen genetische Alterationen an einer vom Primärtumor entfernten Stelle mit möglicherweise unterschiedlichen Selektionsbedingungen. Dies würde zu einer genetischen Divergenz zwischen Metastase und Primärtumor führen und könnte nicht-relevante Mechanismen für die Metastasierung und Malignität offenbaren.

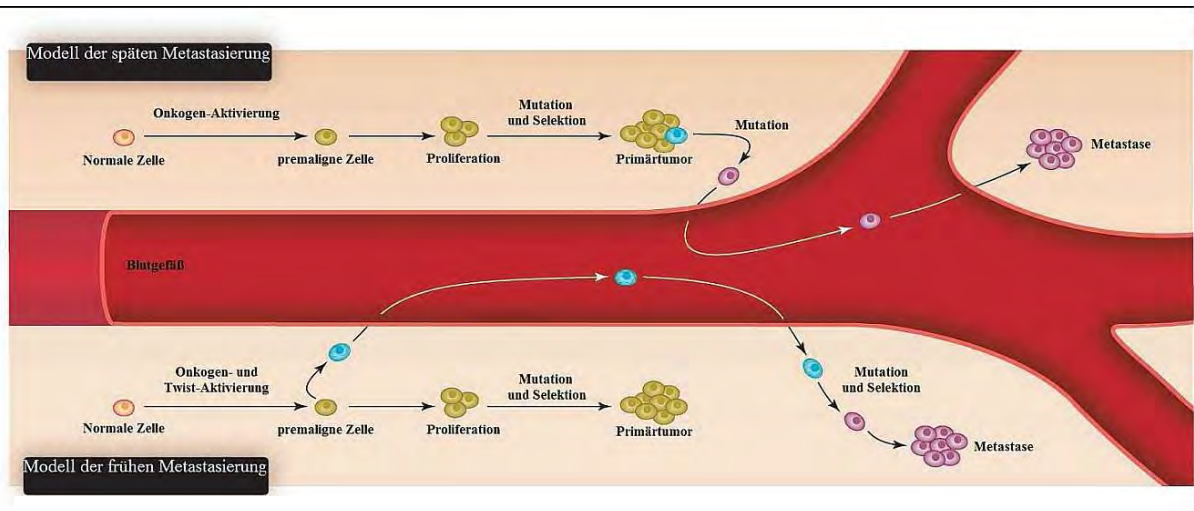


Abb. D-2: Das Modell der späten Metastasierung (oben) und der frühen Metastasierung im Vergleich nach Klein (2008) [413]. Bei der späten Metastasierung finden die genetischen und epigenetischen Veränderungen hauptsächlich im Primärtumor statt, bevor es zur Metastasenbildung kommt. Die Metastase ist dabei genetisch vergleichbar mit dem Primärtumor. Bei der frühen Metastasierung (unten) entwickeln Primärtumor und Metastase voneinander unabhängig genetische Veränderungen und unterliegen anderen selektiven Bedingungen. Dadurch kommt es zu einer genetischen Divergenz von Primärtumor und Metastase.

Unter dem Aspekt der frühen Metastasierung ist die Theorie der CICs ebenfalls mit Vorsicht zu betrachten, da erstens auch diese Theorie davon ausgeht, dass eine Metastasierung durch migrierende Tumorstammzellen spät in der Tumorphase stattfindet und zweitens die Ergebnisse auf Untersuchungen mit Metastasen beruhen. Sollte sich das Modell der frühen Metastasierung bestätigen, müssten bei Untersuchungen auf die Malignität und CIC-relevante, genetische Alterationen mit Metastasen auch die Selektionsbedingungen des Milieus miteinbezogen werden. Gerade von epigenetischen Alterationen ist bekannt, dass sie milieuhabhängig sein können [414]. Zudem müsste jede Metastase als unabhängiger Tumor betrachtet werden. Auch die Melanomzelllinie D41-MEL wurde von einer Metastase und nicht vom Primärtumor isoliert. Unter dem Aspekt dieses Modells wäre nicht zu klären, ob die TSPY 1-Expression Hinweis auf den Ablauf eines „Keimzellprogrammes“ in D41-MEL und mitverantwortlich für die Tumorgenese und -progression wäre. Oder, ob die TSPY 1-Expression eher ein Ausdruck von epigenetischen Alterationen aufgrund des Milieus der Metastase wäre.

Für zukünftige Vakzinierungen wäre zu beachten, dass das Antigenexpressionsprofil zwischen „Primärtumor“ und „Metastasen“ abweichen könnte. Die Immunantworten gegen den Tumor entwickeln sich spontan und werden nicht durch die Vakzinierung generiert, allenfalls gesteigert. Die Vakzinierungen müssten demnach auf ein Panel an Antigenen erweitert werden, statt gegen einzelne Antigene zu vakzinieren, da die hohe Individualität nicht nur durch den individuellen HLA-Phänotyp entstehen würde, sondern auch durch die unterschiedlich exprimierten Antigene zwischen „Primärtumor“ und „Metastasen“.

E Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Zielstrukturen autologer, tumorreaktiver CD8⁺ T-Zellen im Modell des Melanompatienten D41 charakterisiert, der im metastasierten Stadium nach Vakzinierung mit autologen dendritischen Zellen und bestrahlten Tumorzellen eine dauerhafte komplette Remission erreichte (O'Rourke et al., Melanoma Res. 17:316, 2007). Aus kryokonservierten Blutlymphozyten verschiedener Zeitpunkte wurden durch Stimulation mit autologen Tumorzellen (D41-MEL) in unabhängigen gemischten Lymphozyten-/Tumorzell-Kulturen (MLTCs) tumorreaktive CD8⁺ T-Zellen angereichert. Als Erstes wurde überprüft, ob sie gegen bekannte Melanomantigene in Assoziation mit den HLA-Klasse I-Allelen des Patienten gerichtet waren. Dabei zeigten sich Reaktivitäten gegen das melanosomale Differenzierungsantigen Melan-A mit HLA-A*0201 und darüber hinaus gegen die Cancer/Testis-Antigene (CTA) MAGE-A3 und MAGE-A6 mit HLA-A*0101, sowie NY-ESO-1, MAGE-A4 und MAGE-A10 mit HLA-A*0201. In einem zweiten Schritt wurde mit T-Zell-Klonen aus D41-MLTC 2, die keines dieser Antigene erkannten, eine cDNA-Expressionsbank von D41-MEL gescreent. Dies führte zur Klonierung einer für TSPY 1 (testis-specific protein Y-encoded 1) kodierenden cDNA mit einem der T-Zell-Klone. Er erkannte mit hoher Affinität die synthetischen TSPY 1-Peptide LLDDIMAEV (Aminosäurepositionen 66-73) und LLLDDIMAEV (Aminosäurepositionen 65-73) in Assoziation mit HLA-A*0201. Serologische Immunantworten gegen das als CTA einzustufende TSPY 1 sind bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine T-Zell-Antwort gegen TSPY 1 nachgewiesen. TSPY 1 trägt mutmaßlich zu Entstehung des Gonadoblastoms bei, seine Expression wurde jedoch z.B. auch in Seminomen, Leberzellkarzinomen und Melanomen nachgewiesen. Die Expression von TSPY 1 in der Zelllinie D41-MEL-Zellen war sehr heterogen. Einzelne Klone der Linie exprimierten TSPY 1 auf stabil hohem, andere Klone auf ebenso stabil intermediärem bzw. nicht detektierbarem Niveau. Die Expression und die Erkennung durch TSPY 1-reaktive T-Zell-Klone wurde durch die demethylierende Substanz 5-Aza-2'-deoxycytidine gesteigert. Dies spricht für eine Promotor-Hypermethylierung als Ursache fehlender bzw. niedriger Expression, wie dies für verschiedene CTA zutrifft. Die im Blut des Patienten D41 detektierbare antitumorale T-Zell-Reaktivität war bereits vor der Vakzinierung mit Tumorzellen nachweisbar und hatte sich somit spontan entwickelt. Ihre Individualität war vorgegeben durch das Antigenexpressionsmuster der D41-Tumorzellen, sowie durch den HLA-Phänotyp und mutmaßlich auch das T-Zellrepertoire des Patienten. Die detaillierte Analyse komplexer antitumoraler T-Zellantworten legt den Grundstein für eine Immuntherapie, die sich auf das tatsächliche Potential des individuellen T-Zellsystems stützen kann.

F Literaturverzeichnis

1. Hanahan,D. and R.A.Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
2. Kawakami,Y., T.Fujita, Y.Matsuzaki, T.Sakurai, M.Tsukamoto, M.Toda, and H.Sumimoto. 2004. Identification of human tumor antigens and its implications for diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Sci.* 2004. Oct. ;95. (10):784. -91.
3. Carter,P., L.Smith, and M.Ryan. 2004. Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocr. Relat Cancer* 11: 659-687.
4. Hahn,W.C., C.M.Counter, A.S.Lundberg, R.L.Beijersbergen, M.W.Brooks, and R.A.Weinberg. 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400: 464-468.
5. FOULDS,L. 1954. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res.* 14: 327-339.
6. Nowell,P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28.
7. Vogelstein,B., D.Lane, and A.J.Levine. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310.
8. Liggett,W.H., Jr. and D.Sidransky. 1998. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J. Clin. Oncol.* 16: 1197-1206.
9. Greenblatt,M.S., W.P.Bennett, M.Hollstein, and C.C.Harris. 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994. Sep. 15. ;54. (18.):4855. -78.
10. Coley,W.B. 1991. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin. Orthop. Relat Res.* 1991. Jan. ;(262.):3-11.
11. Ada,G. 1999. The coming of age of tumour immunotherapy. *Immunol. Cell Biol.* 77: 180-185.
12. Stutman,O. 1974. Cell-mediated immunity and aging. *Fed. Proc.* 1974. Sep. ;33. (9.):2028. -32.
13. Smyth,M.J., K.Y.Thia, S.E.Street, E.Cretney, J.A.Trapani, M.Taniguchi, T.Kawano, S.B.Pelikan, N.Y.Crowe, and D.I.Godfrey. 2000. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* 191: 661-668.
14. Dunn,G.P., L.J.Old, and R.D.Schreiber. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 21: 137-148.
15. Shankaran,V., H.Ikeda, A.T.Bruce, J.M.White, P.E.Swanson, L.J.Old, and R.D.Schreiber. 2001. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410: 1107-1111.
16. Darnell,R.B. and J.B.Posner. 2003. Observing the invisible: successful tumor immunity in humans. *Nat. Immunol.* 2003. Mar. ;4(3):201.
17. Dighe,A.S., E.Richards, L.J.Old, and R.D.Schreiber. 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity.* 1: 447-456.

18. Picaud,S., B.Bardot, E.De Maeyer, and I.Seif. 2002. Enhanced tumor development in mice lacking a functional type I interferon receptor. *J. Interferon Cytokine Res.* 2002. Apr;22. (4):457. -62.
19. Kaplan,D.H., V.Shankaran, A.S.Dighe, E.Stockert, M.Aguet, L.J.Old, and R.D.Schreiber. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95: 7556-7561.
20. Street,S.E., J.A.Trapani, D.MacGregor, and M.J.Smyth. 2002. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J. Exp. Med.* 196: 129-134.
21. Dunn,G.P., A.T.Bruce, H.Ikeda, L.J.Old, and R.D.Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3: 991-998.
22. Al Batran,S.E., M.R.Rafiiyan, A.Atmaca, A.Neumann, J.Karbach, A.Bender, E.Weidmann, H.M.Altmannsberger, A.Knuth, and E.Jager. 2005. Intratumoral T-cell infiltrates and MHC class I expression in patients with stage IV melanoma. *Cancer Res.* 65: 3937-3941.
23. Sato,E., S.H.Olson, J.Ahn, B.Bundy, H.Nishikawa, F.Qian, A.A.Jungbluth, D.Frosina, S.Gnjatic, C.Ambrosone, J.Kepner, T.Odunsi, G.Ritter, S.Lele, Y.T.Chen, H.Ohtani, L.J.Old, and K.Odunsi. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Dec. 20. ;102. (51.):18538. -43. Epub. 2005. Dec. 12. Epub.
24. Zhang,L., J.R.Conejo-Garcia, D.Katsaros, P.A.Gimotty, M.Massobrio, G.Regnani, A.Makrigiannakis, H.Gray, K.Schlienger, M.N.Liebman, S.C.Rubin, and G.Coukos. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003. Jan. 16. ;348. (3):203. -13.
25. Grulich,A.E. 2000. Update: cancer risk in persons with HIV/AIDS in the era of combination antiretroviral therapy. *Aids Read.* 2000. Jun. ;10(6.):341. -6.
26. De Plaen,E., C.Lurquin, A.Van Pel, B.Mariame, J.P.Szikora, T.Wolfel, C.Sibille, P.Chomez, and T.Boon. 1988. Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85: 2274-2278.
27. Nagorsen,D., C.Scheibenbogen, F.M.Marincola, A.Letsch, and U.Keilholz. 2003. Natural T cell immunity against cancer. *Clin. Cancer Res.* 9: 4296-4303.
28. van der,B.P., C.Traversari, P.Chomez, C.Lurquin, E.De Plaen, B.J.Van den Eynde, A.Knuth, and T.Boon. 2007. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J. Immunol.* 178: 2617-2621.
29. Adam,J.K., B.Odhav, and K.D.Bhoola. 2003. Immune responses in cancer. *Pharmacol. Ther.* 99: 113-132.
30. Pardoll,D.M. 2001. Immunology. Stress, NK receptors, and immune surveillance. *Science* 294: 534-536.
31. Ljunggren,H.G. and K.Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11: 237-244.
32. Karre,K., H.G.Ljunggren, G.Piontek, and R.Kiessling. 2005. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. 1986. *J. Immunol.* 174: 6566-6569.

33. Colonna,M., E.G.Brooks, M.Falco, G.B.Ferrara, and J.L.Strominger. 1993. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 260: 1121-1124.
34. Dohring,C., D.Scheidegger, J.Samaridis, M.Cella, and M.Colonna. 1996. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J. Immunol.* 156: 3098-3101.
35. Gumperz,J.E., V.Litwin, J.H.Phillips, L.L.Lanier, and P.Parham. 1995. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J. Exp. Med.* 181: 1133-1144.
36. Grzywacz,B., J.S.Miller, and M.R.Verneris. 2008. Use of natural killer cells as immunotherapy for leukaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 21: 467-483.
37. Bethge,W.A., C.Faul, M.Bornhauser, G.Stuhler, D.W.Beelen, P.Lang, M.Stelljes, W.Vogel, M.Hagele, R.Handgretinger, and L.Kanz. 2008. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. *Blood Cells Mol. Dis.* 40: 13-19.
38. Pfeiffer,M., M.Schumm, T.Feuchtinger, K.Dietz, R.Handgretinger, and P.Lang. 2007. Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 138: 97-100.
39. Bauer,S., V.Groh, J.Wu, A.Steinle, J.H.Phillips, L.L.Lanier, and T.Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285: 727-729.
40. Zhang,C., J.Zhang, J.Niu, Z.Zhou, J.Zhang, and Z.Tian. 2008. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum. Immunol.* 69: 490-500.
41. Mantovani,A., B.Bottazzi, F.Colotta, S.Sozzani, and L.Ruco. 1992. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* 13: 265-270.
42. Gough,M.J., A.A.Melcher, A.Ahmed, M.R.Crittenden, D.S.Riddle, E.Linardakis, A.N.Ruchatz, L.M.Emiliusen, and R.G.Vile. 2001. Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Res.* 2001. Oct. 1;61. (19.):7240. -7.
43. Bonnotte,B., N.Larmonier, N.Favre, A.Fromentin, M.Moutet, M.Martin, S.Gurbuxani, E.Solary, B.Chauffert, and F.Martin. 2001. Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system. *J. Immunol.* 167: 5077-5083.
44. Bingle,L., N.J.Brown, and C.E.Lewis. 2002. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 2002. Mar. ;196. (3):254. -65.
45. Gowans,J.L., D.D.Mcgregor, and D.M.Cowen. 1962. Initiation of immune responses by small lymphocytes. *Nature.* 1962. Nov. 17;196. :651. -5.
46. Mason,D.W. and S.J.Simmonds. 1988. The autonomy of CD8+ T cells in vitro and in vivo. *Immunology.* 1988. Oct. ;65. (2):249. -57.
47. Powrie,F. and D.Mason. 1988. Phenotypic and functional heterogeneity of CD4+ T cells. *Immunol. Today.* 1988. Sep. ;9. (9.):274. -7.

