
Erkennung
der α -Kette des GM-CSF-Rezeptors (CSF2RA)
durch einen HLA-unabhängigen α : β -T-Zellrezeptor

Dissertation

zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften" (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Katharina Kukla

geboren am 05. Mai 1985 in Nürnberg

Mainz, Januar 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 14. April 2015

Zusammenfassung

Aus dem tumorreaktiven T-Zellrepertoire der Melanompatientin Ma-Mel-86/INTH, bei der im Verlauf Lymphknotenmetastasen HLA-Klasse I-negativer Tumorzellen auftraten, wurden durch Stimulation mit autologen Tumorzellen CD8⁺ T-Zellklone isoliert und expandiert, die auf Melanomzellen der Patientin CSF2RA (engl. *GM-CSF receptor alpha chain*) in HLA-unabhängiger Weise erkannten. Aus einem der T-Zellklone wurde ein CSF2RA-reaktiver $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor (TCR, engl. *T-cell receptor*) kloniert (Bezeichnung: TCR-1A.3/46). Die α -Kette des TCR enthielt die Domänen TRAV14/DV4*01, TRAJ48*01 und TRAC*01, die β -Kette die Domänen TRBV10-3*01, TRBD2*01, TRBJ2-7*01 und TRBC2*01. Durch Austausch der humanen konstanten gegen die homologen murinen Domänen wurde der TCR optimiert (Bezeichnung: cTCR-1A.3/46) und hinsichtlich seiner Expression und Funktionalität nach retroviralem Transfer in humane PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) im ⁵¹Chromfreisetzungstest, im IFN- γ -ELISpot-Assay und in einem Degranulations-Assay validiert. TCR-transgene T-Zellen lysierten nicht nur spezifisch die HLA-defizienten, CSF2RA⁺ Melanomlinien des Modells Ma-Mel-86, sondern erkannten auch Zelllinien verschiedener Spezies nach Transfektion von CSF2RA sowie Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen und ein breites Spektrum hämatologischer Malignome myeloiden Ursprungs ungeachtet deren HLA-Phänotypen. Lymphatische Zellen sowie CD34⁺ Blutstammzellen wurden in *In vitro*-Untersuchungen nicht erkannt.

Der Zusatz von GM-CSF zu Zellen, die CSF2RA und CSF2RB exprimierten, inhibierte die Erkennung durch TCR-transgene PBMC, während die Koexpression der α - und der β -Kette des GM-CSF-Rezeptors alleine keinen negativen Effekt auf die Erkennung hatte. Daraus war zu schließen, dass CSF2RA präferentiell freistehend und weniger nach Integration in den heteromultimerischen GM-CSF-Rezeptor-Komplex erkannt wurde.

In der zweidimensionalen *Collier-de-Perles*-Visualisierung der IMGT-Datenbank (engl. *International immunogenetics information system*) wies der CSF2RA-reaktive TCR-1A.3/46 im Vergleich zu TCR von konventionellen, HLA-restringierten T-Zellen keine Besonderheiten auf. Darüber hinaus waren auch die von den HLA-unabhängigen T-Zellen exprimierten CD8-Moleküle identisch zu den CD8-Molekülen HLA-abhängiger CTL (engl. *cytotoxic T lymphocytes*). Die Präsenz von CD8-Molekülen förderte die HLA-unabhängige Erkennung von CSF2RA, schien aber dafür nicht zwingend erforderlich zu sein, da Antikörper gegen CD8 die Erkennung zu ca. 65 % blockierten und TCR-transgene CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu TCR-transduzierten CD8⁺ T-Zellen eine deutlich verringerte, aber noch erhaltene Funktionalität aufwiesen. Es ist derzeit nicht klar, ob HLA-unabhängige T-Zellen gegen CSF2RA im peripheren Blut der Patientin vorkamen, weil sie der im Tiermodell postulierten Thymusselektion MHC-unabhängiger TCR (Tikhonova *et al.*, *Immunity* 36:79, 2012) entkommen waren, oder weil ein ursprünglich gegen einen HLA-Peptid-Komplex gerichteter TCR eine HLA-unabhängige Kreuzreaktivität aufwies.

CSF2RA verbessert die Glucoseutilisation in malignen Zellen, und es wurden ihm embryotrophe Eigenschaften zugeschrieben (Spielholz *et al.*, *Blood* 85:973, 1995; Sjöblom *et al.*, *Biol. Reprod.* 67:1817, 2002). Damit kann CSF2RA malignes Wachstum fördern und ist somit ein potentielles Zielmolekül für die Immuntherapie. Seine HLA-unabhängige Erkennung würde sowohl die HLA-Vielfalt als auch den HLA-Verlust als typische Limitationen der T-Zellimmuntherapie umgehen. Zur Überprüfung der *In vivo*-Spezifität des HLA-unabhängigen TCR gegen CSF2RA und damit zum Ausschluss relevanter *off-tumor/on-target*- bzw. *off-tumor/off-target*-Effekte ist jedoch eine Testung in einem präklinischen Tiermodell erforderlich.

Summary

Melanoma patient Ma-Mel-86/INTH developed lymph-node metastases of HLA class I-negative tumor cells. From her peripheral blood CD8⁺ T-cell clones recognizing CSF2RA (*GM-CSF receptor alpha chain*) in an HLA class I-independent manner were isolated and expanded by stimulation with autologous tumor cells. From one of these T-cell clones a CSF2RA-reactive $\alpha\beta$ -T-cell receptor (designated TCR-1A.3/46) was cloned. Its α -chain comprised the domains TRAV14/DV4*01, TRAJ48*01 and TRAC*01, and its β -chain contained the domains TRBV10-3*01, TRBD2*01, TRBJ2-7*01 and TRBC2*01. By replacing the human constant domains with their homologous murine counterparts the TCR was optimized (designated cTCR-1A.3/46) and validated regarding its expression and functionality using ⁵¹chromium release, IFN- γ -ELISpot and degranulation assays. TCR-transgenic T cells not only specifically lysed HLA-deficient, CSF2RA⁺ Ma-Mel-86 melanoma lines but also recognized various cell lines of different species upon transfection with *CSF2RA*. In addition, monocytes, granulocytes, dendritic cells and a broad range of hematological malignancies of myeloid origin were targeted, irrespective of their HLA phenotypes. Lymphatic cells as well as CD34⁺ blood stem cells were not recognized in *in vitro* assays.

The addition of GM-CSF to cells expressing both CSF2RA and CSF2RB inhibited the recognition by TCR-transgenic PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*), while coexpression of the GM-CSF receptor α - and β -chain alone did not negatively affect antigen recognition. This led to the conclusion that CSF2RA⁺ cells were preferentially recognized when free CSF2RA was accessible on the cell surface and to a lesser extent when the protein was integrated into the heteromultimeric GM-CSF receptor complex.

According to the two-dimensional *Collier-de-Perles* visualization of the IMGT database (*International immunogenetics information system*), the CSF2RA-reactive TCR-1A.3/46 did not show characteristic features compared to TCR derived from conventional HLA-restricted T cells. Additionally, CD8 molecules expressed by HLA-independent T cells were identical to CD8 molecules expressed by HLA-dependent CTL (engl. *cytotoxic T lymphocytes*). The presence of CD8 molecules promoted HLA-independent recognition of CSF2RA but appeared not to be essential, since antibodies directed against CD8 blocked recognition only by about 65 % and TCR-transgenic CD4⁺ T cells exhibited a decreased but still retained functionality. It remains to be elucidated if the presence of HLA-independent, anti-CSF2RA T cells in the patient's peripheral blood was due to their escape from thymus selection, as postulated in animal models (Tikhonova *et al.*, *Immunity* 36:79, 2012), or if it resulted from an HLA-independent cross reactivity of a primarily HLA-restricted TCR.

CSF2RA has been shown to improve glucose utilization by malignant cells and to mediate embryotrophic effects (Spielholz *et al.*, *Blood* 85:973, 1995; Sjöblom *et al.*, *Biol. Reprod.* 67:1817, 2002). Thus, CSF2RA can support malignant growth and, therefore, represents a potential target molecule for immunotherapy. Its HLA-independent recognition might circumvent HLA diversity and HLA loss as typical limitations of T cell-based immunotherapy. However, preclinical testing in animal models is required to validate the *in vivo* specificity of the HLA-independent, anti-CSF2RA TCR and to exclude relevant *off-tumor/on-target* and *off-tumor/off-target* effects.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	iv
Summary	v
Inhaltsverzeichnis	vi
Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xiii
Abkürzungsverzeichnis	xiv
 1 EINLEITUNG.....	 1
1.1 T-Lymphozyten.....	1
1.1.1 T-Zell-Entwicklung	2
1.1.2 Der T-Zellrezeptor.....	4
1.1.3 Antigenprozessierung und -präsentation durch MHC-Moleküle.....	6
1.2 Tumorummunologie und Immuntherapie	8
1.2.1 <i>Immunosurveillance & Immunoediting</i>	9
1.2.2 <i>Immune Escape</i> -Mechanismen von Tumoren.....	10
1.2.3 Malignom-assoziierte Antigene und deren Identifizierung.....	11
1.2.4 Zelluläre Immuntherapie bei Malignomen	13
1.2.4.1 Stärkung des körpereigenen Immunsystems.....	13
1.2.4.2 Allogene Blutstammzelltransplantation (allo-HSCT)	14
1.2.4.3 Adoptiver Transfer antigenspezifischer T-Zellen	14
1.2.4.4 Adoptiver Transfer genetisch modifizierter, antigenspezifischer T-Zellen	16
1.3 Das Melanommodell Ma-Mel-86.....	17
1.3.1 HLA-unabhängige T-Zellreaktivität im Melanommodell Ma-Mel-86	18
1.3.2 Das TAA CSF2RA und der GM-CSF-Rezeptor	19
1.4 Zielsetzungen der Arbeit	22
 2 MATERIAL & METHODEN.....	 23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	23
2.1.1.1 Geräte	23
2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien, Plastik-/Glaswaren	24
2.1.1.3 Chemikalien, Zusätze, Reagenzien, Medien	26
2.1.2 Molekular- und immunbiologische Kits	28
2.1.3 Enzyme	28
2.1.4 Antibiotika	29
2.1.5 Molekulargewichtsmarker	29
2.1.6 Zytokine	30
2.1.7 Plasmide und Vektoren.....	30
2.1.8 Oligonukleotide	30
2.1.8.1 Primer zur Klonierung und Sequenzierung der CD8α- und CD8β-Konstrukte	31
2.1.8.2 Primer zur Klonierung und Sequenzierung der TCR-Konstrukte.....	31
2.1.8.3 Primer zur Klonierung und Sequenzierung der CSF2RA/CSF2RB-Konstrukte.....	32

2.1.8.4	Primer für den Nachweis von T-Zellrezeptor V β -Familien	33
2.1.8.5	Primer für den spezifischen Nachweis von β -Aktin.....	34
2.1.8.6	Primer zur Sequenzierung und zur Bestimmung der Orientierung von Inserts, kloniert in pcDNA3.1V5-His-TOPO	34
2.1.8.7	Primer zur Sequenzierung und zur Bestimmung der Orientierung von Inserts, kloniert in pBullet_IRES_neo	34
2.1.8.8	Primer zur Sequenzierung und zur Bestimmung der Orientierung von Inserts, kloniert in pDONR221	34
2.1.8.9	Primer zur Genotypisierung von QUAD-KO.Bcl-2Tg Mäusen	34
2.1.9	Antikörper.....	35
2.1.9.1	Antikörper für durchflusszytometrische Analysen	35
2.1.9.2	Antikörper für Blockadeexperimente im ELISpot Assay	36
2.1.9.3	Antikörper, die aus Hybridomen aufgereinigt wurden	37
2.1.9.4	Antikörper für IFN- γ -ELISpot-Assays	37
2.1.9.5	Antikörper für Western Blot-Experimente	37
2.1.9.6	<i>Micro Beads</i> zur magnetischen Zellseparation	38
2.1.10	Lösungen und Puffer	38
2.1.11	Bakteriennährmedien.....	42
2.1.12	Zellkulturnährmedien	43
2.1.13	Bakterienstämme.....	45
2.1.14	Eukaryotische Zelllinien	46
2.1.15	Mausstämme	49
2.1.16	Software.....	49
2.2	Methoden	50
2.2.1	Zellbiologische Methoden	50
2.2.1.1	Zellkultur	50
2.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl und Viabilität.....	50
2.2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	50
2.2.1.4	Isolierung von murinen Splenozyten.....	51
2.2.1.5	Isolierung humaner peripherer Blutlymphozyten aus <i>Buffy Coats</i> /Heparin- Vollblut und Erythrozytenlyse.....	51
2.2.1.6	Isolierung hämatopoetischer Zellen durch magnetische Zellseparation.....	51
2.2.1.7	Generierung von Fast-DC aus plastikadhärenten Monozyten.....	52
2.2.1.8	Generierung EBV-immortalisierter B-Zelllinien aus humanen PBMC.....	52
2.2.1.9	Generierung tumorspezifischer T-Lymphozyten in MLTC	52
2.2.1.10	Klonierung von T-Zellen durch Grenz-Verdünnungsverfahren	53
2.2.1.11	Unspezifische Expansion der CD8 ⁺ Lymphozyten.....	54
2.2.1.11.1	Unspezifische Expansion der humanen CD8 ⁺ Lymphozyten mit OKT3.....	54
2.2.1.11.1.1	Expansion von T-Zellklonen	54
2.2.1.11.1.2	Vorbehandlung von humanen PBMC für die retrovirale Transduktion.....	54
2.2.1.11.2	Unspezifische Expansion muriner Splenozyten als Vorbehandlung für die Transduktion.....	55

2.2.1.11.3	Unspezifische Expansion der CD8 ⁺ Splenozyten mit CD3/CD28-Dynabeads....	55
2.2.1.12	Transiente und stabile Transfektionen von Zellen	55
2.2.1.12.1	Transiente Transfektion von 293T-Zellen mittels Lipofectamine™2000.....	55
2.2.1.12.2	Transiente Transfektion von Expi293F™-Zellen mittels ExpiFectamine™	56
2.2.1.12.3	Transiente Transfektion von Pheonix-AMPHO-Zellen mittels FuGene®6.....	56
2.2.1.12.4	Stabile Transfektion durch Elektroporation	56
2.2.1.13	Retrovirale Transduktion humaner PBMC/muriner Splenozyten und der T-Zell- Leukämie-Zelllinie Jurkat-76 mit den TCR-Konstrukten	57
2.2.1.14	Interferon-γ-ELISpot-Assay.....	58
2.2.1.15	Antikörper-/GM-CSF-Blockade der T-Zellen.....	59
2.2.1.16	⁵¹ Chrom-Freisetzungstest.....	60
2.2.1.17	Degranulationstest	60
2.2.1.18	Durchflussszytometrie.....	61
2.2.1.19	Kultivierung von Antikörper-produzierenden Hybridomzelllinien und Antikörper- aufreinigung	61
2.2.1.20	Ausdifferenzierung von MUTZ-3-Zellen zu unreifen und reifen DC.....	62
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	63
2.2.2.1	Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien	63
2.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA	63
2.2.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	63
2.2.2.4	Restriktionsverdau von DNA	64
2.2.2.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	64
2.2.2.6	5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels alkalischer Phosphatase	64
2.2.2.7	Ligation.....	64
2.2.2.7.1	Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten	64
2.2.2.7.2	Klonierung von PCR-Amplifikaten mittels des TOPO® TA Expression Kits	65
2.2.2.8	Transformation von Bakterien	65
2.2.2.9	Isolierung von genomischer DNA	65
2.2.2.9.1	Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen.....	65
2.2.2.9.2	Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwänzen zur Genotypisierung	65
2.2.2.10	Isolierung von RNA	66
2.2.2.11	Reverse Transkription	66
2.2.2.12	Aufreinigung von Nukleinsäuren mit dem <i>High Pure® PCR Product</i> <i>Purification Kit</i>	66
2.2.2.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	66
2.2.2.14	Ortsgerichtete Mutagenese	67
2.2.2.15	Generierung bicistronischer Konstrukte mittels der Gateway®-Technologie	68
2.2.2.16	T-Zellrezeptor-Klonierung und -Chimärisierung.....	69
2.2.2.17	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-, RNA- und Proteinlösungen	69
2.2.2.18	Sequenzanalyse von Plasmid-DNA und PCR-Produkten.....	70
2.2.2.19	Datenbankanalysen	70

2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	71
2.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	71
2.2.3.2	Transfer auf Nitrocellulosemembran und Antikörperdetektion.....	71
3	ERGEBNISSE.....	73
3.1	Isolierung CSF2RA-reaktiver CTL	73
3.1.1	Isolierung CSF2RA-reaktiver CTL aus MLTC 5C.....	75
3.1.2	Isolierung CSF2RA-reaktiver CTL aus MLTC 1A.3.....	75
3.2	Klonierung und Chimärisierung des T-Zellrezeptors des CSF2RA-reaktiven T-Zellklons 1A.3/46.....	76
3.2.1	Klonierung des TCR-1A.3/46.....	76
3.2.2	Chimärisierung des TCR-1A.3/46 (bezeichnet als cTCR-1A.3/46)	78
3.2.3	Expression des TCR-1A.3/46 und des cTCR-1A.3/46 in Jurkat-76-Zellen und in PBMC.....	80
3.2.4	Funktionalitätstest des TCR-1A.3/46 und des cTCR-1A.3/46	81
3.2.4.1	Funktionalität des TCR-1A.3/46 auf CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen	81
3.2.4.2	Funktionalität und Spezifität des cTCR-1A.3/46	81
3.2.4.2.1	IFN- γ -ELISpot-Assay.....	81
3.2.4.2.2	⁵¹ Chrom-Freisetzungstest	83
3.2.4.2.3	Degranulationsassay.....	83
3.2.4.3	Funktionalitätsvergleich des TCR-1A.3/46 und des cTCR-1A.3/46.....	84
3.2.5	Erkennungsmuster hämatopoetischer Zellen durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen.....	86
3.2.5.1	Erkennung verschiedener nicht maligner hämatopoetischer Zellreihen durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen	86
3.2.5.2	Erkennung von Leukämie-Zelllinien durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen	88
3.2.5.3	Erkennung von primären AML-Zellisolaten durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen.....	90
3.2.5.4	Erkennung von primären CML-Isolaten durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen	92
3.3	Analyse des HLA-unabhängigen Erkennungsmechanismus von CSF2RA durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen	94
3.3.1	Erkennung von löslichem CSF2RA durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen.....	94
3.3.2	Erkennung des GM-CSF-Rezeptor-Komplexes durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen.....	96
3.3.2.1	Erkennung des GM-CSF-Rezeptors durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen.....	96
3.3.2.2	Erkennung des GM-CSFR/GM-CSF-Komplexes durch cTCR-1A.3/46- transduzierte T-Zellen	97
3.3.3	Rolle von CD8 für die HLA-unabhängige Erkennung von CSF2RA und TRP-2	99
3.3.3.1	Vergleich der CD8-Sequenzen HLA-abhängiger und HLA-unabhängiger T-Zell-Klone.....	99

3.3.3.2	Auswirkung einer OKT8-Blockade auf die HLA-unabhängige Erkennung von CSF2RA und TRP-2.....	100
3.3.3.3	Funktionalität des CSF2RA-reaktiven und des TRP-2-reaktiven TCR nach Transduktion muriner, CD8-positiver und CD8-negativer Splenozyten	101
4	DISKUSSION	106
4.1	Der TCR des CSF2RA-reaktiven CTL 1A.3/46	106
4.2	Spezifität und zytolytisches Potential des CSF2RA-reaktiven cTCR-1A.3/46	111
4.3	Analyse des Erkennungsmechanismus von CSF2RA durch cTCR-1A.3/46.....	113
4.3.1	Keine HLA-unabhängige Erkennung von löslichem CSF2RA.....	113
4.3.2	HLA-unabhängige Erkennung des GM-CSF-Rezeptor-Komplexes	114
4.3.3	Rolle von CD8 für die HLA-unabhängige Erkennung von CSF2RA.....	116
4.4	Mögliche therapeutische Anwendungen des cTCR-1A.3/46	120
4.5	Mögliche Sicherheitsrisiken einer therapeutischen Anwendung des cTCR-1A.3/46 und Zukunftsperspektiven	122
4.6	Schlussfolgerungen	128
5	ANHANG.....	130
5.1	cDNA- und Aminosäuresequenzen	130
5.1.1	cDNA- und Aminosäure-Sequenz* TCR-1A.3/46.....	130
5.1.2	cDNA- und Aminosäure-Sequenz cTCR-1A.3/46.....	131
5.1.3	cDNA- und Aminosäuresequenz p2A-Element	131
5.1.4	Aminosäure-Sequenz CSF2RA/CSF2RB.....	132
5.1.5	Aminosäure-Sequenz CD8α/CD8β.....	133
5.2	Vektorkarten	134
5.2.1	Vektorkarten pcDNA3.1	134
5.2.1.1	Vektorkarte pcDNA3.1/V5-His TOPO	134
5.2.1.2	Vektorkarte pcDNA3.1-DEST.....	134
5.2.2	Vektorkarten pDONR™221	135
5.2.2.1	Vektorkarte pDONR™221 P1-P2.....	135
5.2.2.2	Vektorkarte pDONR™221 P1-P5r.....	135
5.2.2.3	Vektorkarte pDONR™221 P5-P2.....	136
5.2.3	Vektorkarte pBullet_IRES_neo-DEST	136
5.2.4	Vektorkarte pHIT-60 und pCOLT-CALV	137
5.2.5	Vektorkarte pCL-ECO	137
5.2.6	Vektorkarte pMX	137
	Literaturverzeichnis	cxviii
	Eidesstattliche Erklärung	cliii
	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Schematische Darstellung der T-Zellentwicklung im Thymus.	3
Abb. 1-2:	Schematischer Aufbau der TCR α - und TCR β -Kette (A) und des TCR-CD3-Komplexes (B)	4
Abb. 1-3:	Schematische Darstellung der durch TCR-Aktivierung in der T-Zelle ausgelösten Signalkaskade.....	6
Abb. 1-4:	Schematische Darstellung der Antigenprozessierung und -präsentation.....	7
Abb. 1-5:	Schematische Darstellung über die drei Phasen des <i>Immunoeditings</i>	10
Abb. 1-6:	Überblick über das Methodenrepertoire spezifischer adoptiver T-Zelltherapie	15
Abb. 1-7:	Schematischer Aufbau eines TCR im Vergleich zu einem CAR	16
Abb. 1-8:	Krankheits- und Behandlungsverlauf der Melanompatientin Ma-Mel-86/INTH	17
Abb. 1-9:	Phänotypische Merkmale der Melanomlinien im Melanommodell Ma-Mel-86	18
Abb. 3-1:	Reaktivität und TCR-Analyse zweier exemplarischer CSF2RA-reaktiver CTL aus den Klonierungen der MLTC 5C und -1A.3	74
Abb. 3-2:	Klonierungsstrategie des TCR aus CTL 1A.3/46 (TCR-1A.3/46; anti-CSF2RA).....	76
Abb. 3-3:	Übersicht über die Ergebnisse der Klonierung des TCR aus CTL 1A.3/46 (TCR-1A.3/46; anti-CSF2RA)	77
Abb. 3-4:	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Chimärisierung des TCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA)	78
Abb. 3-5:	Durchflusszytometrische Analyse der TCR-Expression	80
Abb. 3-6:	Funktionalität des TCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) auf CD8 ⁺ (A) und CD4 ⁺ (B) T-Zellen nach retroviraler Transduktion humaner PBMC (Spender: BC 1229025) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay	81
Abb. 3-7:	Funktionalität des cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) nach retroviraler Transduktion humaner PBMC im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay	82
Abb. 3-8:	Zytotoxizitätstest von PBMC nach retroviraler Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) im Vergleich zum CSF2RA-reaktiven CTL 1A.3/46	83
Abb. 3-9:	Degranulations-Assay von PBMC nach retroviraler Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA)	84
Abb. 3-10:	Vergleich der Reaktivität von PBMC nach retroviraler Transduktion mit TCR-1A.3/46 oder cTCR-1A.3/46 mit der des CSF2RA-reaktiven CTL 1A.3/44 im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay.....	85
Abb. 3-11:	Erkennung verschiedener hämatopoetischer Zellreihen durch PBMC nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) und cTCR-2C/417 (anti-TRP-2) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay.....	87
Abb. 3-12:	Testung verschiedener Leukämiezelllinien auf Erkennung durch cTCR-1A.3/46- (anti-CSF2RA) bzw. cTCR-2C/417- (anti-TRP-2) transduzierte PBMC im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay.....	89
Abb. 3-13:	Erkennung un- sowie ausdifferenzierter MUTZ-3-Zellen durch PBMC nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay.....	90

Abb. 3-14:	Testung primärer AML-Zellisolate auf Erkennung durch PBMC nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) oder cTCR-2C/417 (anti-TRP-2) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay	91
Abb. 3-15:	Testung primärer CML-Zellisolate auf Erkennung durch PBMC nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) oder cTCR-2C/417 (anti-TRP-2) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay	92
Abb. 3-16:	Expression von solCSF2RA-Isoform c in Expi293F-Zellen und Erkennung durch PBMC nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay	95
Abb. 3-17:	Expression von bicistronischen CSF2RA/CSF2RB-Konstrukten und Erkennung der Transfektanten durch PBMC nach retroviraler Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay	97
Abb. 3-18:	Erkennung von CSF2RA in Kombination mit CSF2RB und GM-CSF durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA) bzw. CTL 1A.3/4 (anti-CSF2RA) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay	98
Abb. 3-19:	Übersicht über die CD8 β -Expressionsanalysen und Sequenzierungsergebnisse	100
Abb. 3-20:	OKT8-Blockade HLA-unabhängiger und HLA-abhängiger CTL im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay	101
Abb. 3-21:	TCR-Expression (A) und Funktionalität muriner BL6-Splenozyten im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay (B) nach retroviraler Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) bzw. cTCR-2C/417 (anti-TRP-2)	102
Abb. 3-22:	Genotypisierung der QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäuse und Charakterisierung der Splenozyten	103
Abb. 3-23:	TCR-Expression (A) und Funktionalität muriner QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay (B) nach retroviraler Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) oder cTCR-2C/417 (anti-TRP-2)	104
Abb. 4-1:	Vergleichende IMGT/ <i>Collier de Perles</i> -Darstellung der V-Domänen des (A) TCR von CTL 1A.3/46 (gegen CSF2RA, HLA-unabhängig, Patientin Ma-Mel-86) und des (B) TCR von CTL 3.2/143 (gegen TRP-2, restringiert durch HLA-A*02:01, Patient D05)	107
Abb. 5-1:	Vektorkarte pcDNA3.1/V5-His TOPO	134
Abb. 5-2:	Vektorkarte pcDNA3.1-DEST	134
Abb. 5-3:	Vektorkarte pDONR TM 221 P1-P2	135
Abb. 5-4:	Vektorkarte pDONR TM 221 P1-P5r	135
Abb. 5-5:	Vektorkarte pDONR TM 221 P5-P2	136
Abb. 5-6:	Vektorkarte pBullet_IRES_neo-DEST	136
Abb. 5-7:	Vektorkarte pCL-ECO	137
Abb. 5-8:	Vektorkarte pMX	137

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Stimulatorzellzahlen für T-Zellklonierung	54
Tabelle 2-2:	Übersicht der Elektroporationsbedingungen für verschiedene Zelllinien	57
Tabelle 2-3:	Übersicht eingesetzter Target/-Effektorzellzahlen im ELISpot-Assay	59
Tabelle 2-4:	Übersicht eingesetzter Antikörperkonzentrationen im Western Blot.....	71
Tabelle 3-1:	Übersicht über die Klonierungen der MLTC 5C und -1A.3 sowie über die daraus hervorgegangenen CSF2RA-reaktiven CTL-Klone.....	74

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
β2M	β2-Mikroglobulin
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
Abb.	Abbildung
ad	lateinisch <i>auf</i>
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
AP-1	engl. <i>activator protein 1</i>
APC	antigenpräsentierende Zelle (engl. <i>antigen-presenting cell</i>)
APL	Akute Promyelozyten-Leukämie
<i>att</i>	Rekombinationssequenz des Bakteriophagen Lambda (engl. <i>attachment site</i>)
b	Base
BC	engl. <i>Buffy Coat</i>
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCL-2	engl. <i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-XL	engl. <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BCR-ABL	engl. <i>breakpoint cluster region; Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
BGH	Rinder-Wachstumshormonen (engl. <i>bovine growth hormone</i>)
BID	engl. <i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BiTEs	engl. <i>bispecific T cell engagers</i>
BL6	Mausstamm C57BL6/J wt
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
c	chimärisiert
CAR	chimärer Antigenrezeptor
<i>ccdB</i>	Toxigen des <i>ccd</i> -Systems (engl. <i>control of cell death</i>)
CCR7	engl. <i>C-C chemokine receptor type 7</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CDK4	engl. <i>cyclin-dependent kinase 4</i>
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CDR	engl. <i>complementarity determining region</i>
CEA	carcinoembryonales Antigen
CLIP	engl. <i>class II-associated invariant chain peptide</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
CmR	Chloramphenicol-Resistenzgen
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
Cr	Chrom
CSA	Cyclosporin A
CSF2RA	GM-CSF Rezeptor α-Kette (engl. <i>colony stimulating factor 2 receptor α-chain</i>)
CSF2RB	GM-CSF Rezeptor β-Kette (engl. <i>colony stimulating factor 2 receptor β-chain</i>)
CSPG4	engl. <i>chondroitin sulfate proteoglycan 4</i>

CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
CVIA	computergestützte Video-Imager-Analyse
Cy5	Cyanin 5
d	Tag (engl. <i>day</i>)
DAG	Diacylglycerol
DC	dendritische Zelle (engl. <i>dendritic cell</i>)
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser (H ₂ O)
DFF	engl. <i>DNA fragmentation factor 40</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DETC	engl. <i>dendritic epidermal γ:δ-T cells</i>
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
DMEM	Dubleco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	doppelt positiv
<i>DpnI</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i> G41
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E:T	Effektor-zu-Zielzellen-Verhältnis (engl. <i>effector-to-target ratio</i>)
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz (engl. <i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISpot	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>
engl.	Englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
ENV	Gen kodierende für virale Hüllprotein (engl. <i>envelope</i>)
ERAV	equines Rhinitis A Virus
<i>et al.</i>	lateinisch: et alii, und andere
Fa.	Firma
FAB	engl. <i>French-American-British</i>
FACS	engl. <i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FASL	FAS-Ligand
FASR	FAS-Rezeptor
FCS	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLT3-ITF	engl. <i>Fms-like tyrosine kinase-internal tandem duplications</i>
FMDV	Maul- und Klauenseuche-Virus (engl. <i>food-and-mouth disease virus</i>)
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
fw	vorwärts (engl. <i>forward</i>)
g	Gramm
GADS	engl. <i>GRB2-related adaptor downstream of Shc</i>
GAG	Gen kodierend für die Strukturproteine des Virus (engl. <i>group-specific antigen</i>)
GRB2	engl. <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GMAF	engl. <i>global minor allele frequency</i>
GM-CSF	engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>

GM-CSFR	engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor</i>
gp100	engl. <i>glycoprotein 100</i>
GvHD	engl. <i>graft-versus-host disease</i>
GvL	engl. <i>graft-versus-leukemia</i>
h	human
HEPES	engl. <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HER-2	engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HERPUD1	engl. <i>homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1</i>
HIF	engl. <i>hypoxia-inducible factor</i>
HLA	humanes Leukozytenantigen (engl. <i>human leukocyte antigen</i>)
HPLC	engl. <i>high pressure liquid chromatography</i>
HPV	humanes Papillomavirus
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
HS	Humanserum
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HVEM	engl. <i>herpesvirus entry mediator</i>
I	Ionomycin
IBD	engl. <i>inflammatory bowel disease</i>
ICOS	engl. <i>inducible costimulation</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IHF	engl. <i>Integration Host Factor</i>
IL	Interleukin
imDC	unreife dendritische Zelle (engl. <i>immature dendritic cell</i>)
IFN- γ	Interferon γ
IMGT	engl. <i>International immunogenetics information system</i>
Int	Integrase
IP ₃	Inositoltriphosphat
IRES	engl. <i>internal ribosomal entry site</i>
ITAM	engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
ITK	engl. <i>interleukin-2-inducible T-cell kinase</i>
IU	engl. <i>international units</i>
IVS	Intron (enlg. <i>intervening sequence</i>)
JAK	Januskinase
KanR	Kanamycin-Resistenzgen
kb	Kilobase
kDa	Kilo-Dalton
Kg	Kilogramm
KLH	engl. <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
KmG	kortiko-medulläre Grenze
KIR	Killer-inhibierender Rezeptor
K-ras	engl. <i>Kirsten rat sarcoma</i>
l	Liter
LAMP-1	engl. <i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LAT	(engl. <i>linker of activated T cells</i>)
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
LCK	engl. <i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>

LPS	Lipopolysaccharide
LTR	engl. <i>long terminal repeats</i>
m	murin
M	Mol
M13	Sequenzierungsprimersequenz des Bakteriophagen M13
MΦ	Makrophage
mAb	monoklonaler Antikörper (engl. <i>monoclonal antibody</i>)
MACS	engl. <i>magnetically activated cell sorting</i>
MAGE	engl. <i>melanoma-associated antigen</i>
MAIT	engl. <i>mucosal-associated invariant T cells</i>
MAP	engl. <i>mitogen-activated protein</i>
Max	Maximum
MCS	engl. <i>multiple cloning site</i>
mDC	reife dendritische Zelle (engl. <i>mature dendritic cell</i>)
MDSC	myeloide Suppressorzellen, engl. <i>myeloid-derived suppressor cell</i>
Mel	Melanom
MEM α	engl. <i>Minimum Essential Medium</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MICA	engl. <i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>
MICB	engl. <i>MHC class I polypeptide-related sequence B</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MLTC	Gemischte Lymphozyten-Tumorzell-Kultur (engl. <i>mixed lymphocyte tumor cell culture</i>)
mM	millimolar
MoMLV	Moloney Maus Leukämie Virus
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MRD	engl. <i>minimal residual disease</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MUC-1	Mucin 1
N	Normal
Na	Natrium
Na ₂ ⁵¹ CrO ₄	Natriumchromat
NaCl	Natriumchlorid
n.e.	nicht ermittelt
NEAA	engl. <i>non-essential amino acid</i>
NeoR	Neomycin-Resistenzgen
NFAT	engl. <i>nuclear factor of activated T cells</i>
NFκB	engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGS	engl. <i>next generation sequencing</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKG2D	engl. <i>Natural killer group 2, member D</i>
NKR	NK-Zellrezeptor
NKT	natürliche Killer-T-Zelle
NY-ESO	engl. <i>New York esophageal squamous cell carcinoma</i>
OptiMEM	engl. <i>optimized Eagle's Minimal Essential Medium</i>
ori	Replikationsursprung (engl. <i>origin of replication</i>)

p2A	porcines 2A-Element
pA	Polyadenylierungssignal
PAP	pulmonal-alveoläre Proteinose
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle (engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCMV	Promoter des humanen Cytomegalievirus
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	engl. <i>programmed death-1</i>
PD-L1	engl. <i>programmed death ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PHA	Phytohämagglutinin
PI3	Phosphoinositid-3
PIP ₂	Phosphoinositoldiphosphat
PLC-γ	Phospholipase C-γ
PMA	engl. <i>Phorbol-Myristate Acetate</i>
PRAME	engl. <i>preferentially expressed antigen of melanoma</i>
POL	Gen kodierend für retrovirale Polymerase
PS	retrovirales Verpackungssignal (engl. <i>packaging signal</i>).
PSP	prostataspezifische saure Phosphatase
PSV40	Promoter des <i>Simian Virus 40</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pUC	pUC-Plasmid-Replikationsursprung
RCAS	engl. <i>receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells</i>
rev	engl. <i>reverse</i>
RNA	Ribonucleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (engl. <i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Ru5	Ru5-Region der 5'-LTR.
RUNX3	engl. <i>runt-related transcription factor 3</i>
s	Sekunde
SA	Spleißakzeptor
sc	Einzelkette (engl. <i>single chain</i>)
scFv	engl. <i>single chain variable fragment</i>
SCID	engl. <i>severe combined immunodeficiency</i>)
scTv	engl. <i>single chain TCR variable domain</i>
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
se	engl. <i>sense</i>
SEREX	engl. <i>serological identification of antigens by recombinant expression cloning</i>
SH2	engl. <i>Src-homology 2</i>
siRNA	engl. s mall i nterfering R NA
SLP-76	engl. <i>SH2 domain containing lymphocyte cytosolic protein</i>
Smal	S erratia m arcescens
SMART	engl. <i>switching mechanism at 5' end of RNA transcript</i>

SN	Überstand (engl. <i>supernatant</i>)
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOC	engl. <i>super optimal broth with catabolite repression</i>
solCSF2RA	lösliches CSF2RA (engl. <i>soluble CSF2RA</i>)
SP	einzel positiv (engl. <i>single positive</i>)
STAT	engl. <i>signal transducers and activators of transcription</i>
SV40	engl. <i>Simian Virus 40</i>
SVLT	engl. <i>Simian Virus 40 large T antigen</i>
T2A	<i>Thosea asigna</i> virus 2A
T7	RNA-Promoter des Bakteriophagen T7
TAC	Tris-Ammoniumchlorid
TAP	engl. <i>transporter associated with antigen processing</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TCA	Trichlorazetat
TCGF	engl. <i>T cell growth factor</i>
T _{CM}	Zentrale Gedächtnis-T-Zellen (engl. <i>central memory T cells</i>)
TCR	T-Zellrezeptor (engl. <i>T cell receptor</i>)
TE	Testeinheit
T _{EM}	Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (engl. <i>effector memory T cells</i>)
TGF	engl. <i>transforming growth factor</i>
ThPOK	engl. <i>Th inducing POZ-Kruppel Factor</i>
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
Tk	Thymidinkinase
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TRAC	Konstante Domäne der TCR- α -Kette (engl. <i>T cell receptor alpha constant domain</i>)
TRAIL	engl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAJ	Verbindungsregion der TCR- α -Kette (engl. <i>T cell receptor alpha junction region</i>)
TRAV	Variable Region der TCR- α -Kette (engl. <i>T cell receptor alpha variable region</i>)
TRBC	Konstante Domäne der TCR- β -Kette (engl. <i>T cell receptor beta constant domain</i>)
TRBD	Diversitätsregion der TCR- β -Kette (engl. <i>T cell receptor beta diversity region</i>)
TRBJ	Verbindungsregion der TCR- β -Kette (engl. <i>T cell receptor beta junction region</i>)
TRBV	Variable Region der TCR- β -Kette (engl. <i>T cell receptor beta variable region</i>)
TRP-2	engl. <i>tyrosine-related protein 2</i>
T _{SCM}	Stammzell-Gedächtnis-T-Zellen (engl. <i>stem cell memory T cells</i>)
ULBP-1	UL16-bindendes Protein
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
VNTR	engl. <i>variable number of tandem repeats</i>
wt	Wild-Typ
WT1	Wilms tumor 1
Xis	Exzisionase
ZAP-70	engl. <i>ζ-chain-associated protein</i>

1 Einleitung

Die elementare Aufgabe des Immunsystems ist der Erhalt der Integrität des Organismus gegenüber eindringenden Pathogenen oder entarteten, körpereigenen Zellen. Neben physiologischen Barrieren, wie der Haut und enzymsekretierenden Schleimhäuten, sind prinzipiell zwei grundlegend verschiedene Komponenten des Immunsystems zu differenzieren: die angeborene, unspezifische Immunität und die erworbene, spezifische Immunität¹. Beide Bestandteile stehen jedoch in engem Kontakt zueinander und sind auf stetige Wechselwirkungen angewiesen, um eine effiziente Immunantwort hervorzurufen². Während sich das angeborene Immunsystem durch eine schnelle und breit gefächerte Immunantwort auszeichnet, die durch Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine, Zytokine, **Natürliche Killerzellen** (NK-Zellen), Mastzellen, Granulozyten, Makrophagen (MΦ) und Dendritische Zellen (DC, engl. *dendritic cell*) vermittelt wird, ist die adaptive Immunität durch eine verzögerte Immunreaktion gekennzeichnet, die jedoch zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses führt¹. Entscheidend hierfür sind die für die humorale Immunantwort zuständigen B-Zellen sowie die für die zelluläre Immunantwort verantwortlichen T-Lymphozyten³. Hinsichtlich der Kontrolle und Therapie von Malignomen erweisen sich nach heutigem Erkenntnisstand T-Zellen als die potentesten Effektoren⁴, weshalb im Folgenden insbesondere auf Möglichkeiten und Risiken der Nutzung dieser speziellen Mediatoren für die Tumorthherapie eingegangen wird.