48. Godfrey,D.I., K.J.Hammond, L.D.Poulton, M.J.Smyth, and A.G.Baxter. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* 21: 573-583.
49. Smyth,M.J. and D.I.Godfrey. 2000. NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword. *Nat. Immunol.* 1: 459-460.
50. Coux,O., K.Tanaka, and A.L.Goldberg. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 801-847.
51. Rock,K.L., I.A.York, and A.L.Goldberg. 2004. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* 5: 670-677.
52. Seifert,U., C.Maranon, A.Shmueli, J.F.Desoutter, L.Wesoloski, K.Janek, P.Henklein, S.Diescher, M.Andrieu, S.H.de la, T.Weinschenk, H.Schild, D.Laderach, A.Galy, G.Haas, P.M.Kloetzel, Y.Reiss, and A.Hosmalin. 2003. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* 4: 375-379.
53. Ciechanover,A. 1994. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of action and cellular physiology. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 375: 565-581.
54. Kloetzel,P.M. 2004. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. Biophys. Acta* 1695: 225-233.
55. Yewdell,J.W. 2001. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.* 11: 294-297.
56. Yewdell,J.W. and A.B.Hill. 2002. Viral interference with antigen presentation. *Nat. Immunol.* 3: 1019-1025.
57. Adams,J. 2003. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.* 29 Suppl 1: 3-9.
58. Rivett,A.J. 1993. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.* 291 (Pt 1): 1-10.
59. Tanaka,K. and T.Chiba. 1998. The proteasome: a protein-destroying machine. *Genes Cells* 3: 499-510.
60. Orlowski,M. 1990. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 29: 10289-10297.
61. Nussbaum,A.K., T.P.Dick, W.Keilholz, M.Schirle, S.Stevanovic, K.Dietz, W.Heinemeyer, M.Groll, D.H.Wolf, R.Huber, H.G.Rammensee, and H.Schild. 1998. Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95: 12504-12509.
62. Cascio,P., C.Hilton, A.F.Kisselev, K.L.Rock, and A.L.Goldberg. 2001. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 20: 2357-2366.
63. Reits,E., A.Griekspoor, J.Neijsen, T.Groothuis, K.Jalink, P.van Veelen, H.Janssen, J.Calafat, J.W.Drijfhout, and J.Neefjes. 2003. Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity.* 18: 97-108.
64. York,I.A., A.X.Mo, K.Lemerise, W.Zeng, Y.Shen, C.R.Abraham, T.Saric, A.L.Goldberg, and K.L.Rock. 2003. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys

- antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity*. 18: 429-440.
65. Saric,T., S.C.Chang, A.Hattori, I.A.York, S.Markant, K.L.Rock, M.Tsujimoto, and A.L.Goldberg. 2002. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* 3: 1169-1176.
 66. Serwold,T., F.Gonzalez, J.Kim, R.Jacob, and N.Shastri. 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419: 480-483.
 67. Wolfel,C., I.Drexler, A.Van Pel, T.Thres, N.Leister, W.Herr, G.Sutter, C.Huber, and T.Wolfel. 2000. Transporter (TAP)- and proteasome-independent presentation of a melanoma-associated tyrosinase epitope. *Int. J. Cancer*. 2000. Nov. 1;88. (3):432. -8.
 68. Monaco,J.J. 1992. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol. Today* 13: 173-179.
 69. Robertson,M. 1991. Antigen processing. Proteasomes in the pathway. *Nature* 353: 300-301.
 70. Goldberg,A.L. and K.L.Rock. 1992. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357: 375-379.
 71. Sabatte,J., J.Maggini, K.Nahmod, M.M.Amaral, D.Martinez, G.Salamone, A.Ceballos, M.Giordano, M.Vermeulen, and J.Geffner. 2007. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007. Feb. -Apr;18. (1-2):5-17. Epub. 2007. Feb. 26. Epub.
 72. Brown,J.H., T.S.Jardetzky, J.C.Gorga, L.J.Stern, R.G.Urban, J.L.Strominger, and D.C.Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*. 1993. Jul. 1;364. (6432.):33. -9.
 73. Janeway,C.A., Jr. 2001. How the immune system protects the host from infection. *Microbes. Infect.* 3: 1167-1171.
 74. Flaswinkel,H., M.Barner, and M.Reth. 1995. The tyrosine activation motif as a target of protein tyrosine kinases and SH2 domains. *Semin. Immunol.* 7: 21-27.
 75. Klein,L. and B.Kyewski. 2000. "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J. Mol. Med.* 2000. ;78. (9.):483. -94.
 76. Lanzavecchia,A. and F.Sallusto. 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290: 92-97.
 77. Sallusto,F., C.R.Mackay, and A.Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 593-620.
 78. Lanzavecchia,A. and F.Sallusto. 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106: 263-266.
 79. Turley,S.J. 2002. Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2002. Dec. ;14(6.):765. -70.
 80. Gallimore,A. and S.Sakaguchi. 2002. Regulation of tumour immunity by CD25+ T cells. *Immunology*. 2002. Sep. ;107. (1):5-9.

81. Shevach,E.M. 2004. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis Rheum.* 2004. Sep. ;50. (9.):2721. -4.
82. Spiotto,M.T., Y.X.Fu, and H.Schreiber. 2003. Tumor immunity meets autoimmunity: antigen levels and dendritic cell maturation. *Curr. Opin. Immunol.* 2003. Dec. ;15. (6.):725. -30.
83. Ochsenbein,A.F. 2002. Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 2002. Dec. ;9. (12.):1043. -55.
84. Murphy,B. and A.M.Krensky. 1999. HLA-derived peptides as novel immunomodulatory therapeutics. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999. Jun. ;10(6.):1346. -55.
85. Carreno,B.M. and M.Collins. 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2002. ;20. :29. -53. Epub. 2001. Oct. 4. Epub.
86. Smyth,M.J., D.I.Godfrey, and J.A.Trapani. 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* 2: 293-299.
87. Smyth,M.J. 2005. Type I interferon and cancer immunoediting. *Nat. Immunol.* 6: 646-648.
88. Dobrzanski,M.J., J.B.Reome, and R.W.Dutton. 2000. Type 1 and type 2 CD8+ effector T cell subpopulations promote long-term tumor immunity and protection to progressively growing tumor. *J. Immunol.* 2000. Jan. 15. ;164. (2):916. -25.
89. Krammer,P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000. Oct. 12. ;407. (6805.):789. -95.
90. Farrar,J.D., K.H.Katz, J.Windsor, G.Thrush, R.H.Scheuermann, J.W.Uhr, and N.E.Street. 1999. Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state. *J. Immunol.* 1999. Mar. 1;162. (5):2842. -9.
91. Gordan,J.D. and R.H.Vonderheide. 2002. Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. *Cytotherapy.* 2002. ;4(4):317. -27.
92. Spiotto,M.T., M.A.Reth, and H.Schreiber. 2003. Genetic changes occurring in established tumors rapidly stimulate new antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. Apr 29. ;100. (9.):5425. -30. Epub. 2003. Apr 17. Epub.
93. Ohnmacht,G.A. and F.M.Marincola. 2000. Heterogeneity in expression of human leukocyte antigens and melanoma-associated antigens in advanced melanoma. *J. Cell Physiol.* 2000. Mar. ;182. (3):332. -8.
94. Coulie,P.G., H.Ikeda, J.F.Baurain, and R.Chiari. 1999. Antitumor immunity at work in a melanoma patient. *Adv. Cancer Res.* 76: 213-242.
95. Wolfel,T., M.Hauer, J.Schneider, M.Serrano, C.Wolfel, E.Klehmann-Hieb, E.De Plaen, T.Hankeln, K.H.Meyer zum Buschenfelde, and D.Beach. 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269: 1281-1284.
96. Lennerz,V., M.Fatho, C.Gentilini, R.A.Frye, A.Lifke, D.Ferel, C.Wolfel, C.Huber, and T.Wolfel. 2005. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102: 16013-16018.

97. Gilboa, E. 1999. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*. 1999. Sep. ;11(3):263. -70.
98. Renkvist, N., C. Castelli, P. F. Robbins, and G. Parmiani. 2001. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 50: 3-15.
99. Echchakir, H., F. Mami-Chouaib, I. Vergnon, J. F. Baurain, V. Karanikas, S. Chouaib, and P. G. Coulie. 2001. A point mutation in the alpha-actinin-4 gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human lung carcinoma. *Cancer Res.* 2001. May. 15. ;61. (10):4078. -83.
100. Malarkannan, S., M. Afkarian, and N. Shastri. 1995. A rare cryptic translation product is presented by Kb major histocompatibility complex class I molecule to alloreactive T cells. *J. Exp. Med.* 1995. Dec. 1;182. (6.):1739. -50.
101. Coulie, P. G., F. Lehmann, B. Lethe, J. Herman, C. Lurquin, M. Andrawiss, and T. Boon. 1995. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995. Aug. 15. ;92. (17):7976. -80.
102. Robbins, P. F., M. El Gamil, Y. F. Li, E. B. Fitzgerald, Y. Kawakami, and S. A. Rosenberg. 1997. The intronic region of an incompletely spliced gp100 gene transcript encodes an epitope recognized by melanoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* 1997. Jul. 1;159. (1):303. -8.
103. Berke, Z., M. H. Andersen, M. Pedersen, L. Fugger, J. Zeuthen, and J. S. Haurum. 2000. Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules. *Leukemia*. 2000. Mar. ;14(3):419. -26.
104. Pawelec, G., E. Mariani, J. McLeod, A. Ben Yehuda, T. Fulop, M. Aringer, and Y. Barnett. 2004. Engineering anticancer T cells for extended functional longevity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004. Jun. ;1019. :178. -85.
105. del Mazo, J., G. Pranter, M. Torres, and M. Ferraro. 1994. DNA methylation changes during mouse spermatogenesis. *Chromosome. Res.* 1994. Mar. ;2(2):147. -52.
106. De Smet, C., O. De Backer, I. Faraoni, C. Lurquin, F. Brasseur, and T. Boon. 1996. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. Jul. 9. ;93. (14):7149. -53.
107. Barker, C. F. and R. E. Billingham. 1977. Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* 1977. ;25. :1-54.
108. Tomita, Y., M. Kimura, T. Tanikawa, T. Nishiyama, H. Morishita, M. Takeda, M. Fujiwara, and S. Sato. 1993. Immunohistochemical detection of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and major histocompatibility complex class I antigens in seminoma. *J. Urol.* 1993. Mar. ;149. (3):659. -63.
109. Gotter, J., B. Brors, M. Hergenroth, and B. Kyewski. 2004. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J. Exp. Med.* 199: 155-166.
110. Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein. 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* 2: 1032-1039.

111. De Smet,C., V.Martelange, S.Lucas, F.Brasseur, C.Lurquin, and T.Boon. 1997. Identification of human testis-specific transcripts and analysis of their expression in tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. Dec. 29. ;241. (3):653. -7.
112. Simpson,A.J., O.L.Caballero, A.Jungbluth, Y.T.Chen, and L.J.Old. 2005. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5: 615-625.
113. Coulie,P.G., V.Brichard, A.Van Pel, T.Wolfel, J.Schneider, C.Traversari, S.Mattei, E.De Plaen, C.Lurquin, J.P.Szikora, J.C.Renauld, and T.Boon. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 1994. Jul. 1;180. (1):35. -42.
114. Ikeda,H., B.Lethe, F.Lehmann, N.van Baren, J.F.Baurain, C.De Smet, H.Chambost, M.Vitale, A.Moretta, T.Boon, and P.G.Coulie. 1997. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity.* 6: 199-208.
115. Ohminami,H., M.Yasukawa, and S.Fujita. 2000. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood* 95: 286-293.
116. Andersen,M.H., L.O.Pedersen, J.C.Becker, and P.T.Straten. 2001. Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.* 61: 869-872.
117. Rensing,M.E., J.H.de Jong, R.M.Brandt, J.W.Drijfhout, W.E.Benckhuijsen, G.M.Schreuder, R.Offringa, W.M.Kast, and C.J.Melief. 1999. Differential binding of viral peptides to HLA-A2 alleles. Implications for human papillomavirus type 16 E7 peptide-based vaccination against cervical carcinoma. *Eur. J. Immunol.* 1999. Apr;29. (4):1292. -303.
118. De Visser,K.E., T.N.Schumacher, and A.M.Kruisbeek. 2003. CD8+ T cell tolerance and cancer immunotherapy. *J. Immunother.* 2003. Jan. -Feb. ;26. (1):1-11.
119. Usener,D., D.Schadendorf, J.Koch, S.Dubel, and S.Eichmuller. 2003. cTAGE: a cutaneous T cell lymphoma associated antigen family with tumor-specific splicing. *J. Invest Dermatol.* 2003. Jul. ;121. (1):198. -206.
120. Mamula,M.J., R.J.Gee, J.I.Elliott, A.Sette, S.Southwood, P.J.Jones, and P.R.Blier. 1999. Isoaspartyl post-translational modification triggers autoimmune responses to self-proteins. *J. Biol. Chem.* 1999. Aug. 6. ;274. (32.):22321. -7.
121. Pauli,C., M.Munz, C.Kieu, B.Mack, P.Breinl, B.Wollenberg, S.Lang, R.Zeidler, and O.Gires. 2003. Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett.* 2003. Apr 10;193. (1):25. -32.
122. Hanada,K., J.W.Yewdell, and J.C.Yang. 2004. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature.* 2004. Jan. 15. ;427. (6971.):252. -6.
123. Finn,O.J., K.R.Jerome, R.A.Henderson, G.Pecher, N.Domenech, J.Magarian-Blander, and S.M.Barratt-Boyes. 1995. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.* 1995. Jun. ;145. :61. -89.

124. Wang,R.F., X.Wang, A.C.Atwood, S.L.Topalian, and S.A.Rosenberg. 1999. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science* 284: 1351-1354.
125. Wang,S., S.Bartido, G.Yang, J.Qin, Y.Moroi, K.S.Panageas, J.J.Lewis, and A.N.Houghton. 1999. A role for a melanosome transport signal in accessing the MHC class II presentation pathway and in eliciting CD4+ T cell responses. *J. Immunol.* 1999. Dec. 1;163. (11):5820. -6.
126. Crotzer,V.L., R.E.Christian, J.M.Brooks, J.Shabanowitz, R.E.Settlage, J.A.Marto, F.M.White, A.B.Rickinson, D.F.Hunt, and V.H.Engelhard. 2000. Immunodominance among EBV-derived epitopes restricted by HLA-B27 does not correlate with epitope abundance in EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines. *J. Immunol.* 164: 6120-6129.
127. De Plaen,E., C.Lurquin, B.Lethe, B.P.van der, V.Brichard, J.C.Renauld, P.Coulie, A.Van Pel, and T.Boon. 1997. Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods.* 1997. Jun. ;12. (2):125. -42.
128. Gluzman,Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell.* 1981. Jan. ;23(1):175. -82.
129. Wolfel,C., V.Lennerz, E.Lindemann, G.Hess, H.G.Derigs, C.Huber, W.Herr, and T.Wolfel. 2008. Dissection and molecular analysis of alloreactive CD8+ T cell responses in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Immunol. Immunother.* 57: 849-857.
130. Sahin,U., O.Tureci, and M.Pfreundschuh. 1997. Serological identification of human tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 709-716.
131. Sahin,U., O.Tureci, H.Schmitt, B.Cochlovius, T.Johannes, R.Schmits, F.Stenner, G.Luo, I.Schobert, and M.Pfreundschuh. 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995. Dec. 5;92. (25.):11810. -3.
132. Chen,Y.T., M.J.Scanlan, U.Sahin, O.Tureci, A.O.Gure, S.Tsang, B.Williamson, E.Stockert, M.Pfreundschuh, and L.J.Old. 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. Mar. 4;94. (5):1914. -8.
133. Jager,E., S.Gnjatic, Y.Nagata, E.Stockert, D.Jager, J.Karbach, A.Neumann, J.Rieckenberg, Y.T.Chen, G.Ritter, E.Hoffman, M.Arand, L.J.Old, and A.Knuth. 2000. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Oct. 24. ;97. (22.):12198. -203.
134. Mintz,P.J., J.Kim, K.A.Do, X.Wang, R.G.Zinner, M.Cristofanilli, M.A.Arap, W.K.Hong, P.Troncso, C.J.Logothesis, R.Pasqualini, and W.Arap. 2003. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat. Biotechnol.* 2003. Jan. ;21(1):57. -63. Epub. 2002. Dec. 23. Epub.
135. Klade,C.S., T.Voss, E.Krystek, H.Ahorn, K.Zatloukal, K.Pummer, and G.R.Adolf. 2001. Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics.* 2001. Jul. ;1(7.):890. -8.
136. Brichory,F., D.Beer, F.Le Naour, T.Giordano, and S.Hanash. 2001. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer Res.* 2001. Nov. 1;61. (21):7908. -12.

137. Castelli,C., W.J.Storkus, M.J.Maeurer, D.M.Martin, E.C.Huang, B.N.Pramanik, T.L.Nagabhushan, G.Parmiani, and M.T.Lotze. 1995. Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1995. Jan. 1;181. (1):363. -8.
138. Stickel,J.S., A.O.Weinzierl, N.Hillen, O.Drews, M.M.Schuler, J.Hennenlotter, D.Wernet, C.A.Muller, A.Stenzl, H.G.Rammensee, and S.Stevanovic. 2009. HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases. *Cancer Immunol. Immunother.* 58: 1407-1417.
139. Kawahara,M., T.Hori, Y.Matsubara, K.Okawa, and T.Uchiyama. 2006. Identification of HLA class I-restricted tumor-associated antigens in adult T cell leukemia cells by mass spectrometric analysis. *Exp. Hematol.* 34: 1496-1504.
140. Hogan,K.T., J.N.Sutton, K.U.Chu, J.A.Busby, J.Shabanowitz, D.F.Hunt, and C.L.Slingluff, Jr. 2005. Use of selected reaction monitoring mass spectrometry for the detection of specific MHC class I peptide antigens on A3 supertype family members. *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 359-371.
141. Hofmann,S., M.Gluckmann, S.Kausche, A.Schmidt, C.Corvey, R.Lichtenfels, C.Huber, C.Albrecht, M.Karas, and W.Herr. 2005. Rapid and sensitive identification of major histocompatibility complex class I-associated tumor peptides by Nano-LC MALDI MS/MS. *Mol. Cell Proteomics.* 4: 1888-1897.
142. Stevanovic,S. 2002. Structural basis of immunogenicity. *Transpl. Immunol.* 10: 133-136.
143. Lu,J. and E.Celis. 2000. Use of two predictive algorithms of the world wide web for the identification of tumor-reactive T-cell epitopes. *Cancer Res.* 60: 5223-5227.
144. Rammensee,H., J.Bachmann, N.P.Emmerich, O.A.Bachor, and S.Stevanovic. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213-219.
145. Maecker,B., B.von, K.S.Anderson, R.H.Vonderheide, and J.L.Schultze. 2001. Linking genomics to immunotherapy by reverse immunology--'immunomics' in the new millennium. *Curr. Mol. Med.* 2001. Nov. ;1(5):609. -19.
146. Kessler,J.H., N.J.Beekman, S.A.Bres-Vloemans, P.Verdijk, P.A.van Veelen, A.M.Kloosterman-Joosten, D.C.Vissers, G.J.ten Bosch, M.G.Kester, A.Sijts, D.J.Wouter, F.Ossendorp, R.Offringa, and C.J.Melief. 2001. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J. Exp. Med.* 2001. Jan. 1;193. (1):73. -88.
147. Balch,C.M., A.C.Buzaid, S.J.Soong, M.B.Atkins, N.Cascinelli, D.G.Coit, I.D.Fleming, J.E.Gershenwald, A.Houghton, Jr., J.M.Kirkwood, K.M.McMasters, M.F.Mihm, D.L.Morton, D.S.Reintgen, M.I.Ross, A.Sober, J.A.Thompson, and J.F.Thompson. 2001. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* 19: 3635-3648.
148. Soong,S.J., R.A.Harrison, W.H.McCarthy, M.M.Urist, and C.M.Balch. 1998. Factors affecting survival following local, regional, or distant recurrence from localized melanoma. *J. Surg. Oncol.* 1998. Apr;67. (4):228. -33.
149. Pittet,M.J., D.Valmori, P.R.Dunbar, D.E.Speiser, D.Lienard, F.Lejeune, K.Fleischhauer, V.Cerundolo, J.C.Cerottini, and P.Romero. 1999. High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J. Exp. Med.* 190: 705-715.