1.1 T-Lymphozyten

T-Zellen unterscheiden sich von anderen Lymphozyten durch ihre Expression des Oberflächenmarkers CD3 (engl. *cluster of differentiation*) sowie eines antigenspezifischen T-Zellrezeptors (TCR, engl. *T-cell receptor*)¹. Durch Interaktion des TCR mit MHC:Peptid-Komplexen (engl. *major histocompatibility complex*) auf antigenpräsentierenden Zellen (APC, engl. *antigen-presenting cell*) sind sie dazu befähigt, körpereigene von fremden Zellen zu unterscheiden sowie beispielsweise von Viren infizierte oder kanzeröse Zellen zu detektieren und zu eliminieren¹. Eine grobe Klassifizierung kann anhand der Oberflächenexpression ihrer Korezeptoren in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erfolgen¹. CD4⁺ T-Zellen wiederum können gemäß ihrer Effektorfunktionen in T-Helferzellen (T_H1, T_H2, T_H9, T_H17, T_H22, T_{FH}) und regulatorische T-Zellen (iT_{reg}, nT_{reg}) eingeteilt werden⁵. T-Helferzellen spielen eine essentielle Rolle für die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (CTL, engl. *cytotoxic T lymphocyte*) und Makrophagen sowie in der Differenzierung von B-Lymphozyten zu antikörpersekretierenden Plasmazellen^{6,7}, wohingegen T_{reg} zur Regulation der Selbsttoleranz beitragen⁸. Der ihnen gemeinsame Oberflächenmarker CD4 besteht aus vier extrazellulären Immunglobulindomänen, einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Teil⁹. CD4⁺ T-Zellen erkennen Peptide einer Länge von 13-18 Aminosäuren, die hauptsächlich aus Proteinen extrazellulären Ursprungs prozessiert und gebunden an MHC-Klasse II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden¹. Demgegenüber erkennen CD8⁺ T-Zellen acht bis zehn Aminosäuren lange Peptide aus Proteinen intrazellulären Ursprungs in Assoziation mit MHC-Klasse I-Molekülen¹. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen sind im Wesentlichen an der Eliminierung von virusbefallenen Zellen sowie von Tumorzellen beteiligt¹. Nach erfolgter Aktivierung durch Antigenkontakt und Differenzierung zu Effektorzellen stehen ihnen dafür im Wesentlichen zwei Mechanismen zur Verfügung. Zum einen werden in einer kalziumabhängigen Reaktion von der T-Zelle zytotoxische Granula freigesetzt. Diese enthalten Perforine, die die Zellmembran der Zielzelle durchlöchern, und Granzyme (Serinproteasen), die durch die perforininduzierten Öffnungen in die

Zielzellen eindringen und durch Caspasespaltung Apoptose induzieren¹. In einem zweiten Mechanismus erfolgt durch die Interaktion des **FAS**-Liganden (FASL) der T-Zelle mit dem **FAS**-Rezeptor (FASR) der Targetzelle die Induktion des programmierten Zelltods¹. Außerdem wird durch die Sekretion von IFN- γ (**Interferon γ**) die Phagozytose von Zelltrümmern durch Makrophagen initiiert¹. Charakteristisch für CTL ist die Expression des Oberflächenmarkers CD8, welcher homodimer in Form von zwei CD8 α -Ketten oder heterodimer in Form von einer CD8 α - und einer CD8 β -Kette vorliegen kann¹. Beide Ketten bestehen aus je einer extrazellulären Immunglobulindomäne, einem die Zytoplasmamembran durchspannenden Bereich sowie einem kurzen zytoplasmatischen Teil^{9,10}. Des Weiteren lassen sich von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen CD4⁻ und CD8⁻ γ : δ -T-Zellen abgrenzen, deren TCR sich nicht aus einer α - und einer β -Kette, sondern aus einer γ - und einer δ -Kette zusammensetzt¹. γ : δ -T-Zellen stellen jedoch nur zwischen 1 und 10 % des gesamten T-Zell-Repertoires dar und sind zum Großteil in Epithelien und der Mukosa lokalisiert^{1,11}. Im Gegensatz zu den α : β -TCR der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind die γ : δ -TCR nicht MHC-restringiert und weisen eine geringere TCR-Diversität auf¹¹. Sie werden, ähnlich den **Natürlichen Killer-T-Zellen** (NKT-Zellen), deren α : β -TCR ebenfalls aus invarianten Ketten bestehen und die Lipidantigene im Zusammenhang mit CD1d erkennen¹², als unkonventionelle T-Zellen an der Grenze zwischen adaptiver und angeborener Immunität angesehen^{13,14}.

1.1.1 T-Zell-Entwicklung

Wie B-Lymphozyten und NK-Zellen entstammen T-Zellen pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen (HSC, engl. *hematopoietic stem cell*) des Knochenmarks¹. Ihre vollständige Reifung zu naiven T-Lymphozyten erfolgt jedoch im Thymus (**Abb. 1-1**) und zu einem kleinen Teil in den Tonsillen¹⁵. Die aus dem Knochenmark über Blutgefäße in den Thymus eintretenden Vorläufer-T-Zellen exprimieren weder CD4 noch CD8 und werden daher als **doppelt-negative** (DN) Thymozyten bezeichnet¹. Etwa 20 % davon differenzieren zu γ : δ -T-Zellen, der Großteil jedoch zu α : β -T-Zellen. Die weitere Differenzierung der α : β -T-Thymozyten wird in 4 Stadien unterteilt (DN1 – DN4), die sich hinsichtlich der Expression von CD25, CD44 und Kit unterscheiden. In DN1-Zellen liegen die TCR-Gene noch in ihrer Keimbahnkonfiguration vor, wohingegen in DN2-Thymozyten die DJ-Rekombination und in DN3-Thymozyten die VD-Rekombination der TCR β -Gene erfolgt¹. Zudem oligomerisiert die β -Kette mit einer invarianten prä-TCR α -Kette zu einem prä-TCR-CD3-Komplex an der Zelloberfläche¹. Die folgende ligandenunabhängige prä-TCR-Multimerisierung in DN4-Zellen resultiert in der Proliferation der Thymozyten, unterbindet jegliche weitere TCR β -Rekombination und induziert die Expression von CD4- und CD8-Molekülen¹. In den nun **doppelt-positiven** (DP) Zellen erfolgt die Rekombination der TCR α -Kette¹. Zudem werden in der sogenannten positiven Selektion die TCR auf ihre Fähigkeit hin überprüft, Selbst-MHC-Moleküle zu erkennen¹. Sofern keine TCR-MHC-Bindung erfolgt, wird in den Zellen Apoptose induziert¹. Danach werden durch den Prozess der Negativ-Selektion TCR mit einer zu starken Affinität zu Selbst-Peptid:MHC-Komplexen eliminiert und dadurch zentrale Toleranz etabliert¹. Abhängig davon, ob durch den TCR eine Erkennung von Selbst-MHC Klasse I-Komplexen oder Selbst-MHC Klasse II-Komplexen erfolgt, differenzieren die Thymozyten unter Einwirkung der Transkriptionsfaktoren RUNX3 (engl. *runx-related transcription factor 3*) bzw. ThPOK (engl. *Th inducing POZ-Kruppel Factor*) zu einzel-positiven (SP, engl. *single positive*) CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen und verlassen nun als naive T-Zellen den Thymus¹⁶. γ : δ -T-Zellen unterliegen nicht der Positiv-/Negativselektion und werden nach erfolgreicher γ : δ -TCR-Rekombination bereits im DN3-Stadium aus dem Thymus entlassen¹. Insgesamt

durchlaufen jedoch nur ca. 2 % aller $\alpha\beta$ -Thymozyten erfolgreich alle Stadien der Selektion und zirkulieren schließlich im Blut und in sekundären lymphatischen Organen¹.

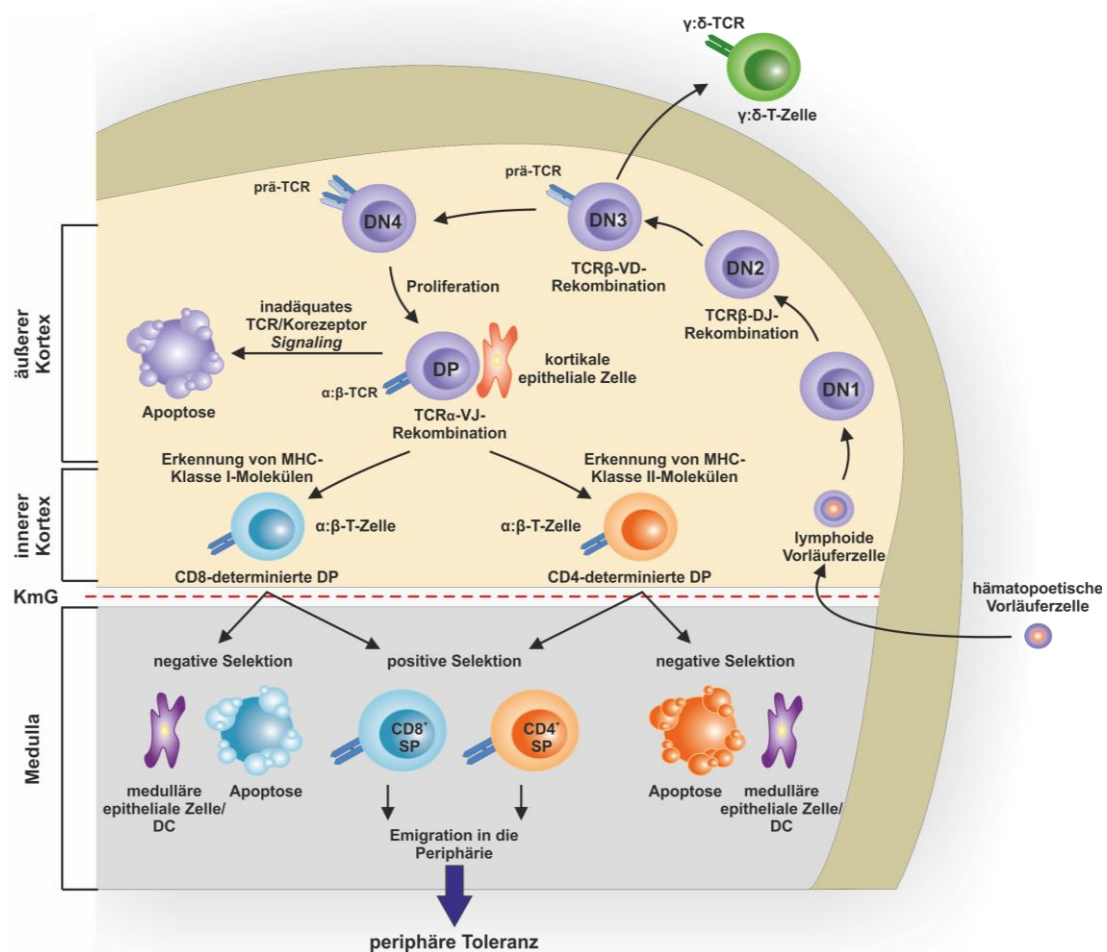


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der T-Zellentwicklung im Thymus. Gezeigt ist die Entwicklung von der hämatopoetischen Vorläuferzelle, über vier DN Stadien und ein DP Stadium bis zur einzel-positiven T-Zelle (vgl. Haupttext für detaillierte Informationen). DC: Dendritische Zelle (engl. *dendritic cell*); DN: doppelt-negative Zelle; DP: doppelt-positive Zelle; KmG: kortiko-medulläre Grenze; MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*); SP: einzel-positive Zelle (engl. *single positive cell*); TCR: T-Zellrezeptor (engl. *T-cell receptor*). Adaptiert aus Germain *et al.*, 2002¹⁶.

Den Thymusselektionen entgangene T-Zellen werden durch verschiedene Mechanismen der peripheren Toleranz, wie z.B. T_{reg} oder sogenannte tolerisierende dendritische Zellen, in ihrer Reaktivität herabreguliert oder durch Apoptose deletiert^{17,1818}. Zudem bleiben bei geringer Expression oder Präsentation von Selbstantigenen die T-Zellen gegenüber ihrem Zielantigen ignorant¹⁷. Erfolgt die T-Zell-Stimulation lediglich über den Kontakt zwischen TCR und Antigen, jedoch ohne die Beteiligung kostimulatorischer Signale (vgl. Abschnitt 1.1.2), werden die T-Zellen anerg. Sie können im Folgenden auch durch eine adäquate Korezeptorstimulation nicht mehr aktiviert werden¹. Eine naive T-Zelle wird aktiviert, wenn sie durch die Bindung ihres TCR an einen MHC:Peptid-Komplex, wie beispielsweise im Falle einer Infektion, ein erstes Signal über den TCR erhält. Erfolgt gleichzeitig noch sowohl die Interaktion kostimulatorischer Moleküle zwischen T-Zelle und APC (zweites Signal) als auch eine durch inflammatorische Zytokine bedingte Polarisierung der T-Zelle (drittes Signal), wird eine starke Proliferation der T-Zelle (klonale Expansion) sowie ihre Differenzierung zur Effektorzelle induziert¹⁹. Schon kurz nach Abklingen der Infektion sterben jedoch 90-95 % der Effektorzellen den programmierten

Zelltod. Nur ca. 5-10 % der T-Zellen überleben und differenzieren zu langlebigen Gedächtniszellen²⁰. Dabei unterscheidet man im Wesentlichen zwei Populationen von Gedächtniszellen, nämlich Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM} , engl. **effector memory T cell**) und zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM} , engl. **central memory T cell**). T_{EM} exprimieren kein CCR7 (engl. **C-C chemokine receptor type 7**), zirkulieren vorwiegend in peripheren Organen und sind gekennzeichnet durch geringe proliferative Kapazität und ein hohes Potential, bei Antigenstimulation rasche Effektorfunktionen auszuüben¹. Die CCR7- und CD62L-exprimierenden T_{CM} sind vorwiegend in den T-Zellzonen sekundärer lymphatischer Organe lokalisiert und weisen ein höheres Proliferationspotential sowie höhere Sensitivität gegenüber einem TCR-Crosslinking auf^{1,21}. Sie können zu Effektor-T-Zellen und T_{EM} differenzieren^{1,21-23}. Neueste Erkenntnisse beschreiben jedoch eine weitere Gedächtnis-Zellpopulation, die neben dem Phänotyp naiver T-Zellen ($CD45RA^+$, $CD45RO^-$, $CCR7^+$, $CD62L^+$, $CD27^+$, $CD28^+$) auch den auf Gedächtniszellen exprimierten Marker CD95 exprimieren. Da diese Zellen enorme Selbsterneuerungskapazität besitzen sowie die Fähigkeit, zu Effektor-T-Zellen, T_{CM} und T_{EM} , zu differenzieren, werden sie als Stammzell-Gedächtnis-T-Zellen (T_{SCM} , engl. **stem cell memory T cell**) bezeichnet²⁴.

1.1.2 Der T-Zellrezeptor

Der TCR eines Großteils der T-Lymphozyten setzt sich aus einer α - und einer β -Kette zusammen. Jede Kette besteht aus einer extrazellulären, N-terminalen variablen Domäne, die der MHC:Peptid-Erkennung dient, und einer die Zytoplasmamembran durchspannenden, konstanten Domäne (TRAC, engl. **T cell receptor α -chain, constant domain**, und TRBC, engl. **T cell receptor β -chain, constant domain**, Abb. 1-2)¹.

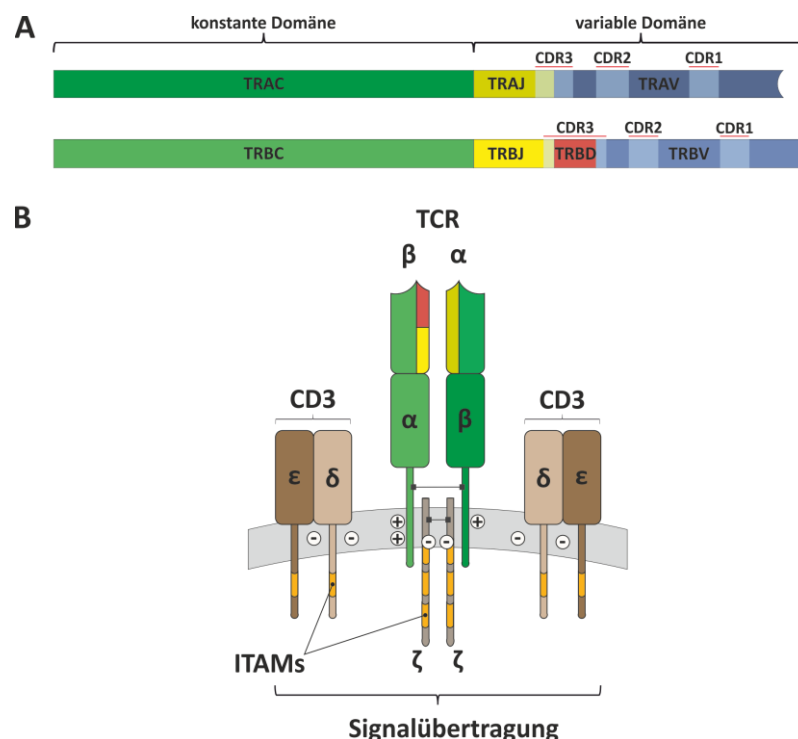


Abb. 1-2: Schematischer Aufbau der TCR α - und TCR β -Kette (A) und des TCR-CD3-Komplexes (B). Vgl. Haupttext für detaillierte Informationen. CDR: engl. *complementarity determining region*; CD: engl. *cluster of differentiation*; ITAM: engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*; TCR: T-Zellrezeptor (engl. *T-cell receptor*); TRAC: engl. *T cell receptor α -chain, constant domain*; TRAJ: engl. *T cell receptor α -chain, junction region*; TRAV: engl. *T cell receptor α -chain, variable region*; TRBC: engl. *T cell receptor β -chain, constant domain*; TRBD: engl. *T cell receptor β -chain, diversity region*; TRBJ: engl. *T cell receptor β -chain, junction region*; TRBV: engl. *T cell receptor β -chain, variable region*. Adaptiert aus Murphy, 2012¹.

Die variable Domäne der α -Ketten ist zusammengefügt aus einem von ca. 70 V- und einem von 61 J-Segmenten (TRAV, engl. *T cell receptor α -chain, variable region*; TRAJ, engl. *T cell receptor α -chain, junction region*), die variable Domäne der β -Ketten aus einem von 20 V-, einem von zwei D- und einem von 13 J-Segmenten (TRBV, engl. *T cell receptor β -chain, variable region*; TRBD, engl. *T cell receptor β -chain, diversity region*; TRBJ, engl. *T cell receptor β -chain, junction region*) (**Abb. 1-2 A**), welche durch Rekombination während der Reifung der Lymphozyten im Thymus zufällig miteinander kombiniert werden¹. Für die β -Ketten stehen zudem noch zwei TRBC-Segmente zur Verfügung¹. Die dadurch bedingte Diversität der TCR-Ketten wird zusätzlich durch das Entfernen bzw. Einfügen von N- und P-Nukleotiden an den Verbindungsstellen beim Zusammenfügen der einzelnen Segmente erhöht¹. Insgesamt ergibt sich damit rein rechnerisch eine TCR-Diversität von ca. 10^{18} ¹. Jede variable Domäne weist drei *complementarity determining regions* (CDR) auf. Während CDR1 und CDR2 der α - und β -TCR-Ketten hauptsächlich mit Peptid-flankierenden MHC-Helices interagieren, erkennen die hochvariablen CDR3-Regionen das gebundene Peptid direkt²⁵.

Cysteinreste in den konstanten Domänen führen durch Disulfidbrückenbildung zu einer TCR-Dimerisierung. Doch erst die durch gegensätzliche Ladung der Seitenketten hervorgerufene Komplexbildung mit den Molekülen CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ und der ζ -Kette stabilisiert den TCR im endoplasmatischen Retikulum (ER) und ermöglicht seinen Transport an die Zelloberfläche²⁶ (**Abb. 1-2 B**).

Nach Bindung der TCR an die Peptid:MHC-Komplexe und der Interaktion der Korezeptoren CD4 bzw. CD8 mit den peptidpräsentierenden MHC-Molekülen erfolgt die Phosphorylierung der ITAMs (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) der CD3-Untereinheiten und der ζ -Kette durch die mit den Korezeptoren assoziierte src-Kinase LCK (engl. *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*)¹. Phosphorylierte ITAMs rekrutieren wiederum die SH2-Domänen-tragende (engl. *Src-homology 2*) Tyrosinkinase ZAP-70 (engl. *ζ -chain-associated protein*), welche ihrerseits ebenfalls von LCK phosphoryliert wird¹. Nach Aktivierung phosphoryliert ZAP-70 die Proteine LAT (engl. *linker of activated T cells*) und SLP-76 (engl. *SH2 domain containing lymphocyte cytosolic protein*), die dadurch zu einer Komplexbildung mit GADS (engl. *GRB2-related adaptor downstream of Shc*) befähigt werden¹. Der GADS:SLP-76:LAT-Komplex rekrutiert im Folgenden die für die Signaltransduktion wichtigste Phospholipase C- γ (PLC- γ)¹. PLC- γ wird anschließend durch die Kinase ITK (engl. *interleukin-2-inducible T-cell kinase*) aktiviert¹. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass diese zuvor durch eine durch Bindung kostimulatorischer Moleküle (z.B. CD28) an ihre Liganden (z.B. CD80/CD86) ausgelöste Signalkaskade selbst phosphoryliert wird¹. PLC- γ spaltet Phosphoinositoldiphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃)¹. Diese Mediatoren sind nun für die Induktion dreierlei Signalkaskaden verantwortlich: Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), AP-1 (engl. *activator protein 1*) und NFAT (engl. *nuclear factor of activate T cells*), welche durch Induktion der Expression verschiedener Gene die Proliferation, Aktivierung und Differenzierung der T-Zelle bewirken¹ (**Abb. 1-3**).

Neben aktivierenden kostimulatorischen Molekülen, wie dem oben genannten CD28, existieren auch zahlreiche inhibitorische Moleküle, wie zum Beispiel CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) und PD-1 (engl. *programmed death-1*), die die Signalübertragung durch den TCR unterbinden oder Apoptose auslösen und damit eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort spielen²⁷.

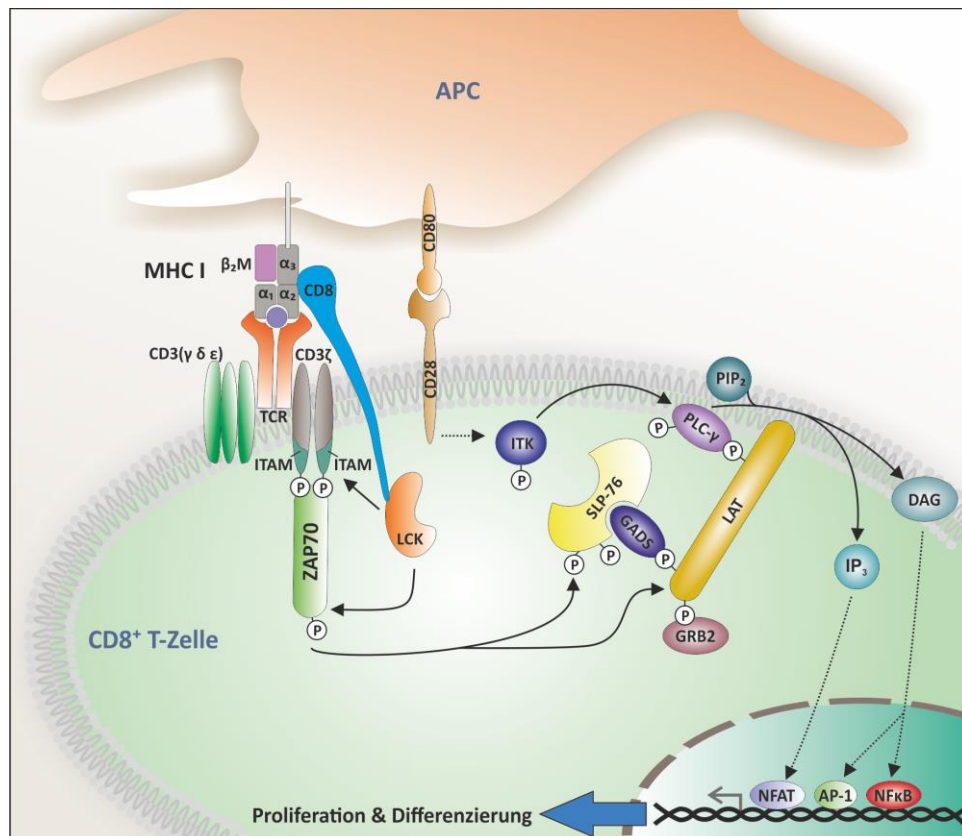


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der durch TCR-Aktivierung in der T-Zelle ausgelösten Signalkaskade. Durch TCR-Stimulation wird eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade ausgelöst, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, AP-1 und NFκB führt. Dies resultiert in der Proliferation und Differenzierung der T-Zelle (vgl. Haupttext für detaillierte Informationen). AP-1: engl. *activator protein 1*; APC: antigenpräsentierende Zelle (engl. *antigen presenting cell*); CD: engl. *cluster of differentiation*; DAG: Diacylglycerol; GADS: engl. *GRB2-related adaptor downstream of Shc*; GRB2: engl. *growth factor receptor-bound protein 2*; IP₃: Inositoltriphosphat; ITAM: engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*; ITK: engl. *interleukin-2-inducible T-cell kinase*; LAT: engl. *linker of activated T cells*; LCK: engl. *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*; MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*); NFAT: engl. *nuclear factor of activated T cells*; NFκB: engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; PIP₂: Phosphoinositoldiphosphat; PLC-γ: Phospholipase C-γ; SLP-76: engl. *lymphocyte cytosolic protein*; TCR: T-Zellrezeptor (engl. *T cell receptor*); ZAP-70: engl. *ζ-chain-associated protein*. Adaptiert aus Abraham und Weiss, 2004²⁸ bzw. Murphy, 2012¹.

1.1.3 Antigenprozessierung und -präsentation durch MHC-Moleküle

T-Zellen sind für eine erfolgreiche Antigenerkennung auf die Präsentation der Antigene durch antigenpräsentierende Zellen angewiesen. Man unterscheidet dabei prinzipiell zwei Präsentationswege, nämlich die Antigenpräsentation über MHC-Klasse I-Moleküle für eine Aktivierung CD8⁺ T-Zellen und die Präsentation von Antigenen über MHC-Klasse II-Moleküle, um CD4⁺ T-Lymphozyten zu aktivieren (**Abb. 1-4**)¹. Beim Menschen werden die MHC-Moleküle auch als **humane Leukozytenantigene (HLA)** bezeichnet¹.

MHC-Klasse I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und bestehen aus zwei Untereinheiten, nämlich der drei Domänen umfassenden, in der Zellmembran verankerten α-Untereinheit sowie der kleineren, löslichen Untereinheit β₂-Mikroglobulin (β₂M)¹. Die menschlichen, für die α-Untereinheit kodierenden HLA-Klasse Ia-Gene werden als HLA-A, -B und -C bezeichnet¹. Für eine Peptidpräsentation werden intrazelluläre Proteine zunächst aufgrund ihrer Ubiquitynylierung durch das Proteasom verdaut und die daraus resultierenden Peptide anschließend in einem aktiven Prozess durch die Proteine TAP-1 (engl. *transporter associated with antigen processing*) und TAP-2 in das ER transferiert^{1,29,30}. Erst durch die Beladung der bis dahin partiell gefalteten MHC-Klasse I-Moleküle mit

dem Peptid wird eine Stabilisierung des Komplexes erreicht, welcher durch Vesikel des sekretorischen Systems zur Oberfläche transportiert wird (**Abb. 1-4 A**)^{1,30,31}.

HLA-Klasse II-Gene werden nur von sogenannten professionellen APC, wie DC, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen exprimiert¹. Der MHC-Klasse II-Komplex setzt sich aus zwei in der Zellmembran verankerten Untereinheiten zusammen¹. Es wird zwischen HLA-DP, -DQ, -DR, -DM und -DO unterschieden¹. Extrazelluläre Proteine werden durch Phagozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose in vesikuläre Kompartimente der APC eingeschleust^{1,30}. Nach Senkung des vesikulären pH werden die Proteine durch die in Lysosomen und Endosomen enthaltenen Proteasen degradiert^{1,30}. Durch Fusion der die Peptide enthaltenden Lysosomen mit sich vom ER abknospenden Vesikeln, welche neu synthetisierte MHC-Klasse II-Moleküle auf ihrem Weg zur Zelloberfläche enthalten, werden beide für die Beladung benötigten Komponenten in einem Kompartiment vereint^{1,30}. Um eine vorzeitige Peptidbeladung der MHC-Klasse II-Moleküle im ER zu verhindern, bilden diese einen Komplex mit CD74 (Ii, invariante Kette), welches zudem dafür Sorge trägt, MHC-Klasse II-Moleküle in Vesikel mit niedrigem pH zu transferieren^{1,30}. Durch die im Endosom befindlichen Proteasen wird die invariante Kette bis auf ein kurzes Peptid, das sogenannte CLIP (engl. *class II-associated invariant chain peptide*), hydrolysiert^{1,30}. Anschließend erfolgt der Austausch des CLIP durch ein zu präsentierendes Peptid, katalysiert durch das spezialisierte MHC-Molekül HLA-DM (vgl. **Abb. 1.4 B**)^{1,30}.

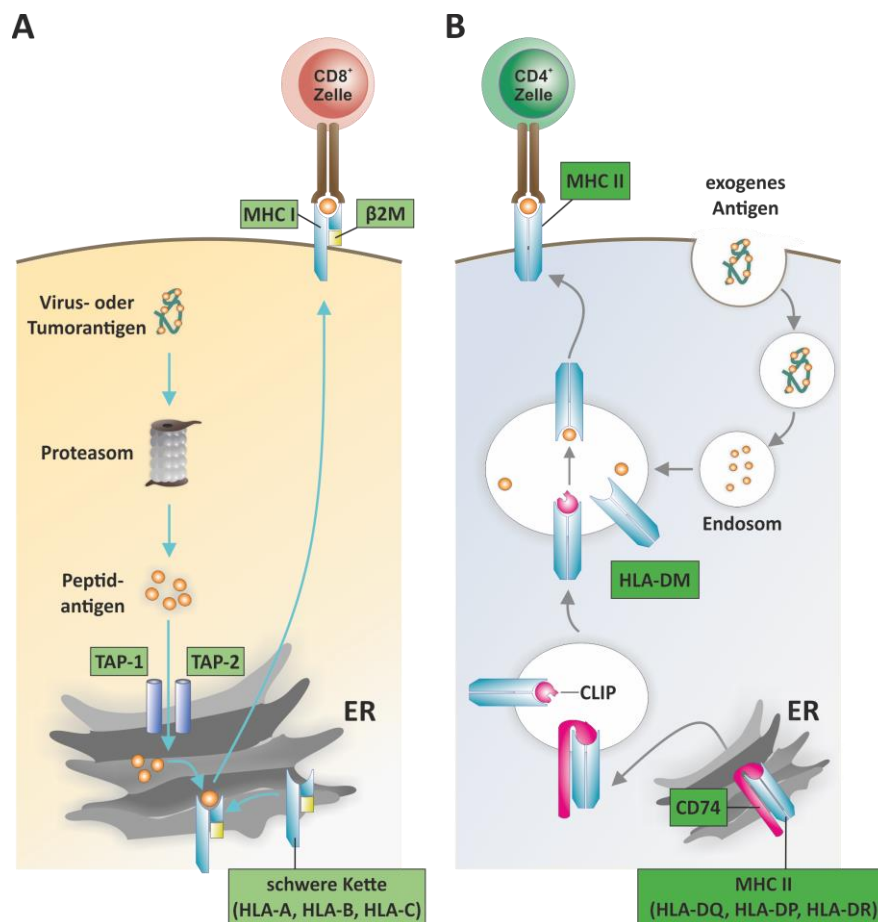


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Antigenprozessierung und -präsentation. (A) Prozessierung intrazellulärer Antigene für die Präsentation auf MHC Klasse-I-Molekülen. **(B)** Prozessierung von Antigenen extrazellulären Ursprungs für die Präsentation durch MHC Klasse-II-Moleküle (vgl. Haupttext für detaillierte Informationen). β2M: β2-Mikroglobulin; CLIP: engl. *class II-associated invariant chain peptide*; ER: endoplasmatisches Retikulum; HLA: humanes Leukozytenantigen; TAP: engl. *transporter associated with antigen processing*; TCR: T-Zellrezeptor (engl. *T cell receptor*). Adaptiert aus Kobayashi und Elsen, 2012³².

Abweichend von den oben skizzierten konventionellen Prozessierungs- und Präsentationswegen sind mittlerweile für spezialisierte APC, wie DC, verschiedene Mechanismen der Kreuzpräsentation bekannt, wobei Peptide extrazellulären Ursprungs auch durch MHC-Klasse I-Moleküle CD8⁺ T-Lymphozyten präsentiert werden^{33,34}.

In der Literatur wurden jedoch auch einzelne Fälle HLA-unabhängiger Antigenerkennung durch CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen beschrieben. Dazu zählt das auf Pankreas-, Mamma-, Bronchial-, Kolon-, Prostata-, Speicheldrüsen- und Ovarialkarzinomzellen überexprimierte, epitheliale Antigen MUC-1 (**Mucin 1**), dessen aus tandemartig angeordneten Sequenzwiederholungen (VNTR, engl. *variable number of tandem repeats*) bestehender, hypoglykosylierter Kern spezifisch von CTL erkannt werden kann^{35–37}. Vermutlich ermöglicht dabei die repetitive Präsenz des immunogenen Epitops ein „Crosslinking“ mehrerer TCR der gleichen T-Zelle auch ohne Beteiligung eines HLA-Moleküls³⁸. Wang *et al.* (2008) beobachteten eine HLA-unrestringierte Erkennung von Nierenkarzinomzellen durch CD4⁺ Lymphozyten³⁹. Hanada *et al.* (2011) gelang es, den exakten Erkennungsmechanismus aufzuklären. Dabei erfolgt zunächst die proteolytische Abspaltung des auf T-Zellen exprimierten TRAIL (solTRAIL, engl. *soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand*) durch die **Matrix-Metalloproteinase 14** (MMP14) der Tumorzellen. solTRAIL bildet daraufhin auf den Tumorzellen einen Komplex mit dem Todesrezeptor 4 (DR4, engl. *death receptor 4*), welcher durch den TCR CD4⁺ T-Zellen HLA-unabhängig erkannt wird⁴⁰.

Auch im murinen System konnte MHC-unabhängige, $\alpha\beta$ -TCR-vermittelte Antigenerkennung gezeigt werden. Tikhonova *et al.* isolierten aus MHC-Molekül- und Korezeptor-defizienten Mäusen zwei TCR, die verschiedene Epitope des murinen Analogon zum humanen Poliovirus-Rezeptor (mCD155) in MHC-unabhängiger Weise erkannten⁴¹. Aufgrund der sehr hohen Affinität der TCR zu ihrem Antigen sowie der Abhängigkeit der Erkennung von Konformation und Glykosylierungsstatus des Zielproteins ähneln diese TCR hinsichtlich ihrem Erkennungsmechanismus Antikörpern⁴¹.

1.2 Tumorimmunologie und Immuntherapie

Bösartige Neoplasien lassen sich gemäß ihrem Ursprungsgewebe in Karzinome, Sarkome, Leukämien und Lymphome einteilen⁴². Sie entstehen in einem mehrstufigen Prozess durch eine sukzessive Ansammlung von genetischen und epigenetischen Veränderungen, insbesondere bedingt durch physikalische und chemische Karzinogene oder Infektionen^{5,43}.

In einer ersten Phase, der Tumorinitiation, kommt es zu irreversiblen Mutationen in Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen oder Genen für DNA-Reparaturmechanismen. Initiierte Zellen bilden keine Tumoren, können jedoch in der zweiten Phase, der sogenannten Tumorpromotion, durch einen Wachstumsstimulus zu prämaligen Läsionen expandieren, welche schließlich in der dritten Phase, der Tumorprogression, zu malignen Neoplasien entarten⁵. Charakteristische Kennzeichen von Malignomen sind genomische Instabilität, Angiogeneseinduktion, Invasivität und die Fähigkeit zur Metastasierung, anhaltende Proliferationskapazitäten, Apoptose-/Seneszenzresistenz, unbegrenztes Replikationspotential, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Substanzen, Reprogrammierung des Energiemetabolismus, ein tumorförderndes, inflammatorisches Mikromillieu und die Befähigung zur Immunevasion⁴⁴.

1.2.1 Immunosurveillance & Immunoediting

Das Immunsystem ist jedoch durchaus in der Lage, maligne Zellen zu erkennen und zu eliminieren, sofern zellintrinsische Tumorsuppressormechanismen versagt haben. Diese Erkenntnis prognostizierte schon Paul Ehrlich Anfang des 20. Jahrhunderts mit der Vision der sogenannten „*magic bullets*“ für eine erfolgreiche Krebsimmuntherapie⁴⁵. Erst durch ein besseres Verständnis des Immunsystems war es Burnet und Thomas ca. 50 Jahre später möglich, ihre Hypothese der *Immunosurveillance* zu formulieren⁴³. Diese postulierte eine Verhinderung der Tumorentwicklung als elementare Aufgabe des Immunsystems^{46,47}. Heute werden dem Immunsystem im Wesentlichen drei dafür verantwortliche Mechanismen zugeschrieben⁴⁸:

- Es bietet Schutz vor viralen Infektionen und damit einhergehenden virus-induzierten Tumoren⁴⁸.
- Es beugt einem inflammatorischen, tumorbegünstigenden Mikromilieu vor, indem es Pathogene eliminiert und für eine unverzügliche Beseitigung der Entzündungsreaktion sorgt⁴⁸.
- Es ermöglicht eine direkte Eliminierung kanzeröser Zellen durch Zellen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems. Dies beruht im Allgemeinen auf der Expression von Liganden aktivierender Rezeptoren bzw. tumorassoziierter Antigene (TAA) seitens der Tumorzellen, die es dem Immunsystem erlauben, kanzeröse Zellen von deren nicht-transformierten Vorläufern zu differenzieren⁴⁸.

Die Erkenntnis, dass das Immunsystem nicht nur einen Einfluss auf die Tumorentstehung hat, sondern auch die Immunogenität von Tumoren modelliert, erweiterte die *Immunosurveillance*-Hypothese durch die Hypothese des *Immunoeditings*^{43,49}. Diese lässt sich in drei Phasen unterteilen, die mit Eliminierung, Equilibrium und *Escape* bezeichnet werden⁵⁰ (**Abb. 1-5**).

Die Eliminierungsphase ist im Wesentlichen mit der *Immunosurveillance* gleichzusetzen. Hierbei kooperieren angeborene und erworbene Immunität, um eine Eliminierung transformierter Zellen zu erzielen noch lange bevor diese klinisch auffällig werden⁴⁸. Seltene Tumorzellvarianten können jedoch diese Eliminationsphase überstehen, woraufhin es zu einem Equilibrium der Tumor:Wirt-Interaktion kommt. Insbesondere durch T-Zellen, IL-12 (Interleukin 12) und IFN- γ werden die Tumorzellen in einen Zustand der Dormanz versetzt oder an der Proliferation gehindert, so dass es zu einem Gleichgewicht zwischen Tumorzellproliferation und immunzellvermittelter Tumorzellzerstörung kommt, wodurch ein Netto-Wachstum des Tumors unterbunden wird⁴⁸. Aufgrund des stetig vom Immunsystem auf die Tumorzellen ausgeübten Selektionsdrucks erlangen einige in der *Escape*-Phase die Fähigkeit, einer Zerstörung durch das Immunsystem zu entkommen (vgl. Abschnitt 1.2.2). Diese Evasion kann sowohl durch eine Veränderung der Tumorzellen als Reaktion auf die Editierung durch das Immunsystem, als auch durch Veränderungen des Immunsystems bedingt sein⁴⁸.

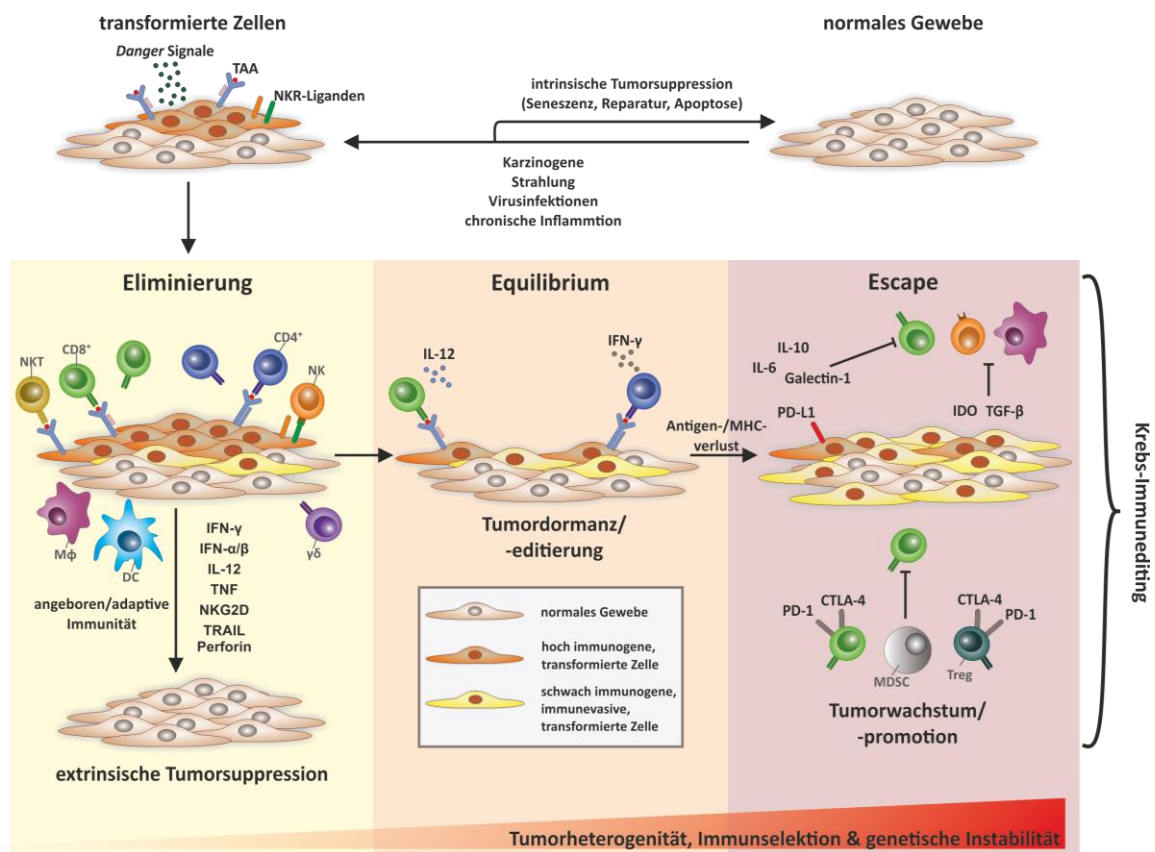


Abb. 1-5: Schematische Darstellung über die drei Phasen des Immunoeditings. Gezeigt ist eine Übersicht über die Eliminierungs-, die Equilibrium-, und die Escape-Phase des Immunoeditings (vgl. Haupttext für detaillierte Informationen). CTLA-4: engl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*; DC: Dendritische Zellen (engl. *dendritic cell*); IDO: Indolamin-2,3-Dioxygenase; IFN: Interferon; IL: Interleukin; Mφ: Makrophage; MDSC: Myeloide Suppressorzellen (engl. *myeloid-derived suppressor cell*); MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*); NK: natürliche Killerzelle; NKG2D: engl. *Natural killer group 2, member D*; NKR: NK-Zellrezeptor; PD-1: engl. *programmed death 1*; PD-L1: engl. *programmed death ligand 1*; TAA: tumorassoziiertes Antigen; TGF: engl. *transforming growth factor*; TNF: Tumornekrosefaktor; TRAIL: engl. *tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*. Adaptiert aus Schreiber et al. 2011⁴⁸.

1.2.2 Immune Escape-Mechanismen von Tumoren

Tumorzellen haben eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um sich einer Vernichtung durch das Immunsystem zu entziehen. Diese Mechanismen bezeichnet man als *Immune Escape-Mechanismen*. Verluste oder Veränderungen von Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie führen beispielsweise dazu, dass T-Zellen nicht mehr dazu in der Lage sind, die Tumorzellen als maligne zu erkennen. So lassen sich häufig eine verminderte Expression bzw. ein kompletter Verlust der TAA selbst^{51,52}, von Proteasomen-Untereinheiten⁵³ oder der TAP-Proteine⁵⁴ in Tumorzellen feststellen. Die Präsentation von TAA kann jedoch auch durch fehlende Expression der HLA-Moleküle unterbunden werden. Dabei ist der Verlust einzelner HLA-Allele^{55,56}, von HLA-Haplotypen⁵⁷ und ein kompletter HLA-Klasse I-Verlust aufgrund von Mutationen in beiden β2-Mikroglobulingenloci⁵⁸ möglich⁵⁹. HLA-Verlustvarianten sollten, bedingt durch die Abwesenheit von inhibierenden KIR-Liganden (**K**iller-inhibierende **R**ezeptoren), wiederum sensibler gegenüber einer NK-Zellvermittelten Lyse sein⁶⁰. Jedoch haben Tumorzellen auch hier Mechanismen entwickelt, einer Zerstörung durch NK-Zellen zu entgehen, wie beispielsweise durch Veränderungen der Expressionslevels der stressinduzierten Liganden für aktivierende Rezeptoren MICA (engl. **M**HC **c**lass **I** **p**olypeptide-related **s**equences **A**) und MICB oder ULBP-1 (**U**L16-**b**indendes **P**rotein)⁶¹ bzw. deren löslicher Isoformen^{62,63}. Auch durch die

Expression von nicht-klassischen HLA-Molekülen wie HLA-G, welche normalerweise in Trophoblasten exprimiert werden, um eine Abstoßungsreaktion des mütterlichen Immunsystems gegen semi-allogene Föten zu verhindern, werden CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen in ihrer Zytotoxizität supprimiert^{64,65}.

Die T-Zellaktivierung hängt stark von dem Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibitorischen kostimulatorischen Molekülen ab, wodurch Tumorzellen eine weitere Möglichkeit geboten wird, sich einer Immunelimination zu entziehen. So können Tumorzellen beispielsweise durch Hochregulation der Genexpression koinhibitorischer Moleküle wie PD-L1⁶⁶ (engl. **programmed death ligand 1**), PD-L2 und HVEM⁶⁷ (engl. **herpesvirus entry mediator**) bzw. durch Herabregulation kostimulatorischer Moleküle, wie CD80 und CD86, die Proliferation und Funktionalität von Effektor-T-Zellen manipulieren bzw. Toleranz und „Erschöpfung“ induzieren^{27,68}.

Tumorzellen können zudem direkt in den Immunzellen Apoptose induzieren, wie z.B. durch die Dysregulation des FasL-FasR-Signalwegs⁶⁹ bzw. durch eine Überexpression des proapoptotischen Liganden RCAS (engl. **receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells**)⁷⁰.

Ein weiterer Mechanismus, eine Elimination durch das Immunsystem zu umgehen, ist die Sekretion/Expression immunsuppressiver Moleküle, wie TGF- β (engl. **transforming growth factor β**)⁷¹, IL-10⁷², VEGF (engl. **vascular endothelial growth factor**)⁷³, Gal-1 (**Galectin**)⁷⁴ oder PGE₂ (**Prostaglandin E2**)⁷⁵. Diese inhibieren lokal die Funktionalität, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und DC.

Auch die gesteigerte Expression von Enzymen des Aminosäurestoffwechsels kann eine Immunevasion von Tumorzellen zur Folge haben. Das Tryptophan-katabolisierende Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) katalysiert die Oxidation von Tryptophan zu N-Formyl-L-kynurenin. Durch eine Überexpression kommt es im Tumormikromilieu zu einem Mangel an Tryptophan und einem Überschuss an für die T-Zellen proapoptotischen Abbauprodukten^{43,76}. Zudem wird eine Differenzierung von T_{reg} forciert⁷⁶. Da auch Arginin für T-Zellen eine essentielle Aminosäure darstellt, führt auch eine lokale Arginindepletion, bedingt durch eine Überexpression des Enzyms Arginase, welches Arginin zu Ornithin metabolisiert, zur Inhibition von T-Zellen. Dieser Effekt beruht insbesondere auf einer durch Argininmangel bewirkten Modulation der CD3 ζ -Ketten-Expression und der damit einhergehenden verminderten T-Zell-Proliferation^{77,78}.

Außerdem sind Tumorzellen dazu befähigt, durch Zytokin- oder Chemokinproduktion immunsupprimierende Zellen des Immunsystems zu rekrutieren und zu aktivieren. Zu diesen zählen **regulatorische T-Zellen (Treg)**, M2-Makrophagen, MDSC (engl. **myeloid-derived suppressor cell**), regulatorische B-Zellen, IL-13-sekretierende NKT-Zellen (**natürliche Killer-T-Zellen**) oder tolerogene DC^{79–81}.

1.2.3 Malignom-assoziierte Antigene und deren Identifizierung

Bedingt durch die für Tumore charakteristische genetische Instabilität kommt es auf Tumorzellen zu Veränderungen einer Vielzahl von Oberflächenmerkmalen. Dies ermöglicht es dem Immunsystem, grundsätzlich zwischen gesunden und kanzerösen Zellen zu differenzieren. Einen Beweis hierfür lieferte beispielsweise 1991 die Identifizierung des ersten, durch CTL erkannten TAA, MAGE-A1 (engl. **melanoma-associated antigen-1**)⁸². Es folgten eine Vielzahl weiterer identifizierter Antigene/T-Zell-Epitope, deren detaillierte Informationen in den Datenbanken des *Cancer Research Institute* eingesehen werden können (<http://cancerimmunity.org/peptide/>). Prinzipiell lassen sich fünf Kategorien von TAA unterscheiden^{43,83}:

- Mutierte Antigene, wie beispielsweise CDK4 (engl. **cyclin-dependent kinase 4**)⁸⁴, B-RAF⁸⁵, K-ras (engl. **Kirsten rat sarcoma**)⁸⁶, FLT3-ITD (engl. **Fms-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplications**)⁸⁷ oder BCR-ABL⁸⁸ (engl. **breakpoint cluster region, Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1**), entstehen sowohl durch nicht-synonyme, somatische Punktmutationen als auch durch Chromosomenaberrationen während der Tumorentwicklung⁴³. Sie sind streng tumorspezifisch, häufig jedoch auch patientenspezifisch⁴³.
- Differenzierungsantigene werden von Tumorzellen, aber auch von normalen Zellen des Ausgangsgewebes exprimiert und bergen daher immer auch das Risiko einer Autoimmunreaktion⁴³. Während sich diese im Falle melanozytärer Differenzierungsantigene beim Melanom, wie Tyrosinase⁸⁹ oder gp100 (engl. **glycoprotein 100**)⁹⁰, meist auf die weniger riskante, oft mit verbesserter Prognose einhergehende Vitiligo beschränkt⁹¹, könnte sie bei Differenzierungsgenen anderen Ursprungs, wie beispielsweise dem carcinoembryonalen Antigen (CEA)⁹² wesentlich gravierendere Auswirkungen haben⁹³.
- Überexprimierte Antigene resultieren aus der hochregulierten Expression bestimmter Proteine in der Tumorzelle⁴³. Die Selbsttoleranz kann hier unter Umständen umgangen werden durch die um ein Vielfaches höhere Präsenz des Antigens auf Tumorzellen im Vergleich zu normalem Gewebe. Jedoch besteht auch immer das Risiko einer Autoimmunreaktion. Beispiele hierfür sind unter anderem HER-2⁹⁴ (engl. **human epidermal growth factor receptor 2**), MUC-1⁹⁵, WT1⁹⁶ (engl. **Wilms tumor 1**) und PRAME⁹⁷ (engl. **preferentially expressed antigen of melanoma**).
- **Cancer/Germine**-(GC)-Antigene kommen durch epigenetische Alterationen in Tumoren zur Expression. Da sie normalerweise nur von HLA-negativen testikulären Keimzellen und Trophoblastzellen exprimiert werden, können auch Antigene dieser Untergruppe als tumorspezifisch angesehen werden⁹⁸. Dazu zählen z.B. sämtliche Mitglieder der MAGE-Familie sowie beispielsweise NY-ESO⁹⁹ (engl. **New York esophageal squamous cell carcinoma**).
- Virale Antigene werden als Folge viraler Infektionen, wie beispielsweise durch das Epstein-Barr-Virus (EBV)¹⁰⁰ oder das humane Papillomavirus (HPV)¹⁰¹, welche häufig in Zusammenhang mit der Entstehung von Malignomen gebracht werden, tumorspezifisch exprimiert⁴³.

Für die Identifizierung von TAA stehen diverse Methoden zur Verfügung⁴³. Im T-zellbasierten Expressionsscreening werden Targetzellen nach Kotransfektion von Tumor-cDNA-Banken (komplementäre DNA, engl. **complementary DNA**) mit den entsprechenden HLA-Molekülen auf eine spezifische Erkennung durch tumorreaktive T-Zellen gescreent⁸². Des Weiteren können Peptide von MHC-Klasse I-Molekülen auf Tumorzellen oder MHC-Klasse II-Molekülen auf Tumorlysat-beladenen DC eluiert und durch LC-MS, einer Kombination von HPLC (engl. **high pressure liquid chromatography**) und Massenspektrometrie (MS), charakterisiert werden¹⁰². Die Basis von SEREX (engl. **serological identification of antigens by recombinant expression cloning**) beruht auf der Erkennung bestimmter Klone einer Tumor-cDNA-Bank durch die in den Seren von Tumorpatienten enthaltenen Antikörper^{103,104}. Da eine Antikörperproduktion der Plasmazellen auf die Aktivierung durch T-Helferzellen angewiesen ist, wird davon ausgegangen, dass die ermittelten Antigene auch Zielmoleküle von T-Helferzellen sein können. In der reversen Immunologie erfolgt eine *in silico*-Vorhersage von

potentiell immunogenen Epitopen tumorrelevanter Proteine aufgrund verschiedener HLA-Bindealgorithmen und bekannter Proteasomschnittstellen¹⁰⁵. Mögliche Kandidatenantigene werden hierbei durch *microarray*-basierte Genexpressionsprofile oder *next generation sequencing* (NGS) von Tumoren im Vergleich zu normalem Gewebe ermittelt⁴³.

1.2.4 Zelluläre Immuntherapie bei Malignomen

Krebsimmuntherapie beinhaltet die direkte Verwendung von Komponenten des Immunsystems bzw. deren Modifikation, um eine erfolgreiche Therapie von Malignomen zu erreichen¹⁰⁶. Schon Ende des 19. Jahrhunderts erzielte William Coley erste krebsimmuntherapeutische Erfolge, indem er hitzeinaktivierte Pathogene der Gattung *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* intratumoral applizierte und Tumorremissionen erwirkte¹⁰⁷. Seit ihrer Geburtsstunde hat sich die Immuntherapie in den letzten hundert Jahren neben der Resektion, der Chemo- und der Strahlentherapie, zu einer vielversprechenden Alternative in der Bekämpfung von Tumorerkrankungen entwickelt. Man unterscheidet zwischen passiver und aktiver Immuntherapie. Unter passiver Immuntherapie werden Ansätze, wie beispielsweise die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT), der adoptive T-Zelltransfer, der TCR-Transfer oder die Gabe TAA-spezifischer Antikörper zusammengefasst^{43,108}. Bei der aktiven Immuntherapie wird versucht, durch Vakzinierung und die Modulation kostimulatorischer/-inhibitorischer Moleküle, wie beispielsweise die Blockade von CTLA-4 oder PD-1 bzw. PD-L1, eine Tumorelimination durch das im Patienten vorhandene Immunsystem zu erreichen^{43,108}.

1.2.4.1 Stärkung des körpereigenen Immunsystems

Im Gegensatz zu präventiven Vakzinen, die darauf abzielen, Virus-induzierten Tumoren vorzubeugen, indem sie eine Infektion mit dem Tumor-initiiierenden Krankheitserreger verhindern, wird bei der therapeutischen Vakzinierung versucht, bereits existierenden Tumoren durch Stimulation des körpereigenen Immunsystems entgegenzuwirken¹⁰⁹. Dafür können beispielsweise unmodifizierte oder gentransfizierte, autologe oder allogene Tumorzellen, für Tumorantigene kodierende Plasmid-DNA bzw. mRNA (Boten-Ribonukleinsäure, engl. *messenger RNA*), Peptide oder mit Tumorlysat bzw. mit Peptiden beladene DC mit oder ohne Adjuvantien appliziert werden¹¹⁰. Derzeit werden eine Vielzahl an Vakzinen in klinischen Studien erprobt¹¹¹. Mit PROVENGE® (sipuleucel-T) ist bisher jedoch nur ein einziges zugelassenes Produkt auf dem Markt¹¹². Dabei werden autologe APC mit einem Fusionsprotein aus GM-CSF (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) und der von über 95 % der Prostatakarzinomzellen exprimierten prostataspezifischen sauren Phosphatase (PSP) beladen und dem Patienten reinfundiert^{112,113}. Elementarer Nachteil der therapeutischen Vakzinierung in der bisher angewandten Form ist jedoch, dass dabei immunologische Barrieren nicht adressiert worden sind, wie dies bei der Blockade von *Checkpoint*-Molekülen der Fall ist¹¹⁴. *Checkpoint*-Moleküle, wie beispielsweise CTLA-4, PD-1 oder PD-L1, haben normalerweise die Aufgabe, überschießende Immunreaktionen zu drosseln bzw. Autoimmunität zu verhindern¹¹⁵. Tumorzellen nutzen u.a. diese inhibitorischen Moleküle, um sich einer Elimination durch das Immunsystem zu entziehen (vgl. Abschnitt 1.2.2)¹¹⁵. Die klinischen Erfolge der Blockade von CTLA-4, PD-1 und PD-L1 beweisen, dass es präexistierende antitumorale T-Zellantworten in Patienten gibt, die bei Wegfallen natürlicher Barrieremechanismen in einem beträchtlichen Teil von Patienten mit metastasierter Erkrankung dauerhafte komplette Remissionen induzieren können¹¹⁶. Die Kombination der therapeutischen Impfung

mit Checkpoint-Blockade zur Steigerung der Erfolgsrate wird in aktuellen und in in Planung befindlichen Studien adressiert.

1.2.4.2 Allogene Blutstammzelltransplantation (allo-HSZT)

Die Geschichte der allo-HSZT geht zurück bis in die späten 1950er Jahre, als Thomas und Kollegen bei einem letal bestrahlten Patienten mit akuter Leukämie eine erfolgreiche Rekonstitution des hämatopoetischen Systems nach syngener Knochenmarkstransplantation zeigen konnten¹¹⁷. 1977 gelang es ihnen schließlich, eine erfolgreich Kuration von Leukämiepatienten im Endstadium durch die Transplantation von Knochenmark HLA-kompatibler Geschwister zu demonstrieren¹¹⁸. Und noch heute ist eine allo-HSZT für hämatologische Malignome, insbesondere für AML-Patienten (**akute myeloische Leukämie**) mit einem hohen Rezidivrisiko oder nach einem Rückfall, die einzig kurative Behandlungsmethode^{119–122}. Bei der allo-HSZT wird zunächst in einer Konditionierungsphase durch Chemo- oder Strahlentherapie das patienteneigene Knochenmark eliminiert, um einer Abstoßung des Transplantats durch das Immunsystem des Patienten vorzubeugen. Nach Wiederherstellung der Hämatopoese durch die allo-HSZT verursachen die im Transplantat enthaltenen Spenderlymphozyten den therapeutisch erwünschten Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (GvL, engl. *graft-versus-leukemia*) und die unerwünschte, zum Teil lebensbedrohliche Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD, engl. *graft-versus-host disease*)¹. Die allo-HSZT birgt daher neben der Chance einer Kuration und des verminderten Rezidivrisikos auch erhebliche Nachteile. So kommt es aufgrund der GvHD, die sich größtenteils gegen Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt des Patienten richtet^{123,124}, und des damit verbundenen erhöhten Infektionsrisikos zu einer recht hohen Morbidität sowie Mortalität¹¹⁹. Sowohl GvHD als auch GvL-Effekt werden im Wesentlichen von T-Lymphozyten vermittelt, was von einer erhöhten Rückfallquote bei Patienten nach einer T-Zell-depletierten allo-HSZT untermauert wird¹²⁵. Das Ausmaß einer GvHD kann jedoch durch die selektive Depletion alloreaktiver T-Zellen vermindert werden¹²⁶. Durch nicht-myeloablative Konditionierung kann zudem die Toxizität des Verfahrens erheblich herabgesetzt werden¹²⁷.

Im Falle eines Rezidivs oder zur Beseitigung der minimalen Resterkrankung (MRD, engl. *minimal residual disease*) haben sich DLI (**D**onor-**L**ymphozyten-**I**nfusionen) als äußerst wirkungsvoll erwiesen^{128,129}. Dabei werden Lymphozytenpräparate des ursprünglichen Stammzellondonors genutzt, um den GvL-Effekt im Patienten zu verstärken¹³⁰. Eine komplette Remission konnte insbesondere bei rezidivierenden **chronischen myeloischen Leukämien** (CML), aber auch bei AML, **akuten lymphatischen Leukämien** (ALL), dem multiplen Myelom, Non-Hodgkin-Lymphom und Myelodysplastischen Syndrom erreicht werden^{131,132}, was erneut die enorme Bedeutung von T-Lymphozyten für die Tumorkontrolle demonstriert^{128,129}.

1.2.4.3 Adoptiver Transfer antigenspezifischer T-Zellen

Adoptive T-Zelltherapie umfasst die Infusion *ex vivo* expandierter bzw. genmodifizierter, tumorreaktiver Effektor-T-Zellen (**Abb. 1.6**) und bietet ebenfalls vielversprechende Behandlungsstrategien für Malignome.

In der TIL-Therapie werden **Tumor-infiltrierende Lymphozyten** direkt aus frisch resektiertem Tumorgewebe isoliert und mit OKT3 und/oder IL-2 expandiert, bevor sie dem Patienten infundiert werden (**Abb. 1-6 A**). In den transferierten TIL sind tumorreaktive T-Zellen nachweislich angereichert¹³³.

Eindrückliche Erfolge wurden insbesondere von S. A. Rosenberg und Kollegen in der Therapie maligner Melanome demonstriert. Sie erzielten bei 22 % der Patienten eine komplette, andauernde Remission und beobachteten eine Ansprechrates von 49-72 %¹³⁴. Jedoch liegen die Nachteile der TIL-Therapie klar auf der Hand: Sie ist nicht nur zeitaufwändig und kostenintensiv, auch kann durch die *Ex vivo*-Inkubation mit IL-2 eine Expansion regulatorischer T-Zellen initiiert werden, die die anti-tumorale Immunantwort vermindert¹³⁵. Zudem ist die TIL-Therapie derzeit weitestgehend noch auf Melanome beschränkt, da sich die Gewinnung tumor-reaktiver Lymphozyten anderer Malignome als problematisch erweist¹³⁶. Auch *ex vivo* durch peptidbeladene DC-stimulierte und expandierte T-Zellklone gegen TAA wie Melan-A/MART-1, gp100, oder EBV-Antigene bei EBV-assoziierten Malignomen, zeigen erste klinische Erfolge (**Abb. 6-1 C**)¹³⁷⁻¹³⁹. Jedoch befindet sich die Entwicklung auch hier erst in der Anfangsphase und die Anwendung ist, bedingt durch die oft sehr niedrigen Frequenzen zirkulierender, tumorreaktiver Lymphozyten, meist sehr aufwändig oder nicht realisierbar¹³³.

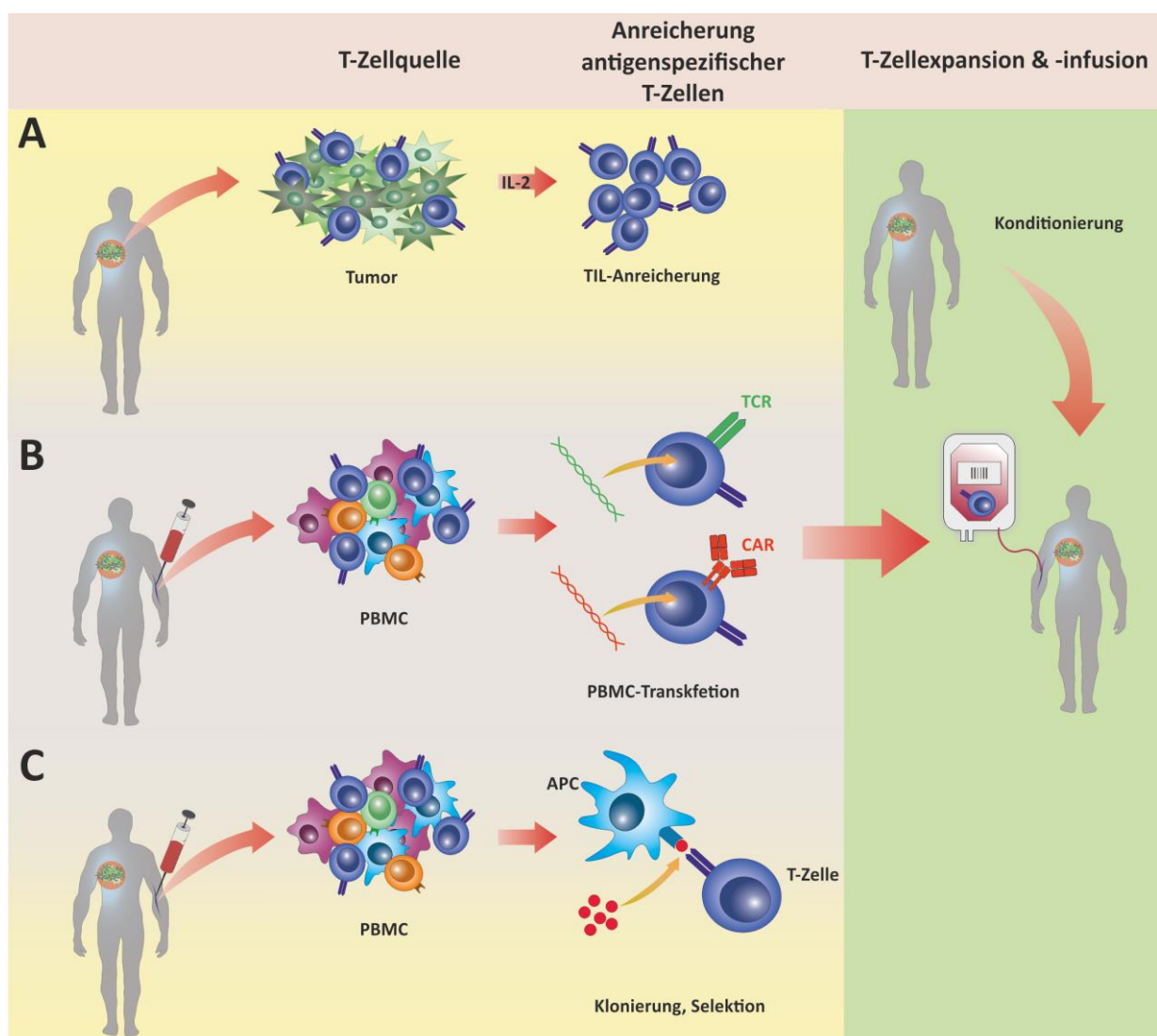


Abb. 1-6: Überblick über das Methodenrepertoire spezifischer adoptiver T-Zelltherapie. Bei der TIL-Therapie werden TIL aus Tumorgewebe isoliert und *in vitro* expandiert (**A**). Tumorreaktive T-Zellen können auch durch Transduktion mit TCR bzw. CAR generiert (**B**), oder durch Stimulation mit peptidbeladenen DC (**C**) angereichert werden. Vor der Infusion expandierter, tumorreaktiver T-Lymphozyten erhalten die Patienten eine lymphodepletierende Konditionierung. Vgl. Haupttext in Abschnitt 1.2.4.3 und Abschnitt 1.2.4.4 für detaillierte Informationen. APC: antigenpräsentierende Zelle (engl. antigen presenting cell); CAR: chimärer Antigenrezeptor; DC: dendritische Zellen (engl. dendritic cells); IL-2: Interleukin 2; PBMC: engl. peripheral blood mononuclear cells; TCR: T-Zellrezeptor (engl. T cell receptor); TIL: Tumor-infiltrierende Lymphozyten. Adaptiert aus Yee, 2013¹⁴⁰.

1.2.4.4 Adoptiver Transfer genetisch modifizierter, antigenspezifischer T-Zellen

Um die oben genannten Limitierungen von allo-HSZT und TIL-Therapie zu umgehen, richtet sich das Augenmerk derzeitiger Forschung im Bereich der adoptiven T-Zelltherapie auf die Verwendung genetisch modifizierter T-Zellen. So kann die Funktionalität von T-Zellen beispielsweise durch Herabregulation von BID (engl. *BH3 interacting-domain death agonist*)¹⁴¹, Hochregulation von BCL-XL (engl. *B-cell lymphoma-extra large*)¹⁴² oder BCL-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*)¹⁴³, Insertion eines mutierten CTLA-4-Gens¹⁴⁴ oder von Zytokinrezeptoren¹⁴⁵ signifikant erhöht werden.

Insbesondere jedoch bietet die meist retrovirale Ausstattung von T-Lymphozyten mit antigenspezifischen Rezeptoren aussichtsreiche Ansätze für T-zellbasierte Tumormimmuntherapien (**Abb. 1-6 B**). Hierbei unterscheidet man prinzipiell zwei Arten von Antigenrezeptoren, natürlich vorkommende oder modifizierte T-Zellrezeptoren und artifizielle chimäre Antigenrezeptoren (CAR). Während T-Zellrezeptoren aus einer α - und einer β -Kette bestehen (vgl. Abschnitt 1.1.2), setzen sich CAR aus der variablen Domäne eines tumorantigenspezifischen Antikörpers, einer extrazellulären „Gelenk“-Region, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Signaldomäne zusammen (**Abb. 1.7**)¹⁴⁶.