150. Mackensen,A., G.Carcelain, S.Viel, M.C.Raynal, H.Michalaki, F.Triebel, J.Bosq, and T.Hercend. 1994. Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J. Clin. Invest.* 1994. Apr;93. (4):1397. -402.
151. van Houdt,I.S., B.J.Sluijter, L.M.Moesbergen, W.M.Vos, T.D.de Gruijl, B.G.Molenkamp, A.J.van den Eertwegh, E.Hooijberg, P.A.van Leeuwen, C.J.Meijer, and J.J.Oudejans. 2008. Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int. J. Cancer* 123: 609-615.
152. O'Rourke,M.G., M.K.Johnson, C.M.Lanagan, J.L.See, L.E.O'Connor, G.J.Slater, D.Thomas, J.A.Lopez, N.R.Martinez, K.A.Ellem, and C.W.Schmidt. 2007. Dendritic cell immunotherapy for stage IV melanoma. *Melanoma Res.* 2007. Oct. ;17(5):316. -22.
153. Parham,P., C.J.Barnstable, and W.F.Bodmer. 1979. Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens. *J. Immunol.* 1979. Jul. ;123. (1):342. -9.
154. Barnstable,C.J., W.F.Bodmer, G.Brown, G.Galfre, C.Milstein, A.F.Williams, and A.Ziegler. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell.* 1978. May. ;14(1):9. -20.
155. Lampson,L.A. and R.Levy. 1980. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J. Immunol.* 1980. Jul. ;125. (1):293. -9.
156. Nepom,B.S., G.T.Nepom, M.Coleman, and W.W.Kwok. 1996. Critical contribution of beta chain residue 57 in peptide binding ability of both HLA-DR and -DQ molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. Jul. 9. ;93. (14):7202. -6.
157. Zinszner,H., M.Masset, J.F.Bourge, J.Colombani, D.Cohen, L.Degos, and P.Paul. 1990. Nucleotide sequence of the HLA-A26 class I gene: identification of specific residues and molecular mapping of public HLA class I epitopes. *Hum. Immunol.* 1990. Mar. ;27. (3):155. -66.
158. Lemonnier,F.A., N.Rebai, P.P.Le Bouteiller, B.Malissen, D.H.Caillol, and F.M.Kourilsky. 1982. Epitopic analysis of detergent-solubilized HLA molecules by solid-phase radioimmunoassay. *J. Immunol. Methods.* 1982. Oct. 15. ;54. (1):9. -22.
159. Radka,S.F., D.D.Kostyu, and D.B.Amos. 1982. A monoclonal antibody directed against the HLA-Bw6 epitope. *J. Immunol.* 1982. Jun. ;128. (6.):2804. -6.
160. White,C.A., S.A.Thomson, L.Cooper, P.M.van Endert, R.Tampe, B.Coupar, L.Qiu, P.G.Parsons, D.J.Moss, and R.Khanna. 1998. Constitutive transduction of peptide transporter and HLA genes restores antigen processing function and cytotoxic T cell-mediated immune recognition of human melanoma cells. *Int. J. Cancer.* 1998. Feb. 9. ;75. (4):590. -5.
161. McMichael,A.J., P.Parham, N.Rust, and F.Brodsky. 1980. A monoclonal antibody that recognizes an antigenic determinant shared by HLA A2 and B17. *Hum. Immunol.* 1980. Sep. ;1(2):121. -9.
162. Santos-Aguado,J., J.A.Barbosa, P.A.Biro, and J.L.Strominger. 1988. Molecular characterization of serologic recognition sites in the human HLA-A2 molecule. *J. Immunol.* 1988. Oct. 15. ;141. (8.):2811. -8.

163. Graham,F.L., J.Smiley, W.C.Russell, and R.Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 1977. Jul. ;36. (1):59. -74.
164. Papadimitriou,L., I.Morianos, V.Michailidou, E.Dionyssopoulou, S.Vassiliadis, and I.Athanassakis. 2008. Characterization of intracellular HLA-DR, DM and DO profile in K562 and HL-60 leukemic cells. *Mol. Immunol.* 2008. Sep. ;45. (15.):3965. -73. Epub. 2008. Jul. 26. Epub.
165. Garrido,F., T.Cabrera, M.A.Lopez-Nevot, and F.Ruiz-Cabello. 1995. HLA class I antigens in human tumors. *Adv. Cancer Res.* 67: 155-195.
166. Algarra,I., J.J.Gaforio, T.Cabrera, A.Collado, and F.Garrido. 1999. The biological consequences of altered MHC class I expression in tumours. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 13: 90-96.
167. Restifo,N.P., F.M.Marincola, Y.Kawakami, J.Taubenberger, J.R.Yannelli, and S.A.Rosenberg. 1996. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996. Jan. 17;88. (2):100. -8.
168. Danchin,E., V.Vitiello, A.Vienne, O.Richard, P.Gouret, M.F.McDermott, and P.Pontarotti. 2004. The major histocompatibility complex origin. *Immunol. Rev.* 2004. Apr;198. :216. -32.
169. Gobin,S.J., M.van Zutphen, A.M.Woltman, and P.J.van den Elsen. 1999. Transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes through the IFN-stimulated response element. *J. Immunol.* 1999. Aug. 1;163. (3):1428. -34.
170. Abraham,C., J.Griffith, and J.Miller. 1999. The dependence for leukocyte function-associated antigen-1/ICAM-1 interactions in T cell activation cannot be overcome by expression of high density TCR ligand. *J. Immunol.* 1999. Apr 15. ;162. (8.):4399. -405.
171. Kandula,S. and C.Abraham. 2004. LFA-1 on CD4+ T cells is required for optimal antigen-dependent activation in vivo. *J. Immunol.* 2004. Oct. 1;173. (7.):4443. -51.
172. Herr,W., B.Linn, N.Leister, E.Wandel, K.H.Meyer zum Buschenfelde, and T.Wolfel. 1997. The use of computer-assisted video image analysis for the quantification of CD8+ T lymphocytes producing tumor necrosis factor alpha spots in response to peptide antigens. *J. Immunol. Methods.* 1997. Apr 25. ;203. (2):141. -52.
173. Gaugler,B., E.B.Van den, B.P.van der, P.Romero, J.J.Gaforio, E.De Plaen, B.Lethe, F.Brasseur, and T.Boon. 1994. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179: 921-930.
174. Jager,E., Y.T.Chen, J.W.Drijfhout, J.Karbach, M.Ringhoffer, D.Jager, M.Arand, H.Wada, Y.Noguchi, E.Stockert, L.J.Old, and A.Knuth. 1998. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med.* 187: 265-270.
175. Kawakami,Y., S.Eliyahu, K.Sakaguchi, P.F.Robbins, L.Rivoltini, J.R.Yannelli, E.Appella, and S.A.Rosenberg. 1994. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1994. Jul. 1;180. (1):347. -52.

176. Huang,L.Q., F.Brasseur, A.Serrano, E.De Plaen, B.P.van der, T.Boon, and A.Van Pel. 1999. Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE-A10 on a human melanoma. *J. Immunol.* 1999. Jun. 1;162. (11):6849. -54.
177. Lau,Y.F., H.W.Lau, and L.G.Komuves. 2003. Expression pattern of a gonadoblastoma candidate gene suggests a role of the Y chromosome in prostate cancer. *Cytogenet. Genome Res.* 101: 250-260.
178. Krick,R., S.Jakubiczka, and J.Arnemann. 2003. Expression, alternative splicing and haplotype analysis of transcribed testis specific protein (TSPY) genes. *Gene* 302: 11-19.
179. Dechend,F., G.Williams, B.Skawran, S.Schubert, M.Krawczak, C.Tyler-Smith, and J.Schmidtke. 2000. TSPY variants in six loci on the human Y chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.* 91: 67-71.
180. Lau,Y.F. 1999. Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the TSPY gene. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 921-927.
181. Schnieders,F., T.Dork, J.Arnemann, T.Vogel, M.Werner, and J.Schmidtke. 1996. Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. *Hum. Mol. Genet.* 5: 1801-1807.
182. Zhang,J.S., T.L.Yang-Feng, U.Muller, T.K.Mohandas, P.J.de Jong, and Y.F.Lau. 1992. Molecular isolation and characterization of an expressed gene from the human Y chromosome. *Hum. Mol. Genet.* 1: 717-726.
183. Gallagher,W.M., O.E.Bergin, M.Rafferty, Z.D.Kelly, I.M.Nolan, E.J.Fox, A.C.Culhane, L.McArdle, M.F.Fraga, L.Hughes, C.A.Currid, F.O'Mahony, A.Byrne, A.A.Murphy, C.Moss, S.McDonnell, R.L.Stallings, J.A.Plumb, M.Esteller, R.Brown, P.A.Dervan, and D.J.Easty. 2005. Multiple markers for melanoma progression regulated by DNA methylation: insights from transcriptomic studies. *Carcinogenesis.* 2005. Nov. ;26. (11):1856. -67. Epub. 2005. Jun. 15. Epub.
184. Lau,Y., P.Chou, J.Iezzoni, J.Alonzo, and L.Komuves. 2000. Expression of a candidate gene for the gonadoblastoma locus in gonadoblastoma and testicular seminoma. *Cytogenet. Cell Genet.* 91: 160-164.
185. Yin,Y.H., Y.Y.Li, H.Qiao, H.C.Wang, X.A.Yang, H.G.Zhang, X.W.Pang, Y.Zhang, and W.F.Chen. 2005. TSPY is a cancer testis antigen expressed in human hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer.* 2005. Aug. 22. ;93. (4):458. -63.
186. Strehl,B., U.Seifert, E.Kruger, S.Heink, U.Kuckelkorn, and P.M.Kloetzel. 2005. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol. Rev.* 2005. Oct. ;207. :19. -30.
187. Coral,S., L.Sigalotti, M.Altomonte, A.Engelsberg, F.Colizzi, I.Cattarossi, E.Maraskovsky, E.Jager, B.Seliger, and M.Maio. 2002. 5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigens in human renal cell carcinoma: immunotherapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* 2002. Aug. ;8. (8.):2690. -5.
188. Lim,J.H., S.P.Kim, E.Gabrielson, Y.B.Park, J.W.Park, and T.K.Kwon. 2005. Activation of human cancer/testis antigen gene, XAGE-1, in tumor cells is correlated with CpG island hypomethylation. *Int. J. Cancer.* 2005. Aug. 20. ;116. (2):200. -6.
189. Melcher,R., C.Steinlein, W.Feichtinger, C.R.Muller, T.Menzel, H.Luhrs, W.Scheppach, and M.Schmid. 2000. Spectral karyotyping of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620. *Cytogenet. Cell Genet.* 88: 145-152.

190. Schatton,T., G.F.Murphy, N.Y.Frank, K.Yamaura, A.M.Waaga-Gasser, M.Gasser, Q.Zhan, S.Jordan, L.M.Duncan, C.Weishaupt, R.C.Fuhlbrigge, T.S.Kupper, M.H.Sayegh, and M.H.Frank. 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451: 345-349.
191. Belicchi,M., F.Pisati, R.Lopa, L.Porretti, F.Fortunato, M.Sironi, M.Scalamogna, E.A.Parati, N.Bresolin, and Y.Torrente. 2004. Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 2004. Aug. 15. ;77. (4):475. -86.
192. Shmelkov,S.V., R.St Clair, D.Lyden, and S.Rafii. 2005. AC133/CD133/Prominin-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. Apr;37. (4):715. -9.
193. Bhatia,M. 2001. AC133 expression in human stem cells. *Leukemia.* 2001. Nov. ;15. (11):1685. -8.
194. Singh,S.K., C.Hawkins, I.D.Clarke, J.A.Squire, J.Bayani, T.Hide, R.M.Henkelman, M.D.Cusimano, and P.B.Dirks. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004. Nov. 18. ;432. (7015.):396. -401.
195. Frank,N.Y., A.Margaryan, Y.Huang, T.Schatton, A.M.Waaga-Gasser, M.Gasser, M.H.Sayegh, W.Sadee, and M.H.Frank. 2005. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 65: 4320-4333.
196. Monzani,E., F.Facchetti, E.Galmozzi, E.Corsini, A.Benetti, C.Cavazzin, A.Gritti, A.Piccinini, D.Porro, M.Santinami, G.Invernici, E.Parati, G.Alessandri, and C.A.La Porta. 2007. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur. J. Cancer* 43: 935-946.
197. Li,Y., Z.L.Tabatabai, T.L.Lee, S.Hatakeyama, C.Ohyama, W.Y.Chan, L.H.Looijenga, and Y.F.Lau. 2007. The Y-encoded TSPY protein: a significant marker potentially plays a role in the pathogenesis of testicular germ cell tumors. *Hum. Pathol.* 38: 1470-1481.
198. Li,Y., E.Vilain, F.Conte, E.Rajpert-De Meyts, and Y.F.Lau. 2007. Testis-specific protein Y-encoded gene is expressed in early and late stages of gonadoblastoma and testicular carcinoma in situ. *Urol. Oncol.* 25: 141-146.
199. Britten,C.M., R.G.Meyer, T.Kreer, I.Drexler, T.Wolfel, and W.Herr. 2002. The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays. *J. Immunol. Methods.* 2002. Jan. 1;259. (1-2):95. -110.
200. Yao,V., C.Platell, and J.C.Hall. 2002. Dendritic cells. *Anz. J. Surg.* 2002. Jul. ;72. (7.):501. -6.
201. Schott,M., J.Feldkamp, M.Klucken, G.Kobbe, W.A.Scherbaum, and J.Seissler. 2002. Calcitonin-specific antitumor immunity in medullary thyroid carcinoma following dendritic cell vaccination. *Cancer Immunol. Immunother.* 2002. Dec. ;51. (11-12.):663. -8. Epub. 2002. Oct. 29. Epub.
202. Galea-Lauri,J., D.Darling, G.Mufti, P.Harrison, and F.Farzaneh. 2002. Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell-leukemia cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination. *Cancer Immunol. Immunother.* 2002. Aug. ;51. (6.):299. -310. Epub. 2002. Jun. 14. Epub.

203. Krause,S.W., C.Neumann, A.Soruri, S.Mayer, J.H.Peters, and R.Andreesen. 2002. The treatment of patients with disseminated malignant melanoma by vaccination with autologous cell hybrids of tumor cells and dendritic cells. *J. Immunother.* 2002. Sep. -Oct. ;25. (5):421. -8.
204. Rosenberg,S.A. and M.E.Dudley. 2004. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. Oct. 5;101. Suppl 2:14639. -45. Epub. 2004. Sep. 20. Epub.
205. Nagorsen,D., U.Keilholz, L.Rivoltini, A.Schmittel, A.Letsch, A.M.Asemissen, G.Berger, H.J.Buhr, E.Thiel, and C.Scheibenbogen. 2000. Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2000. Sep. 1;60. (17):4850. -4.
206. Letsch,A., U.Keilholz, D.Schadendorf, D.Nagorsen, A.Schmittel, E.Thiel, and C.Scheibenbogen. 2000. High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma. *Int. J. Cancer.* 2000. Sep. 1;87. (5):659. -64.
207. Calhoun,R.F., B.Naziruddin, F.Enriquez-Rincon, B.F.Duffy, J.M.Ritter, S.Sundaresan, G.A.Patterson, J.D.Cooper, and T.Mohanakumar. 2000. Evidence for cytotoxic T lymphocyte response against human lung cancer: reconstitution of antigenic epitope with peptide eluted from lung adenocarcinoma MHC class I. *Surgery.* 2000. Jul. ;128. (1):76. -85.
208. Schmitz-Winnenthal,F.H., C.Volk, K.Z'graggen, L.Galindo, D.Nummer, Y.Ziouta, M.Bucur, J.Weitz, V.Schirmacher, M.W.Buchler, and P.Beckhove. 2005. High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients. *Cancer Res.* 2005. Nov. 1;65. (21):10079. -87.
209. Gudmundsdottir,H., A.D.Wells, and L.A.Turka. 1999. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J. Immunol.* 1999. May. 1;162. (9.):5212. -23.
210. Powell,D.J., Jr. and S.A.Rosenberg. 2004. Phenotypic and functional maturation of tumor antigen-reactive CD8+ T lymphocytes in patients undergoing multiple course peptide vaccination. *J. Immunother.* 2004. Jan. -Feb. ;27. (1):36. -47.
211. Lee,P.P., C.Yee, P.A.Savage, L.Fong, D.Brockstedt, J.S.Weber, D.Johnson, S.Swetter, J.Thompson, P.D.Greenberg, M.Roederer, and M.M.Davis. 1999. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat. Med.* 1999. Jun. ;5(6.):677. -85.
212. Trefzer,U., G.Herberth, K.Wohlan, A.Milling, M.Thiemann, T.Sherev, K.Sparbier, W.Sterry, and P.Walden. 2004. Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients. *Int. J. Cancer.* 2004. Jul. 10;110. (5):730. -40.
213. Roskrow,M.A., N.Suzuki, Y.Gan, J.W.Sixbey, C.Y.Ng, S.Kimbrough, M.Hudson, M.K.Brenner, H.E.Heslop, and C.M.Rooney. 1998. Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV-positive relapsed Hodgkin's disease. *Blood.* 1998. Apr 15. ;91. (8.):2925. -34.
214. Papanicolaou,G.A., J.B.Latouche, C.Tan, J.Dupont, J.Stiles, E.G.Pamer, and M.Sadelain. 2003. Rapid expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells expressing a single HLA allele. *Blood.* 2003. Oct. 1;102. (7.):2498. -505. Epub. 2003. Jun. 12. Epub.