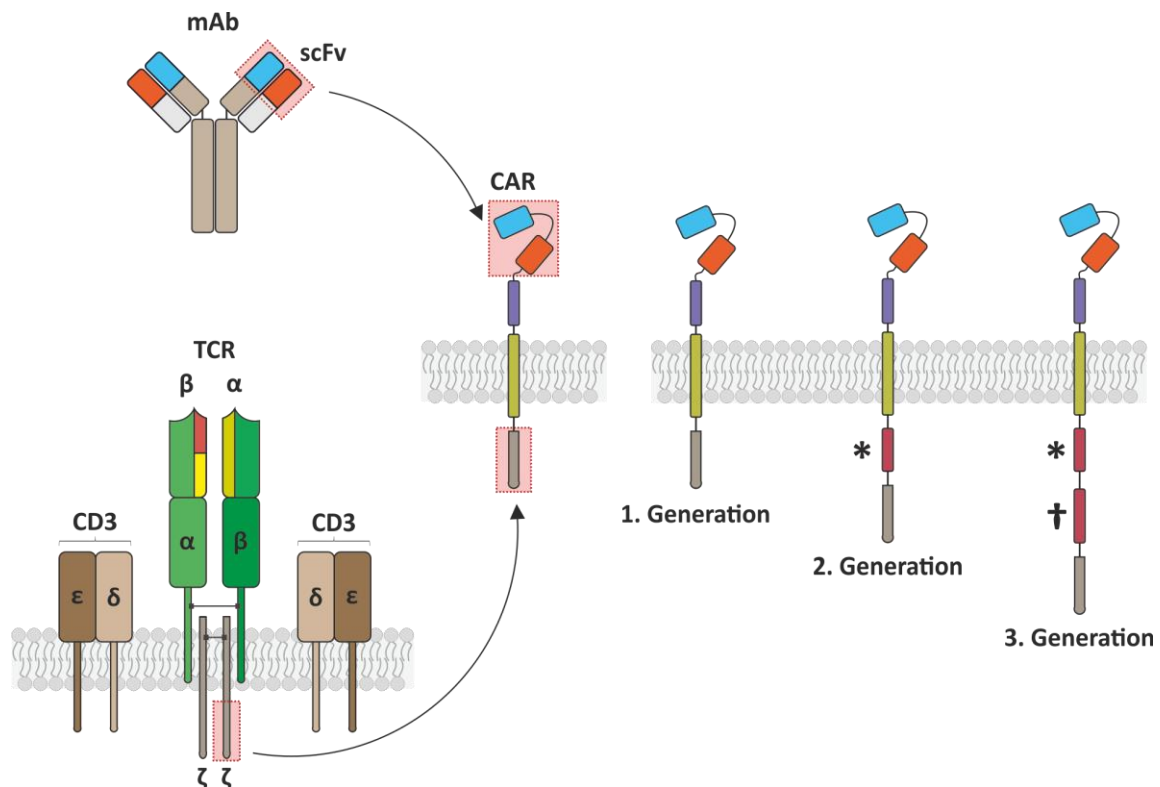


Abb. 1-7: Schematischer Aufbau eines TCR im Vergleich zu einem CAR. Vgl. Haupttext für detaillierte Informationen. (*), (+): Kostimulatorische Domänen [(z.B. CD28 (*)) oder OX-40 (+)]. CAR: chimärer Antigenrezeptor; mAb: monoklonaler Antikörper (engl. *monoclonal antibody*); scFv: engl. *single chain variable fragment*; TCR: T-Zellrezeptor (engl. *T cell receptor*). Adaptiert aus Heczey und Louis, 2013¹⁴⁶ bzw. Murphy, 2012¹.

Bei CAR der ersten Generation stellte die CD3 ζ -Kette die Signaldomäne dar, die nach Bindung des CAR an sein spezifisches Antigen eine T-Zellaktivierung initiiert¹⁴⁷. Aufgrund des für eine effiziente und dauerhafte T-Lymphozytenaktivierung benötigten kostimulatorischen Signals wurden dem CAR-Konstrukt in der zweiten Generation kostimulatorische Domänen hinzugefügt, wie beispielsweise CD27, CD28 oder ICOS (engl. *inducible costimulation*)^{146,148}. CAR der dritten Generation zeichnen sich durch

zusätzliche Signaldomänen aus, wie z.B. 4-1BB oder OX-40, die die Signaltransduktionskapazität optimieren^{146,148}. CAR bieten gegenüber TCR den Vorteil, dass sie ihre Zielantigene unabhängig von MHC-Molekülen erkennen können und somit auch zu einer spezifischen Erkennung von Glykolipiden und Kohlenhydraten befähigt sind¹⁴⁷.

Sowohl mit CAR, wie beispielsweise dem CD19-reaktiven CAR in der Therapie von B-Zell-Malignomen^{149–151}, als auch mit TCR-transgenen T-Zellen, z.B. in der Therapie von Kolorektalkarzinomen¹⁵², Melanomen¹⁵³ oder Synovialsarkomen¹⁵⁴, wurden bereits beträchtliche klinische Erfolge erzielt. Die größten Risiken für den adoptiven TCR-Transfer bestehen in der Fehlpaarung des exogenen mit dem endogenen TCR, wodurch nicht nur die TCR-Expression vermindert wird, sondern auch TCR-Dimere mit unvorhersehbaren und potentiell gefährlichen Spezifitäten gebildet werden, die Autoimmunreaktionen hervorrufen können¹⁵⁵. Jedoch hat auch die Anwendung von CAR diverse Kehrseiten. So weisen CAR-transgene T-Zellen aufgrund der Expression fremder bzw. artifizierender Genprodukte und der damit einhergehenden Immunogenität häufig nur eine geringe Lebensspanne auf¹⁵⁶. Zudem haben sie *in vivo*, bedingt durch das im Vergleich zur klassischen TCR-Aktivierung limitierte Repertoire an Signaltransduktionsdomänen und kostimulatorischen Molekülen, häufig nur eine eingeschränkte Funktionalität und unterliegen einem höheren Risiko anerg zu werden¹⁵⁶.

1.3 Das Melanommodell Ma-Mel-86

Das Melanommodell Ma-Mel-86/INTH¹⁵⁷ (freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt) entstammt einer Melanompatientin, die trotz Hirn- sowie zahlreicher Lymphknotenmetastasen über acht Jahre nach Diagnose des Primärtumors überlebte (**Abb. 1-8**)⁴³.

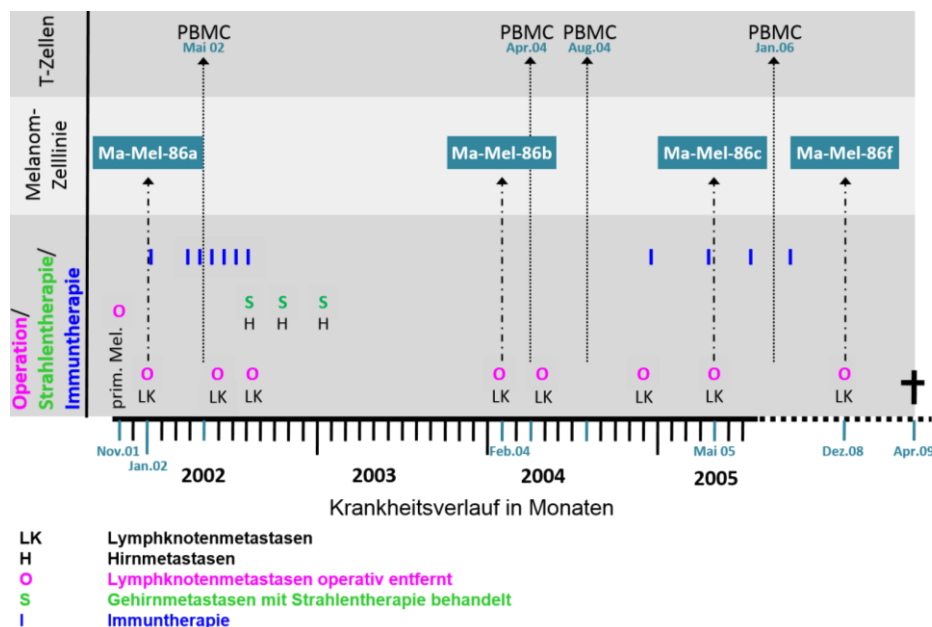
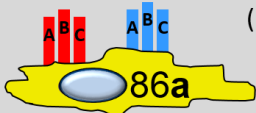
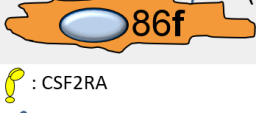


Abb. 1-8: Krankheits- und Behandlungsverlauf der Melanompatientin Ma-Mel-86/INTH. Gezeigt sind die Zeitpunkte der Resektion der Lymphknotenmetastasen sowie eine Übersicht über die daraus generierten Melanomlinien, die Zeitpunkte der strahlentherapeutischen Behandlung der Gehirnmetastasen, der Immuntherapien und die Entnahmedaten von PBMC im Zeitraum von der Resektion des Primärtumors bis zum Ableben der Patientin (vgl. Haupttext für detaillierte Informationen), PBMC: mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (engl. *peripheral blood mononuclear cells*). Adaptiert aus der Dissertation von [REDACTED] (geborene [REDACTED])⁴³

Die Behandlung der Hirnmetastasen erfolgte durch Strahlentherapie, wohingegen die Lymphknotenmetastasen operativ entfernt wurden⁴³. Im Rahmen einer Immuntherapie zu Beginn der Erkrankung erfolgten zunächst Vakzinierungen mit zwei Tyrosinase-Peptiden (KSDICTDEY/HLA-A*01 und AFLPWHRLF/HLA-A*24) und autologen Tumorzellen (2002). Zudem wurden der Patientin mehrere Zyklen IFN- α und IL-2, sowie Ganglioside, KLH (engl. (engl. **Keyhole Limpet Hemocyanin**) und BCG (**Bacillus Calmette-Guérin**) verabreicht. Im späteren Verlauf der Erkrankung erhielt die Patientin Vakzinierungen mit Tumorlysat-beladenen DC (2005-2007)⁴³. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden der Patientin mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC, engl. **peripheral blood mononuclear cells**) entnommen⁴³. Zudem wurden aus vier unterschiedlichen Lymphknotenmetastasen stabile Melanomzelllinien generiert (Ma-Mel-86a, -86b, -86c und -86f)⁴³. Durch Stimulation von PBMC mit den autologen Tumorzellen wurde in sogenannten gemischten Lymphozyten-Tumorzellkulturen (MLTC, engl. **mixed lymphocyte-tumor cell culture**) die Expansion tumorreaktiver CTL ermöglicht, welche im Folgenden der Identifizierung tumorassoziierter Antigene dienten⁴³.

Alle vier Melanomzelllinien weisen charakteristische Merkmale vermeintlicher *Immune Escape*-Mechanismen auf (**Abb. 1-9**). So zeichnet sich Ma-Mel-86a durch die fehlende Expression von melanosomalen Differenzierungsantigenen, darunter gp100, TRP-2 (engl. **tyrosinase-related protein 2**) und Tyrosinase aus. Ma-Mel-86c ist gekennzeichnet durch einen HLA-Klasse I-Haplotyp-Verlust, wohingegen Ma-Mel-86b und -86f aufgrund biallelischer Deletionen im Bereich des β 2-Mikroglobulin-Genlokus keinerlei HLA-Klasse I-Moleküle mehr exprimieren. Zudem wurde eine lymphoblastische B-Zelllinie (INTH-EBV-B) durch Immortalisierung mit EBV generiert⁴³.

Ma-Mel-	HLA-A	HLA-B	HLA-C
 (2002) 86a	-A*01:01 -A*24:02	-B*08:01 -B*15:01	-C*07:01 -C*03:03
 (2004) 86b	-	-	-
 (2005) 86c	-A*01:01	-B*08:01	-C*07:01
 (2007) 86f	-	-	-

 : CSF2RA
  : defizient für melanosomale Differenzierungsantigene
 : TRP-2
  : Expression melanosomaler Differenzierungsantigene

Abb. 1-9: Phänotypische Merkmale der Melanomlinien im Melanommodell Ma-Mel-86. Dargestellt sind die Expressionsmuster von MHC-Klasse I-Molekülen, melanosomalen Differenzierungsantigenen und den Antigenen TRP-2 sowie CSF2RA für die einzelnen Melanomlinien des Modells Ma-Mel-86. Vgl. Haupttext in Abschnitt 1.3 und Abschnitt 1.3.1 für detaillierte Informationen. CSF2RA: engl. *GM-CSF receptor alpha chain*; Syn. *colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low affinity (granulocyte-macrophage)*; TRP-2: engl. *tyrosinase-related protein 2*; Syn. *dopachrome tautomerase*. Adaptiert aus der Dissertation von [REDACTED] (geborene [REDACTED])⁴³.

1.3.1 HLA-unabhängige T-Zellreaktivität im Melanommodell Ma-Mel-86

Mittels Expressionsscreening von cDNA-Banken der Melanomzelllinien Ma-Mel-86a und -86c mit autologen tumorreaktiven T-Zellklonen wurden im Rahmen der Dissertation von [REDACTED] (geborene

██████████) bekannte sowie unbekannte Antigene identifiziert, wie beispielsweise Tyrosinase, gp100, CSPG4 (engl. *chondroitin sulfate proteoglycan 4*) und ein mutiertes HERPUD1-Allel (HERPUD-G161S, engl. *homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1*)⁴³.

Neben HLA-restringierten CTL wurden in diesem Modell jedoch auch diverse $\alpha\beta$ -TCR⁺ T-Zellklone expandiert, die nicht nur Ma-Mel-86a und -86c erkannten, sondern auch Reaktivität gegenüber den HLA-defizienten Tumorzelllinien Ma-Mel-86b und -86f zeigten⁴³. Dabei konnte zwischen vier CTL-Spezifitäten differenziert werden, die sich in charakteristischer Weise hinsichtlich ihres Erkennungsmusters der autologen Melanomzelllinien unterschieden⁴³. Alle HLA-unabhängigen CTL exprimierten CD8 und $\alpha\beta$ -TCR, aber nicht die NK-Zellmarker CD16/CD56 und nicht $\gamma\delta$ -TCR⁴³. Zudem waren sie lediglich durch einen gegen CD3 gerichteten Antikörper blockierbar, jedoch nicht mit HLA-Klasse I- oder HLA-Klasse II-spezifischen Antikörpern⁴³. Für zwei dieser offenkundig HLA-unabhängigen CTL war es bereits möglich, die entsprechenden Antigene zu identifizieren (**Abb. 1-9**). Es handelte sich dabei um das auf Ma-Mel-86b, -86c und -86f exprimierte melanozytäre Differenzierungsantigen TRP-2 (engl. *tyrosinase-related protein 2*; Syn. *dopachrome tautomerase*) sowie um die in Ma-Mel-86b und -86c exprimierte α -Kette des GM-CSF-Rezeptors (GM-CSFR, engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor*), bezeichnet als CSF2RA [engl. *GM-CSF receptor alpha chain*; Syn. *colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low affinity (granulocyte-macrophage)*]⁴³. Beide Antigene wurden auch nach ektopischer Expression in Hamster-, Maus- und Affenzellen sowie in Zellen humanen Ursprungs durch die entsprechenden CTL erkannt⁴³. Gegen CSF2RA gerichtete CTL zeigten Kreuzreaktivität gegenüber maligne transformierten Zellen diversen Ursprungs, wie AML, Pankreas-, Lungen-, Ovarial- und Gallenblasenkarzinomlinien sowie weiteren allogenen Melanomen⁴³.

HLA-unabhängige, TCR-vermittelte Antigenerkennung durch T-Lymphozyten bietet hinsichtlich krebsimmuntherapeutischer Fragestellungen erhebliche Vorteile. So wird nicht nur eine enorme Erweiterung des immuntherapeutischen Repertoires für Patienten mit seltenen HLA-Phänotypen ermöglicht, sondern auch verschiedenen *Immune Escape*-Mechanismen, wie HLA-Verlust oder Veränderungen der Antigenprozessierungsmaschinerie, entgegengewirkt⁴³.

1.3.2 Das TAA CSF2RA und der GM-CSF-Rezeptor

Der humane CSF2RA-Genlokus ist in der pseudoautosomalen Region (PAR) des kurzen Arms der Geschlechtschromosomen zu finden (Position p22.32 auf dem X-Chromosom, Position p11.3 auf dem Y-Chromosom; NCBI Referenzsequenz: NG_012280.1, NM_172245.2, NP_758448.1)¹⁵⁸. Kodiert werden von diesem 44 kb umspannenden Gen sowohl fünf membranständige, als auch drei lösliche Isoformen (www.uniprot.org; P15509). Das im cDNA-Bank-Expressionsscreening identifizierte, durch CD8⁺ $\alpha\beta$ -TCR⁺ T-Zellen HLA-unabhängig erkannte Antigen ist die durch die 1.831 bp lange Transkriptionsvariante 2 kodierte Isoform a⁴³ (Sequenz siehe Abschnitt 5.1.4). Diese membranständige und im Allgemeinen am stärksten vertretene Isoform wird von 13 Exons kodiert und besteht aus 400 Aminosäuren, wodurch sich eine errechnete molekulare Masse von ca. 40 kDa ergibt. Bedingt durch elf N-Glykosylierungsstellen im extrazellulären Bereich und unter anderem damit einhergehender posttranslationaler Modifikationen ergibt sich unter physiologischen Bedingungen jedoch ein Molekulargewicht von bis zu 84 kDa¹⁵⁹.

Das Protein stellt die α -Kette des GM-CSF-Rezeptors dar und weist zu seinem Liganden GM-CSF lediglich eine sehr geringe Affinität auf ($K_D = 0,8$ bis $1,2$ nM). Erst nach erfolgter Dimerisierung mit der β -Kette (CSF2RB, engl. *colony-stimulating factor 2 receptor, beta, low affinity*), welche gleichzeitig auch wesentlicher Bestandteil des IL-3- und IL-5-Rezeptorkomplexes ist (*common beta chain*), erfolgt eine Bindung des Liganden mit hoher Affinität ($K_D = 1$ bis 20 pM)^{160,161}. Aus vier heterotrimeren Proteinkomplexen, bestehend aus je einem GM-CSF-Molekül, einer α - und einer β -Kette, bildet sich ein komplizierter Dodekamerkomplex¹⁶². Beide Ketten des GM-CSF-Rezeptors werden der Hämatoepoetin-Rezeptorfamilie (Klasse I-Zytokinrezeptoren) zugeordnet. Diese sind gekennzeichnet durch vier konservierte Cysteinreste und ein konserviertes WSXWS-Motiv im extrazellulären Bereich¹⁶³. Nach der Aktivierung des Rezeptors durch Ligandenbindung werden im Wesentlichen drei unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden initiiert, nämlich der Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg (PI₃), der MAP-Kinase-Weg (engl. *mitogen-activated protein*) und die JAK-STAT-Signalkaskade (JAK = **J**anus**K**inase, STAT = engl. *signal transducers and activators of transcription*). Dadurch wird in rezeptortragenden Zellen Proliferation, Reifung und Differenzierung ausgelöst¹⁶⁴.

Exprimiert werden CSF2RA und der GM-CSF-Rezeptor hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen der myeloiden Reihe, wie beispielsweise Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, DC und deren Vorläuferzellen¹. Seine Präsenz wurde jedoch auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen, wie Endothelzellen, Fibroblasten, Oligodendrozyten, Astrozyten, Neuronen, Melanozyten und Trophoblastzellen postuliert^{165–171}. Die physiologische Bedeutung des GM-CSF-Rezeptors auf nicht-hämatopoetischen Zellen ist weitgehend ungeklärt. Für männliche Keimzellen wurde jedoch eine gesteigerte, GM-CSF-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Glucose und Vitamin C gezeigt¹⁶⁹. Auch scheint die GM-CSF-Rezeptor- α -Kette alleine über ein gesondertes physiologisches Funktionsrepertoire zu verfügen. So übt sie beispielsweise unabhängig von der β -Kette einen embryotropen Effekt aus, indem sie durch einen noch unbekannten Mechanismus die embryoblastische Apoptose inhibiert^{172,173}. Des Weiteren wurde eine direkte Interaktion von CSF2RA mit dem Lamininrezeptor oder Syndecan-2 beschrieben^{174,175}. Beide dieser membranständigen Moleküle sind an der Metastasierung von Tumoren beteiligt, weshalb auch für CSF2RA eine Rolle für Tumorzellmigration bzw. –adhäsion und einer damit einhergehenden erhöhten Aggressivität von Tumoren denkbar wäre^{176–178}.

Pathophysiologisch scheint CSF2RA bzw. der GM-CSF-Rezeptor vor allem bei der pulmonal-alveoläre Proteinose^{179–181} (PAP) und bei der Entstehung diverser myeloischer Leukämien sowie myeloproliferativen Erkrankungen eine elementare Rolle zu spielen^{182,183}. Außerdem wird er in Verbindung mit inflammatorischen Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoider Arthritis oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*) gebracht¹⁸⁴. Kürzlich wurde zudem ein Bezug einer GM-CSF-Herabregulation im Hippocampus zu Morbus Alzheimer postuliert¹⁶⁸. Auch wird die Expression von CSF2RA oder dem GM-CSF-Rezeptor auf einer Vielzahl maligne transformierter Zellarten beschrieben, wie beispielsweise Melanomen, Prostata-, Lungen-, Kolon-, Hirn-, sowie Kopf-Hals-, Nieren-, Magen- und Ovarialkarzinomzelllinien^{166,185–190}.

Für humane Melanomzellen wurde eine CSF2RA-vermittelte, kinaseunabhängige Steigerung der Glucoseaufnahme ohne Beteiligung der β -Kette gezeigt^{191,192}. Auch wenn diese nicht mit einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen einhergeht, besteht dennoch eine potentielle Korrelation zu daraus resultierenden Vorteilen für den Tumor⁴⁴. So haben Krebszellen nicht nur unter den häufig im

Tumor vorherrschenden hypoxischen Bedingungen und der damit einhergehenden anaeroben Glykolyse einen vermehrten Glucoseverbrauch. Auch konnte unter aeroben Bedingungen, insbesondere in Assoziation mit aktivierten Onkogenen oder mutierten Tumorsuppressorgenen, eine metabolische Umstellung innerhalb der Tumorzellen auf anaerobe Glykolyse gezeigt werden (Warburg-Effekt)¹⁹³. Sowohl Hypoxie als auch die Expression aktivierter Onkogene führen zu erhöhten Expressionsleveln der Transkriptionsfaktoren HIF1 α (engl. **Hypoxia-inducible factor 1-alpha**) und HIF2 α und in Folge zu einer gesteigerten Expression glykolyserrelevanter Enzyme und Glucosetransporter. CSF2RA scheint daher zu der für die Tumorpromotion charakteristischen Umstellung des Energiemetabolismus beizutragen^{43,44}.

Hinsichtlich immuntherapeutischer Fragestellungen erscheint CSF2RA insbesondere aufgrund seiner breit gefächerten Expression auf malignen transformierten Zellen unterschiedlichen Ursprungs als äußerst attraktive Zielstruktur.

1.4 Zielsetzungen der Arbeit

Um die HLA-unabhängige T-Zellantwort gegen CSF2RA näher zu charakterisieren, sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst weitere CSF2RA-reaktive CTL-Klone durch Stimulation von PBMC der Patientin Ma-Mel-86/INTH mit autologen Tumorzellen expandiert und kloniert werden. Aus einem CTL-Klon mit hoher CSF2RA-Reaktivität sollte dessen TCR in einen retroviralen Expressionsvektor kloniert und in allogenen PBMC exprimiert werden. Die transduzierten T-Zellen waren dann auf ihre Fähigkeit zu testen, CSF2RA⁺ Targetzellen zu erkennen. Durch den Austausch der humanen konstanten durch die homologen murinen Domänen, der als Chimärisierung bezeichnet wird, sollte der TCR bezüglich seiner Funktionalität weiter optimiert und anschließend hinsichtlich seiner Spezifität gegenüber normalen und malignen Zellen in IFN- γ -ELISpot- und Degranulations-Assays sowie in Zytotoxizitätstests eingehend charakterisiert werden, um sein therapeutisches Potential für eine klinische Anwendung und deren Sicherheit zu evaluieren.

Da bisher nur wenige Beispiele für eine HLA-unabhängige Antigenerkennung in der Literatur beschrieben sind, sollte in einem zweiten Teil dieser Arbeit der der HLA-unabhängigen CSF2RA-Erkennung zugrunde liegende, molekulare Mechanismus näher charakterisiert werden. Dazu war nicht nur die Erkennung von löslichem CSF2RA und der Einfluss der Assemblierung des kompletten GM-CSF-Rezeptorkomplexes auf die Erkennung durch den CSF2RA-reaktiven TCR zu analysieren. Auch sollte die Abhängigkeit MHC-unrestrictierter T-Zellerkennung von dem Korezeptor CD8 näher charakterisiert werden. Dafür waren die CD8-Moleküle diverser HLA-abhängiger sowie HLA-unabhängiger CTL aus verschiedenen Melanommodellen zu sequenzieren und die Auswirkung blockierender anti-CD8-Antikörper auf die Funktionalität HLA-abhängiger bzw. HLA-unabhängiger CTL zu vergleichen. Außerdem sollte in diesem Zusammenhang die Fähigkeit HLA-unabhängiger TCR evaluiert werden, nach Transduktion CD4-, CD8- sowie MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-negativer muriner Milzlymphozyten (Splenozyten) CSF2RA⁺ Targetzellen im IFN- γ -ELISpot zu erkennen.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

2.1.1.1 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Autoklaven	
Durchreichautoklav	Holzner/Nußloch, Deutschland
VX-150	Systec/Wettenberg, Deutschland
Automatic Gamma Counter Wizard	Perkin Elmer/Rodgau, Deutschland
Bakterienbrutschrank	Heraeus/Hanau, Deutschland
BD FACS Canto TM II	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
Brucheis-Automat	Ziegra/Isernhagen, Deutschland
¹³⁷ Cäsiumquelle Gamma cell 2000	Molsgaarg Medical/Gansloe, Denmark
Chemikalienwaage	Sartorius/Göttingen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator BBD6220	Heraeus/Hanau, Deutschland
Digital Graphic Printer UP-D890	Biometra, Sony/Göttingen, Deutschland
Dispenser Repeater® Plus	Eppendorf/Hamburg, Deutschland
Elektroporationsgerät GenePulser II, X cell TM	Bio-Rad GmbH/München, Deutschland
ELISpot-Analyse-System ImmunoSpot®	C.T.L. Europe GmbH/Bonn, Deutschland
Feinwaage Precisa 40SM-200A	PAG Oerlikan AG/Zürich, Schweiz
Geigerzähler Monitor LB1210D	BERTHOLD Technologies/Bad Wildbach, Deutschland
Geldokumentationsanlage BioDocAnalyzer	Biometra/Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoresekammern	PEQLAB/Erlangen, Deutschland
GenePower Supply GPS200/400	Pharmacia/Uppsala, Schweden
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf/Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipetten	Gilson/Middleton, USA
	Eppendorf/Hamburg, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch/Stuttgart, Deutschland
	Liebherr/Mainz, Deutschland
Magnete MiniMACS, µMACS	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch-Gladbach, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte IKAMAG®REC-G	Janke & Kunkel/Staufen, Deutschland
Magnetständer MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch-Gladbach, Deutschland
Mehrkanalpipetten	BIOHIT/Helsinki, Finnland
ErgoOne	Starlab/Ahrensburg, Deutschland
mLINE	BIOHIT/Helsinki, Finnland
Mikrowelle MWS2819	Bauknecht/Neunkirchen, Deutschland
Packard Cobra gamma counter	Perkin Elmer LAS GmbH/Rodgau, Deutschland
Peristaltikpumpe Econo Pump	Bio-Rad GmbH/München, Deutschland
Phasenkontrastmikroskope	
Axiovert 25	Zeiss/Jena, Deutschland
Eclipse TS100	Nikon/Alzenau, Deutschland
pH-Meter Toledo Five easy	Mettler-Toledo GmbH/Wertheim, Deutschland

Pipettierhilfe accu-jet®pro	Brand/Wertheim, Deutschland
Schüttelinkubator certomat® S II & H	Sartorius/Göttingen, Deutschland
Schwenker IKA-VIBRAX-VXR	Janke & Kunkel GmbH u. Co.KG IKA-Labortechnik/Staufen, Deutschland
Spektralphotometer Ultrospec 3000	Pharmacia/Freiburg, Deutschland
Spülmaschine G7883 CD	Miele Professional/Gütersloh, Deutschland
sterile Werkbänke	
antair BSK	Heraeus/Hanau, Deutschland
Hera safe	Heraeus/Hanau, Deutschland
Stickstoffbanken	
Chronos & Biosafe® KRYOMATC	Messer Griesheim/Bad Soden, Deutschland
MVE1400 Series	Cryo-Tech/Flemington, USA
Stickstoffvorratstank XL-180	Taylor-Wharton/Husum, Deutschland
Thermocycler T _{gradient} , T1, T3	Biometra/Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort, 5436	Eppendorf/Hamburg, Deutschland
Trockenschränke	
OV5	Biometra/Göttingen, Deutschland
Venticell	Medcenter Einrichtungen GmbH/Planegg, Deutschland
Vakuumpumpe ME2C	Vacuubrand GmbH + Co.KG/Wertheim, Deutschland
Wasserbad, beheizbar	GFL/Großburgwedel, Deutschland
Wasserdeionisierungsanlage	Elga Labwater/Celle, Deutschland
Wasserstrahlpumpe	Brand/Wertheim, Deutschland
Western Blot Blotkammer Criterion Blotter	Bio-Rad GmbH/München, Deutschland
Western Blot-Dokumentationsanlage	Bio-Rad GmbH/München, Deutschland
ChemiDoc™ MP System	
Western Blot Gelelektrophoresekammer	Thermo Fisher Scientific/Schwerte, Deutschland
MINIVE complete SE3000 - 10A-1.0	
Western Blot Electrophoresis Power Supply EPS 1001	Amersham Biosciences/Freiburg, Deutschland
Vortexer	
Lab dancer	VWR International GmbH/Darmstadt, Deutschland
REAX control, REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & CO.KG/Schwabach, Deutschland
VF2	Janke & Kunkel GmbH u. Co.KG IKA-Labortechnik/Staufen, Deutschland
Zentrifugen	
3S-R, Biofuge fresco	Heraeus/Hanau, Deutschland
Centrifuge 5424, 5415R	Eppendorf/Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific/Schwerte, Deutschland
Multifuge Rotina 420	Hettich/Tuttlingen, Deutschland

2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien, Plastik-/Glaswaren

Material	Bezugsquelle
Affinitätssäulen (HiTrap, 1 ml)	Amersham Biosciences/Freiburg, Deutschland
Autoklavier-Indikatorband	neoLab/Heidelberg, Deutschland
Bechergläser, Glas (0,5 l, 1,0 l, 2,0 l)	Jenaer Glas/Zwiesel, Deutschland

Bechergläser, Kunststoff (0,1 l, 0,2l, 0,5 l, 1,0 l)	Vitlab/Seeheim-Jugenheim, Deutschland
Dispenser Einmalspitzen RepeatOne®	Starlab/Ahrensburg, Deutschland
Duran-Glasflaschen (0,5 l, 1,0 l, 2,0 l, 5,0 l)	Schott/Mainz, Deutschland
Einfrierboxen	Nalge Nunc/Wiesbaden
Einfrierröhrchen	
Cryo-Röhrchen Cellstar®	Greiner bio-one/Nürtingen, Deutschland
Cryo Tube™ Vials	Nunc™/Roskilde, Dänemark
Einwegküvetten	ratilab® GmbH/Dreieich-Buchsschlag, Deutschland
Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner bio-one/Nürtingen, Deutschland
Einwegskalpelle	pfm medical/Köln, Deutschland
Einmalspritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml)	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
	B. Braun Melsungen AG/Melsungen, Deutschland
	Bio-Rad GmbH/München, Deutschland
Elektroporationsküvetten (0,1 cm, 0,2 cm, 0,4 cm)	VWR International GmbH/Darmstadt, Deutschland
	Merck Millipore/Eschborn, Deutschland
ELISpot-Platten	
(MultiScreen _{HTS} -IP, 0,45 µm, MSIPS4510;	
MultiScreen-IP, 0,45 µm, S2EM004M99)	
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH + Co.KG/Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf/Wesseling, Deutschland
(0,2 mm, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	
Erlenmeyerkolben (0,5 l, 1,0 l, 2,0 l)	Jenaer Glas/Zwiesel, Deutschland
	Schott/Mainz, Deutschland
FACS-Röhrchen (5ml)	Greiner bio-one/Nürtingen, Deutschland
Filtereinheiten (0,2 µm, 0,45 µm)	Whatman GmbH/Dassel, Deutschland
Filterpapier (3mm)	Whatman GmbH/Dassel, Deutschland
Handschuhe sempercare®	Semperit Technische Produkte GmbH/Wien, Österreich
Impfösen	Nunc™/Roskilde, Dänemark
Kanülen Sterican®	B. Braun Melsungen AG/Melsungen, Deutschland
MS-Säulen (Zellseparation)	Miltenyi Biotec/Bergisch Gladbach, Deutschland
	Amersham Biosciences/Freiburg, Deutschland
Nitrocellulosemembran	
(HyBond ECL 0,45 µm; 7x8 cm)	
NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Protein Gele,	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
1,0 mm; 12 well	
Nylon-Zellsiebe (70 µm) BD Falcon™	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
Parafilm®M	Thermo Fisher Scientific/Schwerte, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one/Nürtingen, Deutschland
Petrischalen (ø 35 mm, 60 mm und 94 mm)	Greiner bio-one/Nürtingen, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab/Ahrensburg, Deutschland
(0,5 µl-10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one/Nürtingen, Deutschland
Por®Dialysis Membrane	Thermo Fisher Scientific/Schwerte, Deutschland
Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch-Gladbach, Deutschland
Quarzküvetten	Pharmacia/Freiburg, Deutschland
Sterilfilter Stericup® (500 ml; 0,22 µm/0,45 µm)	Merck Millipore GmbH/Schwalbach, Deutschland

Sterilfilter Steritop™ (0,22 µm/0,45 µm)	Merck Millipore GmbH/Schwalbach, Deutschland
Thermopapier für schwarz/weiß Drucker K56HM-CR Zählkammern	Mitsubishi electric/Ratingen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Fuchs-Rosenthal, Schrenk/Hofheim, Deutschland
Zellkulturplatten (6-Loch-)	Greiner bio-one/Nürtingen, Deutschland
Zellkulturplatten (24-Loch-, 48-Loch-, 96-Loch-)	Costar, corning/Amsterdam, Niederlande
Zellschaber	Greiner bio-one/Nürtingen, Deutschland
Zellsiebe	Sarstedt/Nümbrecht, Deutschland
	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland

2.1.1.3 Chemikalien, Zusätze, Reagenzien, Medien

Chemikalie/Zusatz/Reagenz/Medium	Bezugsquelle
AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)-Tabletten	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH/Heidelberg, Deutschland
AIM-V® Medium	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
Albumin, bovines	Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Steinheim, Deutschland
Aluminiumsulfat-(14-18)-hydrat	Carl Roth AG/Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumacetat	Merck/Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Steinheim, Deutschland
Aqua	B. Braun Melsungen AG/Melsungen, Deutschland
Aqua ad. Iniectionabilia	B. Braun Melsungen AG/Melsungen, Deutschland
Azeton	Carl Roth AG/Karlsruhe, Deutschland
Bacto Agar	Difco/Stuttgart, Deutschland
BD Bacto™ Yeast Extract	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
Bacto Tryptone	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Merck/Darmstadt, Deutschland
Chrom ⁵¹ Radionuklid	Perkin Elmer/Rodgau, Deutschland
Concanavalin A (ConA)	Calbiochem/Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G-250	Carl Roth AG/Karlsruhe, Deutschland
Diethyl-Pyrocyanat (DEPC)	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck/Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Merck/Darmstadt, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Lonza/Köln, Deutschland
DNA-Molekulargewichtsmarker	Roche/Mannheim, Deutschland
Essigsäure	PEQLAB/Erlangen, Deutschland
Ethanol, absolut	Carl Roth AG/Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem GmbH/Darmstadt, Deutschland
ExpiFectamine™ 293 Expression Medium	Merck/Darmstadt, Deutschland
FACSClean™	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
FACSFlow™	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
FACSRinse™	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland

FCS (fötales Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH/Steinheim, Deutschland
Ficoll 400	PAA/Pasching, Österreich
Formaldehyd 37 %	Merck/Darmstadt, Deutschland
Formamid	Merck/Darmstadt, Deutschland
FuGene®6	Promega/Mannheim, Deutschland
Gelred	abcam/Cambridge, UK
Glycerol	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
Human Albumin Kalbi 20 %	Octapharm/Langenfeld, Deutschland
Humanserum (HS)	Transfusionszentrale Universitätsmedizin Mainz/Mainz, Deutschland
Interferon-gamma (IFN-γ)	R & D Systems/Wiesbaden, Deutschland
Isoamylalkohol	Merck/Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Thermo Fisher Scientific/Schwerte, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën/Seelze, Deutschland
Laemmli Sample Buffer, 2x	Serva/Heidelberg, Deutschland
L-Glutamin	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
Lipofectamine™2000	Life Technologies/Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck/Darmstadt, Deutschland
MEM α (engl. <i>Minimum Essential Medium</i>)	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
Methanol	J. T. Baker/Deventer, Niederlande
NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer (20x)	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
Milchpulver, Blotting Grade, fettarm	Carl Roth AG/Karlsruhe, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth AG/Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Merck/Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth AG/Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck/Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck/Darmstadt, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
OptiMEM	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck/Darmstadt, Deutschland
PBS (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
PBS-Pulver	Biochrom AG/Berlin, Deutschland
Phosphorsäure	Carl Roth AG/Karlsruhe, Deutschland
Phytohämagglutinin (PHA)	Biochrom AG/Berlin, Deutschland
Polybrene	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
Protein Assay	Bio-Rad GmbH/München, Deutschland
Protein Standard	Bio-Rad GmbH/München, Deutschland
Retronectin	Clontech/Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Roti®-Phenol/Chloroform (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol, 25:24:1)	Carl Roth AG/Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
SOC-Medium (engl. <i>super optimal broth with catabolite repression</i>)	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
TBE-Puffer (10x)	Serva Electrophoresis GmbH/Heidelberg, Deutschland
Towbin Transfer Buffer (10x)	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
Trichlorazetat (TCA)	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland

Tris-HCl	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
Tris (-hydroxymethyl)-aminoethan	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
Tris Puffer, pH8,0 1M	Serva/Heidelberg, Deutschland
Trizma® base	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Merck/Darmstadt, Deutschland
TripLE™ Express	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
Tween 20 %	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth AG/Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland

2.1.2 Molekular- und immunbiologische Kits

Kit	Bezugsquelle
5x Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, StarSEQ GmbH/Mainz, Deutschland
5x Sequenzierungspuffer	Applied Biosystems, StarSEQ GmbH/Mainz, Deutschland
Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
Dynabeads® Mouse T-Activator CD3/CD28	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences/Freiburg, Deutschland
ExpiFectamine™ 293 Expression Kit	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
High Pure® PCR Product Purification Kit	Roche/Mannheim, Deutschland
HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen/Hilden, Deutschland
Hi Trap™ Protein G HP (1 ml)	GE Healthcare Bio-Sciences AB/München, Deutschland
IOTest®BetaMark Kit	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
Mab Trap™ TMGII Kit	Amersham Biosciences/Freiburg, Deutschland
MultiSite Gateway® Pro Kit	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
pcDNA3.1™/V5-His TOPO® TA Expression Kit	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen/Hilden, Deutschland
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen/Hilden, Deutschland
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen/Hilden, Deutschland
QIAshredder™	Qiagen/Hilden, Deutschland
Quik change® Lightening Site-directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies/Kassel, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen/Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen/Hilden, Deutschland
Vectastain® Elite Kit	Vektor Laboratories/Burlingame, USA

2.1.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Advantage®2 Polymerase Mix	Clontech/Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	NEB/Frankfurt am Main, Deutschland
BP Clonase™ II Enzyme Mix	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
DNase I, 100 mg	Roche Diagnostics GmbH/Mannheim, Deutschland

EasyA® High-Fidelity PCR Cloning Enzyme	Stratagene, Agilent Technologies/Kassel, Deutschland
LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
Perfect Taq Plus Master Mix	5Prime GmbH/Hamburg, Deutschland
Pfu Polymerase	Stratagene, Agilent Technologies/Kassel, Deutschland
Proteinase K	Roche/Mannheim, Deutschland
Q5-Polymerase	NEB/Frankfurt am Main, Deutschland
Ready Mix™ red taq™	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	Promega/Mannheim, Deutschland NEB/Frankfurt am Main, Deutschland Qiagen/Hilden, Deutschland
RNase A, 100 mg/ml	
SuperScript®III First Strand Synthesis System	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
SuperScript™II Reverse Transcriptase	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
SuperScript™III Reverse Transcriptase	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
T4 DNA Ligase	NEB/Frankfurt am Main, Deutschland
Taq DNA Polymerase, 5 U/μl	VWR International GmbH/Darmstadt, Deutschland Peqlab/Erlangen, Deutschland

2.1.4 Antibiotika

Antibiotikum	Bezugsquelle	eingesetzte Konzentration
Ampicillin	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland	100 μg/ml
Kanamycin	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland	50 μg/ml
Neomycin	Biochrom AG/Berlin, Deutschland	0,8 mg/ml – 1,6 mg/ml
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland	500 μg/ml
Puromycin	Carl Roth AG/Karlsruhe, Deutschland	1 μg/ml

2.1.5 Molekulargewichtsmarker

Größenstandard/Ladepuffer	Bezugsquelle
1 kb DNA ladder, 500 μg/ml	New England BioLabs/Frankfurt am Main, Deutschland
DNA loading dye, 6x	Thermo Fisher Scientific/Schwerte, Deutschland
Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder, 6,5 μg/μl	Thermo Fisher Scientific/Schwerte, Deutschland
RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Thermo Fisher Scientific/Schwerte, Deutschland
RNA loading dye, 2x	Thermo Fisher Scientific/Schwerte, Deutschland
SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Zytokine

Zytokin	Bezugsquelle
<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (GM-CSF), Leukine®sargramostim	Bayer HealthCare Pharmaceuticals/Berlin, Deutschland
Interferon-gamma (IFN-γ)	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch Gladbach, Deutschland R & D Systems/Wiesbaden, Deutschland
Interleukin-1β (IL-1β)	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch Gladbach, Deutschland
Interleukin-2 (IL-2), Proleukin®S	Novartis, Sandoz Pharmaceuticals GmbH/Holzkirchen, Deutschland
Interleukin-4 (IL-4)	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch Gladbach, Deutschland
Interleukin-6 (IL-6)	Promocell GmbH/Heidelberg, Deutschland
Interleukin-15 (IL-15)	R & D Systems/Wiesbaden, Deutschland
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Sigma-Aldrich/Steinheim, Deutschland
T cell growth factor (TCGF)	Eigenproduktion [REDACTED], Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland
Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)	Promocell GmbH/Heidelberg, Deutschland

2.1.7 Plasmide und Vektoren

Plasmide	Bezugsquelle
pBullet_IRES_neo-DEST ^{194,195}	freundlicherweise von [REDACTED] [REDACTED] zur Verfügung gestellt (modifiziert durch [REDACTED])
pcDNA3.1-DEST	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland (modifiziert durch [REDACTED])
pcDNA3.1™/V5-His TOPO®	TOPO TA Cloning Kit®, Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
pCL-ECO ¹⁹⁶	freundlicherweise von [REDACTED] [REDACTED] zur Verfügung gestellt
pCOLT-GALV ¹⁹⁵	freundlicherweise von [REDACTED] [REDACTED] zur Verfügung gestellt
pDONR TM P1-P5r	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
pDONR TM P1-P2	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
pDONR TM P5-P2	Life Technologies/Darmstadt, Deutschland
pHIT60 ^{195,197}	freundlicherweise von [REDACTED] [REDACTED] zur Verfügung gestellt
pMX ¹⁹⁸	freundlicherweise [REDACTED] [REDACTED] zur Verfügung gestellt

Die detaillierten Vektorkarten sind unter Abschnitt 5.2 gelistet.

2.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die Amplifikation sowie die Sequenzierung definierter DNA-Abschnitte wurden unter Zuhilfenahme der im Internet frei zugänglichen Software *OligoCalc* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>) designt. Für Primer, die bei einer ortsgerichteten Mutagenese (vgl. Abschnitt 2.2.2.14) Anwendung fanden, wurde die Software *QuickChange Primer Design* der Firma Agilent Technologies (www.agilent.com/genomics/qcpcd; Kassel,

Deutschland) genutzt. Die Wahrscheinlichkeit der Primer "hairpins" zu bilden sowie das Maß an Selbstkomplementarität wurden anhand der Software *OligoAnalyzer3.1* (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) ermittelt. Synthetisiert wurden sämtliche Oligonukleotide durch die Firma Eurofins MWG Operon in Ebersberg bzw. die Firma IDT (engl. *Integrated DNA Technologies*) in Leuven, Belgien. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden zunächst mit ddH₂O (doppelt-destilliertes Wasser) auf eine Stockkonzentration von 100 µmol/l eingestellt. Die Verbrauchslösung wurde mit ddH₂O auf eine Konzentration von 10 µmol/l verdünnt, wovon, sofern nicht anders angegeben, für die PCR/Sequenzierungsreaktionen (vgl. Abschnitt 2.2.2.13 und 2.2.2.18) je 10 pmol (1 µl) eingesetzt wurden⁴³.

2.1.8.1 Primer zur Klonierung und Sequenzierung der CD8α- und CD8β-Konstrukte

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
CD8a.fw	sense	GGGAGCGCGTCATGGCCTTA
CD8a.rv	antisense	TGGCTGTTGCACAGGGTTAGACG
CD8b.fw	sense	GGGCGCGCCACGATGC
CD8b.rv	antisense	GCCACAGCTCACCAGGGCAG
CD8b-var2+4.rv	antisense	TCCCCTTGAGGCTGTTTCATGAAAC
CD8b-var3.rv	antisense	TGAGGCCTGTATATTCAGTAGTCCAT TC
CD8b-var5.rv	antisense	CCGTATTCTCTGCTCATTTGTAAAATT GT

2.1.8.2 Primer zur Klonierung und Sequenzierung der TCR-Konstrukte

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
5'-Primer.se	sense	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC G
64T-Primer.rev	antisense	CGATAAAAGCTCCGGGGATAACAGA[T]64GC
attB1_Kozak+START_TRAV14/DV4.se	sense	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTCGCCACCATGTCACTTTCTAG CCTGCTGAAGGTGGTCACAG
attB1-TRA-1A3/46.Kos(2)-ATG.se	sense	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTCACCGCCATGTCACTTTCTAG CCTGCTGAAG
attB1-TRA-1A3/46.Kos-ATG.se	sense	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGT CACTTTCTAGCCTGCTGAAG
attB2_TRBV10_3_STOP.rev	antisense	AACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACT AGCCTCTGGAATCCTTTCT
attB5_SmaI-START_TRBV10-3.se	sense	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTG CTCCCGGGCCTATGGGCACAAGTT GTTCTTCTATG
attB5_START_TRBV10-3.se	sense	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTG CTATGGGCACAAGTTGTTCTTCTAT G
attB5_TRBV10_3.for	sense	ACAAGTTTGTATACAAAAGTTGCTAC CGCCATGGGCACAAGTTGTTCTTC
attB5r_P2A_TRAC(m)-noSTOP.rev	antisense	GGGGACAAGTTTGTATACAAAAGTTG TAGGCCCGGGTTCCTCCACGTC TCCAGCCTGCTTCAGCAGGCTGAAG TTAGTAGCTCCGCTTCCGCTGCTCCA CAGTCTCAGTGTATCAGCAGATT

Capswitch-Oligonukleotid.se	sense	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC GCGGG
Ctrl_Smal-dig.rev	antisense	CTGTGACCGTGAGCCTGG
Ctrl_Smal-dig.se	sense	GAGAACCCCGGGCCTATG
Cα-3'-UTR-Primer.rev	antisense	CTGTCTTACAATCTTGCAGATC
Cα-Sequenzierungs-Primer.rev (Cα-Seq-Primer)	antisense	TTTAGAGTCTCTCAGCTGGTACACGG
Cβ1-3'-UTR-Primer.rev	antisense	CACTTCCAGGGCTGCCTTC
Cβ2-3'-UTR-Primer.rev	antisense	TGACCTGGGATGTTTTGGAGCTA
Cβ-Sequenzierungs-Primer.rev	antisense	TTCCCATTCACCCACCAGCTCAG
T7-Capswitch-Primer.se	sense	TTATACGACTCACTATAGGGAGGAAG CAGTGGTAACAACGCAGAGT
TRAC.fw	sense	GCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTAT AGTTCAAAAC
TRAC.rev	antisense	TGGGCTGGGGAAGAAGGTGTCTTCT GGAA
TRAJ48(hu)_TAIL(constant-m).rev	antisense	CACGGCAGGTTTCAGGATTCTGGATA TTGGGTATGATGGTGAGTCTTGTTCC AGTCCCAAAGG
TRAV14/DV4*01+Kozak.fw	sense	ACCGCCATGTCACTTTCTAGCCTGC
TRB1A3-46_sdm_C177.rev	antisense	GCCCATGCCCCGGATCTTGTCGATA CCAGTACATATAG
TRB1A3-46_sdm_C177.se	sense	CTATATGTACTGGTATCGACAAGATC CGGGGCATGGGC
TRBC(m)-STOP_attB2.rev	antisense	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTATCAAGAATTCTTTTCTTCAC CATGGCCATCAGCACCAG
TRBC1.rev	antisense	CTAGAAATCCTTTCTCTTGACCATGG C
TRBC2.rev	antisense	CTAGCCTCTGGAATCCTTTCTCTTG
TRBJ2-7(hu)_TAIL(constant-m).rev	antisense	GGTCACGTTCCGCAGGTCCTCTGTG ACCGTGAGCCTGGTGCCCG
TRBV10_03.fw	sense	ATGGGCACAAGGTTGTTCTTCTATGT GGCC
TRBV10_03+Kozak.fw	sense	ACCGCCATGGGCACAAGGTTGTTCT TC

2.1.8.3 Primer zur Klonierung und Sequenzierung der CSF2RA/CSF2RB-Konstrukte

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
attB1-CSF2RA.Kos-ATG.se	sense	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGC TTCTCCTGGTG
attB1-CSF2RB.Kos-ATG.se	sense	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTTCACCATGGTGCTGGCCCAAG GGCTG
attB2-CSF2RA.stop.rev	antisense	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTATCAGGTAATTCCTTACAGGT CAAGACC
attB2-CSF2RA-Isoform b.rev	antisense	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTATTAGGAGCACATAAATGTACA CAGAGCC
attB2-CSF2RA-Isoform c.rev	antisense	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTATCAGTTTGCTTTGATCTGTG GAACTGG
attB2-CSF2RA-Isoform e.rev	antisense	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTATCAGTTTGCTTTGATCTGTG GAACTG

<i>attB5-CSF2RA.ATG.se</i>	sense	GGGGACAACCTTTGTATACAAAAGTTG CTATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTT
<i>attB5r-CSF2RB.2A.rev</i>	antisense	GGGG ACAACTTTTGTATACAAAAGTTGTAGG TCCAGGGTTCTCCTCCACGTCTCCA GCCTGCTTCAGCAGGCTGAAGTTAG TAGCTCCGCTTCCACACACCTCCCC AGGCTTGTT
<i>CSF2RA_CDS.for</i>	sense	ACCGCCATGCTTCTCCTGCTG
<i>CSF2RA_CDS.rev</i>	antisense	TCAGGTAATTTCTTCACGGTCAAGAC
<i>CSF2RA_Intron3.rev</i>	antisense	GCAGACATGGGTCCTCATCCTGG
<i>CSF2RA_Isoform c-intern.rev</i>	antisense	TCAGTTTGTCTTTGATCTGTGGAAGT G
<i>CSF2RA_Isoform g.rev</i>	antisense	TCACAGAGATGACTCTGACCCCAAC
<i>CSF2RA_nt367.rev</i>	antisense	CTGAGCAGCGGTACCCTCCCTTCCT G
<i>CSF2RA_nt874.fw</i>	sense	CACAGTGTGAAGATCAGAGCTGCAG ACGTCC
<i>CSF2RA_Stop nt966.rev</i>	antisense	TCACCCGTCGTCAGAACCAAATTC
<i>CSF2RB.fw</i>	sense	ACCGCCATGGTGCTGGCC
<i>CSF2RB_mRNA.fw</i>	sense	ACCGCCCTGGTGCTGCC
<i>CSF2RB.rev</i>	antisense	TCAACACACCTCCCCAGGCTTG
<i>CSF2RB_STOPnt1197.rev</i>	antisense	CATGCTGTGGGCGTTCTGGAG
<i>CSF2RB_STOPnt1932.rev</i>	antisense	CAGAGGGACCAAGTTGCACCTG
<i>CSF2RB_STOPnt498.rev</i>	antisense	CAACCAGTGGCTCTGGGGACTC

2.1.8.4 Primer für den Nachweis von T-Zellrezeptor V β -Familien

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
V β -1.se	sense	CCGCACAACAGTTCCCTGACTTGC
V β -2.se	sense	GGCCACATACGAGCAAGGCGTCA
V β -3.se	sense	ACAGTGTCTCTAGAGAGAAG
V β -4.se	sense	TTCCCATCAGCCGCCCAAACCTAA
V β -5.1.se	sense	AGTGAGACACAGAGAAACAA
V β -5.4-8.se	sense	AGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCC
V β -6.se	sense	TCAGGTGTGATCCAATTTCT
V β -7.se	sense	CCTGAATGCCCCAACAGCTCTC
V β -8.1-2.se	sense	TGTCACCAGACTGGGAACCACCAC
V β -8.3.se	sense	TCTGGTACAGACAGACCATGAT
V β -9.se	sense	TTCCCTGGAGCTTGGTGACTCTGC
V β -10.1.se	sense	GCTCCAAAACTCATCCTGTAC
V β -11.se	sense	TGCCAGGCCCTCACATACCTCTCA
V β -12.2.se	sense	CCAAGACACAAGGTCACAGAGACA
V β -13.se	sense	GTGTCACTCAGACCCCAAAATTCC
V β -14.se	sense	TCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAA
V β -15.se	sense	CAGGCACAGGCTAAATTCTCCCTG
V β -16.se	sense	GCCTGCAGAACTGGAGGATTCTGG
V β -17.se	sense	TCCTCTCACTGTGACATCGGCCCA
V β -18.se	sense	CTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCC
V β -19.se	sense	TCTCAATGCCCAAGAACGCACCC

Vβ-20.1.se	sense	CCTCCAGCTGCTCTTCTACTC
Vβ-21.se	sense	GATTCACAGTTGCCTAAGGA
Vβ-22.se	sense	AAGTGATCTTGCGCTGTGTCCCCA
Vβ-23.se	sense	GCAGGGTCCAGGTCAGGACCCCCA
Vβ-24.se	sense	CCCAGTTTGGAAAGCCAGTGACCC
Vβ-25.se	sense	GACAGAAAGCAAAATTATATTGTGCC
Cβ-as	antisense	CGGGCTGCTCCTTGAGGGGCTGCG

2.1.8.5 Primer für den spezifischen Nachweis von β-Aktin

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
beta-Aktin_1.se	sense	GGATTCCTATGTGGGCG
beta-Aktin_2.rev	antisense	GGCGTACAGGGATAGC

2.1.8.6 Primer zur Sequenzierung und zur Bestimmung der Orientierung von Inserts, kloniert in pcDNA3.1V5-His-TOPO

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
T7.se	sense	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH.rev	antisense	TAGAAGGCACAGTCGAGG

2.1.8.7 Primer zur Sequenzierung und zur Bestimmung der Orientierung von Inserts, kloniert in pBullet IRES neo

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
pBullet.fw	sense	GACGGCATCGCAGCTTGGATA

2.1.8.8 Primer zur Sequenzierung und zur Bestimmung der Orientierung von Inserts, kloniert in pDONR221

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
M13.fw	sense	TAATACGACTCACTATAGGG
M13.rev	antisense	TAGAAGGCACAGTCGAGG

2.1.8.9 Primer zur Genotypisierung von QUAD-KO.Bcl-2Tg Mäusen

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' → 3')
beta-Aktin.fw	sense	TGTTACCAACTGGGACGACA
beta-Aktin.rev	antisense	GACATGCAAGGAGTGCAAGA
hBcl-2.fw	sense	ACACGCCCCATCCAGCCGCATC
hBcl-2.rev	antisense	TGTGGCTCAGATAGGCACCCAG

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Antikörper	Bezugsquelle
Goat -anti-Maus-IgG1-FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD107a-PE-Cy5 (Cyanin 5)	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD116-FITC (Klon 4H1)	eBioscience /Frankfurt am Main, Deutschland
anti-human-CD11c-PE (Phycoerythrin)	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD13-FITC	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-human-CD131 (Klon 1C1)-PE	eBioscience /Frankfurt am Main, Deutschland
anti-human-CD14-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD14-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD15-PE	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch-Gladbach, Deutschland
anti-human-CD16-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD16-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD19-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD20-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD3-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD3-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD33-PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-human-CD34-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD4-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD4-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD40-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD45RA-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD4-FITC	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-human-CD4-PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-human-CD54-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD56-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD66b-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD8-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD8-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD80-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD83-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-CD86-FITC	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-human-CD8-FITC	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-human-CD8-PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-human-CSF2RA polyclonaler Antikörper	Trans Genic Inc./Kobe, Japan
anti-human-GM-CSF-anti Rezeptor (Klon 12B7-17-A)	Merck Millipore/Eschborn, Deutschland
anti-human-HLA-A*24	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-HLA-ABC-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-HLA-DR-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-IgG-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-IgG-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-Vβ3-PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland

anti-human-V β 1-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 11-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 12-PE ($\triangleq$ TRBV10-3)	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 13.1-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 13.2-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 13.6-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 14-PE ($\triangleq$ TRBV28)	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 16-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 17-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 18-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 2-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 20-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 21.3-FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 22-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 23-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 3-FITC ($\triangleq$ TRBV28)	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 3-PE ($\triangleq$ TRBV28)	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 4-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 5.1-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 5.2-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 5.3-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 7-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 7.2-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 8-PE	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human-V β 9-PE ($\triangleq$ TRBV3-1)	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-human- α : β -TCR-PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-human- γ : δ -TCR-APC	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-CD3-PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-CD4-PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-CD8-PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-IgG1-FITC	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-IgG1-PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-IgG2a-FITC	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-IgG2a-PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-IgG2b-FITC	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-IgG2b-PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-MHC H2-D ^b -PE	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-MHC H2-IA ^b -FITC	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland
anti-Maus-MHC H2-K ^b -PE	BD Bioscience/Heidelberg, Deutschland

2.1.9.2 Antikörper für Blockadeexperimente im ELISpot Assay

Antikörper	Bezugsquelle
anti-human-CSF2RA polyclonal antibody	Trans Genic Inc./Kobe, Japan
anti-human-GM-CSF- α Rezeptor (Klon 12B7-17-A)	Merck Millipore/Eschborn, Deutschland
anti-human-HLA-A*24	Beckman Coulter/Krefeld, Deutschland

2.1.9.3 Antikörper, die aus Hybridomen aufgereinigt wurden

In folgender Tabelle zusammengefasste Antikörper wurden über Affinitätschromatographie aus Hybridomüberstand aufgereinigt (vgl. Abschnitt 2.2.1.19). Die Antikörper wurden sowohl für durchflusszytometrische Analysen als auch für Blockadeexperimente im IFN- γ -ELISpot-Assay eingesetzt.

Antikörper	Spezifität	Bezugsquelle	Konzentration für Blockadeexperimente
B1.23.2	HLA-B, HLA-C, HLA-Aw	(2)	100-200 $\mu\text{g/ml}$
GAP.A3	HLA-A3	ATCC/Wesel, Deutschland	25-50 $\mu\text{g/ml}$
HB145	HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ	ATCC/Wesel, Deutschland	50-260 $\mu\text{g/ml}$
HB55	HLA-DR	ATCC/Wesel, Deutschland	50-100 $\mu\text{g/ml}$
HLA-A*24	HLA-A*24	ATCC/Wesel, Deutschland	100-200 $\mu\text{g/ml}$
OKT3	CD3	ATCC/Wesel, Deutschland	25-50 $\mu\text{g/ml}$
OKT8	CD8	ATCC/Wesel, Deutschland	25-50 $\mu\text{g/ml}$
SFR8.B6	HLA-Bw6, einige HLA-C-Allele	ATCC/Wesel, Deutschland	> 500 $\mu\text{g/ml}$
W6/32 (1)	HLA-Klasse I-Moleküle	(1)	25-450 $\mu\text{g/ml}$

(1) freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

(2) freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

2.1.9.4 Antikörper für IFN- γ -ELISpot-Assays

ELISpot-Antikörper	Bezugsquelle	Verwendung
anti-human Interferon- γ mAb 1-D1K (Maus-IgG1)	Mabtech AB/Nacka, Schweden	Primärantikörper zur Beschichtung der PVDF-Membran der ELISpot-Platte
anti-human Interferon- γ mAb 7-B6-1; biotinyliert (Maus-IgG1)	Mabtech AB/Nacka, Schweden	Detektionsantikörper für den Nachweis von an den Primärantikörper gebundenem humanen IFN- γ
anti-Maus Interferon- γ mAb AN18 (Ratte-IgG1)	Mabtech AB/Nacka, Schweden	Primärantikörper zur Beschichtung der PVDF-Membran der ELISpot-Platte
anti-Maus Interferon- γ mAb R4-6A; biotinyliert (Ratte-IgG1)	Mabtech AB/Nacka, Schweden	Detektionsantikörper für den Nachweis von an den Primärantikörper gebundenem murinen IFN- γ

2.1.9.5 Antikörper für Western Blot-Experimente

Western Blot Antikörper gerichtet gegen	Bezugsquelle
anti-Aktin (pan) Rabbit mAb (Klon C67E7)	Cell Signaling Technology/Leiden, Niederlande
ECL Eesel-anti-Kaninchen-IgG/HRP	Amersham Biosciences/Freiburg, Deutschland
ECL Schaf-anti-Maus-IgG/HRP	Amersham Biosciences/Freiburg, Deutschland
anti-human-GM-CSF- α Rezeptor (Klon 12B7-17-A)	Merck Millipore/Eschborn, Deutschland

2.1.9.6 Micro Beads zur magnetischen Zellseparation

Zur Isolation entsprechender Zell-Subpopulationen wurden mit Antikörpern beschichtete, magnetische *Micro Beads* genutzt.

Magnetische <i>MicroBeads</i>	Bezugsquelle
CD4- <i>Micro Beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8- <i>Micro Beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch Gladbach, Deutschland
CD19- <i>Micro Beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch Gladbach, Deutschland
CD34- <i>Micro Beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch Gladbach, Deutschland
CD66abce- <i>Micro Beads</i>	Miltenyi Biotec GmbH/Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.10 Lösungen und Puffer

Acetatpuffer für ELISpot-Assays

Essigsäure	4,6 ml
Natriumacetat (0,2 N)	11,0 ml
ddH ₂ O	46,9 ml

AEC-Komplex für ELISpot-Assays

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	1 Tablette
N,N-Dimethylformamid	2,5 ml
Acetatpuffer; filtriert (0,22 µm)	47,5 ml
steril filtriert (0,22 µm) und vor Gebrauch 25 µl frisches H ₂ O ₂ zugesetzt	

Ammoniumacetat (10 M/7,5 M)

Ammoniumacetat	770,0 g/577,5 g
ddH ₂ O	ad 1,0 l

Ammoniumchlorid (0,16 M)

Ammoniumchlorid	8,3 g
ddH ₂ O	ad 1,0 l

Ampicillin (50 mg/ml)

Ampicillin	50,0 g
ddH ₂ O	ad 1,0 l

Avidin-Peroxidase-Komplex für ELISpot-Assays

Vectastain-Reagenz A	1 Tropfen
Vectastain-Reagenz B	1 Tropfen
Tween®20 (10 %)	0,1 ml
PBS	10,0 ml

Coomassie-Färbelösung

Aluminiumsulfat-(14-18)-hydrat	100 g
Ethanol	200 ml
Phosphorsäure	47 ml
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,4 g
ddH ₂ O	ad 2,0 l

Coomassie-Entfärbelösung

Ethanol	200 ml
Phosphorsäure	47 ml
ddH ₂ O	ad 2,0 l

DEPC-H₂O

DEPC	2,0 ml
ddH ₂ O	ad 2,0 l

20 Minuten gerührt, nach 24 Stunden autoklaviert, dunkel gelagert

DNA-Ladepuffer für Agarosegele (6x)

Bromphenolblau	25,0 mg
Xylencyanol	25,0 mg
Glycerol	3,0 ml
ddH ₂ O	ad 10,0 ml

EDTA 0,5 M

EDTA	18,6 g
ddH ₂ O	ad 100,0 ml

Lysepuffer für humane Erythrozyten

Ammoniumchlorid	8,29 g
Kaliumhydrogencarbonat	1,0 g
EDTA	0,0372 g
ddH ₂ O	ad 1,0 l
pH: 7,29	

Lysepuffer für murine Erythrozyten (TAC-Puffer, Tris-Ammoniumchlorid)

Ammoniumchlorid (0,16 M)	90,0 ml
Tris (0,17 M)	10,0 ml
pH: 7,2	

SDS (30 %; w/v)

SDS (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)	150,0 g
ddH ₂ O	ad 500,0 ml

Essigsäure (0,2 N)

Essigsäure (96 %)	11,3 g
ddH ₂ O	ad 1,0 l

FACS-Fixierungslösung

Formaldehydlösung (37 %)	1,35 ml
PBS	ad 50,0 ml

FACS-Puffer

BSA (Rinderserumalbumin, engl. <i>bovine serum albumin</i>)	5,0 g
EDTA (0,5 M)	0,345 g
PBS	ad 500,0 ml
pH: 7	

Formaldehydgel, denaturierend (0,8 %)

Agarose	0,56 g
ddH ₂ O	ad 56,0 ml
MOPS-Puffer (10x)	7,0 ml
Formaldehydlösung (37 %)	7,0 ml
GelRed	2,0 µl

MACS-Puffer

BSA (0,5 %)	2,5 g
EDTA (2 mM)	0,29 g
PBS	ad 0,5 l
steril filtriert (0,22 µm)	

Mausschwanz-Lysepuffer

Tris (50 mM)	6,057 g
NaCl (100 mM)	5,844 g
EDTA (100 mM)	29,224 g
SDS (1 %)	10 ml
Proteinase K	20 µl
ddH ₂ O	ad 1,0 l

MOPS-Puffer (10x)

(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	41,86 g
Natriumacetat pH7 (3 M)	16,7 ml
EDTA, pH8 (0,5 M)	10,0 ml
ddH ₂ O	ad 1,0 l

MOPS-Puffer (1x)

MOPS (10x)	100,0 ml
H ₂ O _{DEPC}	900,0 ml

Natriumacetat (0,2 N)

Natriumacetat	16,4 g
ddH ₂ O	ad 1,0 l

Natriumacetat (3 M)

Natriumacetat	24,6 g
ddH ₂ O	ad 100,0 ml

PBS (1x)

Instamed PBS-Pulver	95,5 g
ddH ₂ O	ad 10,0 l

RNA-Ladepuffer für Agarosegele

Formamid (deionisiert)	100 µl
Formaldehydlösung (37 %)	70 µl
MOPS-Puffer (10x)	50 µl
Bromphenolblau (2 %)	20 µl
H ₂ O _{DEPC}	271 µl

TBE-Puffer (Tris-Borsäure-EDTA, 0,5x)

TBE-Puffer (10x)	50,0 ml
ddH ₂ O	ad 1,0 l

TBS (engl. *Tris-buffered saline*; 10x)

Natriumchlorid	87,66 g
Trizma® Base	24,23 g
ddH ₂ O	ad 1,0 l
pH: 7,6	

TBS (1x)

TBS (10x)	100 ml
ddH ₂ O	ad 1,0 l

TBS-T (0.05 % Tween®20)

TBS (1x)	1,0 l
Tween®20	500 µl

Towbin-Transferpuffer (1x)

Towbin-Transferpuffer (10x)	100 ml
ddH ₂ O	ad 1,0 l
Methanol	220 ml

Tris (0,17 M)

Tris	20,6 g
ddH ₂ O	ad 1,0 l
pH: 7,65	

Trypanblau (Gebrauchslösung)

Stocklösung A	37,5 ml
Stocklösung B	12,5 ml
filtriert (0,22 µm)	

Trypanblau, Stocklösung A, (0,2 %)

Trypanblau	1 g
ddH ₂ O	ad 500,0 ml

Trypanblau, Stocklösung B, (4,5 % NaCl)

Natriumchlorid (NaCl)	22,5 g
ddH ₂ O	ad 500,0 ml

Western Blot Antikörper-Lösung

Milchpulver oder BSA	3-5 g
TBS-T oder TBS	ad 100 ml

Western Blot Blocking-Lösung

Milchpulver	5 g
TBS-T	ad 100 ml

Western Blot Zelllysepuffer

Natriumchlorid (150 mM)	250 mg
INP-40 (1%)	300 µl
Tris pH8 (50 mM)	1,5 ml
ddH ₂ O	ad 30 ml

2.1.11 BakteriennährmedienEinfriermedium (60 % Glycerol)

Glycerol	30,0 ml
LB-Medium	ad 50,0 ml

LB-Agar

LB-Medium	0,5 l
Bacto-Agar	7,5 g

LB-Medium (engl. *lysogeny broth*)

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	10,0 g
ddH ₂ O	ad 1,0 l

2.1.12 ZellkulturnährmedienAIM-V human_{komplett}

AIM-V + L-Glutamin

Humanserum (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C)	10 %
---	------

In AIM-V human_{komplett}-Medium wurden humane PBMC, T-Zellen, Monozyten, Granulozyten, CD19⁺ Zellen, CD34⁺ Zellen und Leukämiezellisolate kultiviert.

DMEM_{Phoenix-AMPHO}

DMEM

L-Glutamin	2 mM
FCS (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C)	10 %
Penicillin	500 IU/ml
Streptomycin	500 µg/ml
HEPES	25 mM
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	1x

Das Medium DMEM_{Phoenix-AMPHO} diente der Kultivierung der Phoenix-AMPHO-Zelllinie.

Einfriermedium_{FCS}

FCS (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C)

DMSO	10 %
------	------

Einfriermedium_{FCS} wurde für die Kryokonservierung von 293T-Zellen, sowie sämtlicher Maus-, Melanom-, Leukämie- und EBV-B-Zelllinien genutzt.

Einfriermedium_{HS}

Humanserum (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C)

DMSO	10 %
------	------

Humane PBMC, T-Zellen, Monozyten, Granulozyten, CD19⁺ Zellen, C34⁺ Zellen, DC sowie Leukämiezellisolate wurden in Einfriermedium_{HS} eingefroren.

MEM $\alpha_{\text{MUTZ-3}}$ MEM α

L-Glutamin	2 mM
FCS (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C)	10 %
Penicillin	500 IU/ml
Streptomycin	500 µg/ml
2-Mercaptoethanol	50 µM
konditioniertes Medium der humanen Blasenkarzinomzelllinie 5637	10 %

Die Kultivierung der MUTZ-3-Zelllinie erfolgte in MEM $\alpha_{\text{MUTZ-3}}$ -Medium.

MEM $\alpha_{\text{MUTZ-3-Differenzierung}}$ MEM α

L-Glutamin	2 mM
FCS (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C)	10 %
Penicillin	500 IU/ml
Streptomycin	500 µg/ml
2-Mercaptoethanol	50 µM

MEM $\alpha_{\text{MUTZ-3-Differenzierung}}$ -Medium wurde für die Zelllinie MUTZ-3 während der Differenzierung zu unreifen (imDC, engl. *immature dendritic cell*) und reifen (mDC, engl. *mature dendritic cell*) Dendritischen Zellen verwendet.

MEM $\alpha_{\text{M-07e}}$ MEM α

L-Glutamin	2 mM
FCS (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C)	20 %
Penicillin	500 IU/ml
Streptomycin	500 µg/ml
konditioniertes Medium der humanen Blasenkarzinomzelllinie 5637	20 %

Im Medium MEM $\alpha_{\text{M-07e}}$ erfolgte die Kultivierung der Zelllinie M-07e.

RPMI_{Blockade}

RPMI 1640 + L-Glutamin

FCS (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C)	10 %
--------------------------------------	------

RPMI_{Blockade} wurde für die Blockade von ELISpot-Platten verwendet.

RPMI_{DC}

RPMI 1640 + L-Glutamin

Humanserum (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C) 2 %

Penicillin 500 µg/ml

RPMI_{DC}-Medium wurde für die Differenzierung von humanen Monozyten zu imDC und mDC genutzt.

RPMI human_{Transduktion}

RPMI 1640 + L-Glutamin

Humanserum (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C) 10 %

Penicillin 500 IU/ml

Streptomycin 500 µg/ml

HEPES 25 mM

Das Medium RPMI human_{Transduktion} wurde für die Kultivierung humaner PBMC sowie der Phoenix-AMPHO-Zelllinie während der Transduktion verwendet.

RPMI_{komplett}

RPMI 1640 + L-Glutamin

FCS (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C) 10-20 %

Penicillin 500 IU/ml

Streptomycin 500 µg/ml

RPMI_{komplett} wurde, sofern nicht anders angegeben, für die Kultivierung von murinen T-Zellen, 293T-Zellen sowie sämtlicher Maus-, AML-, CML-, ALL-, APL-, Melanom- und EBV-B-Zelllinien verwendet.

RPMI₅₆₃₇

RPMI 1640 + L-Glutamin

FCS (hitzeinaktiviert, 45 min/56 °C) 10 %

Penicillin 500 IU/ml

Streptomycin 500 µg/ml

2-Mercaptoethanol 50 µM

In RPMI₅₆₃₇ wurde die humane Blasenzellkarzinomlinie 5637 kultiviert.

2.1.13 Bakterienstämme

<i>E.coli</i>-Stamm	Genotyp, relevante Eigenschaften
DH10B TM	$\Delta(ara-leu)$ 7697 <i>araD139 fhuA</i> $\Delta lacX74$ <i>galK16 galE15 e14-ϕ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$</i>
One Shot [®] <i>ccdB</i> Survival TM 2 T1 Phage Resistent	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ <i>f80lacZDM15</i> $\Delta lacX74$ <i>recA1 araD139</i> $\Delta(ara-leu)$ 7697 <i>galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG fhuA::IS2</i>
One Shot [®] Top 10	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ <i>f80dlacZDM15</i> $\Delta lacX74$ <i>recA1 araD139</i> $\Delta(ara-leu)$ 7697 <i>galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG λ</i>

XL10-Gold	TetrD(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr</i>].
-----------	--

2.1.14 Eukaryotische Zelllinien

Primäre hämatopoetische Zellen

PBMC wurden aus **Buffy Coats** (BC) bzw. Vollblut aufgereinigt (vgl. Abschnitt 2.2.1.5), welche bzw. welches freundlicherweise von [REDACTED]

[REDACTED] zur Verfügung gestellt wurden. Die für die Kreuzerkennungsexperimente im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten allogenen AML- und CML-Zellisolate entstammen dem Knochenmark bzw. therapeutischen Leukapheresen von Leukämiepatienten der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland.