215. Serody,J.S., E.J.Collins, R.M.Tisch, J.J.Kuhns, and J.A.Frelinger. 2000. T cell activity after dendritic cell vaccination is dependent on both the type of antigen and the mode of delivery. *J. Immunol.* 2000. May. 1;164. (9.):4961. -7.
216. Brossart,P., S.Wirths, G.Stuhler, V.L.Reichardt, L.Kanz, and W.Brugger. 2000. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood.* 2000. Nov. 1;96. (9.):3102. -8.
217. Loveland,B.E., A.Zhao, S.White, H.Gan, K.Hamilton, P.X.Xing, G.A.Pietersz, V.Apostolopoulos, H.Vaughan, V.Karanikas, P.Kyriakou, I.F.McKenzie, and P.L.Mitchell. 2006. Mannan-MUC1-pulsed dendritic cell immunotherapy: a phase I trial in patients with adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2006. Feb. 1;12. (3 Pt. 1):869. -77.
218. Escobar,A., M.Lopez, A.Serrano, M.Ramirez, C.Perez, A.Aguirre, R.Gonzalez, J.Alfaro, M.Larrondo, M.Fodor, C.Ferrada, and F.Salazar-Onfray. 2005. Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clin. Exp. Immunol.* 2005. Dec. ;142. (3):555. -68.
219. Palucka,A.K., M.V.Dhodapkar, S.Paczesny, S.Burkeholder, K.M.Wittkowski, R.M.Steinman, J.Fay, and J.Banchereau. 2003. Single injection of CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine can lead to induction of T-cell immunity in patients with stage IV melanoma. *J. Immunother.* 2003. Sep. -Oct. ;26. (5):432. -9.
220. Palucka,A.K., M.V.Dhodapkar, S.Paczesny, H.Ueno, J.Fay, and J.Banchereau. 2005. Boosting vaccinations with peptide-pulsed CD34+ progenitor-derived dendritic cells can expand long-lived melanoma peptide-specific CD8+ T cells in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* 2005. Mar. -Apr;28. (2):158. -68.
221. Lin,C.L., W.F.Lo, T.H.Lee, Y.Ren, S.L.Hwang, Y.F.Cheng, C.L.Chen, Y.S.Chang, S.P.Lee, A.B.Rickinson, and P.K.Tam. 2002. Immunization with Epstein-Barr Virus (EBV) peptide-pulsed dendritic cells induces functional CD8+ T-cell immunity and may lead to tumor regression in patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2002. Dec. 1;62. (23):6952. -8.
222. Lau,R., F.Wang, G.Jeffery, V.Marty, J.Kuniyoshi, E.Bade, M.E.Ryback, and J.Weber. 2001. Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* 2001. Jan. -Feb. ;24. (1):66. -78.
223. de Vries,I.J., M.R.Bernsen, W.J.Lesterhuis, N.M.Scharenborg, S.P.Strijk, M.J.Gerritsen, D.J.Ruiter, C.G.Figdor, C.J.Punt, and G.J.Adema. 2005. Immunomonitoring tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome. *J. Clin. Oncol.* 2005. Aug. 20. ;23(24.):5779. -87.
224. Slingluff,C.L., Jr., G.R.Petroni, G.V.Yamshchikov, S.Hibbitts, W.W.Grosh, K.A.Chianese-Bullock, E.A.Bissonette, D.L.Barnd, D.H.Deacon, J.W.Patterson, J.Parekh, P.Y.Neese, E.M.Woodson, C.J.Wiernasz, and P.Merrill. 2004. Immunologic and clinical outcomes of vaccination with a multiepitope melanoma peptide vaccine plus low-dose interleukin-2 administered either concurrently or on a delayed schedule. *J. Clin. Oncol.* 2004. Nov. 15. ;22. (22.):4474. -85.
225. Zaks,T.Z., D.B.Chappell, S.A.Rosenberg, and N.P.Restifo. 1999. Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J. Immunol.* 1999. Mar. 15. ;162. (6.):3273. -9.
226. Godard,B., A.Gazagne, A.Gey, M.Baptiste, B.Vingert, B.Pegaz-Fiornet, L.Strompf, W.H.Fridman, D.Glotz, and E.Tartour. 2004. Optimization of an elispot assay to detect

- cytomegalovirus-specific CD8⁺ T lymphocytes. *Hum. Immunol.* 2004. Nov. ;65. (11):1307. -18.
227. Garcia-Lora,A., I.Algarra, and F.Garrido. 2003. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J. Cell Physiol.* 2003. Jun. ;195. (3):346. -55.
 228. Huppa,J.B. and M.M.Davis. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 973-983.
 229. Campbell,I.L., K.Bizilj, P.G.Colman, B.E.Tuch, and L.C.Harrison. 1986. Interferon-gamma induces the expression of HLA-A,B,C but not HLA-DR on human pancreatic beta-cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 62: 1101-1109.
 230. Zhou,F. 2009. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int. Rev. Immunol.* 28: 239-260.
 231. Antonia,S.J., M.Extermann, and R.A.Flavell. 1998. Immunologic nonresponsiveness to tumors. *Crit Rev. Oncog.* 1998. ;9. (1):35. -41.
 232. Ganss,R., A.Limmer, T.Sacher, B.Arnold, and G.J.Hammerling. 1999. Autoaggression and tumor rejection: it takes more than self-specific T-cell activation. *Immunol. Rev.* 1999. Jun. ;169. :263. -72.
 233. Grossi,C.E., E.Ciccone, C.Tacchetti, G.Santoro, and G.Anastasi. 2000. Anatomy of the immune system: facts and problems. *Ital. J. Anat. Embryol.* 105: 97-124.
 234. Murer,K., M.Urosevic, J.Willers, P.Selvam, E.Laine, G.Burg, and R.Dummer. 2004. Expression of Melan-A/MART-1 in primary melanoma cell cultures has prognostic implication in metastatic melanoma patients. *Melanoma Res.* 2004. Aug. ;14(4):257. -62.
 235. Derby,M., M.Alexander-Miller, R.Tse, and J.Berzofsky. 2001. High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL. *J. Immunol.* 166: 1690-1697.
 236. Slifka,M.K. and J.L.Whitton. 2001. Functional avidity maturation of CD8(+) T cells without selection of higher affinity TCR. *Nat. Immunol.* 2: 711-717.
 237. Boon,T., P.Coulie, M.Marchand, P.Weynants, T.Wolfel, and V.Brichard. 1994. Genes coding for tumor rejection antigens: perspectives for specific immunotherapy. *Important Adv. Oncol.* 53-69.
 238. Houghton,A.N. 1994. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J. Exp. Med.* 180: 1-4.
 239. Yee,C., P.A.Savage, P.P.Lee, M.M.Davis, and P.D.Greenberg. 1999. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. *J. Immunol.* 162: 2227-2234.
 240. Dutoit,V., V.Rubio-Godoy, P.Y.Dietrich, A.L.Quiqueres, V.Schnuriger, D.Rimoldi, D.Lienard, D.Speiser, P.Guillaume, P.Batard, J.C.Cerottini, P.Romero, and D.Valmori. 2001. Heterogeneous T-cell response to MAGE-A10(254-262): high avidity-specific cytolytic T lymphocytes show superior antitumor activity. *Cancer Res.* 61: 5850-5856.
 241. Zeh,H.J., III, D.Perry-Lalley, M.E.Dudley, S.A.Rosenberg, and J.C.Yang. 1999. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J. Immunol.* 162: 989-994.

242. Snyder,J.T., M.A.Alexander-Miller, J.A.Berzofsky, and I.M.Belyakov. 2003. Molecular mechanisms and biological significance of CTL avidity. *Curr. HIV. Res.* 1: 287-294.
243. Derby,M.A., J.T.Snyder, R.Tse, M.A.Alexander-Miller, and J.A.Berzofsky. 2001. An abrupt and concordant initiation of apoptosis: antigen-dependent death of CD8+ CTL. *Eur. J. Immunol.* 2001. Oct. ;31. (10):2951. -9.
244. Roy-Proulx,G., M.C.Meunier, A.M.Lanteigne, S.Brochu, and C.Perreault. 2001. Immunodomination results from functional differences between competing CTL. *Eur. J. Immunol.* 2001. Aug. ;31. (8.):2284. -92.
245. Wolpert,E.Z., P.Grufman, J.K.Sandberg, A.Tegnesjo, and K.Karre. 1998. Immunodominance in the CTL response against minor histocompatibility antigens: interference between responding T cells, rather than with presentation of epitopes. *J. Immunol.* 1998. Nov. 1;161. (9.):4499. -505.
246. Valmori,D., N.Gervois, D.Rimoldi, J.F.Fonteneau, A.Bonelo, D.Lienard, L.Rivoltini, F.Jotereau, J.C.Cerottini, and P.Romero. 1998. Diversity of the fine specificity displayed by HLA-A*0201-restricted CTL specific for the immunodominant Melan-A/MART-1 antigenic peptide. *J. Immunol.* 1998. Dec. 15. ;161. (12.):6956. -62.
247. Valmori,D., J.F.Fonteneau, C.M.Lizana, N.Gervois, D.Lienard, D.Rimoldi, V.Jongeneel, F.Jotereau, J.C.Cerottini, and P.Romero. 1998. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J. Immunol.* 1998. Feb. 15. ;160. (4):1750. -8.
248. Yee,C., J.A.Thompson, P.Roche, D.R.Byrd, P.P.Lee, M.Piepkorn, K.Kenyon, M.M.Davis, S.R.Riddell, and P.D.Greenberg. 2000. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J. Exp. Med.* 2000. Dec. 4;192. (11):1637. -44.
249. Houghton,A.N., J.S.Gold, and N.E.Blachere. 2001. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr. Opin. Immunol.* 2001. Apr;13(2):134. -40.
250. Gervois,N., Y.Guilloux, E.Diez, and F.Jotereau. 1996. Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions. *J. Exp. Med.* 1996. May. 1;183. (5):2403. -7.
251. Zorn,E. and T.Hercend. 1999. A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen resulting from a somatic point mutation. *Eur. J. Immunol.* 29: 592-601.
252. Robbins,P.F., M.El Gamil, Y.F.Li, G.Zeng, M.Dudley, and S.A.Rosenberg. 2002. Multiple HLA class II-restricted melanocyte differentiation antigens are recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. *J. Immunol.* 169: 6036-6047.
253. Boon,T., P.G.Coulie, and E.B.Van den. 1997. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol. Today.* 1997. Jun. ;18. (6.):267. -8.
254. Kawakami,Y., S.Eliyahu, C.H.Delgado, P.F.Robbins, L.Rivoltini, S.L.Topalian, T.Miki, and S.A.Rosenberg. 1994. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91: 3515-3519.
255. Brichard,V., A.Van Pel, T.Wolfel, C.Wolfel, E.De Plaen, B.Lethe, P.Coulie, and T.Boon. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 178: 489-495.

256. Manz,E., F.Schnieders, A.M.Brechlin, and J.Schmidtke. 1993. TSPY-related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutive elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y chromosome. *Genomics* 17: 726-731.
257. Arnemann,J., J.T.Epplen, H.J.Cooke, U.Sauermann, W.Engel, and J.Schmidtke. 1987. A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue. *Nucleic Acids Res.* 15: 8713-8724.
258. Vogel,T. and J.Schmidtke. 1998. Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the "testis-specific protein". *Cytogenet. Cell Genet.* 80: 209-213.
259. Krick,R., A.Aschrafi, D.Hasgun, and J.Arnemann. 2006. CK2-dependent C-terminal phosphorylation at T300 directs the nuclear transport of TSPY protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341: 343-350.
260. Gomez-Nunez,M., J.Pinilla-Ibarz, T.Dao, R.J.May, M.Pao, J.S.Jaggi, and D.A.Scheinberg. 2006. Peptide binding motif predictive algorithms correspond with experimental binding of leukemia vaccine candidate peptides to HLA-A*0201 molecules. *Leuk. Res.* 30: 1293-1298.
261. Gotter,J. and B.Kyewski. 2004. Regulating self-tolerance by deregulating gene expression. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 741-745.
262. Tureci,O., U.Sahin, C.Zwick, M.Koslowski, G.Seitz, and M.Pfreundschuh. 1998. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95: 5211-5216.
263. Old,L.J. 2001. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun.* 1: 1.
264. Old,L.J. and Y.T.Chen. 1998. New paths in human cancer serology. *J. Exp. Med.* 187: 1163-1167.
265. Laduron,S., R.Deplus, S.Zhou, O.Kholmanskikh, D.Godelaine, C.De Smet, S.D.Hayward, F.Fuks, T.Boon, and E.De Plaen. 2004. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res.* 32: 4340-4350.
266. Scanlan,M.J., A.J.Simpson, and L.J.Old. 2004. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* 4: 1.
267. Ford,H.L. and A.B.Pardee. 1999. Cancer and the cell cycle. *J. Cell Biochem. Suppl* 32-33: 166-172.
268. Canela,N., A.Rodriguez-Vilarrupla, J.M.Estanyol, C.Diaz, M.J.Pujol, N.Agell, and O.Bachs. 2003. The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J. Biol. Chem.* 278: 1158-1164.
269. Estanyol,J.M., M.Jaumot, O.Casanovas, A.Rodriguez-Vilarrupla, N.Agell, and O.Bachs. 1999. The protein SET regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity. *J. Biol. Chem.* 274: 33161-33165.
270. Kellogg,D.R., A.Kikuchi, T.Fujii-Nakata, C.W.Turck, and A.W.Murray. 1995. Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins. *J. Cell Biol.* 130: 661-673.

271. Scanlan,M.J., A.O.Gure, A.A.Jungbluth, L.J.Old, and Y.T.Chen. 2002. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 188: 22-32.
272. Jungbluth,A.A., E.Stockert, Y.T.Chen, D.Kolb, K.Iversen, K.Coplan, B.Williamson, N.Altorki, K.J.Busam, and L.J.Old. 2000. Monoclonal antibody MA454 reveals a heterogeneous expression pattern of MAGE-1 antigen in formalin-fixed paraffin embedded lung tumours. *Br. J. Cancer* 83: 493-497.
273. Chen,Q., H.Jackson, M.Shackleton, P.Parente, W.Hopkins, S.Sturrock, D.MacGregor, E.Maraskovsky, T.Y.Tai, N.Dimopoulos, K.A.Masterman, T.Luke, I.D.Davis, W.Chen, and J.Cebon. 2005. Characterization of antigen-specific CD8+ T lymphocyte responses in skin and peripheral blood following intradermal peptide vaccination. *Cancer Immun.* 5: 5.
274. Valmori,D., V.Dutoit, M.Ayyoub, D.Rimoldi, P.Guillaume, D.Lienard, F.Lejeune, J.C.Cerottini, P.Romero, and D.E.Speiser. 2003. Simultaneous CD8+ T cell responses to multiple tumor antigen epitopes in a multi-peptide melanoma vaccine. *Cancer Immun.* 3: 15.
275. Marchand,M., N.van Baren, P.Weynants, V.Brichard, B.Dreno, M.H.Tessier, E.Rankin, G.Parmiani, F.Arienti, Y.Humblot, A.Bourlond, R.Vanwijck, D.Lienard, M.Beauduin, P.Y.Dietrich, V.Russo, J.Kerger, G.Masucci, E.Jager, J.De Greve, J.Atzpodien, F.Brasseur, P.G.Coulie, B.P.van der, and T.Boon. 1999. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int. J. Cancer* 80: 219-230.
276. Longmate,J., J.York, C.La Rosa, R.Krishnan, M.Zhang, D.Senitzer, and D.J.Diamond. 2001. Population coverage by HLA class-I restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Immunogenetics* 52: 165-173.
277. van der,B.P., J.Bastin, T.Gajewski, P.G.Coulie, P.Boel, C.De Smet, C.Traversari, A.Townsend, and T.Boon. 1994. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur. J. Immunol.* 24: 3038-3043.
278. Filippini,A., A.Riccioli, F.Padula, P.Lauretti, A.D'Alessio, P.De Cesaris, L.Gandini, A.Lenzi, and E.Ziparo. 2001. Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Hum. Reprod. Update.* 7: 444-449.
279. Streilein,J.W. 1995. Unraveling immune privilege. *Science* 270: 1158-1159.
280. Tung,K.S. and C.Teuscher. 1995. Mechanisms of autoimmune disease in the testis and ovary. *Hum. Reprod. Update.* 1: 35-50.
281. Bechmann,I., S.Lossau, B.Steiner, G.Mor, U.Gimsa, and R.Nitsch. 2000. Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. *Glia* 32: 25-41.
282. Hedger,M.P. and A.Meinhardt. 2003. Cytokines and the immune-testicular axis. *J. Reprod. Immunol.* 58: 1-26.
283. Jassim,A., W.Ollier, A.Payne, A.Biro, R.T.Oliver, and H.Festenstein. 1989. Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur. J. Immunol.* 19: 1215-1220.
284. Grobholz,R., C.S.Verbeke, C.Schleger, K.U.Kohrmann, B.Hein, G.Wolf, U.Bleyl, G.C.Spagnoli, K.Coplan, D.Kolb, K.Iversen, and A.A.Jungbluth. 2000. Expression of

- MAGE antigens and analysis of the inflammatory T-cell infiltrate in human seminoma. *Urol. Res.* 28: 398-403.
285. Cheville, J.C. and P.C. Roche. 1999. MAGE-1 and MAGE-3 tumor rejection antigens in human germ cell tumors. *Mod. Pathol.* 12: 974-978.
 286. Pollack, M.S., D. Vugrin, W. Hennessy, H.W. Herr, B. Dupont, and W.F. Whitmore, Jr. 1982. HLA antigens in patients with germ cell cancers of the testis. *Cancer Res.* 42: 2470-2473.
 287. Schuppe, H.C. and A. Meinhardt. 2005. Immune privilege and inflammation of the testis. *Chem. Immunol. Allergy* 88: 1-14.
 288. Saint, F., X. Leroy, J.P. Graziana, D. Moukassa, B. Gosselin, J. Biserte, D. Chopin, and J.M. Rigot. 2002. Dendritic cell infiltration in a patient with seminomatous germ cell tumor of the testis: is there a relationship with infertility and tumor stage? *J. Urol.* 167: 1643-1647.
 289. Hadrup, S.R., O. Braendstrup, G.K. Jacobsen, S. Mortensen, L.O. Pedersen, T. Seremet, M.H. Andersen, J.C. Becker, and P.T. Straten. 2006. Tumor infiltrating lymphocytes in seminoma lesions comprise clonally expanded cytotoxic T cells. *Int. J. Cancer* 119: 831-838.
 290. Fang, D., T.K. Nguyen, K. Leishear, R. Finko, A.N. Kulp, S. Hotz, P.A. Van Belle, X. Xu, D.E. Elder, and M. Herlyn. 2005. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 65: 9328-9337.
 291. Strohmeyer, T., S. Peter, M. Hartmann, S. Munemitsu, R. Ackermann, A. Ullrich, and D.J. Slamon. 1991. Expression of the hst-1 and c-kit protooncogenes in human testicular germ cell tumors. *Cancer Res.* 51: 1811-1816.
 292. Strohmeyer, T., D. Reese, M. Press, R. Ackermann, M. Hartmann, and D. Slamon. 1995. Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *J. Urol.* 153: 511-515.
 293. Oram, S.W., X.X. Liu, T.L. Lee, W.Y. Chan, and Y.F. Lau. 2006. TSPY potentiates cell proliferation and tumorigenesis by promoting cell cycle progression in HeLa and NIH3T3 cells. *BMC. Cancer.* 2006. Jun. 9. ;6. :154.
 294. Skotheim, R.I., G.E. Lind, O. Monni, J.M. Nesland, V.M. Abeler, S.D. Fossa, N. Duale, G. Brunborg, O. Kallioniemi, P.W. Andrews, and R.A. Lothe. 2005. Differentiation of human embryonal carcinomas in vitro and in vivo reveals expression profiles relevant to normal development. *Cancer Res.* 65: 5588-5598.
 295. Looijenga, L.H., R. Hersmus, A.J. Gillis, R. Pfundt, H.J. Stoop, R.J. van Gurp, J. Veltman, H.B. Beverloo, E. van Drunen, A.G. van Kessel, R.R. Pera, D.T. Schneider, B. Summersgill, J. Shipley, A. McIntyre, S.P. van der, E. Schoenmakers, and J.W. Oosterhuis. 2006. Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: primary spermatocyte as tumorigenic precursor and DMRT1 as candidate chromosome 9 gene. *Cancer Res.* 66: 290-302.
 296. Clark, W.H., Jr., D.E. Elder, D. Guerry, M.N. Epstein, M.H. Greene, and M. Van Horn. 1984. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol.* 15: 1147-1165.
 297. Herlyn, M., J. Thurin, G. Balaban, J.L. Bannicelli, D. Herlyn, D.E. Elder, E. Bondi, D. Guerry, P. Nowell, W.H. Clark, and . 1985. Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. *Cancer Res.* 45: 5670-5676.