B78H1

B78H1 ist ein nicht-pigmentierter, HLA-Klasse I-negativer, von der murinen B16-Melanomzelllinie stammender Klon¹⁹⁹.

HEK 293T-Zellen

Die Zelllinie HEK 293T (ATCC® CRL-3216™) ist eine Weiterentwicklung der humanen, embryonalen Nierenzelllinie HEK 293, welche durch das transformierende Gen des Adenovirus-Typ 5 immortalisiert wurde^{43,200}. HEK 293T-Zellen wurden zusätzlich mit dem großen T-Antigen des SV40-Virus (engl. *simian virus 40*) stabil transfiziert^{43,201}. Daher ist die Zelllinie dazu befähigt, Vektoren mit dem SV40-Replikationsursprung episomal zu replizieren, was zu hohen Expressionsraten der in die transfizierten Plasmide inserierten Gensequenzen führt. Die 293T-Zelllinie wurde freundlicherweise [REDACTED] [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

HEL

Die Zelllinie HEL (DSMZ ACC 11) wurde aus dem peripheren Blut eines 30-jährigen Patienten mit akuter Erythroleukämie (FAB M6) generiert²⁰². (1)

HL-60

Die Zelllinie HL-60 (ATCC® CCL-240™) wurde aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Patientin mit akuter myeloblastischer-Leukämie mit Ausreifung (FAB M2) generiert^{203,204}. Die myeloblastischen Zellen können durch Supplementierung des Mediums mit DMSO zu neutrophilen Granulozyten differenziert werden²⁰⁵, die phagozytotische Aktivität aufweisen sowie auf chemotaktische Stimuli ansprechen²⁰⁶. (1)

Jurkat-76

Die Zelllinie Jurkat-76 wurde aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen T-Zell-Leukämie-Patienten etabliert²⁰⁷. Der Klon 76 ist defizient hinsichtlich endogener TCR-Ketten-Expression und erlaubt daher eine Expressionsevaluierung transfizierter bzw. transduzierter TCR-Ketten²⁰⁸. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

K562

Die Zelllinie K562 (ATCC® CCL-243™) wurde aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie in der terminalen Blastenkrise generiert²⁰⁹. Die undifferenzierten Zellen sind der granulozytischen Reihe zuzuordnen. Sie sind negativ hinsichtlich der Expression von HLA-Klasse I- sowie HLA-Klasse II-Molekülen, und erlauben daher eine unspezifische Erkennung durch NK-Zellen auszuschließen⁴³.

KCL-22

Die Zelllinie KCL-22 (DSMZ: ACC 519) wurde aus dem Pleuraerguss einer 32-jährigen Patientin mit Philadelphiachromosom-positiver, chronischer myeloischer Leukämie während der Blastenkrise etabliert²¹⁰. Die unreifen, undifferenzierten Zellen differenzieren *in vivo* zu Granulozyten²¹¹. (1)

LAMA-84

Die Zelllinie LAMA-84 (DSMZ: ACC 168) wurde aus dem peripheren Blut einer 29-jährigen Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie einen Monat nach Ausbruch der Blastenkrise generiert. Die Zellen weisen charakteristische Marker von Megakaryozyten und erythroiden Zellen auf²¹². (1)

M-07e

Die Zelllinie M-07e (DSMZ: ACC 104) entstammt dem peripheren Blut eines einen Monat alten Mädchens mit akuter Megakaryoblastenleukämie (FAB M7). Sie ist ein Zytokin-abhängiger Subklon der Megakaryoblastenleukämiezelllinie M-07^{213,214}. (1)

MOLM-14

Die Zelllinie MOLM-14 wurde aus dem peripheren Blut eines 20-jährigen Patienten zum Zeitpunkt des Rückfalls einer akuten Monoblastenleukämie (FAB M5a) als Folge eines Myelodysplastischen Syndroms generiert²¹⁵. (1)

MUTZ-3

Die Zelllinie MUTZ-3 (DSMZ: ACC 295) wurde aus dem peripheren Blut eines 29-jährigen Patienten mit akuter Myelomonozytenleukämie (FAB M4) zum Zeitpunkt der Diagnose generiert²¹⁶. Die Zellen weisen morphologisch sowie immunophänotypisch Monozytencharakteristiken auf. Sie können durch entsprechende Zytokingabe (vgl. Abschnitt 2.2.1.20) zu unreifen und reifen DC differenziert werden^{217,218}.

MV4-11

Die Makrophagen-Zelllinie MV4-11 (ATCC® CRL-9595™) wurde generiert aus dem peripheren Blut eines zehnjährigen Patienten mit biphänotypischer B-Myelomonozytenleukämie²¹⁹. (1)

NB4

Die Zelllinie NB4 wurde aus dem Knochenmark einer 24-jährigen Patientin mit akuter Promyelozytenleukämie (FAB M3) nach dem zweiten Rezidiv etabliert²²⁰. Die Zellen weisen eine myeloblastische Morphologie auf. (1)

NOMO-1

Die Zelllinie NOMO-1 (DMSZ ACC 542) wurde aus dem Knochenmark einer 31-jährigen Patientin mit akuter myeloischer Leukämie (FAB M5a) zum Zeitpunkt des zweiten Rezidivs generiert¹⁷. (1)

Phoenix-AMPHO

Die Zelllinie Phoenix-AMPHO (Achacoso and Nolan, unpub.)²²¹ wurde freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt. Die Retrovirus-Verpackungszelllinie der zweiten Generation ist transgen für retrovirale Polymerase-, Struktur- sowie amphotrope Hüllproteine, um eine Helfervirus-unabhängige Retrovirenproduktion zu ermöglichen. Die Transgene unterliegen dabei anstelle dem Moloney Maus-Leukämievirus entstammenden Promoter dem CMV Promoter/Enhancer (**Cytomegalievirus**), um die Gefahr der Rekombination zu eliminieren. Phoenix-AMPHO-Zellen zeichnen sich zudem durch ihre hohe Transfizierbarkeit aus, sowie für ihre Fähigkeit, DNA episomal zu erhalten und zu replizieren

RS4;11

Die Lymphoblasten-Zelllinie RS4;11 (ATCC® CRL-1873™) stammt aus dem Knochenmark einer 32-jährigen Patientin mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL)²²² und weist charakteristische Merkmale der B-Zellreihe auf. (1)

THP-1

Die THP-1-Zelllinie (ATCC® TIB-202™) wurde aus dem peripheren Blut eines einjährigen Kindes mit akuter Monozytenleukämie (FAB M5) etabliert. Phänotypisch sind die Zellen Monozyten zuzuordnen²²³. (1)

U-937

Die Zelllinie U-937 (ATCC® CRL-1593.2™) wurde aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen Patienten mit diffus histiozytischem Lymphom generiert²²⁴. Die Zellen (FAB M5) entstammen der myeloiden Reihe und weisen Charakteristiken von unreifen Monoblasten bzw. Makrophagen auf. (1)

Zelllinien aus dem Melanommodell Ma-Mel-86

Die Melanomzelllinien Ma-Mel-86a, -86b, -86c und -86f wurden aus unterschiedlichen Lymphknotenmetastasen einer Melanompatientin (Ma-Mel-86/INTH) generiert (vgl. Abschnitt 1.3)⁴³. Sie unterscheiden sich in charakteristischer Weise hinsichtlich ihrer HLA-Klasse I-Expression. Ma-Mel-86a exprimiert alle HLA-Klasse I-Moleküle, wohingegen Ma-Mel-86b und -86f defizient für jegliche HLA-Klasse I-Molekül-Expression sind; Ma-Mel-86c weist lediglich einen Verlust von einem HLA-Klasse I-Haplotypen auf (vgl. **Abb. 1.9**)⁴³. Zusätzlich stand eine EBV-transformierte lymphoblastoide B-Zelllinie (INTH-EBV-B) zur Verfügung (vgl. Abschnitt 2.2.1.8)⁴³.

Die Zelllinien wurden freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

(1) Freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

2.1.15 Mausstämme

Mausstamm	Bezugsquelle
C57BL6/J wt (wildtyp) QUAD-KO.Bcl-2Tg	Jackson Laboratory/Bar Harbor, USA freundlicherweise von [REDACTED] [REDACTED] zur Verfügung gestellt

Die Mäuse wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz nach aktuellen Richtlinien gehalten und gezüchtet. Alle Versuche wurden unter Einhaltung des derzeit geltenden Tierschutzgesetzes bzw. der Tierschutzversuchstierverordnung durchgeführt.

2.1.16 Software

Programm	Hersteller/Firmensitz
BD FACS Diva Software	BD Biosciences/Heidelberg, Deutschland
BioDocAnalyze	Biometra/Göttingen, Deutschland
EditSeq	DNA Star/Madison, USA
FinchTV	Geospiza/Seattle, USA
FlowJo Vers.7.2.5	Tree Star, Inc./Ashland, USA
ImageLab™	Bio-Rad GmbH/München, Deutschland
ImmunoSpot®	C.T.L. Europe GmbH/Bonn, Deutschland
MegAlign	DNA Star/Madison, USA
SeqMan	DNA Star/Madison, USA
SnapGene	GSL Biotech LLC/Chicago, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Um Kontaminationen jeglicher Art zu vermeiden bzw. Sterilität zu gewährleisten, erfolgte die Durchführung sämtlicher zellbiologischer Methoden unter der Sicherheitswerkbank. Ausnahmen stellten hierfür lediglich das Mikroskopieren und Zählen der Zellen dar. Sowohl Arbeitsflächen der Sicherheitswerkbank als auch Verbrauchsmaterialien und Handschuhe wurden vor Benutzung mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert. Kultiviert wurden die eukaryotischen Zellen im Brutschrank bei 37 °C und einem CO₂-Partialdruck von 5 % in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre. Die verwendeten Zellkulturmedien sind unter Abschnitt 2.1.12 aufgeführt. Adhärente Zellen wurden bei 90 %-iger Konfluenz passagiert. Dazu wurden diese zuerst für fünf Minuten durch Inkubation in Trypsin-EDTA-Lösung bzw. mechanisch vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, in PBS suspendiert und abzentrifugiert (1500 rpm/5 min, engl. *revolutions per minute*). Nach anschließender Resuspendierung im entsprechenden Zellkulturmedium wurden die Zellen gezählt und mit ihrer zelllinienspezifischen Dichte ausgesät. Suspensionszellen wurden zweimal pro Woche subkultiviert und dabei, je nach Zelllinie, auf 0,05 – 5x10⁶ Zellen/ml eingestellt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität

Zellzahlen wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt. Zur Viabilitätsbestimmung der Zellen wurde Trypanblau genutzt, welches lediglich geschädigte oder tote Zellen blau anfärbt und dadurch eine Unterscheidung zu weiterhin hell leuchtenden, vitalen Zellen ermöglicht⁴³.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 40 µl einer Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit der Trypanblau-Gebrauchslösung (vgl. Abschnitt 2.1.10) verdünnt und in die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer überführt. Um die jeweilige Zellzahl/ml zu ermitteln, wurde von folgender Formel Gebrauch gemacht⁴³:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten vitalen Zellen}}{\text{ausgezählte Großquadrate} \times \text{Kammertiefe [0,2 mm]}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^3 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung der Zellen wurden diese portionsweise in 1 ml des entsprechenden Einfriermediums (vgl. Abschnitt 2.1.12) aufgenommen und eingefroren. Für die Kryokonservierung von 293T-Zellen sowie sämtlicher Maus-, Melanom- und EBV-B-Zelllinien wurde Einfriermedium_{FCS} genutzt, humane T-Zellen und humane DC wurden in Einfriermedium_{HS} eingefroren⁴³.

Um ein möglichst zellschonendes Einfrieren zu erreichen, wurden die Einfrierröhrchen in mit Isopropanol gefüllten Kryoboxen tiefgeköhlt. Diese gewährleisten ein Abkühlen des Inhalts um -1 °C pro Minute. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in die Stickstoffbank überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese im Wasserbad bei 37 °C leicht angetaut, in vorgewärmtem Medium aufgenommen und zweimal gewaschen, bevor sie gezählt und in Kultur genommen wurden⁴³. Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO bei Raumtemperatur toxisch für Zellen ist, wurde stets darauf geachtet, den Einfrier- und Auftauprozess möglichst zügig durchzuführen⁴³.

2.2.1.4 Isolierung von murinen Splenozyten

Nach Opferung der Mäuse durch zervikale Dislokation wurden die Milzen unter sterilen Bedingungen präpariert und sofort in RPMI_{komplett} homogenisiert. Nach Filterung der Zellsuspension durch 100 µm Nylon-Zellsiebe erfolgte die Erythrozytenlyse für drei Minuten in 3 ml TAC-Puffer (Tris-Ammoniumchlorid). Nach zweimaligem Waschen mit je 10 ml RPMI_{komplett} wurden die Splenozyten gezählt und entsprechend ihrem Verwendungszweck für nachfolgende Versuche ausplattiert.

2.2.1.5 Isolierung humaner peripherer Blutlymphozyten aus Buffy Coats/Heparin-Vollblut und Erythrozytenlyse

Periphere mononukleäre Zellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) wurden aus Vollblut bzw. „Buffy Coats“ durch Ficoll-basierte Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Das Blut wurde dazu zunächst 1:2 mit PBS verdünnt und 15 ml Ficoll im 50 ml Röhrchen vorsichtig damit überschichtet. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 2500 rpm ohne Bremse zeichneten sich die PBMC als milchige Interphase zwischen Plasma- und Ficollschicht ab, welche mit einer Pipette vorsichtig abgenommen wurde. Sofern das Pellet nach dreimaligem Waschen mit PBS noch eine starke Rotfärbung aufwies, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für drei Minuten auf Eis mit 3-5 ml Lysepuffer (vgl. Abschnitt 2.1.10) inkubiert und anschließend ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Abhängig von dem nachfolgenden Verwendungszweck wurden die PBMC kryokonserviert (vgl. Abschnitt 2.2.1.3) oder zur Isolierung von CD3⁺, CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten, CD19⁺ B-Lymphozyten bzw. zur Generierung von EBV-B-Zelllinien und unreifen sowie reifen DC aus Monozyten genutzt⁴³.

2.2.1.6 Isolierung hämatopoetischer Zellen durch magnetische Zellseparation

Die Isolierung hämatopoetischer Zellsubpopulationen erfolgte mittels magnetischer „Micro Beads“ der Fa. Miltenyi (MACS, engl. *magnetically activated cell sorting*), deren Oberfläche mit Antikörpern – gerichtet gegen spezifische CD-Oberflächenmarker der entsprechenden zu isolierenden Zellsubpopulation – beschichtet ist.

Nach dem Waschen der PBMC mit MACS-Puffer (vgl. Abschnitt 2.1.10) wurden je 10x10⁶ Zellen mit 20 µl anti-CD-Micro Beads in 80 µl MACS-Puffer für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die überschüssigen Micro Beads ausgewaschen und die an die magnetischen Micro Beads gebundenen Zellen in 500 µl MACS-Puffer über eine Magnetsäule nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die Isolierung von neutrophilen Granulozyten erfolgte aus Vollblut. Sie wurden zunächst mit Biotin-konjugierten anti-CD66abce-Antikörpern markiert und anschließend durch magnetische Streptavidin-gekoppelte Micro Beads über eine Magnetsäule separiert.

Nach der Aufreinigung wurde die Reinheit der isolierten Zellsubpopulationen durch Färbung charakteristischer CD-Marker durchflusszytometrisch kontrolliert (vgl. Abschnitt 2.2.1.18). T-Zellen wurden dabei anhand ihrer CD3-, CD4- bzw. CD8-Expression charakterisiert. Granulozyten wurden auf die Oberflächenexpression des Markers CD66b, B-Zellen auf die Expression von CD19 und hämatopoetische Blutstammzellen auf die Präsenz von CD34 getestet.

Sowohl die positiven, als auch die negativen Zellfraktionen (Durchlauf) wurden für spätere Anwendungen kryokonserviert oder in Kultur genommen.

2.2.1.7 Generierung von Fast-DC aus plastikadhärenten Monozyten

Fast-DC wurden analog zu Dauer *et al.* generiert²²⁵. Dazu wurden zunächst $10\text{-}15 \times 10^6$ PBMC pro Testeinheit (TE) einer 6-Loch-Zellkulturplatte in je 3 ml RPMI_{DC} (vgl. Abschnitt 2.1.12) für 90 min im Brutschrank inkubiert, bis eine Adhärenz der Monozyten erreicht war. Anschließend wurden die nicht-adhären Zellen durch dreimaliges Waschen mit warmem PBS abgespült und die Monozyten in RPMI_{DC} mit 1.000 IU/ml GM-CSF und 500 IU/ml Interleukin 4 (IL-4) für 24 Stunden bei 37 °C/5 % CO₂ inkubiert, um unreife dendritische Zellen (imDC, engl. *immature dendritic cell*) zu generieren. Diese konnten nun unter der Verwendung von *TripLE™ Express* bei Bedarf geerntet werden. Die Ausdifferenzierung zu reifen DC (mDC, engl. *mature dendritic cell*) erfolgte im nächsten Schritt durch Inkubation für 48 Stunden in RPMI_{DC}, supplementiert mit 10 ng/ml Interleukin-1 β (IL-1 β), 10 ng/ml Tumornekrosefaktor α (TNF α), 1.000 IU/ml Interleukin 6 (IL-6) und 1 μ g/ml Prostaglandin E₂ (PGE₂). Die Reinheit sowie das Maß der Ausreifung wurde durchflusszytometrisch anhand der Oberflächenexpression der DC-Marker CD80, CD83 und CD86 im Vergleich zu der Expression des Monozytenmarkers CD14 bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.1.18).

2.2.1.8 Generierung EBV-immortalisierter B-Zelllinien aus humanen PBMC

Sämtliche im Folgenden genannte Arbeitsschritte wurden in einem Gentechniklabor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Die zur Immortalisierung verwendeten EBV-Überstände wurden durch die Zelllinie B95-8 produziert. Dazu wurden die Zellen wie unter Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben aufgetaut und für drei Tage in RPMI_{komplett} kultiviert. Danach wurden 1×10^6 der adhären Zellen, sowie 1×10^6 der in Suspension gebliebenen Zellen in 25 ml RPMI_{komplett} für zwölf Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Überstände bei 1500 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und durch 0,45 μ m-Filtereinheiten filtriert. Die Lagerung der EBV-Überstände erfolgte in der Stickstoffbank.

Zur Generierung EBV-immortalisierter B-Zelllinien wurden humane PBMC aufgetaut (vgl. Abschnitt 2.2.1.3) und je 10×10^6 Zellen in 10 ml AIM-V human_{komplett} pro 15-ml-Röhrchen aufgenommen. Nach Zentrifugation von fünf Minuten bei 1500 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 500 μ l EBV-Überstand resuspendiert. Nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen in 5 ml RPMI_{komplett} aufgenommen und mit 2 μ l Cyclosporin A (CSA) supplementiert, um eine, durch die EBV-Infektion autologer B-Zellen induzierte, Proliferation zytotoxischer T-Zellen zu verhindern²²⁶. Die Inkubation erfolgte in aufrecht stehenden 25 cm²-Gewebekulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach 24 Stunden wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in frischem RPMI_{komplett} resuspendiert. Die Zellen wurden erneut in aufrecht stehenden 25 cm²-Gewebekulturflaschen im Brutschrank inkubiert, bis sich das Medium gelb verfärbte und die Zellen kleine Klümpchen bildeten. Von da an wurden die Gewebekulturflaschen liegend inkubiert und die Zellsuspension zweimal wöchentlich subkultiviert (vgl. Abschnitt 2.2.1.1) bzw. kryokonserviert (vgl. Abschnitt 2.2.1.3).

2.2.1.9 Generierung tumorspezifischer T-Lymphozyten in MLTC

Die Anreicherung von CD8⁺ tumorreaktiven T-Lymphozyten erfolgte durch Stimulation von PBMC mit autologen Tumorzellen in gemischten Lymphozyten-Tumorzellkulturen (MLTC, engl. *mixed lymphocyte-tumor cell culture*)⁴³.

Dazu wurden zunächst kryokonservierte PBMC aufgetaut (vgl. Abschnitt 2.2.1.3) und das Pellet mit 1 ml DNase (1mg/ml) für fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um einem Verklumpen der Zellen

vorzubeugen. Vor einer ersten Stimulation wurden daraus mittels magnetischer Zellseparation (vgl. Abschnitt 2.2.1.6) CD8⁺ T-Lymphozyten isoliert, um ein Überwachsen der CD8⁺ MLTC-Responderpopulation durch schneller wachsende CD4⁺ T-Lymphozyten zu umgehen. Anschließend wurden pro Testeinheit einer 24-Loch-Zellkulturplatte 1×10^6 CD8-angereicherte PBMC in 1 ml AIM-V_{komplett} ausgesät und je 1×10^5 Tumorzellen sowie 2×10^5 Zellen der CD8-negativen Population, jeweils bestrahlt bei 10.000 Rad (100 Gy), in 1 ml AIM-V_{komplett} zugegeben. Nach dreitägiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte ein Mediumswechsel zu AIM-V_{komplett} und IL-2 in einer Endkonzentration von 250 IU/ml. Einmal wöchentlich wurde die Restimulation der T-Lymphozyten (vgl. Abschnitt 2.2.1.10) durchgeführt⁴³.

2.2.1.10 Klonierung von T-Zellen durch Grenz-Verdünnungsverfahren

CD8⁺ MLTC-Responderlymphozyten wurden durch Grenz-Verdünnungsverfahren in 96-Loch-Rundbodenzellkulturplatten kloniert⁴³.

Dazu wurden die T-Lymphozyten schrittweise nach folgendem Schema verdünnt:

- Verdünnung I: 100.000 T-Lymphozyten/ml
→ 500.000 T-Lymphozyten, aufgenommen in 5 ml AIM-V_{komplett}
- Verdünnung II: 10.000 T-Lymphozyten/ml
→ 500 µl der Verdünnung I und 4,5 ml AIM-V_{komplett}
- Verdünnung III: 1.000 T-Lymphozyten/ml
→ 500 µl der Verdünnung II und 4,5 ml AIM-V_{komplett}
- Verdünnung IV: 100 T-Lymphozyten/ml
→ 2 ml der Verdünnung III und 18 ml AIM-V_{komplett}

Die Verdünnung IV wurde dann dazu verwendet, zehn 96-Loch-Zellkulturplatten mit einem T-Lymphozyten/Testeinheit (TE), eine Platte mit drei T-Lymphozyten/TE und eine Platte mit 0,3 T-Lymphozyten/TE anzusetzen. Dazu wurden je 100 µl der T-Zellsuspension pro TE der 96-Loch-Rundbodenzellkulturplatte ausplattiert, wofür Verdünnung IV nochmals wie nachfolgend dargelegt verdünnt wurde⁴³:

- für jede Platte mit einem T-Lymphozyten/TE ($\triangleq$ 10 T-Lymphozyten/ml)
→ 1,1 ml von Verdünnung IV und 9,9 ml AIM-V_{komplett}
- für jede Platte mit drei T-Lymphozyten/TE ($\triangleq$ 30 T-Lymphozyten/ml)
→ 4,5 ml von Verdünnung IV und 11,25 ml AIM-V_{komplett}
- für jede Platte mit 0,3 T-Lymphozyten/TE ($\triangleq$ 3 T-Lymphozyten/ml)
→ 1,5 ml von Verdünnung IV und 12 ml AIM-V_{komplett}

Dazu wurden als Stimulatorzellen pro Testeinheit 3.000 Tumorzellen und als *feeder*-Zellen 50.000 EBV-B-Zellen, jeweils bestrahlt bei 10.000 Rad (100 Gy), in 100 µl AIM-V_{komplett}, supplementiert mit 250 IU/ml IL-2 gegeben⁴³.

Die daraus resultierenden CTL wurden expandiert, indem sie analog zu Wölfel *et al.*²²⁷ einmal wöchentlich mit den autologen Melanomlinien restimuliert wurden. Dazu wurden, abhängig von der Größe der verwendeten Zellkulturplatte die in folgender Tabelle (**Tabelle 2-1**) zusammengefassten Stimulator- und *feeder*-Zellzahlen eingesetzt⁴³.

Tabelle 2-1: Stimulatorzellzahlen für T-Zellklonierung.

Zellkulturplatte	Verwendete Stimulator- und <i>feeder</i> -Zellezahlen pro TE
96-Loch-Rundbodenzellkulturplatten	3.000 autologe Tumorzellen 50.000 allogene EBV-B-Zellen
96-Loch-Flachbodenzellkulturplatten	20.000 autologe Tumorzellen 50.000 allogene EBV-B-Zellen
48-Loch- Zellkulturplatten	50.000 autologe Tumorzellen 100.000 allogene EBV-B-Zellen
24-Loch- Zellkulturplatten	100.000 autologe Tumorzellen 200.000 allogene EBV-B-Zellen

2.2.1.11 Unspezifische Expansion der CD8⁺ Lymphozyten

2.2.1.11.1 Unspezifische Expansion der humanen CD8⁺ Lymphozyten mit OKT3

2.2.1.11.1.1 Expansion von T-Zellklonen

OKT3 ist ein monoklonaler Antikörper (mAb, engl. *monoclonal antibody*), der die ϵ -Ketten der CD3-Moleküle auf der Oberfläche von T-Zellen bindet und der seine therapeutische Anwendung in der immunsuppressiven Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation findet. Die Wirkung beruht darauf, dass die T-Zellen durch die Bindung des Antikörpers an die CD3-Moleküle zwar unspezifisch aktiviert, in ihrer Effektorfunktion jedoch blockiert und Antikörper-markierte T-Zellen durch das Immunsystem eliminiert werden²²⁸. Ersteres macht man sich bei der unspezifischen Stimulation von CD8⁺ T-Lymphozyten zunutze.

Pro Stimationsansatz wurden $1-2 \times 10^5$ T-Zellen in 5 ml AIM-V_{komplett} in einer 25 cm²-Gewebekulturflaschen vorgelegt. Dazu wurden als *feeder*-Zellen $2,5 \times 10^7$ PBMC (als Mischung der PBMC dreier gesunder Spender) und 5×10^6 allogene EBV-B-Zellen, jeweils bestrahlt mit 10.000 Rad (100 Gy), in 20 ml AIM-V_{komplett} gegeben. Nach Zugabe von OKT3 in einer Endkonzentration von 30 ng/ml, IL-2 in einer Endkonzentration von 250 IU/ml, sowie IL-15 in einer Endkonzentration von 2,5 ng/ml erfolgte die Kultivierung für 14 Tage in aufrecht stehenden 25 cm²-Gewebekulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach sieben Tagen wurden 12,5 ml des Mediums vorsichtig abgenommen und durch 12,5 ml frisches AIM-V_{komplett}, supplementiert mit 250 IU/ml IL-2 und 2,5 ng/ml IL-15, ersetzt. OKT3-stimulierte T-Zellen wurden entweder direkt 14 Tage nach erfolgter OKT3-Stimulation im IFN- γ -ELISpot-Assay eingesetzt oder nach 14-tägiger OKT3-Stimulation einmalig analog zu Wölfel *et al.*²²⁷ restimuliert und fünf Tage später im ELISpot-Assay getestet⁴³.

2.2.1.11.1.2 Vorbehandlung von humanen PBMC für die retrovirale Transduktion

Die meisten – wie auch die in dieser Arbeit verwendeten auf dem **Moloney Maus Leukämie Virus** (MoMLV) basierenden – rekombinanten Retroviren sind lediglich dazu in der Lage, mitotische Zellen stabil zu transduzieren. Sie werden zwar von ruhenden Zellen aufgenommen, das Nukleokapsid kann

jedoch nur die Kernmembran passieren, sobald diese während der Mitosephase aufgelöst ist²²⁹. Daher war es nötig, die T-Zellen in Vorbereitung auf eine Transduktion zu aktivieren bzw. in eine exponentielle Proliferationsphase zu bringen. Dies wurde durch unspezifische Stimulation mit OKT3 erreicht. Dazu wurden 2×10^6 frisch aufgetaute PBMC gesunder Spender in je einem Milliliter RPMI human^{Transduktion} aufgenommen und pro Testeinheit einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Nach Zugabe von 30 ng/ml OKT3 und 600 IU/ml IL-2 erfolgte die Kultivierung für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂, bevor die Zellen schließlich für die Transduktion geerntet wurden (vgl. Abschnitt 2.2.1.13).

2.2.1.11.2 Unspezifische Expansion muriner Splenozyten als Vorbehandlung für die Transduktion

Um murine Splenozyten in eine exponentielle Wachstumsphase zu versetzen und somit eine retrovirale Transduktion zu ermöglichen (vgl. Abschnitt 2.2.1.11.1.2), wurden je 3×10^6 Splenozyten/ml RPMI_{komplett}, supplementiert mit 2 µg/ml **Concanavalin A** (ConA) und 5 % TCGF (engl. **T cell growth factor**), pro Testeinheit einer 24-Loch-Zellkulturplatte bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. ConA ist ein mitogenes Lectin der Jackbohne, das durch einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus eine unspezifische Proliferation muriner T-Zellen induziert²³⁰. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und konnten für eine Transduktion verwendet werden.

2.2.1.11.3 Unspezifische Expansion der CD8⁺ Splenozyten mit CD3/CD28-Dynabeads

Für eine unspezifische Stimulation muriner Splenozyten nach der Transduktion (vgl. Abschnitt 2.2.1.13) wurden je 1×10^6 Splenozyten mit 1,5 µl CD3/CD28-Dynabeads nach Angaben des Herstellers pro Testeinheit einer 24-Loch-Zellkulturplatte in 2 ml RPMI_{komplett}, supplementiert mit 10 % TCGF, stimuliert. Funktionale Tests erfolgten vier bis fünf Tage nach der Stimulation.

2.2.1.12 Transiente und stabile Transfektionen von Zellen

Transfektion beschreibt das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen. Dabei unterscheidet man die transiente Transfektion, bei der die fremde DNA nur kurzzeitig in der Wirtszelle verbleibt, von stabiler Transfektion, bei der die Fremd-DNA in das Wirtsgenom integriert. Unerlässlich für eine optimale Transfektionseffizienz ist, dass die Zielzellen sich zum Zeitpunkt der Transfektion in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Aus diesem Grund wurden die Zellen unabhängig vom Transfektionsverfahren zwei bis fünf Tage vor der Transfektion subkultiviert, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70 % aufwiesen. Um bei den zu transfizierenden Zellen einen Wachstumsschub zu erreichen wurde für 293T-Zellen und Melanomzelllinien ca. 16 Stunden vor der Transduktion bzw. für Phoenix-AMPHO-Zellen vier Stunden vor der Transfektion ein Mediumswechsel durchgeführt.

2.2.1.12.1 Transiente Transfektion von 293T-Zellen mittels Lipofectamine™ 2000

Durch die transiente Transfektion von 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden, die für Antigene kodierten, mittels *Lipofectamine™ 2000* wurden Antigen-präsentierende Zellen hergestellt, die als T-Zell-Targetzellen im ELISpot-Assay eingesetzt wurden.

Die Transfektion erfolgte direkt in der ELISpot-Platte. Hierfür wurden 20.000 293T-Zellen pro Testeinheit der 96-Loch-Zellkulturplatte in je 120 µl RPMI_{Blockade} vorgelegt. Chargenabhängig wurden pro TE 0,2-1,0 µl *Lipofectamine™ 2000* ad 21 µl RPMI gemischt und die Lösung fünf Minuten bei RT inkubiert. 300 ng Antigen-DNA und, sofern benötigt, 100 ng HLA-cDNA wurden in 12 µl RPMI pro TE zugegeben

und nach 20-minütiger Inkubation des *Lipofectamine*TM 2000-DNA-Gemischs bei RT 30 µl pro TE zu den zu transfizierenden Zellen pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die T-Zellen dazu gegeben⁴³.

2.2.1.12.2 Transiente Transfektion von Expi293TM-Zellen mittels ExpiFectamineTM

Für die transiente Transfektion der Expressionszelllinie Expi293TM wurden die Zellen einen Tag zuvor auf eine Zelldichte von 2x10⁶ Zellen/ml Expi293TM Expressions-Medium verdünnt. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen auf 2,9x10⁶ Zellen/ml mit Expi293TM Expressions-Medium eingestellt. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des *Expifectamine*TM 293 *Transfection Kits* der Firma Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die transfizierte DNA setzte sich aus Plasmiden zusammen, deren cDNA-Inserts für folgende Proteine kodierten: 74 % (740 ng/ml) des gewünschten Antigens (z.B. CSF2RA, TRP-2), 25 % (250 ng/ml) p21 und p27 (kodiert in einem bicistronischen Vektor) sowie 1 % (10 ng/ml) SVLT-DNA (engl. *Simian Vacuolating Virus 40 large T* antigen). P21 und p27 führen zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G1- und S-Phase^{231,232}, was in einer erhöhten Expression der Antigene resultiert. Das SVLT-Gen dient dabei der Steigerung der Expression von mit dem SV40-Origin/Promoter ausgestatteten transfizierten Vektoren durch die Induktion von episomaler Replikation der transfizierten Plasmide. Geerntet wurden die Zellen bzw. Überstände drei Tage nach der Transfektion. Zur Kontrolle wurde *eGFP*-cDNA (engl. *enhanced green fluorescent protein*) transfiziert und die Transfektionseffizienz durchflusszytetrisch ermittelt (vgl. Abschnitt 2.2.1.18).

2.2.1.12.3 Transiente Transfektion von Phoenix-AMPHO-Zellen mittels FuGene[®]6

Um die Verpackungszelllinien Phoenix-AMPHO zur Virenproduktion zu befähigen, wurde diese transient durch *FuGene*[®]6 mit den dazu benötigten Plasmiden transfiziert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1,2x10⁶ Zellen pro 10 cm-Zellkultur-Petrischale in 8 ml DMEM_{Phoenix-AMPHO} ausgesät. Nach 24 Stunden bzw. vier Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumswechsel zu 8 ml frischem DMEM_{Phoenix-AMPHO}. Für die Transfektion wurden zunächst pro Petrischale 800 µl DMEM mit 60 µl *FuGene*[®]6 im 1,5 ml-Eppendorf-Cup vorgelegt und fünf Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde dazu 10 µg des retroviralen Expressionsvektors gegeben, dessen Fremd-Gen es in die Viren zu verpacken galt. Außerdem wurden je 5 µg der beiden Helferplasmide pHIT60 (kodierend für Polymerase- sowie Strukturgene des Virus)^{195,197} und pCOLT-GALV (kodierend für die viralen Hüllproteine)¹⁹⁵ für die Transduktion humaner PBMC und Jurkat-76-Zellen, bzw. 7 µg des Helferplasmids pCL-ECO (kodierend für virale Polymerase-, Struktur- sowie Hüllproteine)¹⁹⁶ für die Transduktion muriner Splenozyten zugegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise und unter stetigem, vorsichtigen Schwenken der Petrischalen zu den Phoenix-AMPHO-Zellen gegeben.

2.2.1.12.4 Stabile Transfektion durch Elektroporation

Um möglichst optimale Transfektionseffizienzen zu erhalten, wurden die Elektroporationsbedingungen zur stabilen Transfektion für jede Zelllinie spezifisch ausgetestet (siehe **Tabelle 2-2** für die jeweils optimalsten Elektroporationsbedingungen). 3x10⁶-10x10⁶ Zellen wurden in 100-200 µl OptiMEM aufgenommen und in Elektroporationsküvetten überführt. Anschließend wurden 7,5-25 µg cDNA zugegeben und die Küvette in den Elektroporator gestellt. Nach erfolgtem Stromimpuls wurden die

Zellen für fünf Minuten bei RT in der Elektroporationskuvette inkubiert, bevor sie schließlich in 5 ml vorgewärmten RPMI_{komplett} aufgenommen und in aufrecht stehenden 25 cm²-Gewebekulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert wurden. Als Kontrolle wurde *eGFP*-cDNA elektroporiert. Stabile Transfektanten wurden durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums selektiert und eventuell kloniert. Ca. 24 Stunden nach erfolgter Elektroporation wurde die Transfektionseffizienz anhand der *eGFP*-Expression durchflusszytometrisch ermittelt (vgl. Abschnitt 2.2.1.18) ⁴³.

Tabelle 2-2: Übersicht der Elektroporationsbedingungen für verschiedene Zelllinien.

Zelllinie	verwendete Zellzahl je Kuvette	DNA/RNA-Menge	Spaltbreite der Kuvette	Impuls (square wave)
B78H1	3x10 ⁶ Zellen/100 µl	10 µg DNA	2 mm	140 V/25 ms
	3x10 ⁶ Zellen/100 µl	7,5 µg DNA	2 mm	160 V/15 ms
Jurkat-76	10x10 ⁶ Zellen/200 µl	25 µg DNA	2 mm	140 V/25 ms
Ma-Mel-86b.12	3x10 ⁶ Zellen/100 µl	10 µg DNA	2 mm	140 V/25 ms
Ma-Mel-86c	3x10 ⁶ Zellen/100 µl	10 µg DNA	2 mm	140 V/25 ms

2.2.1.13 Retrovirale Transduktion humaner PBMC/muriner Splenozyten und der T-Zell-Leukämie-Zelllinie Jurkat-76 mit den TCR-Konstrukten

Die retrovirale Transduktion wurde in Anlehnung an Voss *et al.* durchgeführt²³³. Sämtliche im Folgenden genannten Arbeitsschritte wurden in einem Gentechniklabor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Erst zwei Wochen nach erfolgter Transduktion wurden die transgenen Zellen in ein Gentechniklabor der Sicherheitsstufe 1 überführt.