298. Herlyn,M., W.H.Clark, U.Rodeck, M.L.Mancianti, J.Jambrosic, and H.Koprowski. 1987. Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 56: 461-474.
299. Zabierowski,S.E. and M.Herlyn. 2008. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J. Clin. Oncol.* 26: 2890-2894.
300. Klein,C.A., T.J.Blankenstein, O.Schmidt-Kittler, M.Petronio, B.Polzer, N.H.Stoecklein, and G.Riethmuller. 2002. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 360: 683-689.
301. Cronwright,G., K.Le Blanc, C.Gotherstrom, P.Darcy, M.Ehnman, and B.Brodin. 2005. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *Cancer Res.* 65: 2207-2215.
302. Houben,R., J.Wischhusen, F.Menaa, P.Synwoldt, D.Schrama, E.B.Brocker, and J.C.Becker. 2008. Melanoma stem cells: targets for successful therapy? *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*
303. Singh,S.K., I.D.Clarke, M.Terasaki, V.E.Bonn, C.Hawkins, J.Squire, and P.B.Dirks. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63: 5821-5828.
304. Bapat,S.A., A.M.Mali, C.B.Koppikar, and N.K.Kurrey. 2005. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 65: 3025-3029.
305. Costa,F.F., K.Le Blanc, and B.Brodin. 2007. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells* 25: 707-711.
306. He,B., N.Reguart, L.You, J.Mazieres, Z.Xu, A.Y.Lee, I.Mikami, F.McCormick, and D.M.Jablons. 2005. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene* 24: 3054-3058.
307. He,X.C., J.Zhang, W.G.Tong, O.Tawfik, J.Ross, D.H.Scoville, Q.Tian, X.Zeng, X.He, L.M.Wiedemann, Y.Mishina, and L.Li. 2004. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat. Genet.* 36: 1117-1121.
308. Dravid,G., Z.Ye, H.Hammond, G.Chen, A.Pyle, P.Donovan, X.Yu, and L.Cheng. 2005. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23: 1489-1501.
309. Bellovin,D.I., R.C.Bates, A.Muzikansky, D.L.Rimm, and A.M.Mercurio. 2005. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res.* 65: 10938-10945.
310. Brabletz,T., A.Jung, S.Spaderna, F.Hlubek, and T.Kirchner. 2005. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 5: 744-749.
311. Collins,A.T., P.A.Berry, C.Hyde, M.J.Stower, and N.J.Maitland. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65: 10946-10951.
312. Dick,J.E. 2005. Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044: 1-5.

313. Shackleton,M., F.Vaillant, K.J.Simpson, J.Stingl, G.K.Smyth, M.L.Asselin-Labat, L.Wu, G.J.Lindeman, and J.E.Visvader. 2006. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439: 84-88.
314. Ponti,D., A.Costa, N.Zaffaroni, G.Pratesi, G.Petrangolini, D.Coradini, S.Pilotti, M.A.Pierotti, and M.G.Daidone. 2005. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 65: 5506-5511.
315. Kim,C.F., E.L.Jackson, A.E.Woolfenden, S.Lawrence, I.Babar, S.Vogel, D.Crowley, R.T.Bronson, and T.Jacks. 2005. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121: 823-835.
316. Houghton,J., C.Stoicov, S.Nomura, A.B.Rogers, J.Carlson, H.Li, X.Cai, J.G.Fox, J.R.Goldenring, and T.C.Wang. 2004. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306: 1568-1571.
317. Mihic-Probst,D., A.Kuster, S.Kilgus, B.Bode-Lesniewska, B.Ingold-Heppner, C.Leung, M.Storz, B.Seifert, S.Marino, P.Schraml, R.Dummer, and H.Moch. 2007. Consistent expression of the stem cell renewal factor BMI-1 in primary and metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 121: 1764-1770.
318. Klein,W.M., B.P.Wu, S.Zhao, H.Wu, A.J.Klein-Szanto, and S.R.Tahan. 2007. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* 20: 102-107.
319. Grichnik,J.M., J.A.Burch, R.D.Schulteis, S.Shan, J.Liu, T.L.Darrow, C.E.Vervaert, and H.F.Seigler. 2006. Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *J. Invest Dermatol.* 126: 142-153.
320. Topczewska,J.M., L.M.Postovit, N.V.Margaryan, A.Sam, A.R.Hess, W.W.Wheaton, B.J.Nickoloff, J.Topczewski, and M.J.Hendrix. 2006. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat. Med.* 12: 925-932.
321. Wang,E., S.Voiculescu, I.C.Le Poole, M.El Gamil, X.Li, M.Sabatino, P.F.Robbins, B.J.Nickoloff, and F.M.Marincola. 2006. Clonal persistence and evolution during a decade of recurrent melanoma. *J. Invest Dermatol.* 126: 1372-1377.
322. Schatton,T. and M.H.Frank. 2008. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21: 39-55.
323. Rapp,U.R., F.Ceteci, and R.Schreck. 2008. Oncogene-induced plasticity and cancer stem cells. *Cell Cycle* 7: 45-51.
324. Krivtsov,A.V., D.Twomey, Z.Feng, M.C.Stubbs, Y.Wang, J.Faber, J.E.Levine, J.Wang, W.C.Hahn, D.G.Gilliland, T.R.Golub, and S.A.Armstrong. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442: 818-822.
325. Wang,J.C. and J.E.Dick. 2005. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol.* 15: 494-501.
326. Rizvi,A.Z., J.R.Swain, P.S.Davies, A.S.Bailey, A.D.Decker, H.Willenbring, M.Grompe, W.H.Fleming, and M.H.Wong. 2006. Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103: 6321-6325.
327. Bonnet,D. and J.E.Dick. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3: 730-737.

328. Hope, K.J., L.Jin, and J.E.Dick. 2004. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat. Immunol.* 5: 738-743.
329. Hendrix, M.J., E.A.Seftor, A.R.Hess, and R.E.Seftor. 2003. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat. Rev. Cancer* 3: 411-421.
330. Bittner, M., P.Meltzer, Y.Chen, Y.Jiang, E.Seftor, M.Hendrix, M.Radmacher, R.Simon, Z.Yakhini, A.Ben Dor, N.Sampas, E.Dougherty, E.Wang, F.Marincola, C.Gooden, J.Lueders, A.Glatfelter, P.Pollock, J.Carpten, E.Gillanders, D.Leja, K.Dietrich, C.Beaudry, M.Berens, D.Alberts, and V.Sondak. 2000. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406: 536-540.
331. Rothhammer, T., F.Bataille, T.Spruss, G.Eissner, and A.K.Bosserhoff. 2007. Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma. *Oncogene* 26: 4158-4170.
332. Balint, K., M.Xiao, C.C.Pinnix, A.Soma, I.Veress, I.Juhasz, E.J.Brown, A.J.Capobianco, M.Herlyn, and Z.J.Liu. 2005. Activation of Notch1 signaling is required for beta-catenin-mediated human primary melanoma progression. *J. Clin. Invest* 115: 3166-3176.
333. Weeraratna, A.T., Y.Jiang, G.Hostetter, K.Rosenblatt, P.Duray, M.Bittner, and J.M.Trent. 2002. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1: 279-288.
334. van Kempen, L.C., J.J.van den Oord, G.N.van Muijen, U.H.Weidle, H.P.Bloemers, and G.W.Swart. 2000. Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am. J. Pathol.* 156: 769-774.
335. Zhu, H., M.Mazor, Y.Kawano, M.M.Walker, H.Y.Leung, K.Armstrong, J.Waxman, and R.M.Kypta. 2004. Analysis of Wnt gene expression in prostate cancer: mutual inhibition by WNT11 and the androgen receptor. *Cancer Res.* 64: 7918-7926.
336. Shiina, H., J.E.Breault, W.W.Basset, H.Enokida, S.Urakami, L.C.Li, S.T.Okino, M.Deguchi, M.Kaneuchi, M.Terashima, T.Yoneda, K.Shigeno, P.R.Carroll, M.Igawa, and R.Dahiya. 2005. Functional Loss of the gamma-catenin gene through epigenetic and genetic pathways in human prostate cancer. *Cancer Res.* 65: 2130-2138.
337. Wu, R., Y.Zhai, E.R.Fearon, and K.R.Cho. 2001. Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res.* 61: 8247-8255.
338. Goodell, M.A., K.Brose, G.Paradis, A.S.Conner, and R.C.Mulligan. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* 183: 1797-1806.
339. Tumbar, T., G.Guasch, V.Greco, C.Blanpain, W.E.Lowry, M.Rendl, and E.Fuchs. 2004. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303: 359-363.
340. Frank, N.Y., S.S.Pendse, P.H.Lapchak, A.Margaryan, D.Shlain, C.Doeing, M.H.Sayegh, and M.H.Frank. 2003. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* 278: 47156-47165.
341. Dean, M. 2005. The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol.* 400: 409-429.

342. Scharenberg,C.W., M.A.Harkey, and B.Torok-Storb. 2002. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99: 507-512.
343. Tanaka,K. 1994. Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *J. Leukoc. Biol.* 56: 571-575.
344. Dovhey,S.E., N.S.Ghosh, and K.L.Wright. 2000. Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res.* 60: 5789-5796.
345. Realini,C., W.Dubiel, G.Pratt, K.Ferrell, and M.Rechsteiner. 1994. Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.* 269: 20727-20732.
346. Eleuteri,A.M., R.A.Kohanski, C.Cardozo, and M.Orlowski. 1997. Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *J. Biol. Chem.* 272: 11824-11831.
347. Ustrell,V., G.Pratt, and M.Rechsteiner. 1995. Effects of interferon gamma and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92: 584-588.
348. Gaczynska,M., K.L.Rock, and A.L.Goldberg. 1993. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365: 264-267.
349. Driscoll,J., M.G.Brown, D.Finley, and J.J.Monaco. 1993. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* 365: 262-264.
350. Turzynski,A. and R.Mentlein. 1990. Prolyl aminopeptidase from rat brain and kidney. Action on peptides and identification as leucyl aminopeptidase. *Eur. J. Biochem.* 190: 509-515.
351. Beninga,J., K.L.Rock, and A.L.Goldberg. 1998. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 273: 18734-18742.
352. Cardozo,C. and R.A.Kohanski. 1998. Altered properties of the branched chain amino acid-preferring activity contribute to increased cleavages after branched chain residues by the "immunoproteasome". *J. Biol. Chem.* 273: 16764-16770.
353. Boes,B., H.Hengel, T.Ruppert, G.Multhaup, U.H.Koszinowski, and P.M.Kloetzel. 1994. Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J. Exp. Med.* 179: 901-909.
354. Groettrup,M., T.Ruppert, L.Kuehn, M.Seeger, S.Standera, U.Koszinowski, and P.M.Kloetzel. 1995. The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro. *J. Biol. Chem.* 270: 23808-23815.
355. Sijts,A.J., T.Ruppert, B.Rehermann, M.Schmidt, U.Koszinowski, and P.M.Kloetzel. 2000. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J. Exp. Med.* 191: 503-514.
356. Sijts,A.J., S.Standera, R.E.Toes, T.Ruppert, N.J.Beekman, P.A.van Veelen, F.A.Ossendorp, C.J.Melief, and P.M.Kloetzel. 2000. MHC class I antigen processing of an

- adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J. Immunol.* 164: 4500-4506.
357. Schwarz,K., B.M.van den, S.Kostka, R.Kraft, A.Soza, G.Schmidtke, P.M.Kloetzel, and M.Groettrup. 2000. Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *J. Immunol.* 165: 768-778.
 358. Van Kaer,L., P.G.Ashton-Rickardt, M.Eichelberger, M.Gaczynska, K.Nagashima, K.L.Rock, A.L.Goldberg, P.C.Doherty, and S.Tonegawa. 1994. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity.* 1: 533-541.
 359. Sibille,C., K.G.Gould, K.Willard-Gallo, S.Thomson, A.J.Rivett, S.Powis, G.W.Butcher, and P.De Baetselier. 1995. LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Biol.* 5: 923-930.
 360. Fehling,H.J., W.Swat, C.Laplace, R.Kuhn, K.Rajewsky, U.Muller, and H.von Boehmer. 1994. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 265: 1234-1237.
 361. Gileadi,U., H.T.Moins-Teisserenc, I.Correa, B.L.Booth, Jr., P.R.Dunbar, A.K.Sewell, J.Trowsdale, R.E.Phillips, and V.Cerundolo. 1999. Generation of an immunodominant CTL epitope is affected by proteasome subunit composition and stability of the antigenic protein. *J. Immunol.* 163: 6045-6052.
 362. Sewell,A.K., D.A.Price, H.Teisserenc, B.L.Booth, Jr., U.Gileadi, F.M.Flavin, J.Trowsdale, R.E.Phillips, and V.Cerundolo. 1999. IFN-gamma exposes a cryptic cytotoxic T lymphocyte epitope in HIV-1 reverse transcriptase. *J. Immunol.* 162: 7075-7079.
 363. Morel,S., F.Levy, O.Burlet-Schiltz, F.Brasseur, M.Probst-Kepper, A.L.Peitrequin, B.Monsarrat, R.Van Velthoven, J.C.Cerottini, T.Boon, J.E.Gairin, and B.J.Van den Eynde. 2000. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity.* 12: 107-117.
 364. van Hall,T., A.Sijts, M.Camps, R.Offringa, C.Melief, P.M.Kloetzel, and F.Ossendorp. 2000. Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J. Exp. Med.* 192: 483-494.
 365. Dick,T.P., T.Ruppert, M.Groettrup, P.M.Kloetzel, L.Kuehn, U.H.Koszinowski, S.Stevanovic, H.Schild, and H.G.Rammensee. 1996. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86: 253-262.
 366. Schwarz,K., M.Eggers, A.Soza, U.H.Koszinowski, P.M.Kloetzel, and M.Groettrup. 2000. The proteasome regulator PA28alpha/beta can enhance antigen presentation without affecting 20S proteasome subunit composition. *Eur. J. Immunol.* 30: 3672-3679.
 367. Stohwasser,R., U.Salzmann, J.Giesebrecht, P.M.Kloetzel, and H.G.Holzthutter. 2000. Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur. J. Biochem.* 267: 6221-6230.
 368. Sigalotti,L., E.Fratta, S.Coral, S.Tanzarella, R.Danielli, F.Colizzi, E.Fonsatti, C.Traversari, M.Altomonte, and M.Maio. 2004. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 2004. Dec. 15. ;64. (24.):9167. -71.
 369. Sigalotti,L., S.Coral, M.Altomonte, L.Natali, G.Gaudino, P.Cacciotti, R.Libener, F.Colizzi, G.Vianale, F.Martini, M.Tognon, A.Jungbluth, J.Cebon, E.Maraskovsky, L.Mutti, and

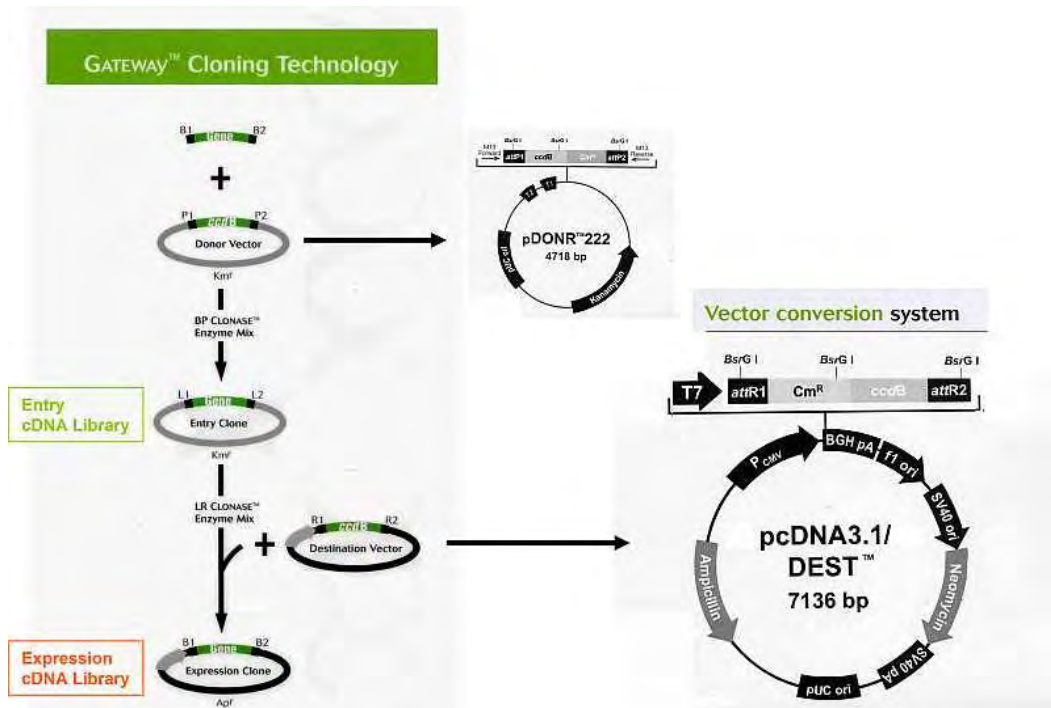
- M.Maio. 2002. Cancer testis antigens expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implications. *Br. J. Cancer* 86: 979-982.
370. Laird,P.W. 2003. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat. Rev. Cancer* 3: 253-266.
371. Laird,P.W. and R.Jaenisch. 1996. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu. Rev. Genet.* 30: 441-464.
372. Li,E., C.Beard, and R.Jaenisch. 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366: 362-365.
373. Tate,P.H. and A.P.Bird. 1993. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 226-231.
374. Reik,W., W.Dean, and J.Walter. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089-1093.
375. Baylin,S.B. and J.G.Herman. 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 16: 168-174.
376. Jones,P.A. 2002. DNA methylation and cancer. *Oncogene* 21: 5358-5360.
377. Robertson,K.D. and P.A.Jones. 2000. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 21: 461-467.
378. Yuan,B.Z., A.M.Jefferson, N.C.Popescu, and S.H.Reynolds. 2004. Aberrant gene expression in human non small cell lung carcinoma cells exposed to demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Neoplasia.* 6: 412-419.
379. Herman,J.G. 1999. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 9: 359-367.
380. Piyathilake,C.J., O.Henao, A.R.Frost, M.Macaluso, W.C.Bell, G.L.Johanning, D.C.Heimbürger, A.Niveleau, and W.E.Grizzle. 2003. Race- and age-dependent alterations in global methylation of DNA in squamous cell carcinoma of the lung (United States). *Cancer Causes Control* 14: 37-42.
381. Holliday,R. 1979. A new theory of carcinogenesis. *Br. J. Cancer* 40: 513-522.
382. Jenuwein,T. and C.D.Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.
383. Esteller,M. 2000. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur. J. Cancer* 36: 2294-2300.
384. Costello,J.F., M.C.Fruhwald, D.J.Smiraglia, L.J.Rush, G.P.Robertson, X.Gao, F.A.Wright, J.D.Feramisco, P.Peltomaki, J.C.Lang, D.E.Schuller, L.Yu, C.D.Bloomfield, M.A.Caligiuri, A.Yates, R.Nishikawa, H.H.Su, N.J.Petrelli, X.Zhang, M.S.O'Dorisio, W.A.Held, W.K.Cavenee, and C.Plass. 2000. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat. Genet.* 24: 132-138.
385. Esteller,M. 2002. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21: 5427-5440.
386. Feinberg,A.P. and B.Vogelstein. 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301: 89-92.