Die Verpackungszelllinie Phoenix-AMPHO wurde für jede Transfektion frisch aufgetaut (vgl. Abschnitt 2.2.1.3) und zunächst 1x10⁶ Zellen pro 75 cm²-Gewebekulturflasche bei 37 °C/5 % CO₂ in 13 ml DMEM_{Phoenix-AMPHO} kultiviert. Nach drei Tagen wurden die Zellen erneut subkultiviert und mit 1,2x10⁶ Zellen pro 10 cm-Zellkultur-Petrischale in 8 ml DMEM_{Phoenix-AMPHO} ausgesät. Die Transfektion erfolgte am Folgetag (vgl. Abschnitt 2.2.1.12.3) vier Stunden nach einem Mediumswechsel. Transfiziert wurde dabei sowohl der retrovirale Vektor pBul_{let}_IRES_neo^{194,195} bzw. pMX¹⁹⁸, kodierend für den TCR, sowie die Helferplasmide. Dienten humane Zellen als Transduktionstargets, wurden die Helferplasmide pHIT60, welches für Polymerase- und Strukturproteine des Moloney Maus Leukämie Virus kodiert^{195,197}, und pCOLT-GALV, kodierend für amphotrope Hüllproteine des Gibbonaffenleukämievirus (GALV)¹⁹⁵, kotransfiziert. Sollten murine Zellen transduziert werden, wurde das MoMLV-basierte Helferplasmid pCL-ECO¹⁹⁶, kodierend sowohl für virale Polymerase-, Struktur, als auch ecotrope Hüllproteine, verwendet. Circa. 26-28 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium erneut verworfen und mit 8 ml RPMI human_{Transduktion} ersetzt, um am darauffolgenden Tag möglichst frischen Überstand, angereichert mit den infektiösen retroviralen Partikeln, zu erhalten. Der Überstand wurde nach ca. 20 Stunden bei 2000 rpm für zehn Minuten abzentrifugiert, um Zellreste zu entfernen, und stand nun für die Transduktion von PBMC, Splenozyten oder Jurkat-76-Zellen zur Verfügung. Dazu wurden die zu transduzierenden Zellen nach entsprechender Vorbehandlung (vgl. Abschnitt 2.2.1.11.1.2 und Abschnitt 2.2.1.11.2) für fünf Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert und im retroviralen Überstand resuspendiert. Pro ml retroviraler Überstand wurden 1x10⁶ OKT3-stimulierte humane PBMC, 1x10⁶ Jurkat-76-Zellen oder 2x10⁶ ConA-stimulierte murine Splenozyten resuspendiert. Nach Zugabe von 4 µg/ml Polybrene

und 600 IU/ml IL-2 wurde je 1 ml der Zellsuspension pro TE einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und diese für 90 min bei 2000 rpm und 32 °C ohne Bremse zentrifugiert. Für die Transduktion muriner Splenozyten wurden die 24-Loch-Zellkulturplatten zuvor über Nacht bei 4°C mit 25 mg/ml Retronectin pro TE beschichtet, am Folgetag einmal mit 1 ml PBS pro TE gewaschen und mit 1 ml/TE 2 % BSA (Rinderserumalbumin, engl. *bovine serum albumin*) in PBS blockiert. Anschließend erfolgte eine Kultivierung für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂, bevor eine zweite Transduktionsrunde mit frisch geerntetem viralen Überstand durchgeführt wurde. Nach erneuter 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die T-Lymphozyten/Splenozyten mit bestrahlten Tumorzellen oder CD3/CD28-Dynabeads (vgl. Abschnitt 2.2.1.11.3) stimuliert. Sofern der transduzierte retrovirale Expressionsvektor mit einem Neomycin-Resistenzgen ausgestattet war (pBullet_IRES_neo), erfolgte dabei die Selektion transduzierter T-Zellen durch Zugabe von 0,8 mg/ml G418. Die Jurkat-76-Zellen wurden lediglich mit 1,6 mg/ml G418 selektiert; eine Stimulation war bei der bereits immortalisierten Zelllinie nicht erforderlich. Nach zwei bis drei Tagen wurde die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch anhand der Oberflächenexpression der entsprechenden TCR-V β -Kette evaluiert (vgl. Abschnitt 2.2.1.18). Die Restimulation der TCR-transgenen T-Zellen erfolgte analog zu Wölfel *et al.*²²⁷ wöchentlich mit 0,1x10⁶ Zellen Ma-Mel-86c (bestrahlt) pro 1,5x10⁶ T-Zellen in AIM-V_{komplett} (vgl. Abschnitt 2.2.1.10), supplementiert mit 600 IU/ml IL-2 und, sofern der eingebrachte retrovirale Expressionsvektor ein Neomycin-Resistenzgen enthielt (pBullet_IRES_neo) mit 0,8 mg/ml G418. Einen Tag vor Funktionalitätstests wurde die prozentuale TCR-Expression durch Färbung von CD8 bzw. CD4 sowie der entsprechenden TCR-V β -Kette erneut ermittelt und die einzusetzende Gesamtzellzahl reaktiver Effektorzellen berechnet. Zudem wurde dem Medium frisches IL-2 zugesetzt.

2.2.1.14 Interferon- γ -ELISpot-Assay

Das Prinzip des IFN- γ -ELISpot-Assays (engl. *enzyme-linked immunosorbent spot*) basiert auf dem Antikörper-vermittelten Nachweis des Zytokins Interferon- γ (IFN- γ), welches von T-Lymphozyten nach spezifischem Antigenkontakt freigesetzt wird. Dazu wird zunächst ein gegen ein IFN- γ -Epitop gerichteter, monoklonaler Primärantikörper mit seiner konstanten Domäne an eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) gebunden. Wird von den T-Lymphozyten infolge eines spezifischen Antigen – T-Zellrezeptorkontaktes IFN- γ sezerniert, kann dieses durch die variable Domäne des Primärantikörpers gebunden werden. Die Zellen werden nach 20-24 Stunden abgewaschen und ein monoklonaler Sekundärantikörper, gerichtet gegen ein zweites IFN- γ -Epitop, zugegeben. Da dieser Zweitantikörper biotinyliert ist, bindet die im darauffolgenden Schritt zugegebene Avidin-gekoppelte Peroxidase an diesen. Das Enzym setzt das im letzten Schritt zugegebene Substrat 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) zu dem roten Produkt 3-Azo-9-Ethylcarbazol um, wodurch die IFN- γ -Freisetzung auf der Membran durch so genannte „Spots“ lokal determiniert wird.

Die Durchführung der Methode erfolgte nach Britten *et al.*²³⁴. Zunächst wurden die ELISpot-Platten mit 15 μ l 35 %-igen Ethanol pro TE aktiviert und dreimal mit 150 μ l PBS/TE gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit 500 ng Primärantikörper (mAb 1-D1K bzw. mAb AN18)/50 μ l PBS/TE über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor der Belegung der ELISpot-Platten wurden diese dreimal mit 150 μ l PBS/TE gewaschen und für 30 min bei 37 °C mit 120 μ l/TE RPMI_{Blockade} blockiert, um eine unspezifische Bindung des später freigesetzten IFN- γ an die Membran zu verhindern. Wenn 293T-Zellen als APC benötigt wurden, erfolgte deren transiente Transfektion mit Antigen- und, sofern benötigt, HLA-cDNA durch

Lipofectamine™2000 direkt in der Platte (vgl. Abschnitt 2.2.1.12.1). Nach ca. 20 Stunden bei 37 °C/5 % CO₂ wurden erst die Malignom- bzw. hämatopoetischen Targetzellen und gegebenenfalls Peptide bzw. Antikörper zur Blockade einer T-Zellerkennung und schließlich die T-Lymphozyten zugegeben (für eingesetzte Target-/Effektorzellzahlen siehe **Tabelle 2-3**). Verwendet wurden dazu in der Regel T-Zellen vier bis sechs Tage nach erfolgter Restimulation. Eine Ausnahme stellten hierbei lediglich OKT3-stimulierte T-Zellen dar, die in einigen Tests direkt 14 Tage nach erfolgter OKT3-Stimulation im IFN-γ-ELISpot-Assay eingesetzt wurden. Die Entwicklung der ELISpot-Platten erfolgte nach 20 Stunden Koinkubation von T-Lymphozyten und Targetzellen bei 37 °C/5 % CO₂. Zuerst wurden die Platten dafür sechsmal mit PBS mit 0,05 % Tween®20 gewaschen. Nach einer zweistündigen Inkubation mit 2 µg/ml des Sekundärantikörpers (mAb 7-B6-1 bzw. mAb R4-6A) in PBS/0.5% BSA bei 37 °C/5 % CO₂ wurden die Platten erneut sechsmal mit 0,05 % Tween®20 in PBS gewaschen und für eine Stunde im Dunkeln mit einem Konjugat aus Avidin und Peroxidase in PBS/0.1% Tween®20 inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit 0,05 % Tween®20 in PBS und dreimal mit PBS gewaschen, um ungebundene Peroxidase zu entfernen und die Platten schließlich für zehn Minuten mit dem Substrat 3-Amino-9-Ethylcarbazol inkubiert. Das durch die T-Zellen freigesetzte, an die Antikörper gebundene, IFN-γ wurde somit in Form von rötlichen Spots auf der Membran sichtbar gemacht. Die Computer-gestützte Auswertung (CVIA, engl. *Computer-assisted Video Image Analysis*) der ELISpot-Platten erfolgte unter Zuhilfenahme des *C.T.L. ImmunoSpot® S5 Versa Analyzers* der Firma C.T.L. Europe GmbH (Bonn, Deutschland).

Tabelle 2-3: Übersicht eingesetzter Target-/Effektorzellzahlen im ELISpot-Assay.

Zelllinie	verwendete Zellzahl im ELISpot-Assay
transient oder stabil transfizierte 293T-Zellen	20.000 Zellen/TE
Melanomzellen	50.000 Zellen/TE
AML-, CML-, ALL-, APL-Zellen, EBV-B-Zellen	50-75.000 Zellen/TE
Monozyten, Granulozyten, CD19 ⁺ Zellen, CD34 ⁺ Zellen, imDC und mDC aus Leukozytenkonzentraten bzw. Vollblut	50.000 Zellen/TE
primäre AML- und CML-Isolate	40.000-50.000 Zellen/TE
CTL-Klone	5.000-40.000 Zellen/TE
TCR-transgene T-Zellen	1,500-50.000 TRBV ⁺ Zellen/TE

2.2.1.15 Antikörper-/GM-CSF-Blockade der T-Zellen

Um eine Reaktivität der T-Zellen gegen allogene HLA-Moleküle auszuschließen bzw. die Reaktivität gegen ein spezifisches Antigen zu bestätigen, wurden im ELISpot-Assay monoklonale Antikörper – gerichtet gegen einzelne HLA-Moleküle oder Gruppen von HLA-Molekülen bzw. gegen das entsprechende Antigen selbst – eingesetzt. Diese wurden entweder kommerziell erworben oder aus Hybridomüberständen durch Affinitätschromatographie aufgereinigt (vgl. Abschnitt 2.2.1.19). Die für eine erfolgreiche Blockade einzusetzende Antikörperkonzentration wurde zuvor im IFN-γ-ELISpot-Assay ausgetestet.

Für eine Blockade der Erkennung von CSF2RA-positiven Zellen durch den entsprechenden CTL bzw. die entsprechenden TCR-transgenen T-Zellen wurden die Targetzellen über Nacht mit 3.000-30.000 IU

GM-CSF/ml Kulturmedium vorinkubiert. Für den Blockadetest im IFN- γ -ELISpot-Assay am nächsten Tag wurden erneut 3.000-30.000 IU GM-CSF/ml zugegeben.

2.2.1.16 ⁵¹Chrom-Freisetzungstest

Zur Bestimmung des lytischen Potentials sowie der Spezifität der T-Lymphozyten gegenüber Targetzellen wurde der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest analog zu Britten *et al.*²³⁴ angewandt.

Dazu wurden 1×10^6 Targetzellen in 50 μ l FCS resuspendiert und mit 100 μ Ci Natriumchromat ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) für zwei Stunden bei 37 °C/5 % CO_2 inkubiert. Das überschüssige, von den Targetzellen nicht aufgenommene, $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit RPMI_{komplett} entfernt und die Targetzellen auf $1,25 \times 10^4$ Zellen/ml in RPMI_{komplett} eingestellt. 1.000 Targetzellen/TE wurden in eine 96-Loch-Rundbodenzellkulturplatte ausplattiert und Effektorzellen in Effektorzell-zu-Targetzell-Verhältnissen (E:T) von 0,2:1 bis 60:1 zugefügt. Um die Spontan- und Maximalfreisetzung des ⁵¹Chrom-Nuklids zu ermitteln, wurde RPMI_{komplett} bzw. eine 1,0 %-ige Tween®20-PBS-Lösung zugegeben. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C/5 % CO_2 wurden die Platten für fünf Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert und 80 μ l der Überstände für die Auswertung des freigesetzten ⁵¹Chrom-Nuklids (⁵¹Cr) in Polystyrol-Röhrchen überführt. Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte nach folgender Formel⁴³:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = \frac{(\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})}{(\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})} \times 100$$

2.2.1.17 Degranulationstest

Der Degranulationstest wurde erstmals von Betts *et al.*²³⁵ als Durchflusszytometrie-basierter Funktionalitätstest für das zytolytische Potential von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen beschrieben. Dabei wird die Zunahme der Oberflächenexpression von CD107a (LAMP-1; engl. *lysosomal-associated membrane protein 1*) infolge einer T-Zellstimulation durchflusszytometrisch analysiert. CTL enthalten zytotoxische Granula, welche nach einer Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit der Zytoplasmamembran verschmelzen, um ihren zytotoxischen Inhalt zu entleeren (vgl. Abschnitt 1.1). CD107a als Teil der zytotoxischen Granula wird dabei ebenfalls transient auf der Zelloberfläche exponiert, bevor die Moleküle wieder internalisiert werden.

Die T-Zellen wurden dabei mit 1 μ l anti-CD107a-PE-Cy5/ 1×10^6 T-Zellen für 30 min markiert und anschließend für 24 Stunden mit den auf Erkennung zu testenden Targetzellen im E:T-Verhältnis von 2:1 bei 37 °C/5 % CO_2 koinkubiert. Zugegeben wurde dabei außerdem der Sekretionsinhibitor Monensin, welcher einer Azidifizierung intrazellulärer Kompartimente wie beispielsweise Lysosomen entgegenwirkt und somit eine Degradierung wieder endozytierter CD107a-Antikörper-Komplexe verhindert²³⁵. Daraufhin wurden die T-Zellen gewaschen, mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD4 oder CD8 gefärbt und in Kombination mit der Oberflächenexpression von CD107a durchflusszytometrisch analysiert (vgl. Abschnitt 2.2.1.18). Als Negativkontrolle dienten dabei mit irrelevanten Targetzellen stimulierte T-Zellen. Für die Bestimmung des Maximaldegranulationswertes wurden mit Phorbol-Myristat Azetat (PMA; 2,5 pg/ml) und Ionomycin (1 ng/ml) stimulierte T-Zellen verwendet.

2.2.1.18 Durchflussszytometrie

Die fluoreszenzbasierte Durchflussszytometrie (FACS, engl. *fluorescence-activated cell sorting*) erlaubt die Charakterisierung bzw. Analyse von Zellen anhand immunphänotypischer Oberflächenmoleküle. Dazu werden die Oberflächenmoleküle entweder direkt mit Antikörpern, an welche ein Fluorophor gekoppelt ist, oder mit unkonjugierten Primärantikörpern gefärbt. In letzterem Fall werden die Primärantikörper wiederum in einem zweiten Schritt mit Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern – gerichtet gegen die Fc-Region der Primärantikörper – gefärbt.

Für durchflussszytometrische Analysen wurden zunächst $0,2 \times 10^6$ Zellen pro FACS-Röhrchen mit 2 ml RPMI_{komplett} gewaschen und für fünf Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellpellets mit 100 µl Hybridomüberstand resuspendiert bzw. mit kommerziell erworbenen Antikörpern (1:20 bis 1:1000 verdünnt mit RPMI_{komplett}) versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und für fünf Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert. Sofern es sich bei dem verwendeten Antikörper um einen ungekoppelten Primärantikörper handelte, folgte nun die Färbung mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper. Dazu wurde dieser 1:100 mit PBS/1 % BSA verdünnt und je 50 µl auf das Zellpellet gegeben. Nach Resuspension erfolgte erneut eine Inkubation für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und nach Zentrifugation von fünf Minuten bei 1500 rpm mit 200-500 µl FACS-Fixierungslösung fixiert⁴³.

Die zur Kontrolle der Transfektionseffizienz mitgeführten eGFP-Trasfektanten (vgl. Abschnitt 2.2.1.12.2 und Abschnitt 2.2.1.12.4) wurden nach einmaligem Waschen 2 ml FACS-Puffer direkt mit 200-500 µl FACS-Fixierungslösung fixiert.

Die Messung erfolgte mittels des Durchflussszytometers *BD FACS Canto™II* mit Hilfe der dazugehörigen Software *BD FACS DIVA* (BD Biosciences, Heidelberg). Die Auswertungen wurde unter Zuhilfenahme der Software *FlowJo* (Tree Star, Inc., Ashland/USA) durchgeführt.

2.2.1.19 Kultivierung von Antikörper-produzierenden Hybridomzelllinien und Antikörper-aufreinigung

Antikörper-produzierende Hybridomzellen wurden wie unter Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben aufgetaut und mit 2×10^5 Zellen/ml in RPMI_{komplett} bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Erhaltungskulturen wurden dabei zweimal wöchentlich subkultiviert. Aus den Erhaltungskulturen wurden regelmäßig Gewebekulturflaschen für die Antikörperproduktion mit $0,1 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät, die im Inkubator kultiviert wurden, bis das Medium nach ca. sechs bis sieben Tagen gelb war. Die Zellen wurden bei 1500 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert, der Überstand gesammelt und bei 4 °C aufbewahrt. Ob der Überstand den entsprechenden Antikörper enthielt, wurde nach Färbung verschiedener Zellen, die das entsprechende Antigen exprimieren, durchflussszytometrisch analysiert (vgl. Abschnitt 2.2.1.18).

Für die Antikörperaufreinigung wurde der Überstand auf einen pH von 8,0 eingestellt, sterilfiltriert und über eine zuvor nach Angaben des Herstellers equilibrierte Affinitätssäule (*Hi Trap™ Protein GHP*-Säule) aufgereinigt. Nach dem Waschen der Säule mit 10 ml *Binding*-Puffer wurde der Antikörper in vier Fraktionen à 2 ml Elutionspuffer eluiert. Die Antikörper-enthaltenden Fraktionen wurden über Nacht bei 4 °C in PBS dialysiert und am Folgetag sterilfiltriert, bevor die photometrische Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des *Bio-Rad Protein Assays* erfolgte (vgl. Abschnitt 2.2.2.17). Im IFN-γ-ELISpot-Assay wurden die aufgereinigten Antikörper in den Verdünnungsstufen 1:20, 1:10 und

1:5 auf ihre Fähigkeit hin geprüft, die Erkennung von Antigenen durch entsprechende HLA-restringierte T-Lymphozyten zu blockieren.

2.2.1.20 Ausdifferenzierung von MUTZ-3-Zellen zu unreifen und reifen DC

Die Zelllinie MUTZ-3 wurde aus peripherem Blut eines 29-jährigen Patienten mit akuter myelomonozytärer Leukämie (FAB M4) generiert und unter normalen Bedingungen in MEM α MUTZ-3 kultiviert. Sie kann aufgrund ihres hohen Anteils an CD34⁺ DC-Vorläuferzellen leicht zu unreifen sowie reifen DC ausdifferenziert werden^{217,218}.

Dazu wurden die Zellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit 3×10^5 Zellen/ml MEM α MUTZ-3-Differenzierung, supplementiert mit 100 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4 und 2,5 ng/ml TNF α , in 12-Loch-Zellkulturplatten bei 37 °C/5 % CO₂ inkubiert. Die Zytokine wurden dabei alle drei Tage erneut zugegeben, bis nach sieben Tagen die unreifen DC geerntet werden konnten. Durch Zugabe von 75 ng/ml TNF α , 10 ng/ml IL-1 β , 1000 IU/ml IL-6 und 1 μ g/ml PGE₂ wurden die unreifen DC innerhalb von 72 Stunden bei 37 °C/5 % CO₂ zu reifen DC ausdifferenziert.

Die Überprüfung von Reinheit und Ausreifung erfolgte anhand der durchflusszytometrischen Expressionsanalyse (vgl. Abschnitt 2.2.1.18) der DC-Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 im Vergleich zum Monozytenmarker CD14.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien

Transgene Bakterien wurden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten kultiviert, die mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion versetzt wurden. Die Inkubation erfolgte dabei für 16 Stunden bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm für Bakterienkulturen in LB-Medium bzw. bei 37 °C für Bakterienkulturen auf LB-Agarplatten.

Kryokonserviert wurden die Bakterien in LB-Medium mit einer Endkonzentration von 15 % Glycerol bei -80 °C.

2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Rekombinante Plasmid-DNA wurde mittels der molekularbiologischen Kits der Firma QIAGEN in Hilden, Deutschland (*HiSpeed® Plasmid Maxi Kit*, *QIAprep® Spin Miniprep Kit*) laut den Angaben des Herstellers aus Bakteriensuspensionen isoliert. Die Konzentration der mit EB-Puffer isolierten Plasmid-Lösungen erfolgte spektralphotometrisch (vgl. Abschnitt 2.2.2.17) bevor die isolierte Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert wurde.

2.2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle nach Anlegen eines elektrischen Feldes durch eine Agarosegelmatrix und werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Kleine Moleküle wandern dabei schneller als große Moleküle. Die Konzentration der Agarose bestimmt den Trennbereich der DNA-Fragmente, wobei diese umso höher gewählt werden muss, je kleiner die zu erwartenden DNA-Fragmente sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Agarosegele mit Konzentrationen von 0,8 % bis 2,0 % verwendet. Dazu wurden 0,8 g bis 2 g Agarose in 100 ml 0,5x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 70 °C wurden der verflüssigten Agarose 0,5 µl GelRed zugesetzt. GelRed ist ein interkalierender DNA-Farbstoff, der nach Exposition mit UV-Licht rot fluoresziert und somit die im Agarosegel gebundenen DNA-Fragmente sichtbar macht. Anschließend wurde die Agaroselösung in noch flüssigem Zustand in die Gelkammer gegossen, der Gelkamm für die Herstellung der Probentaschen eingesetzt und das Gel für ca. 30 min vollständig auspolymerisiert. Nach Auftragen der mit Ladepuffer versetzten, zu analysierenden DNA-Lösung auf das Gel erfolgte die Elektrophorese in 0,5x TBE als Laufpuffer bei einer Spannung von ca. 5 V/cm Laufstrecke bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Die Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente erfolgte dabei anhand gleichzeitig mitgeführter, definierter DNA-Größenstandards.

RNA-Moleküle wurden durch denaturierende Formaldehyd-Agarosegele aufgetrennt. Dazu wurde zunächst 1 mg Agarose in 72 ml H₂O_{DEPC} geschmolzen und nach Abkühlen auf etwa 60 °C 10 ml 10x MOPS-Puffer, 18 ml 37 %-iges Formaldehyd und 0,5 µl GelRed zugegeben. Als Laufpuffer diente einfach konzentrierter MOPS-Puffer. Sowohl die RNA-Proben in RNA-Ladepuffer als auch der RNA-Größenstandard wurden vor dem Auftragen auf das Gel für fünf Minuten bei 72 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5 V/cm Laufstrecke.

Schlussendlich erfolgte die Dokumentation der Gelelektrophoreseergebnisse mit Hilfe des *BioDocAnalyze-Systems* (Biometra/Göttingen, Deutschland).

2.2.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Sowohl zur Analyse von DNA-Sequenzen als auch zur Linearisierung von Plasmiden bzw. zum Erhalt definierter DNA-Fragmente für anschließende Klonierungsexperimente war das Schneiden der DNA mittels Restriktionsendonukleasen erforderlich. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme aus Bakterien oder Archaeen, die bestimmte Sequenzmotive erkennen und die DNA an dieser Stelle hydrolysieren. Pro µg DNA wurden dabei zehn Units der Restriktionsendonuklease zugegeben und die Reaktion in entsprechendem Puffer bei laut Herstellerangaben empfohlener Temperatur für mindestens zwei Stunden inkubiert.

2.2.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau bzw. von PCR-Produkten zur Sequenzanalyse aus Agarosegelen wurde das *QIAquick® Gel Extraction Kit* der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte dabei in 25-50 µl EB-Puffer, gefolgt von der spektralphotometrischen Bestimmung der Nukleinsäurereinheit und -konzentration.

2.2.2.6 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels alkalischer Phosphatase

Um eine Religation des Vektorrückgrats in der Ligationreaktion (vgl. Abschnitt 2.2.2.7.1) nach erfolgtem Restriktionsverdau zu verhindern, ist es möglich, die Vektorenden am 5'-Ende zu dephosphorylieren. Dazu wurden pro 30-50 µg restringierter (vgl. Abschnitt 2.2.2.4) und durch Agarosegelelektrophorese aufgereinigter Plasmid-DNA (vgl. Abschnitt 2.2.2.5) zehn Units alkalische Phosphatase im vom Hersteller empfohlenen Puffer zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Mit Hilfe des *High Pure® PCR Product Purification Kits* (vgl. Abschnitt 2.2.2.12) von QIAGEN (Hilden, Deutschland) wurde der Vektor anschließend nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und konnte nach spektralphotometrischer Konzentrationsbestimmung (vgl. Abschnitt 2.2.2.17) für eine Ligation verwendet werden.

2.2.2.7 Ligation

2.2.2.7.1 Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten

Unter Ligation versteht man die enzymkatalysierte, kovalente Verknüpfung mehrerer DNA-Fragmente. Im Rahmen von Klonierungsexperimenten wurde hierbei die vom Bakteriophagen T4 stammende T4-DNA-Ligase verwendet. Vektor und Insert wurden dabei in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die zu verwendende Menge an Insert berechnete sich anhand folgender Formel:

$$\text{Menge des Inserts (ng)} = \frac{3 \times \text{Menge des Vektors (ng)} \times \text{Länge (kb) des Inserts}}{\text{Größe (kb) des Vektors}}$$

Die Reaktion wurde nach Angaben des Enzymherstellers (NEB/Frankfurt am Main, Deutschland), angesetzt und für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Ligase bei 65 °C für 15 min hitzeinaktiviert, woraufhin eine Transformation (vgl. Abschnitt 2.2.2.8) in chemisch kompetente *E. coli* erfolgte.

2.2.2.7.2 Klonierung von PCR-Amplifikaten mittels des TOPO® TA Expression Kits

Für die Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pcDNA™3.1/V5-His TOPO® wurde das pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit der Firma Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) laut Vorgaben des Herstellers genutzt. Abweichend zum mitgelieferten Protokoll wurde lediglich die Menge des Klonierungsansatzes reduziert. Dazu wurden 2 µl des PCR-Produkts mit 0,5 µl Vektor und 0,5 µl Salzlösung (200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) für 30 min bei RT inkubiert.

2.2.2.8 Transformation von Bakterien

Transformation bedeutet das nicht-virale Einbringen von freier Fremd-DNA in Bakterienzellen. Dazu wurden die Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend 2 µl eines Ligations-/Rekombinationsansatzes bzw. 2-10 ng Plasmid-DNA bei einer Retransformation zu 45 µl chemisch kompetenten Bakterien gegeben. Nach Inkubation auf Eis für mindestens 30 min erfolgte ein Hitzeschock von 45 s bei 42 °C, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation auf Eis. Danach wurde dem Transformationsansatz 250 -500 µl auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium (engl. *super optimal broth with catabolite repression*) zugefügt und die Bakterien für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Je nach zu erwartender Transformationseffizienz wurden 25 µl bis 250 µl pro LB-Agarplatte, supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausgestrichen und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert, bevor am nächste Tag die Kolonien für eine Anzucht in LB-Medium gepickt werden konnten.

2.2.2.9 Isolierung von genomischer DNA

2.2.2.9.1 Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

DNA aus eukaryotischen Zellen wurde mittels des QIAamp® DNA Mini Kits der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden pro Präparation 5x10⁶ Zellen, zweimal gewaschen mit PBS, eingesetzt. Die DNA-Konzentration und -Reinheit wurde spektralphotometrisch (vgl. Abschnitt 2.2.2.17) ermittelt. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 4 °C oder nach Aliquotierung bei -20 °C.

2.2.2.9.2 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwänzen zur Genotypisierung

Um den Genotyp von QUAD-KO.Bcl-2Tg Mäusen zu validieren, wurde das humane BCL-2-Gen (hBcl-2) mittels PCR auf genomischer DNA, die zuvor aus den einzelnen Mausschwänzen isoliert wurde, nachgewiesen.

Dafür wurde zunächst die Schwanzspitze in 500 µl Mausschwanz-Lysepuffer (vgl. Abschnitt 2.1.10) aufgenommen. Dazu wurden 10 µl Proteinase K gegeben und die Mausschwänze über Nacht bei 56 °C unter Schütteln bei 650 rpm verdaut. Nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 11.000 rpm wurde der Überstand abgenommen und mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation für 13 min bei 13.200 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl 70 %-igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nochmals für 13 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und anschließend getrocknet. Schlussendlich wurde das Pellet für 30 min bei 56 °C und 650 rpm in 350 µl ddH₂O gelöst. Für die Genotypisierungs-PCR wurden 3 µl der genomischen DNA eingesetzt.

Zur Kontrolle der Qualität der extrahierten genomischen DNA wurde simultan das murine beta-Aktin-Gen mitamplifiziert.

2.2.2.10 Isolierung von RNA

RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mittels des *RNeasy Mini*[®] Kits der Firma QIAgen (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Verwendet wurden dafür pro Präparation 5×10^6 , zweimal in PBS gewaschene Zellen.

Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.2.17) und die Qualität der RNA durch Agarosegelelektrophorese (vgl. Abschnitt 2.2.2.3) evaluiert. Gelagert wurde die RNA bei -80 °C.

2.2.2.11 Reverse Transkription

Reverse Transkription bedeutet die Umschreibung von RNA in cDNA. Die Reaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit standardmäßig mittels des *Superscript[®] III Reverse Transcriptase*[®] Kits von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden pro reverser Transkriptionsreaktion 5 µg Total-RNA eingesetzt. Als Primer für die Erststrangsynthese dienten Oligo-dT-Primer. Lediglich für die Klonierung der T-Zellrezeptoren (vgl. Abschnitt 2.2.2.16) wurde das *SuperScript[®] II Reverse Transcriptase*[®] Kit der Firma Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) verwendet, da hier nach der Erststrangsynthese zusätzlich überhängende Cytosinnukleotide angefügt werden, die für die nachfolgenden Klonierungsschritte unerlässlich waren (vgl. Abschnitt 3.2.1).

Nach spektralphotometrischer Konzentrationsbestimmung erfolgte die Lagerung der cDNA bei -20 °C. Vor dem Einsatz der cDNA in nachfolgenden Experimenten wurde diese 1:5 mit ddH₂O verdünnt.

2.2.2.12 Aufreinigung von Nukleinsäuren mit dem *High Pure[®] PCR Product Purification Kit*

Das *High Pure[®] PCR Product Purification* Kit der Firma QIAgen (Hilden, Deutschland) diente der Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau (vgl. Abschnitt 2.2.2.4), Vektor-Dephosphorylierung (vgl. Abschnitt 2.2.2.6) oder PCR (vgl. Abschnitt 2.2.2.13) und wurde laut Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) erlaubt eine Amplifikation definierter DNA-Abschnitte. Benötigt werden dazu neben dem DNA-Template zwei, das zu amplifizierende DNA-Fragment flankierende Oligonukleotide, eine thermostabile DNA-Polymerase sowie dNTPs (**D**esoxyribonukleosid**t**riphosphat).

Zur Überprüfung der Orientierung des Inserts im Vektorrückgrat im Rahmen einer Klonierung wurde der PCR-Mastermix direkt zu den zu analysierenden Bakterienkolonien gegeben. Gewählt wurde in diesem Fall, wie auch für den einfachen Nachweis definierter Amplikons, die *Taq*-Polymerase (*Thermus aquaticus*) in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Sollte das PCR-Produkt später der Klonierung dienen, wurden pro Reaktionsansatz 5-50 ng cDNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. In diesem Fall wurden Polymerasen mit *proof-reading*-Funktion, wie das *Easy-A High-Fidelity PCR Cloning Enzyme*, der *Advantage2-Polymerase-Mix*, oder für GC-reiche Regionen bzw. DNA-Abschnitte mit repetitiven Sequenzen die *Q5-Polymerase* verwendet.

Pro PCR-Reaktion ergab sich damit folgender Ansatz, alle Reagenzien wurden in angegebener Reihenfolge dem Reaktionsansatz zugegeben:

- 1x PCR-Puffer (10x)
- 200 µM dNTP-Mix (10 mM)
- 0,1-0,5 µM *sense*-Primer (10 µM)
- 0,1-0,5 µM *antisense*-Primer (10 µM)
- 5-50 ng cDNA (in 10 mM Tris-Cl, pH 8,5)
oder Suspension einer Bakterienkolonie in SOC-Medium, geschüttelt für 1 h bei 200 rpm und 37 °C
- 0,02 U/µl Q5-Polymerase (2 U/µl)
oder 0,05 U/µl *Easy-A High-Fidelity PCR Cloning Enzyme* (5 U/µl)
oder 0,02 U/µl *Advantage2-Polymerase-Mix* (5U/µl)
oder 0,04 U/µl *Taq-DNA-Polymerase* (5 U/µl)

Als Negativkontrolle wurde anstatt der zu amplifizierenden cDNA als Template ddH₂O zugegeben. Das beta-Aktin-Gen als konstitutiv exprimiertes Gen wurde als Positivkontrolle mit spezifischen Primern simultan amplifiziert.

In Fällen von zu amplifizierenden GC-reichen Regionen wurden dem Ansatz zusätzlich 5 % DMSO oder bei Verwendung der Q5-Polymerase 1x *GC-Enhancer* zugefügt, um eine Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern.

Die Amplifikationsreaktion erfolgte in einem Thermocycler unter Verwendung des im Folgenden aufgeführten Programmes:

1	Initiale Denaturierung	5 min	96°C
2	Denaturierung	30 sec	96°C
3	Primerhybridisierung	30-60 sec	45-72°C
4	Elongation	1 min/1000 bp	72°C
5	Terminale Elongation	5 min	72°C



Die Schritte 2 bis 4 wurden 12x bis 35x wiederholt. Die Hybridisierungstemperatur richtete sich dabei nach Länge und Basenzusammensetzung der Primer und wurde mit Hilfe der im Internet frei zugänglichen Software *OligoCalc* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>) und *OligoAnalyzer3.1* (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) errechnet.

Die Amplifikate wurden mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. Abschnitt 2.2.2.3) analysiert und für die weitere Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.14 Ortsgerichtete Mutagenese

Ortsgerichtete Mutagenesen wurden mit Hilfe des *Quik change® Lightning Site-directed Mutagenesis* Kits der Firma Agilent Technologies (Kassel, Deutschland) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Das Primerdesign erfolgte unter Zuhilfenahme der firmeneigenen Software *QuickChange Primer Design*

(www.agilent.com/genomics/qcpd), so dass die Oligonukleotide eine Länge von 25-45 bp, einen GC-Gehalt von mindestens 40 % und eine Mindestschmelztemperatur von 78 °C hatten. Die zu mutierende Base wurde dabei in der Mitte der Oligonukleotide positioniert. Die Synthese der 5'-phosphorylierten Primer erfolgte durch die Firma IDT, wobei für die Aufreinigung die höchste Reinheitsstufe über PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) gewählt wurde. Für die Mutagenese-PCR wurden je 125 ng Primer und 100 ng Template-DNA eingesetzt. Die Umrechnung der Primerkonzentration in zu verwendende Primermenge erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{pmol des Oligonukleotids} = \frac{\text{ng des Oligonukleotids} \times 1000}{330 \times \text{Anzahl der bp des Oligonukleotids}}$$

Nach Verdau der methylierten Template-DNA mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* (*Diplococcus pneumoniae* G41) wurde die neu synthetisierte mutierte Plasmid-DNA in XL10-Gold *E. coli* transformiert (vgl. Abschnitt 2.2.2.8). Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung (vgl. Abschnitt 2.2.2.18) verifiziert.