387. Feinberg, A.P. 2004. The epigenetics of cancer etiology. *Semin. Cancer Biol.* 14: 427-432.
388. Rodriguez, J., J. Frigola, E. Vendrell, R.A. Risques, M.F. Fraga, C. Morales, V. Moreno, M. Esteller, G. Capella, M. Ribas, and M.A. Peinado. 2006. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res.* 66: 8462-9468.
389. Esteller, M. and J.G. Herman. 2002. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.* 196: 1-7.
390. Kimmins, S. and P. Sassone-Corsi. 2005. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434: 583-589.
391. De Smet, C., C. Lurquin, B. Lethe, V. Martelange, and T. Boon. 1999. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol. Cell Biol.* 19: 7327-7335.
392. Weber, J., M. Salgaller, D. Samid, B. Johnson, M. Herlyn, N. Lassam, J. Treisman, and S.A. Rosenberg. 1994. Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 54: 1766-1771.
393. Gure, A.O., I.J. Wei, L.J. Old, and Y.T. Chen. 2002. The SSX gene family: characterization of 9 complete genes. *Int. J. Cancer* 101: 448-453.
394. Lurquin, C., C. De Smet, F. Brasseur, F. Muscatelli, V. Martelange, E. De Plaen, R. Brasseur, A.P. Monaco, and T. Boon. 1997. Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins. *Genomics* 46: 397-408.
395. Sigalotti, L., S. Coral, G. Nardi, A. Spessotto, E. Cortini, I. Cattarossi, F. Colizzi, M. Altomonte, and M. Maio. 2002. Promoter methylation controls the expression of MAGE2, 3 and 4 genes in human cutaneous melanoma. *J. Immunother.* 25: 16-26.
396. Lethe, B., S. Lucas, L. Michaux, C. De Smet, D. Godelaine, A. Serrano, E. De Plaen, and T. Boon. 1998. LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int. J. Cancer* 76: 903-908.
397. dos Santos, N.R., D.R. de Bruijn, E. Kater-Baats, A.P. Otte, and A.G. van Kessel. 2000. Delineation of the protein domains responsible for SYT, SSX, and SYT-SSX nuclear localization. *Exp. Cell Res.* 256: 192-202.
398. De Smet, C., S.J. Courtois, I. Faraoni, C. Lurquin, J.P. Szikora, O. De Backer, and T. Boon. 1995. Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene. *Immunogenetics* 42: 282-290.
399. Janssen, B.L., L.T. van de Locht, A. Fourkour, C. De Smet, E.J. Mensink, G.N. van Muijen, and T.J. de Vries. 1999. Transcription of the MAGE-1 gene and the methylation status of its Ets binding promoter elements: a quantitative analysis in melanoma cell lines using a real-time polymerase chain reaction technique. *Melanoma Res.* 9: 213-222.
400. Goelz, S.E., B. Vogelstein, S.R. Hamilton, and A.P. Feinberg. 1985. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 228: 187-190.
401. Kaneda, A., T. Tsukamoto, T. Takamura-Enya, N. Watanabe, M. Kaminishi, T. Sugimura, M. Tatematsu, and T. Ushijima. 2004. Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer Sci.* 95: 58-64.

402. Hug,M., J.Silke, O.Georgiev, S.Rusconi, W.Schaffner, and K.Matsuo. 1996. Transcriptional repression by methylation: cooperativity between a CpG cluster in the promoter and remote CpG-rich regions. *FEBS Lett.* 379: 251-254.
403. Nan,X., F.J.Campoy, and A.Bird. 1997. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88: 471-481.
404. Boyes,J. and A.Bird. 1992. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* 11: 327-333.
405. Hsieh,C.L. 1994. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol. Cell Biol.* 14: 5487-5494.
406. dos Santos,N.R., R.Torensma, T.J.de Vries, M.W.Schreurs, D.R.de Bruijn, E.Kater-Baats, D.J.Ruiter, G.J.Adema, G.N.van Muijen, and A.G.van Kessel. 2000. Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. *Cancer Res.* 60: 1654-1662.
407. Schultz-Thater,E., C.Noppen, F.Gudat, U.Durmuller, P.Zajac, T.Kocher, M.Heberer, and G.C.Spagnoli. 2000. NY-ESO-1 tumour associated antigen is a cytoplasmic protein detectable by specific monoclonal antibodies in cell lines and clinical specimens. *Br. J. Cancer* 83: 204-208.
408. Arai,M., F.Imazeki, Y.Sakai, R.Mikata, M.Tada, N.Seki, H.Shimada, T.Ochiai, and O.Yokosuka. 2008. Analysis of the methylation status of genes up-regulated by the demethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine, in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 20: 405-412.
409. Lethe,B., B.P.van der, F.Brasseur, and T.Boon. 1997. MAGE-1 expression threshold for the lysis of melanoma cell lines by a specific cytotoxic T lymphocyte. *Melanoma Res.* 1997. Aug. ;7. Suppl 2:S83. -8.
410. Podsypanina,K., Y.C.Du, M.Jechlinger, L.J.Beverly, D.Hambardzumyan, and H.Varmus. 2008. Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science* 321: 1841-1844.
411. Husemann,Y., J.B.Geigl, F.Schubert, P.Musiani, M.Meyer, E.Burghart, G.Forni, R.Eils, T.Fehm, G.Riethmuller, and C.A.Klein. 2008. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13: 58-68.
412. van de Wouw,A.J., M.L.Janssen-Heijnen, J.W.Coebergh, and H.F.Hillen. 2002. Epidemiology of unknown primary tumours; incidence and population-based survival of 1285 patients in Southeast Netherlands, 1984-1992. *Eur. J. Cancer* 38: 409-413.
413. Klein,C.A. 2008. Cancer. The metastasis cascade. *Science.* 2008. Sep. 26. ;321. (5897.):1785. -7.
414. Suter,M.A. and K.M.Aagaard-Tillery. 2009. Environmental influences on epigenetic profiles. *Semin. Reprod. Med.* 27: 380-390.

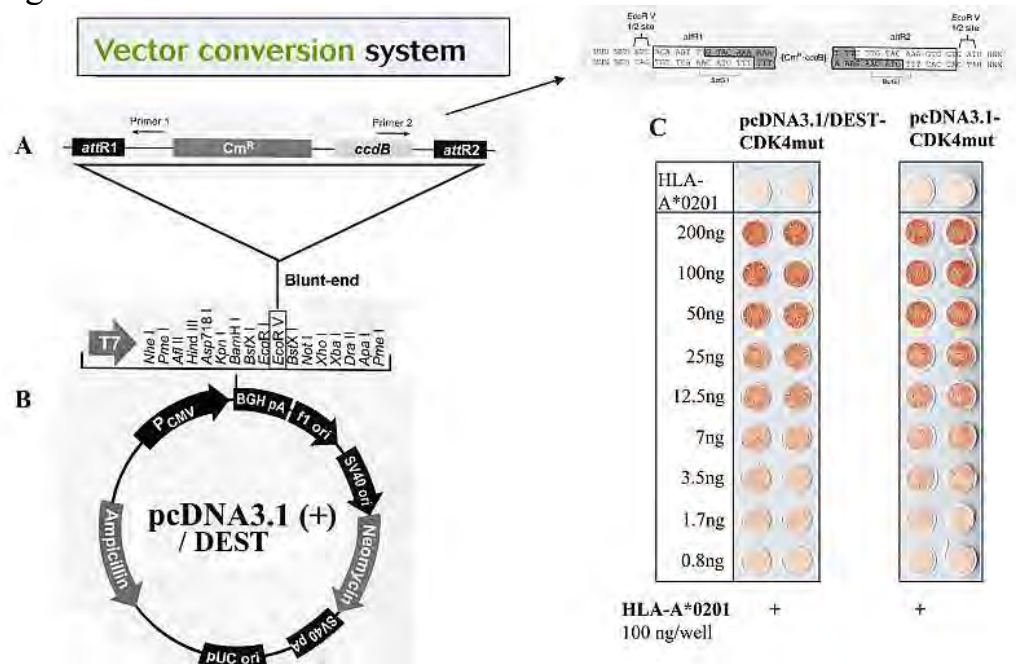
G Anhang

Anhang A



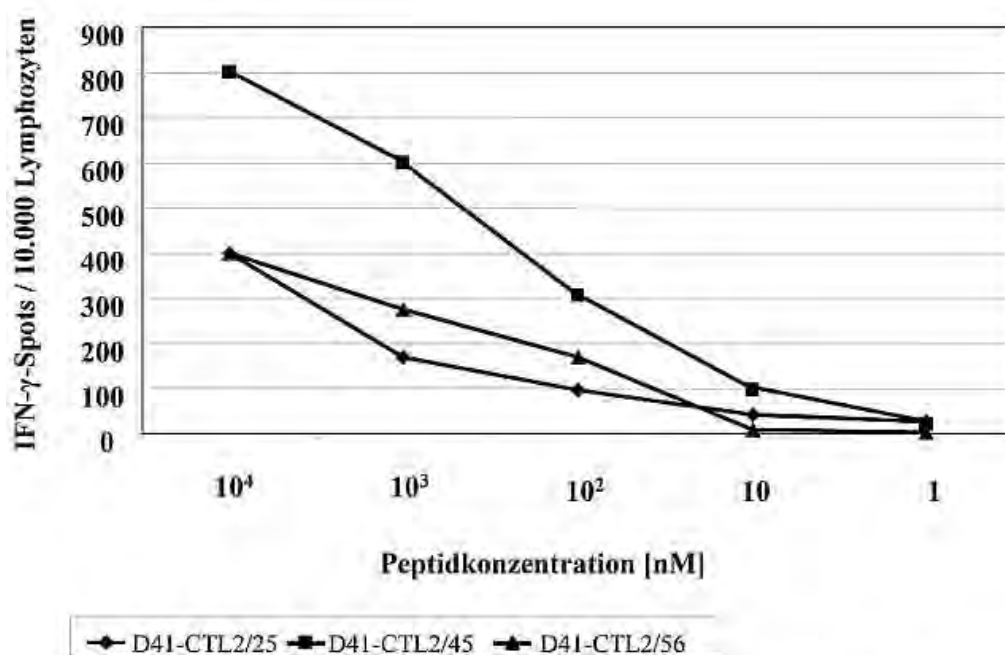
Schema für die Konstruktion der D41- cDNA-Bank LRIV von BP assayII. Die zuerst in cDNA umgeschriebene Poly-A+-RNA wird über homologe Rekombination in einen Übergangsvektor kloniert. Nach Selektion in Bakterien werden die Inserts ebenfalls über homologe Rekombination in den Endvektor kloniert.

Anhang B



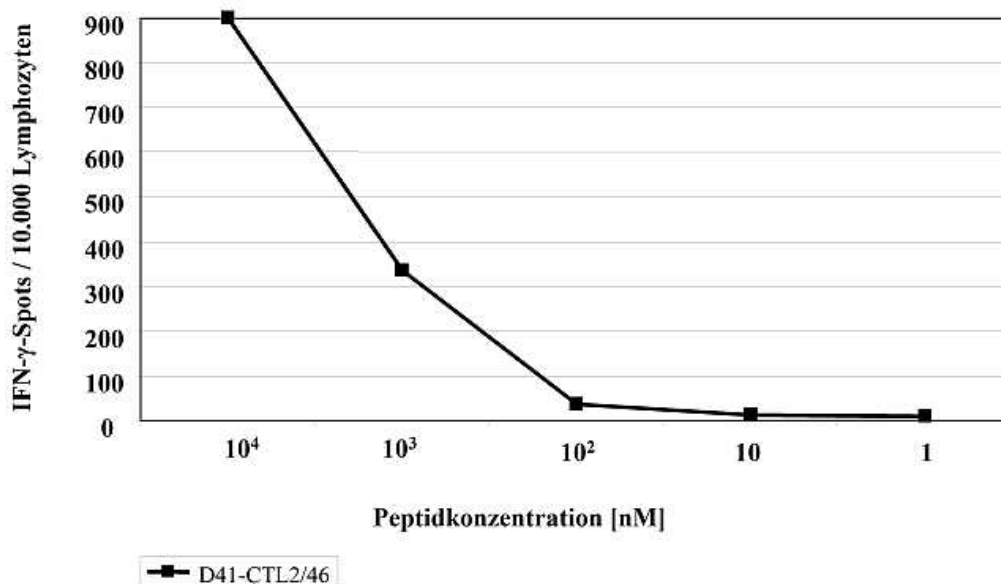
Darstellung des Expressionsvektors für die cDNA-Bank. Dieser ist in Vorarbeiten von Dr. C.Wölfel konstruiert worden, indem eine Rekombinationskassette (A) in den pcDNA3.1 Vektor (B) kloniert wurde. Die Funktionalität des Endvektors ist im IFN- γ -ELISPOT-Assay überprüft worden (C). Dazu wurde das Gen für CDK4mut in den Expressionsvektor kloniert. Dieses Konstrukt ist mit HLA-A*0201 in COS-7-Zellen (20.000 Zellen/TE) kotransfiziert worden. Als Effektorzelle diente der CTL-Klon SK29-CTL14 / 35 (10.000 Lymphozyten/TE)

Anhang C



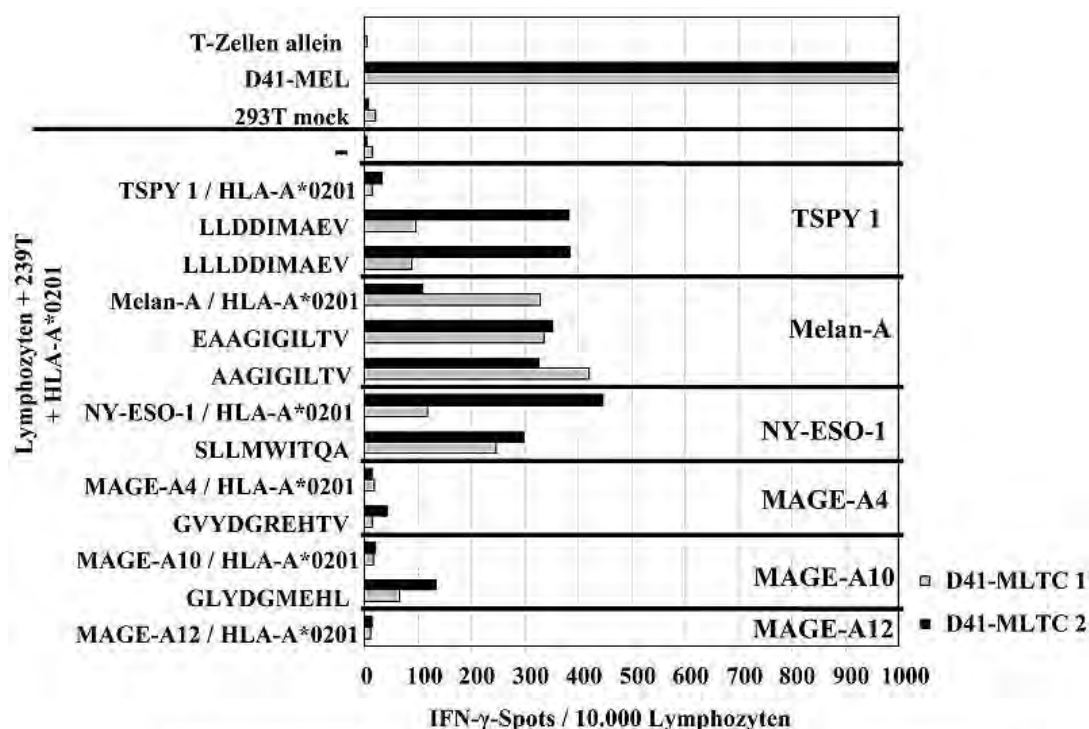
Ergebnis der Peptidtitration EAAGIGILTV (10mer) mit verschiedenen aus D41-MLTC 2 klonierten D41-CTL-Klonen im IFN- γ -ELISPOT-Assay. Die an d4 eingefrorenen CTL-Klone wurden zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 bei 37°C inkubiert (10.000 Lymphozyten / TE). Autologe peptidbeladene EBV-B-Zellen wurden mit 75.000 Zellen pro Testeinheit als APCs eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.12 beschrieben. Auswertung des IFN- γ -ELISPOT-Assays mittels „computer associated video image analysis (Mittelwerte von Doppelbestimmungen)

Anhang D



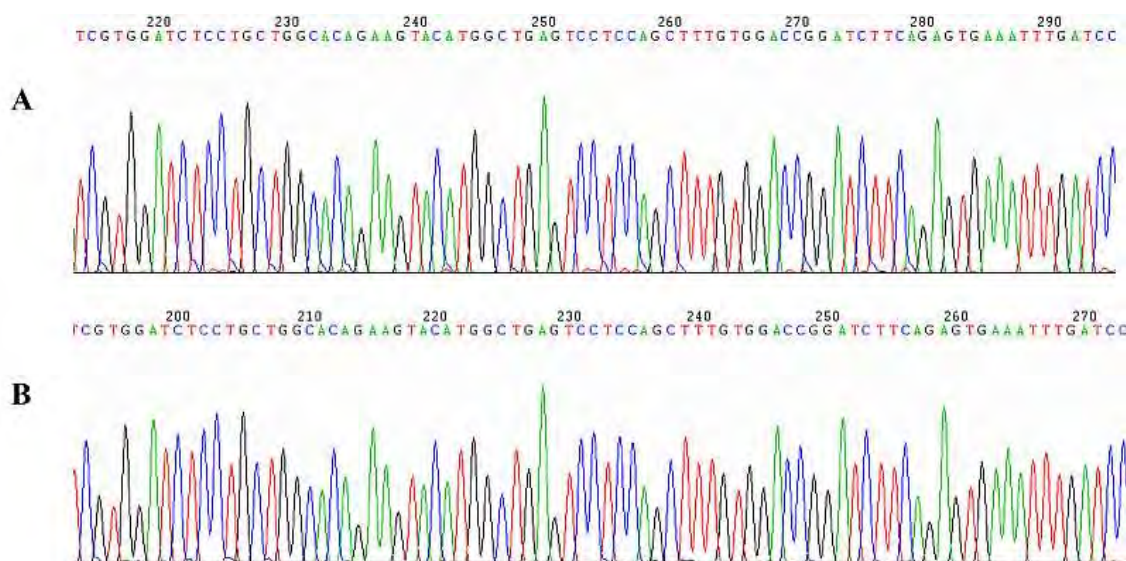
Ergebnis der Peptidtitration von SLLMWITQC (9mer) mit D41-CTL2/46 im IFN- γ -ELISPOT-Assay. Der an d4 eingefrorenen CTL-Klon wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 bei 37°C inkubiert (10.000 Lymphozyten / TE). Autologe peptidbeladene EBV-B-Zellen wurden mit 75.000 Zellen pro Testeinheit als APCs eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.12 beschrieben. Auswertung des IFN- γ -ELISPOT-Assays mittels „computer associated video image analysis (Mittelwerte von Doppelbestimmungen)

Anhang E



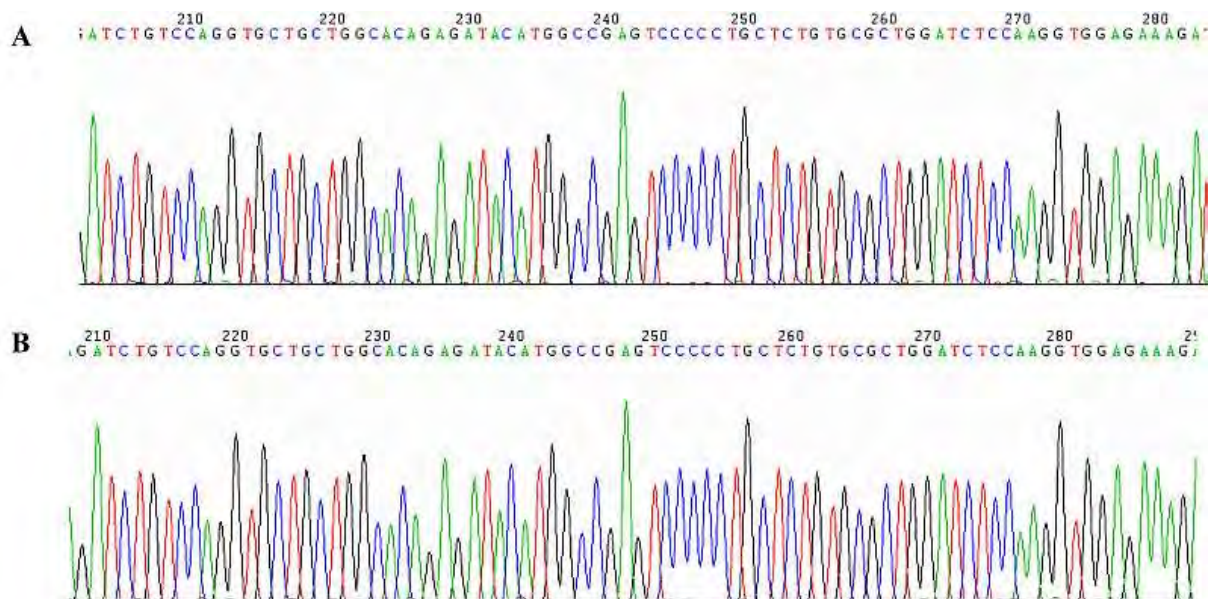
Reaktivität der D41-MLTC 1 und 2 gegen im Modell D41 bekannte Tumorantigene und Peptide. Die an d20+4 kryokonservierten MLTCs wurden zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 inkubiert (eingesetzt mit 10.000 Lymphozyten/TE). Als APCs wurden 293T-Zellen (20.000 Zellen/TE), kotransfiziert mit den Tumorantigenen und HLA-A*0201, bzw. 293T-Zellen, die mit den HLA-A*0201 transfiziert und den Peptiden (10 µM) beladen wurden, eingesetzt. Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.9, 2.1.10 und 2.1.13 beschrieben. Auswertung des IFN-γ-ELISPOT-Assays mittels „computer associated video image analysis“ (Mittelwerte von Doppelbestimmungen).

Anhang F



Sequenzierung der Vβ-Kette der T-Zell-Klone D41-CTL2/62 und 2/152. Sequenziert wurde ein PCR-Produkt, welches aus der cDNA der CTL-Klone mit Primern für Vβ22-Primer und dem CB_as-Primer amplifiziert wurde. Die Vβ-Kette ist Vβ 22. A: D41-CTL2/62 B: D41-CTL2/152

Anhang G

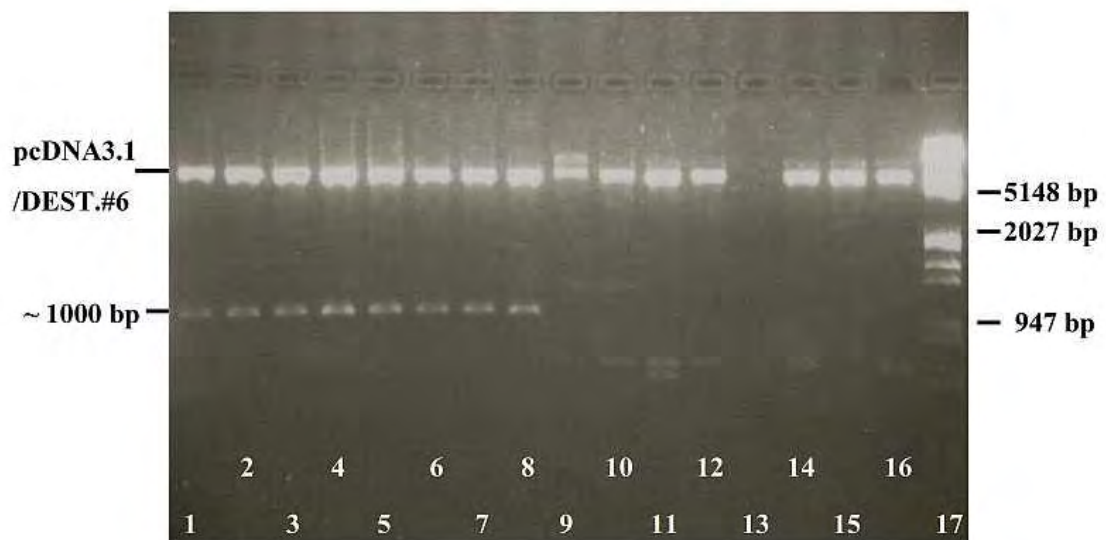


Sequenzierung der V β -Kette der T-Zell-Klone D41-CTL2/121 und 2/155. Sequenziert wurde ein PCR-Produkt, welches aus der cDNA der CTL-Klone mit Primern für V β 24-Primer und dem CB_{as}-Primer amplifiziert wurde. Die V β -Kette ist V β 6

A: D41-CTL2/121

B: D41-CTL2/155

Anhang H



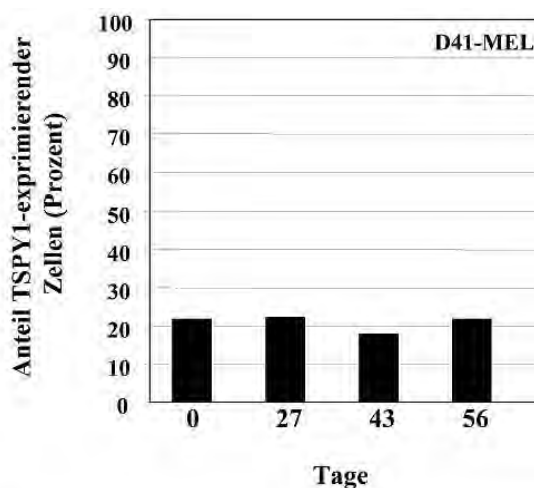
Restriktionshydrolyse von den Plasmiden der im IFN γ -ELISPOT Assay erkannten 8 cDNA-Bank Klone (1-8) und 8 nicht erkannter cDNA-Bank-Klone (9-16) mit *Xba*I und *Hind*III. Eingesetzt wurden ungefähr 2 μ g Plasmid-DNA. Als Standard wurde der DNA Molecular Weight Marker III der Firma Roche eingesetzt (17)

Anhang I

Sequenz von D41-cDNA-Klon #218.138.69

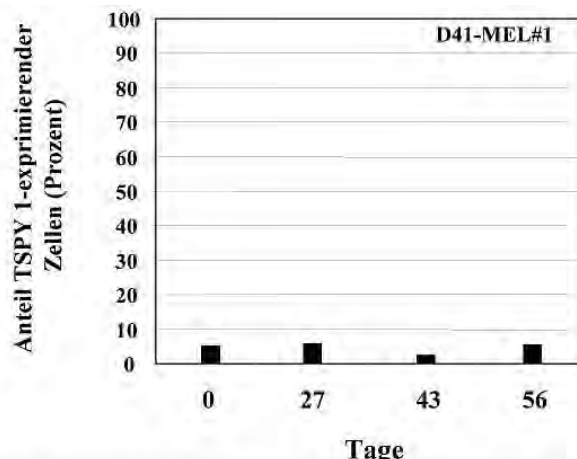
TGTACAAAAAAGTTGGCTGTGGCGTGGGTCTGGGCAGCACAGGCCTTGGTGTGTGCGAGTGCCA
 AGGAGGGCACC GCCTTCAGGATGGAGGCTGTACAGGAGGGGGCGGCCGGGGTGGAGAGTGAG
 CAGGCGGCTTTGGGGGAGGAGGCGGTGCTGCTGTTGGATGACATAATGGCGGAGGTGGAGGTG
 GTGGCGGAGGAGGAGGGCCTCGTGGAGCGGCGGGAGGAGGCCAGCGGGCACAGCAGGCTGT
 GCCTGGCCCTGGGCCCATGACCCAGAGTCTGCACTGGAGGAGCTGCTGGCCGTTTCAGGTGGAG
 CTGGAGCCCGTTAATGCCCAAGCCAGGAAGGCCTTTTCTCGGCAGCGGGAAAAGATGGAGCGG
 AGGCGCAAGCCCCACCTAGACCCGAGAGGCGCCGTCATCCAGAGCGTCCCTGGCTTCTGGGCC
 AATGTTATTGCAAACCAACCCCAAGATGTCAGCCCTGATCACTGACGAAGATGAAGACATGCTGA
 GCTACATGGTCAGCCTGGAGGTGGAAGAAGAGAAGCATCCTGTTTCATCTCTGCAAGATCATGTT
 GTTCTTTTCGGAGTAACCCCTACTTCCAGAATAAAGTGATTACCAAGGAATATCTGGTGAACATC
 ACAGAATACAGGGCTTCTCATTCCACTCCAATTGAGTGGTATCCGGATTATGAAGTGGAGGCCT
 ATCGCCGCAGACACCACAACAGCAGCCTTAACCTTCTCAACTGGTTCTCTGACCACAACCTTCgCA
 GGATCTAACAAGATTGCTGAGATCCTATGTAAGGACCTGTGGCGCAaTCCCcTGCAaTACTACAA
 GAGGATGAAGCCACCTGAAgAGGgAAcAGAgACATCAGGGGACTCCCAGTTGTtGAgTgAATATG
 ATGgAgCATCAgATTTtACCTAATACAGCAgAACTCcTAAAAAGTtaCAGCCaTaTGCAGgACGGCag
 TACTCAgCATGGTCTTTaTGCaCAGgAACTAAAGGAAAAAgAgATCGagTCCAAAAaTTCAGgAAGA
 GGGGGTAAATGTGGATTGTATGGAATGAAAAATAAACATTCTCAAGGAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAA

Anhang J



Durchflusszytometrische Analyse der TSPY 1 exprimierenden Zellen in D41-MEL über einen Zeitraum von 53 Tagen. Es wurden pro Ansatz 2×10^5 Zellen eingesetzt. Die Melanomzellen wurden an den Tagen der FACS-Analyse ebenfalls mit 3×10^6 Zellen /cm² passagiert.

Anhang K



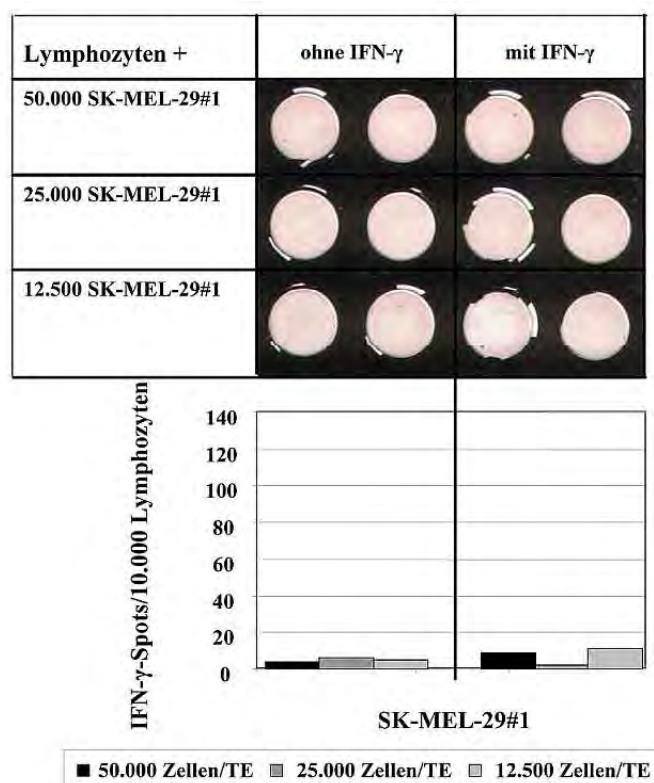
Durchflusszytometrische Analyse der TSPY 1-exprimierenden Zellen in D41-MEL#1 über einen Zeitraum von 56 Tagen. Es wurden pro Ansatz 2×10^5 Zellen eingesetzt. Die Melanomzellen wurden an den Tagen der FACS-Analyse ebenfalls mit 5×10^3 Zellen pro cm² passagiert.

Anhang L

Lymphozyten +	ohne IFN- γ	mit IFN- γ
293T mock		
293T + HLA-A*0201		
293T + HLA-A*0201 + D41-TSPYfull		
293T + HLA-A*0201 + 218.138.69		
293T + HLA-A*0201 + 218.138.69AEV#2		

Reaktivität von D41-CTL2/62 im IFN- γ -ELISPOT-Assay gegen transfizierte, unbehandelte als auch mit IFN- γ -vorbehandelte 293T Zellen. Es wurden vier Tage vor dem Test kultivierte und drei Tage mit 100 U/ml IFN- γ -vorbehandelte 293T-Zellen (20.000/TE) mit HLA-A*0201 und D41-TSPYfull sowie dem cDNA-Bank-Klon #218.138.69 und dem Fragment AEV#2, kloniert von #218.138.69 in pcDNA3.1, transfiziert. Der an d4 kryokonservierte CTL-Klon wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 inkubiert (10.000 Lymphozyten/TE). Die Durchführung des IFN- γ -ELISPOT-Assays erfolgte, wie in Material und Methdoen unter Punkt 2.1.9 und 2.1.10 beschrieben.

Anhang M



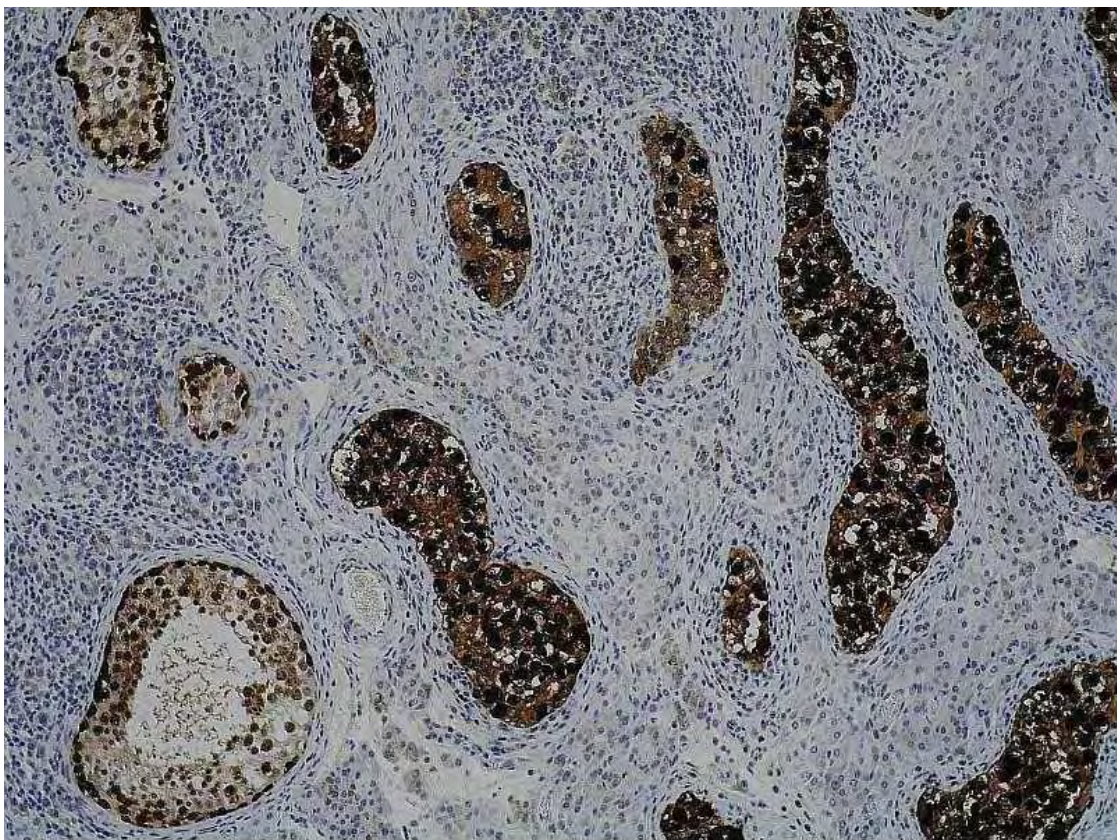
Einfluss von IFN- γ auf die Erkennung von SK-MEL-29#1 durch D41-CTL2/62 im IFN- γ -ELISPOT-Assay. Der an d4 kryokonservierte CTL-Klon wurde zwei Tage vor dem Test aufgetaut und in Medium mit IL-2 inkubiert (eingesetzt mit 10.000 Lymphozyten/TE). Die Melanomzellen wurden in mit 50.000, 25.000 und 12.500 Zellen/TE eingesetzt. Die Durchführung erfolgte, wie in Material und Methoden unter Punkt 2.1.10 angegeben. Die Spontanfreisetzung des CTL-Klons betrug 19 IFN- γ -Spots. Die Auswertung des IFN- γ -ELISPOT-Assays erfolgte mittels CVIA (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen).

Anhang N

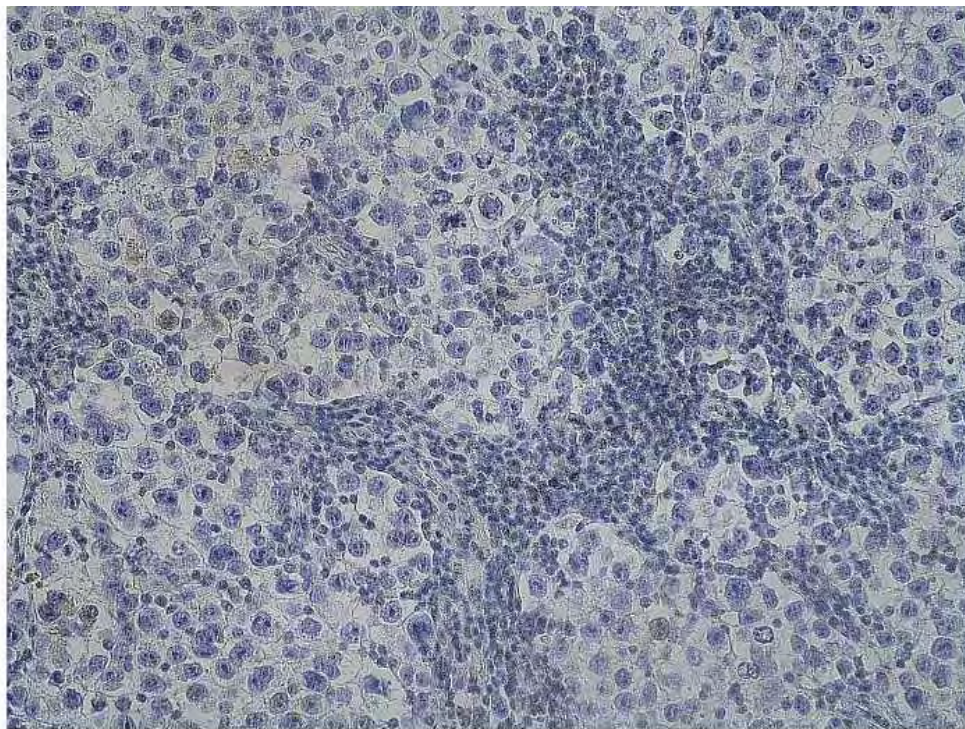


Amplifikation von Aktin Als Qualitätskontrolle der cDNA bei DAC-behandelten Zelllinien. Amplifiziert wurde Aktin mit den Primern actb-852_s und actb-1166_as. Marker III der Firma Roche, Proben 1- 42. Amplikongröße: **205 bp**

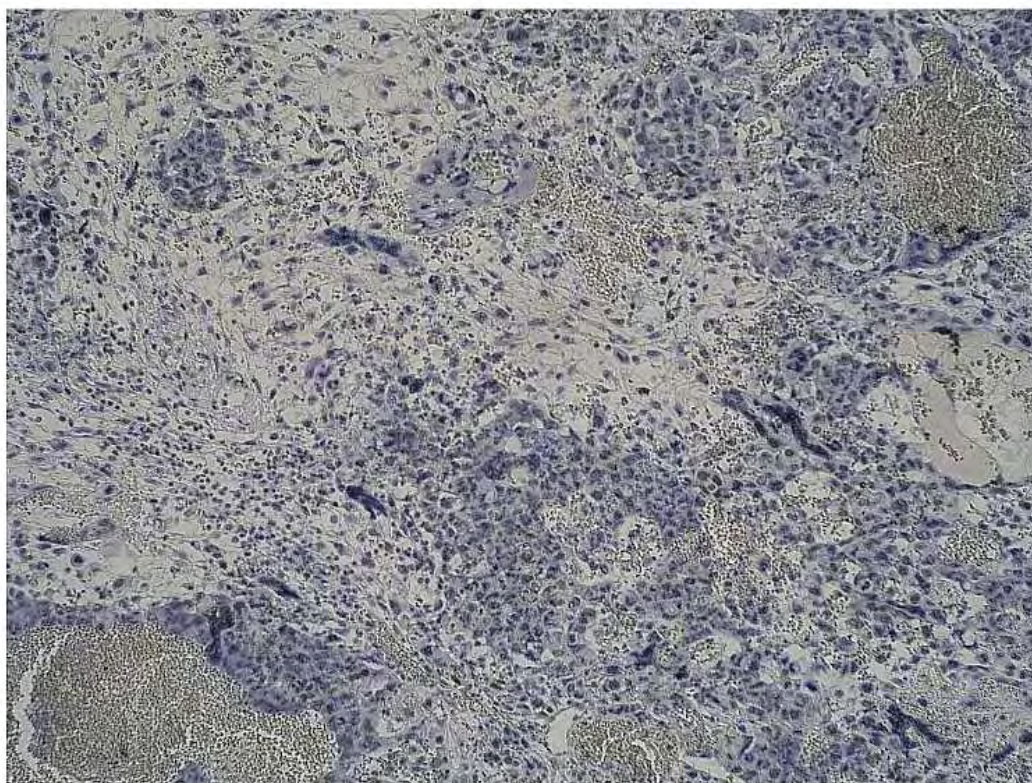
Anhang O



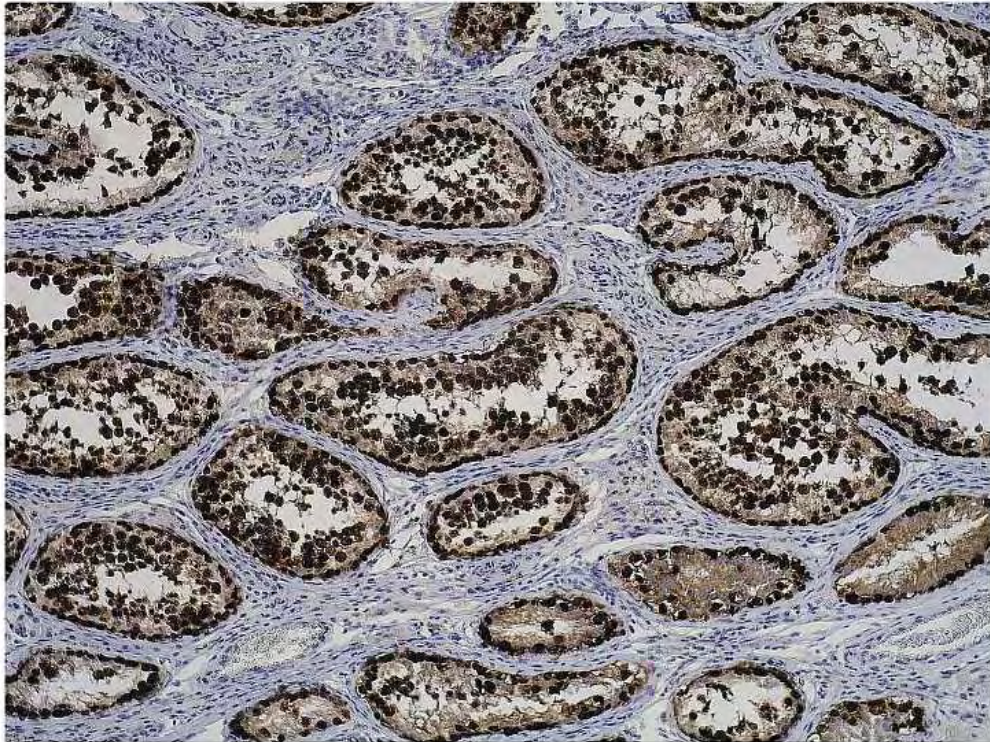
Immunhistochemische Färbung eines Tumorschnittes von Seminom-Patient HT-BT-1 mit einem monoklonalen Maus-anti-TSPY-Antikörper (1:2000). Die intratubulären Keimzellneoplasie-Anteile sind positiv für TSPY 1 und in rot-braun dargestellt.



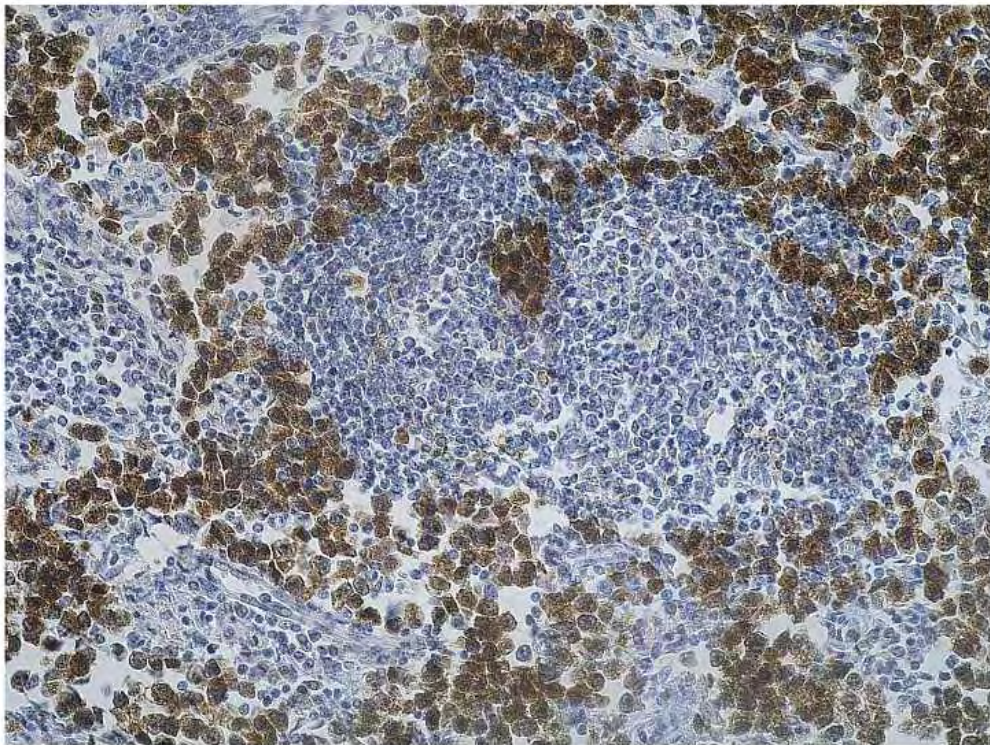
Immunhistochemische Färbung eines Tumorschnittes von Seminom-Patient HT-BT-1 mit einem monoklonalen Maus-anti-TSPY-Antikörper (1:2000). Die Seminom-Anteile sind negativ für TSPY 1.



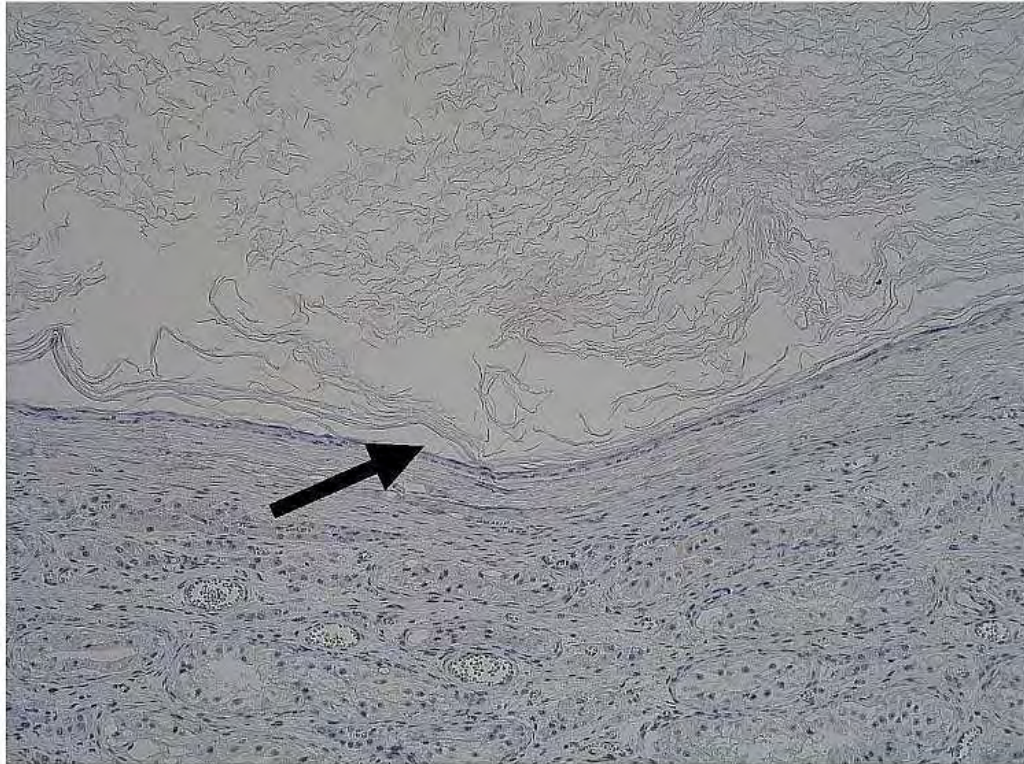
Immunhistochemische Färbung eines Tumorschnittes von Teratokarzinom-Patient HT-IH-1 mit einem monoklonalen Maus-anti-TSPY-Antikörper (1:2000). Der Teratokarzinomanteil ist negativ für TSPY 1.



Immunohistochemische Färbung eines Tumorschnittes von Teratokarzinom-Patient HT-IH-1 mit einem monoklonalen Maus-anti-TSPY-Antikörper (1:2000). Die intratubulären Keimzellneoplasie-Anteile sind positiv für TSPY 1 und in rot-braun dargestellt.



Immunohistochemische Färbung eines Tumorschnittes von Seminom-Patient HT-CK-1 mit einem monoklonalen Maus-anti-TSPY-Antikörper (1:2000). Die Seminom-Anteile sind positiv für TSPY 1 und in rot-braun dargestellt.



Immunhistochemische Färbung eines Tumorschnittes von HT-IH-1 mit einem monoklonalen Maus-anti-TSPY-Antikörper (1:2000). Der Teratokarzinomanteil ist negativ für TSPY 1. Der Pfeil zeigt auf die verhornende Plattenepithelschicht.

H Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
(m)Ak	(monoklonaler) Antikörper
⁵¹ Cr	radioaktives Isotop 51 des Elements Chrom
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AICD	<i>activation-induced-cell-death</i>
Ak	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bspw	beispielsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CIC	<i>cancer initiating cells</i>
CIS	Cancer in situ
CLIP	<i>class II-associated invariant chain peptide</i>
CML	chronisch myeloische Leukämie
CP	Crossing Point
CSC	<i>cancer stem cells</i>
CTA	Cancer/Testis-Antigene
CTL	<i>cytotoxic T-Lymphocyte</i>
CVIA	<i>computer associatede video image analysis</i>
D (kDa)	Dalton (kilodalton)
DC	<i>dendritic cell</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISPOT-Assay	<i>enzyme-linked immunosorbent spot assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FA	funktionelle Avidität
FACS	<i>fluorescence activated cell sort</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ii	invariante Kette
IL	Interleukin
ITAM	<i>immune receptor tyrosine-based activation motif</i>
kb	Kilobasen
KIR	<i>killer inhibitory receptor</i>
M	Molarität
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
mg	Milligram
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
MLTC	<i>mixed lymphocyte/tumor cell cultures</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NK	natürliche Killerzelle
ORF	<i>open reading frame</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure
STA	<i>shared tumor antigens</i>
SV 40	<i>simian virus 40</i>
SZT	Stammzelltherapie
TAA	tumorassoziiertes Antigen
TAP	<i>transporter associated with antigen presentation</i>
TE	Testeinheit
TCR	T-Zell-Rezeptor

TIL	tumor-infiltrierenden Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TTSN	TSPY/TSPY-like/SET/NAP

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Sandra Kuhs

Lebenslauf

Berufliche Tätigkeiten

04 / 2004 – 04 / 2009 Dissertation als wissenschaftliche Mitarbeiterin
an der Universität Mainz
Universitätsklinik, III.Med. Klinik
Hämatologie / Onkologie AG Wölfel, SFB 432

Thema: Identifizierung und Charakterisierung von
tumorassozierten, durch T-Zellen erkannten
Antigenen im Melanommodell D41

Studium

10 / 1997 – 03 / 2004 Studium der Biologie an der Universität Bielefeld
Schwerpunkte:
Genetik, Zell- und Entwicklungsbiologie,
Mikrobiologie, Chemie

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Gentechnologie
und Mikrobiologie

Thema: Charakterisierung der welkeinduzierenden
Eigenschaften von pCM1 aus *Clavibacter*
michiganensis subsp. *michiganensis*

Abschluss: Diplom-Biologin

Berufsausbildung

10 / 1994 – 09 / 1997 Ausbildung zur Kinderkrankenschwester
Städt. Kliniken Barmen, Wuppertal

Schulausbildung

10 / 1985 – 07 / 1994 Gymnasium Vohwinkel in Wuppertal
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Note: 2,6

Nebentätigkeiten

1990, 1992 Betreuerin bei der Stadtranderholung durch
Caritas e.V., Wuppertal

1991 – 1993 Jugendbetreuerin bei der ev. Kirchengemeinde

1993 – 1997	Sonnborn in Wuppertal Kindergottesdiensthelferin bei ev. Kirchengemeinde Sonnborn, Wuppertal
1997 – 2003	Teilzeitkraft als examinierte Pflegekraft bei Sozialstation Hauspflegeverein e.V., Bielefeld
2003 – 2004	Anstellung als studentische Hilfskraft im Rahmen der Diplomarbeit