2.2.2.15 Generierung bicistronischer Konstrukte mittels der Gateway®-Technologie

Bicistronische Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit unter Zuhilfenahme des *MultiSite Gateway® Pro Kits* der Firma Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) generiert. Die Gateway®-Technologie basiert auf dem ortsspezifischen Rekombinationssystem des Phagen Lambda und ermöglicht es, DNA-Fragmente schnell und einfach zwischen verschiedensten Expressionsvektoren zu transferieren^{236,237}. Die Orientierung sowie der offene Leserahmen bleiben dabei stets erhalten, es wird dafür jedoch keine *de novo*-Synthese von DNA benötigt. Im Lambda-Phagen dient das ortsspezifische Rekombinationssystem zum einen der Integration der Phagen-DNA in das *E. coli* Wirtsgenom, zum anderen ist es für den Wechsel vom lysogenen in den lytischen Zyklus verantwortlich. Die für diese beiden Schritte benötigten Enzymmixturen macht man sich bei der Gateway®-Technologie zunutze. Im ersten Schritt werden die von *attB*-Sequenzen (engl. *attachment site*) flankierten DNA-Fragmente durch den sogenannten *Gateway® BP Clonase® II enzyme mix*, der prinzipiell aus der für die Integration des Phagen in das Wirtsgenom benötigten Bakteriophage λ Integrase (Int) und dem *E. coli* *Integration Host Factor* (IHF) besteht, in die mit *attP*-Sequenzen ausgestatteten pDONR-Vektoren rekombiniert. Dabei werden die *attB*- bzw. *attP*-Sequenzen zu *attL*-Sequenzen. In einem zweiten Schritt werden durch den *Gateway® LR Clonase® II enzyme mix*, welcher sich aus den für den Übergang in den lytischen Zyklus benötigten Enzymen Bakteriophage λ Int und Exzisionase (Xis) zusammensetzt, die Fragmente in die mit *attR*-Sequenzen versehenen *Destination*-Vektoren rekombiniert. Durch leichte Variationen in den einzelnen *attB*-Sequenzen wird die Reihenfolge definiert, in der die DNA-Fragmente schlussendlich im *Destination*-Vektor erscheinen.

BP- sowie LR-Reaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Ausnahmen machten hier lediglich die zur Transformation verwendeten Bakterien. Dafür wurden nicht die vom Hersteller empfohlenen *One Shot® Mach1™ T1R E. coli*, sondern der *E. coli*-Stamm *DH10B* verwendet. Zudem wurde auch die BP-Reaktion für 16 h bei 25 °C inkubiert. Ausgangsprodukt für die BP-Reaktion waren PCR-Produkte, die mit entsprechenden *attB*-Primern amplifiziert wurden. Von den PCR-Produkten wurden 150 ng zur Rekombination eingesetzt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Anleitung

des Herstellers. Die Positivselektion wurde durch Kanamycin-Resistenz in den pDONR-Vektoren und mittels Ampizillin-Resistenz in den *Destination*-Vektoren erreicht. Die Negativ-Selektion erfolgte durch das für die Bakterien letale *ccdB*-Gen (engl. **control of cell death**), welches von den *att*-Sequenzen flankiert und erst bei einer erfolgreichen Rekombination aus den Vektoren entfernt wird.

Bicistronische Konstrukte wurden so kloniert, dass sie das **porcine 2A-Element** (p2A-Element, Sequenz siehe Abschnitt 5.1.3) flankierten, welches direkt in den entsprechenden reversen *attB*-Primer des ersten Gens integriert und somit nach der Amplifikation dem PCR-Produkt angehängt wurde. Das p2A-Element ist ein von dem porcinen Teschovirus-1 stammendes, sich selbst schneidendes Peptid (vgl. Abschnitt 4.1).

2.2.2.16 T-Zellrezeptor-Klonierung und -Chimärisierung

Die T-Zellrezeptorketten wurden analog zu Birkholz *et al.*²³⁸ per PCR isoliert (**Abb. 3-2**), die entsprechenden Allele durch Abgleich mit der Datenbank IMGT (engl. *International immunogenetics information system*) identifiziert (**Abb. 3-3 A**) und die einzelnen Ketten zunächst mit Hilfe des *TOPO® TA Expression Kits* (Life Technologies/Darmstadt, Deutschland) in den Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO® kloniert (vgl. Abschnitt 2.2.2.7.2). Anschließend wurden sowohl die α -Kette, als auch die β -Kette unter Zuhilfenahme des *MultiSite Gateway® Pro Kits* der Firma Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) in bicistronischer Form in den retroviralen *Destination*-Vektor pBullet_IRES_neo-DEST subkloniert (**Abb. 3-3 B**, vgl. Abschnitt 2.2.2.15). Die Chimärisierung des CSF2RA-reaktiven TCR 1A.3/46 wurde gemäß der in **Abb. 3-4** dargestellten Klonierungsstrategie durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.2).

2.2.2.17 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-, RNA- und Proteinlösungen

Die Konzentrationen von DNA-, RNA- sowie Protein-Lösungen wurden mit Hilfe des Spektralphotometers *Ultrospec 3000* bestimmt. Für DNA- und RNA-Lösungen wurde dabei die Absorption ultravioletten Lichts durch die Lösung bei 260 nm gemessen. Kalibriert wurde das Photometer dabei auf den für die Lösung der Nukleinsäuren gewählten Puffer. Die Konzentration errechnete sich nach folgenden Formeln:

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

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

E = Extinktion, ds = doppelsträngig, ss = einzelsträngig (engl. *single stranded*)

Die Reinheit der DNA- bzw. RNA-Lösungen wurde anhand des Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) ermittelt. Eine DNA-Lösung wurde bei einem Quotienten von 1,8 bis 2,0, eine RNA-Lösung bei einem Quotienten von 1,9 bis 2,1 als rein und somit frei von kontaminierenden Proteinen angesehen. Eine Verunreinigung mit organischen Lösungsmitteln, Peptiden, Zuckern oder Salzen wurde anhand des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 320 nm ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{320}$), welcher größer als 2,0 zu sein hatte, ausgeschlossen.

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde nach dem Bradford Protein Assay mit Hilfe des *Bio-Rad Protein Assays* der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) laut Angaben des Herstellers bestimmt.

Dabei wird die, durch eine Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit den kationischen und unpolaren Aminosäure-Seitenketten bedingte, Zunahme der Absorption bei 595 nm ermittelt. Für jede Analyse wurde eine Standardkurve verschiedener, definierter Konzentrationen einer frisch angesetzten BSA-Lösung erstellt, anhand derer die Konzentration der zu ermittelnden Proteinlösung errechnet wurde

2.2.2.18 Sequenzanalyse von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma GENterprise (Mainz, Deutschland) mittels Kapillarsequenzierungsgeräten vom Typ *ABI Prism® 3730* (Applied Biosystems™/Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Für Plasmidsequenzierungen wurden 700 ng Plasmid-DNA mit 10 pm eines geeigneten Primers versetzt und in 7 µl Gesamtvolumen eingeschickt. Die Sequenzierungsreaktionen für PCR-Produkte wurden selbst angesetzt. Dafür wurden 50 ng-200 ng des PCR-Produktes mit 10 pm eines geeigneten Primers sowie 5x *Big Dye Terminator v3.1* und dem dazugehörigen Sequenzierungspuffer versetzt und nach 30 Amplifikationszyklen von je 10 s bei 96 °C, gefolgt von vier Minuten bei 55 °C eingeschickt. Qualitativ ausgewertet wurden die erhaltenen Sequenzdateien mithilfe der Software *FinchTV* (Geospiza/Seattle, USA), Sequenzalignments wurden unter Zuhilfenahme der Software *DNA-Star* (GATC-Biotech/Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

2.2.2.19 Datenbankanalysen

Alle editierten eigenen Sequenzen wurden mit publizierten Sequenzen frei zugänglicher Datenbanken im Internet abgeglichen. Generell wurde das BLAST-Programm des NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*; <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) zum Sequenzvergleich genutzt.

Zur Identifizierung sowie für den Abgleich der TCR-Sequenzen diente die IMGT-Datenbank (engl. *international immunogenetics information system*; <http://www.imgt.org/>). Des Weiteren wurde die Datenbank *GenBank* des NCBI für den DNA-Sequenzabgleich genutzt.

Für die Überprüfung von Proteinsequenzen bzw. Proteinstrukturanalysen wurden die Datenbanken *UniProt (Universal Protein Database*; <http://www.uniprot.org/>) bzw. die *PDB (Protein Data Bank*; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) herangezogen.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Mittels Western Blot ist es möglich, Proteine in Zelllysaten oder Gewebshomogenisaten spezifisch nachzuweisen. Durch **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese** (SDS-PAGE; SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*) werden die zu analysierenden Proteinlösungen zunächst unter denaturierenden Bedingungen ihrer Größe nach aufgetrennt, bevor sie auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können.

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Als Ausgangsmaterial dienen hierbei entweder Zelllysate transfizierter Expi293F™-Zellen (vgl. Abschnitt 2.2.1.12.2) oder, sofern sezernierte Proteine nachgewiesen werden sollten, der Überstand der Expi293F™-Zelllinie drei Tage nach Transfektion.

Alle Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anderweitig angegeben, bei 4 °C durchgeführt. Für die Analyse zellulärer Proteine wurden die Zellen durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 1500 rpm, gefolgt von zweimaligem Waschen mit PBS, geerntet und durch Sonifikation in Western Blot-Lysepuffer (vgl. Abschnitt 2.1.10) lysiert. Nach erneuter Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm wurden die Zelllysatsüberstände bei -20 °C eingefroren. Für die Analyse sezernierter Proteine wurden die Zellüberstände durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für zehn Minuten von Zellen und Zellbestandteilen befreit. Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysatsüberständen sowie Zellüberständen erfolgte photometrisch nach der Bradford-Methode (vgl. Abschnitt 2.2.2.17). Die Fällung der Zellüberstände erfolgte mit 10 % Trichlorazetat (TCA) über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Überstände bei 13.000 rpm für 20 min zentrifugiert und das Proteinpellet nach Zugabe von 200 µl Aceton durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min gewaschen. Vor der Beladung des SDS-Polyacrylamidgels wurden die Proben in Probenpuffer aufgenommen und für sieben Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Nach dem Einlaufen der Proben in das Sammelgel für ca. 20 min bei 80 V erfolgte die Auftrennung der Proteine für etwa 90 min bei 120 V in MOPS-Puffer.

2.2.3.2 Transfer auf Nitrocellulosemembran und Antikörperdetektion

Der Transfer auf die Nitrocellulosemembran wurde für 120 min bei 100 V in Towbin-Transferpuffer durchgeführt. Nach einstündiger Blockade in Western Blot *Blocking*-Lösung erfolgte die Primärantikörperinkubation unter Schwenken über Nacht bei 4 °C in Western Blot-Antikörperlösung (eingesetzte Antikörperverdünnungen siehe **Tabelle 2-4**). Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T am folgenden Tag für je sieben Minuten wurde die Membran für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper unter Schwenken bei RT in Western Blot-Antikörperlösung inkubiert (eingesetzte Antikörperverdünnungen siehe **Tabelle 2-4**).

Tabelle 2-4: Übersicht eingesetzter Antikörperkonzentrationen im Western Blot.

Antikörper	Verdünnung	Puffer
Akt (pan) Rabbit mAb (Klon C67E7)	1:1000	3 % BSA in TBS-T
ECL Eesel-anti-Kaninchen-IgG/HRP	1:50.000	5 % Milchpulver in TBS-T
ECL Schaf-anti-Maus-IgG/HRP	1:50.000	5 % Milchpulver in TBS-T
anti-human-GM-CSF- α Rezeptor (Klon 12B7-17-A)	1:1000	3 % BSA in TBS-T

Drei erneuten Waschschritten in TBS-T folgte die Entwicklung mit Hilfe des *ECL* (engl. *enhanced chemiluminescence*) *Western Blotting Detection Reagent* der Firma Amersham (Freiburg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des *ChemiDoc™ MP System*, sowie der Software *ImageLab™* von Bio-Rad (München, Deutschland).

3 Ergebnisse

Die Basis dieser Arbeit bildeten im Folgenden aufgeführte Daten bzw. Materialien, die zu Beginn der Doktorarbeit bereits zur Verfügung standen.

- Neben den vier stabilen Melanomzelllinien des Melanommodells Ma-Mel-86 (Ma-Mel-86a, -86b, -86c, -86f; vgl. Abschnitt 1.3) sowie der autologen, lymphoblastoiden EBV-B-Zelllinie INTH-EBV-B lagen weitere Varianten der Tumorklonen vor. Ein Klon der Melanomlinie Ma-Mel-86b (Ma-Mel-86b.12) war stabil mit der cDNA des Gens für humanes CD80 ausgestattet worden (Massenkultur vor der Klonierung bezeichnet als Ma-Mel-86b.12.CD80 bzw. der daraus erhaltene Klon #4 bezeichnet als Ma-Mel-86b.12.CD80.4). Die Melanomlinie Ma-Mel-86c war mit einem HLA-C*03:03-kodierenden Expressionsplasmid stabil transfiziert worden (Ma-Mel-86c.C3.19).
- Diverse tumorreaktive MLTC waren durch Kokultur von PBMC der Patientin mit verschiedenen autologen Ma-Mel-86-Melanomlinien generiert worden.
- Die HLA-unabhängig erkannten Antigene CSF2RA und TRP-2 waren als Zielantigene von aus MLTC isolierten CTL-Klonen identifiziert worden [z.B. CTL 1A.1/503 und 1A.1/106 (anti-CSF2RA) bzw. CTL 2C/417 (anti-TRP-2)]⁴³.
- Rekombinante Expressionsplasmide waren konstruiert worden, die für das humane CSF2RA (Isoform a), das humane CSF2RB (Isoformen 1 oder X1) sowie das humane TRP-2 (Isoform 1) kodieren.
- Die murine Melanomlinie B78H1 war stabil transfiziert worden mit humanem *CSF2RA* (B78H1.CSF2RA.15) bzw. humanem *TRP-2* (B78H1.TRP-2.5).
- cDNA für einen chimärisierten, Codon-optimierten und funktionell validierten TRP-2-reaktiven TCR (cTCR-2C/417) war in den retroviralen Vektor pMX kloniert worden (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von [REDACTED]).

3.1 Isolierung CSF2RA-reaktiver CTL

Die wenigen in Vorarbeiten etablierten CSF2RA-reaktiven CTL waren schlecht expandierbar und zeigten nach Wochen der Kultur bzw. OKT3-Stimulation abnehmende Reaktivität. Daher sollte versucht werden, aus vorhandenen MLTC weitere CSF2RA-reaktive CTL im Grenzverdünnungsverfahren zu klonieren.

Responderlymphozyten aus zehn etablierten MLTC des Melanommodells wurden dazu auf die Erkennung der autologen Melanomlinien Ma-Mel-86a, -86b, -86c, und -86f sowie transient mit *CSF2RA*-cDNA transfizierter 293T-Zellen im IFN- γ -ELISpot-Assay analysiert. Alle MLTC wiesen Reaktivität gegen eine oder mehrere der autologen Melanomlinien auf (Daten nicht gezeigt). Responderlymphozyten aus den MLTC 5C (an Tag 42 der Kultur mit Ma-Mel-86c restimuliert und vier Tage danach eingefroren, abgekürzt d42+4) und MLTC 1A.3 (d23+5) erkannten in spezifischer Weise sowohl die HLA-defizienten, *CSF2RA*⁺ Melanomlinien Ma-Mel-86b und -86c als auch *CSF2RA*-exprimierende 293T-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die beiden MLTC wurden aufgetaut und sieben Tage nach einmaliger Restimulation mit einer Mischung (1:1) aus Ma-Mel-86b und Ma-Mel-86c oder Ma-Mel-86c.C3.19 mittels des Grenzverdünnungsverfahrens (vgl. Abschnitt 2.2.1.10) kloniert. Die daraus resultierenden CTL-Kone

wurden auf die Erkennung CSF2RA⁺ Zellen getestet, hinsichtlich der von ihnen exprimierten TCR-V β -Ketten durchflusszytometrisch analysiert und, sofern ausreichend Zellen vorhanden waren, OKT3-stimuliert, um eine rasche Zellexpansion zu erzielen. Vierzehn Tage nach OKT3-Stimulation wurden die CTL erneut auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die CSF2RA⁺ Melanomlinien Ma-Mel-86b.12 und B78H1.CSF2RA.15 im IFN- γ -ELISpot-Assay zu erkennen. Als Vergleich dienten die CTL-Klone, die gleichzeitig ohne eine OKT3-Stimulation durch wöchentliche Restimulation weiterkultiviert wurden jeweils sechs Tage nach einer Restimulation (exemplarisch gezeigt für CTL 5C/91 und CTL 1A.3/46 in **Abb. 3.1 A**).

Eine Übersicht darüber, welche MLTC mit welchen Zelllinien stimuliert wurden und die Anzahlen daraus generierter CSF2RA-reaktiver CTL sowie die Ergebnisse der TCR-V β -Expressionsanalysen sind in **Tabelle 3.1** zusammengefasst.

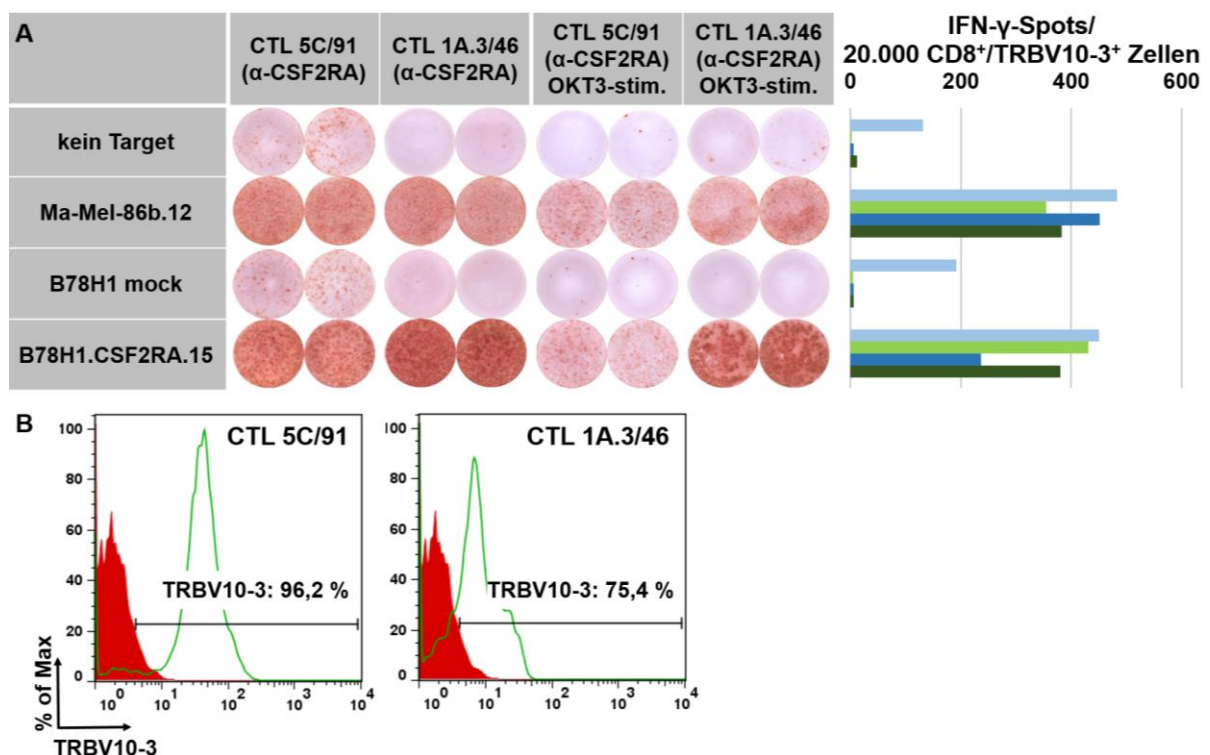


Abb. 3-1: Reaktivität und TCR-Analyse zweier exemplarischer CSF2RA-reaktiver CTL aus den Klonierungen der MLTC 5C und -1A.3. (A) CTL-Klone (20.000 Zellen/TE) aus MLTC 5C und -1A.3 wurden vor und nach OKT3-Stimulation im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay auf Erkennung der Melanomlinien Ma-Mel-86b.12 und B78H1.CSF2RA.15 (50.000 Zellen/TE) getestet. Gezeigt ist ein repräsentativer CSF2RA-reaktiver CTL-Klon aus jeder Klonierung (■: CTL 5C/91; ■: CTL 5C/91, OKT3-stimuliert; ■: CTL 1A.3/46; ■: CTL 1A.3/46, OKT3-stimuliert). **links:** Originaldaten des ELISpot-Assays, **rechts:** Quantifizierung durch *Computer-assisted Video Image Analysis* (CVIA). (B) Die TCR-V β -Ketten der Klone wurden mittels IOTest[®] Beta Mark-Kit durchflusszytometrisch ermittelt (■: IgG-FITC/PE, —: TRBV10-3-FITC). Alle CSF2RA-reaktiven CTL waren TRBV10-3⁺. Dargestellt ist je ein repräsentativer TRBV10-3⁺ Klon jeder Klonierung. α : anti; OKT3-stim.: OKT3-stimuliert.

Tabelle 3-1: Übersicht über die Klonierungen der MLTC 5C und -1A.3 sowie über die daraus hervorgegangenen CSF2RA-reaktiven CTL-Klone.

MLTC	Stimulatorzellen	getestete CTL-Klone	davon CSF2RA-reaktive CTL-Klone	TRBV10-3 ⁺
MLTC 5C d21+7	Ma-Mel86b + Ma-Mel-86c	264	4	4
MLTC 1A.3 d23+7	Ma-Mel-86c.C3.19; Ma-Mel-86c.C3.19 + Ma-Mel-86b.12.CD80	30	21	12 (von 12 getesteten)

3.1.1 Isolierung CSF2RA-reaktiver CTL aus MLTC 5C

Die MLTC 5C wurde 28 Tage nach der ersten von wöchentlich wiederholten Stimulationen nach PBMC-Entnahme mit der Zelllinie Ma-Mel-86c kloniert und dazu mit einer Mischung (1:1) aus Ma-Mel-86b.12 und Ma-Mel-86c wöchentlich restimuliert. Nach 77 Tagen waren 264 Klone gewachsen, darunter vier CSF2RA-reaktive CTL. Alle waren TRBV10-3⁺ (IMGT-Nomenklatur²³⁹, entspricht V β 12 nach Arden *et al.*²⁴⁰; exemplarisch gezeigt für CTL 5C/91 in **Abb. 3.1 B**) und vervielfachten sich durch OKT3-Stimulation 11- bis 20-fach.

3.1.2 Isolierung CSF2RA-reaktiver CTL aus MLTC 1A.3

Die Klonierung der MLTC 1A.3 erfolgte 30 Tage nach der ersten von wöchentlich durchgeführten Stimulationen nach Entnahme der PBMC mit Ma-Mel-86a. Die CTL wurden bis Tag 28 nach Ansetzen der Klonierung mit Ma-Mel-86c.C3.19 stimuliert, danach bis Tag 56 mit einer Mischung (1:1) aus Ma-Mel-86c.C3.19 und der Massenkultur von Ma-Mel-86b.12.CD80 und schließlich mit einer Mischung (1:1) aus Ma-Mel-86c.C3.19 und Ma-Mel-86b.12.CD80.4 stimuliert. Als Stimulatorzellen wurden dabei jeweils die Zelllinien gewählt, die zum Zeitpunkt der Restimulation in durchflusszytometrischen Analysen die höchste Oberflächenexpression von CSF2RA aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Vierundachtzig Tage nach der Klonierung waren 30 CTL-Klone gewachsen, von denen 21 Reaktivität gegenüber CSF2RA aufwiesen. Von zwölf Klonen waren ausreichend Zellen für eine durchflusszytometrische TCR-V β -Analyse vorhanden. Alle CTL-Klone wiesen eine Expression von TRBV10-3 auf (exemplarisch gezeigt für CTL 1A.3/46 in **Abb. 3.1 B**). Sieben dieser Klone wurden OKT3-stimuliert und vermehrten sich dabei zwischen 25- und 55-fach.

Insgesamt wurden somit insgesamt 294 CTL-Klone generiert, von denen 25 gegen CSF2RA gerichtet waren. Alle getesteten CSF2RA-reaktiven Klone waren TRBV10-3-positiv. Durch OKT3-Stimulation war es möglich, diese um das 11- bis 55-fache zu expandieren. Die Reaktivität gegenüber CSF2RA blieb dabei erhalten.

Der aus der Klonierung der MLTC 1A.3 hervorgegangene CTL 1A.3/46 war gekennzeichnet durch einen hohen Anteil IFN- γ sekretierender T-Zellen, ein hohes Maß an Spezifität (**Abb. 3-1 A**) und wies von allen Klonen sowohl vor als auch nach der OKT3-Stimulation das beste Wachstum auf. Zellen des CTL 1A.3/46, die nicht OKT3-stimuliert wurden, vermehrten sich bei Antigen-getriebener Stimulation um das 1,6- bis 5,1-fache pro Woche. Bei OKT3-Stimulation vermehrten sich die CTL-Zellen wöchentlich um das 25- bis 40-fache (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassung: Aus zwei MLTC mit Reaktivität gegenüber CSF2RA konnten 25 CSF2RA-reaktive CTL generiert werden. Diese erkannten CSF2RA in HLA-unabhängiger Weise, exprimierten alle die TCR-V β -Kette TRBV10-3 und waren durch OKT3 expandierbar.

3.2 Klonierung und Chimärisierung des T-Zellrezeptors des CSF2RA-reaktiven T-Zellklons 1A.3/46

3.2.1 Klonierung des TCR-1A.3/46

Da CTL 1A.3/46 sowohl das beste Wachstum als auch die höchste spezifische Reaktivität aufwies, sollte der T-Zellrezeptor (TCR) dieses T-Zellklons isoliert, kloniert und optimiert werden. Die Klonierung des TCR erfolgte gemäß der publizierten Strategie von Birkholz *et al.*²³⁸, die auf einer Kombination aus einer verbesserten *capswitch*-Methode und der SMART-Technologie (engl. *switching mechanism at 5' end of RNA transcript*) basiert^{241,242} (Abb. 3-2).

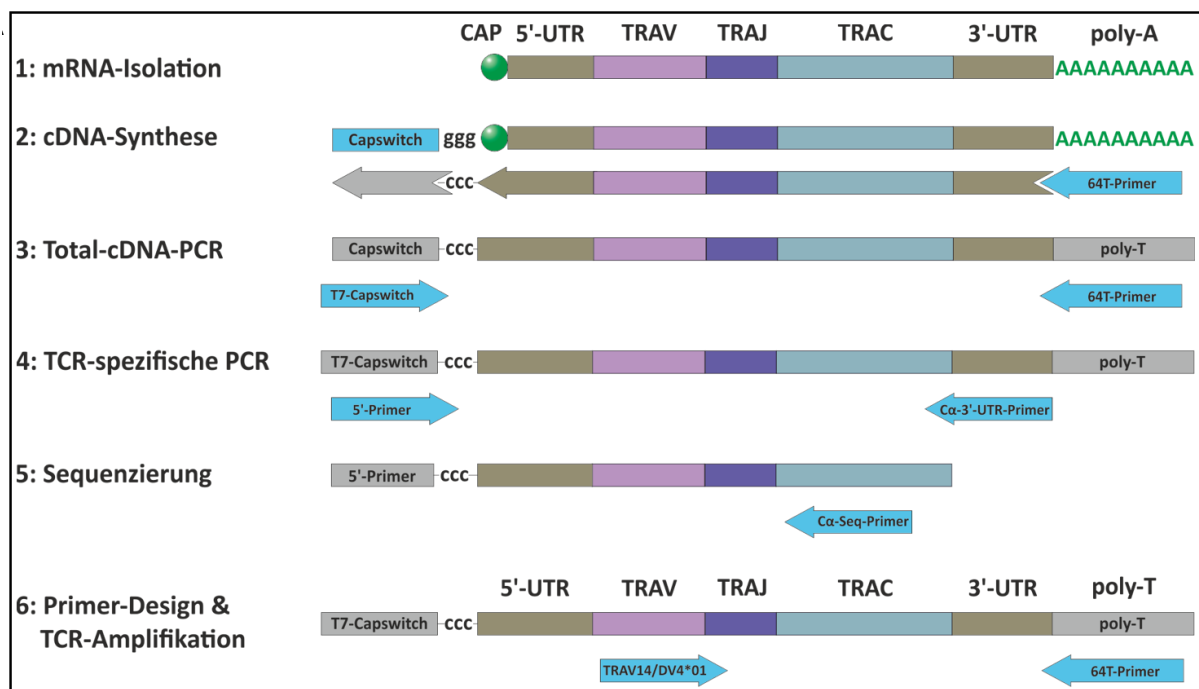


Abb. 3-2: Klonierungsstrategie des TCR aus CTL 1A.3/46 (TCR-1A.3/46; anti-CSF2RA). Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie am Beispiel der TCR α -Kette. [1] Dazu wurde zunächst die Gesamt-mRNA isoliert. [2] Unter Verwendung des an die polyA-Schwänze der mRNA bindenden 64T-Primers wurde durch reverse Transkription cDNA generiert. Die verwendete Reverse Transkriptase (SuperScript®II Reverse Transcriptase®, Life Technologies, Darmstadt) fügte dabei dem 3'-Ende des neu synthetisierten Erststrangs zusätzliche Cytosin-Nukleotide an. Der ebenfalls der Reaktion zugesetzte Capswitch-Primer wies an seinem 3'-Ende drei Guanin-Nukleotide auf und konnte somit an die überhängenden Cytosin-Nukleotide des Erststrangs hybridisieren und der Polymerase als neues Template dienen. [3] Die gesamte cDNA wies daher sowohl an ihrem 5'- als auch an ihrem 3'-Ende definierte, flankierende Sequenzen auf und konnte durch Verwendung des 64T-Primers in Kombination mit dem an die neu generierte Capswitch-Sequenz bindenden Capswitch-Oligo-Primer in der Total-cDNA-PCR vollständig amplifiziert werden. [4] In einer anschließenden TCR-spezifischen PCR wurde die TCR α -Kette selektiv aus dem Total-cDNA-Amplifikat amplifiziert. Verwendet wurden dazu der 5'-Primer in Kombination mit dem, im 3'-UTR der TRAC-Domäne bindenden, α -3'-UTR-Primer. [5] Das daraus resultierende PCR-Produkt wurde unter Verwendung des α -Sequenzierungs-Primers, der in der TRAC-Domäne nahe dem 5'-Ende bindet, sequenziert. Nach Sequenzabgleich mit der IMGT-Datenbank konnten die entsprechenden TRAV- und TRAJ-Regionen identifiziert werden. [6] Ein für die identifizierte TRAV14/DV4*01-Region spezifischer Primer wurde generiert und in Kombination mit dem 64T-Primer zur selektiven Amplifikation der TCR α -Kette genutzt. Als Template wurde hierbei das Amplifikat der Total-cDNA-PCR genutzt. Für die Klonierung der TCR β -Kette wurde analog verfahren (adaptiert aus Birkholz *et al.*, 2009²³⁸).

TCR: T-Zellrezeptor (engl. *T cell receptor*); TRAC: engl. *T cell receptor α -chain, constant domain*; TRAJ: engl. *T cell receptor α -chain, junction region*; TRAV: engl. *T cell receptor α -chain, variable region*; UTR: untranslatierte Region.

Die durch Sequenzabgleich mit der IMGT-Datenbank identifizierten V-, D-, J- und C-Regionen, aus denen sich die TCR α - und TCR β -Ketten des CTL 1A.3/46 zusammensetzten, sowie die daraus resultierenden CDR (engl. *complementarity-determining regions*) sind in **Abb. 3-3 A** zusammengefasst (detaillierte TCR-Sequenz siehe Abschnitt 5.1.1).

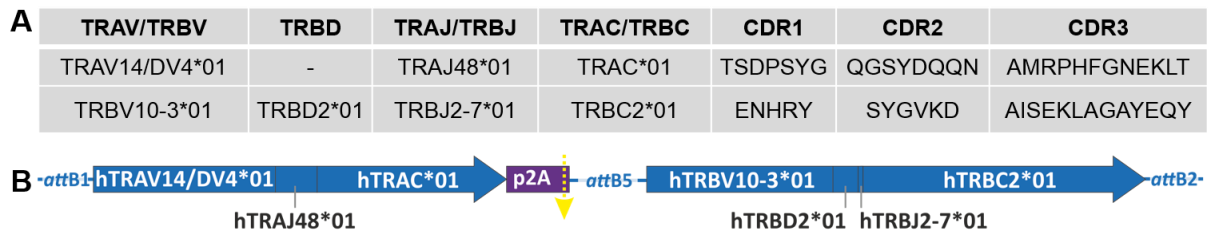


Abb. 3-3: Übersicht über die Ergebnisse der Klonierung des TCR aus CTL 1A.3/46 (TCR-1A.3/46; anti-CSF2RA). (A) Übersicht über die V-, D-, J- und C-Segmente sowie die CDR des TCR-1A.3/46. **(B)** Schematische Darstellung des bicistronischen Konstrukts, bestehend aus TCR α - und TCR β -Kette des TCR-1A.3/46, separiert durch das porcine 2A-Element. Der gelbe Pfeil kennzeichnet die Spaltungsstelle des p2A-Peptids.

CDR: engl. *complementarity determining region*; (h)TRAC: engl. (*human*) *T cell receptor α -chain, constant domain*; (h)TRAJ: engl. (*human*) *T cell receptor α -chain, junction region*; (h)TRAV: engl. (*human*) *T cell receptor α -chain, variable region*; (h)TRBC: engl. (*human*) *T cell receptor β -chain, constant domain*; (h)TRBD: engl. (*human*) *T cell receptor β -chain, diversity region*; (h)TRBJ: engl. (*human*) *T cell receptor β -chain, junction region*; (h)TRBV: engl. (*human*) *T cell receptor β -chain, variable region*.

Die beiden TCR-Ketten wurden zunächst unter Zuhilfenahme des *TOPO TA Cloning Kit*[®] in den Expressionsvektor pcDNA3.1TM/V5-His TOPO[®] kloniert. Durch PCR wurden den TCR-Ketten anschließend jeweils sowohl am 3'-terminalen Bereich als auch am 5'-terminalen Ende die in die verwendeten Primer integrierten und für eine Gateway-Rekombination unerlässlichen *attB*-Sequenzen angefügt. Die daraus resultierenden PCR-Produkte wurden genutzt, um mittels der Gateway[®]-Technologie (vgl. Abschnitt 2.2.2.15) ein bicistronisches Konstrukt, bestehend aus TCR α - und TCR β -Kette, separiert durch das p2A-Element (Sequenz siehe Abschnitt 5.1.3), in dem retroviralen Vektor pBullet_IRES_neo zu generieren (**Abb. 3-3 B**). Aufgrund der auf der Gateway[®]-Technologie basierenden Klonierungsstrategie verbleiben nach p2A-Element-Spaltung am N-terminalen Ende der TCR β -Kette neun aus der *attB5*-Sequenz resultierende, zusätzliche Aminosäuren.

3.2.2 Chimärisierung des TCR-1A.3/46 (bezeichnet als cTCR-1A.3/46)

Die Chimärisierung des CSF2RA-reaktiven TCR-1A.3/46 erfolgte nach dem in **Abb. 3-4 A-C** aufgeführten Schema. Dabei wurden die humanen konstanten Domänen der TCR α - und TCR β -Ketten durch die homologen murinen Sequenzen ersetzt, wodurch Fehlpaarungen von exogenen mit endogenen TCR-Ketten in T-Zellen nach retroviralem TCR-Transfer in PBMC unterbunden werden sollten. Die murinen konstanten TCR-Domänen wurden für die Expression in Säugerzellen Codon-optimiert (durchgeführt von der Firma *Life Technologies*/Darmstadt, Deutschland unter Zuhilfenahme der firmeneigenen Software *GeneOptimizer*[®]). Gleichzeitig wurden dabei kryptische Spleißstellen und destabilisierende RNA-Sequenzelemente entfernt bzw. die Ausbildung stabiler RNA-Sekundärstrukturen minimiert, um eine maximale RNA-Stabilität zu erreichen. Zudem wurden die murinen konstanten Domänen mit je einem zusätzlichen Cystein ausgestattet (TCR α -Kette: T48C; TCR β -Kette: S57C), wodurch die Paarungsstabilität der beiden exogenen TCR-Ketten durch die Ausbildung einer weiteren Disulfidbrücke erhöht wird^{243,244}.

Zwei verschiedene Konstrukte wurden generiert. Bei einem Konstrukt blieben die aus der *attB5*-Sequenz resultierenden 27 Nukleotide am 5'-Ende der TRBV-Region erhalten (cTCR-1A.3/46+*attB*, Daten nicht gezeigt). Beim zweiten Konstrukt wurden diese durch einen zusätzlichen *SmaI*-Verdau (*Serratia marcescens*) entfernt (cTCR-1A.3/46), wodurch nach Translation anstelle neun zusätzlicher Aminosäuren lediglich das aus der Spaltung des p2A-Elements resultierende Prolin am N-terminalen Ende der TCR β -Kette verblieb (**Abb. 3-4 C**). In nachfolgenden Versuchen unterschieden sich die beiden Konstrukte cTCR-1A.3/46+*attB* und cTCR-1A.3/46 weder hinsichtlich der Transduktionseffizienz noch der TCR-Expression bzw. -Funktionalität (Daten nicht gezeigt), weshalb im Weiteren lediglich die mit dem TCR-Konstrukt cTCR-1A.3/46 generierten Daten diskutiert werden. Da nicht bekannt ist, ob die zusätzlichen, aus den *attB*-Sequenzen resultierenden Aminosäuren im N-terminalen Bereich der β -Kette des cTCR-1A.3/46+*attB* einen negativen Einfluss auf die Erkennung von CSF2RA oder die Spezifität des TCR haben, stellt der cTCR-1A.3/46 (Sequenz siehe Abschnitt 5.1.2), bei dem lediglich eine zusätzliche Aminosäure am N-terminalen Ende der TCR β -Kette verbleibt, das präferierte Konstrukt für eine potentielle klinische Anwendung dar.

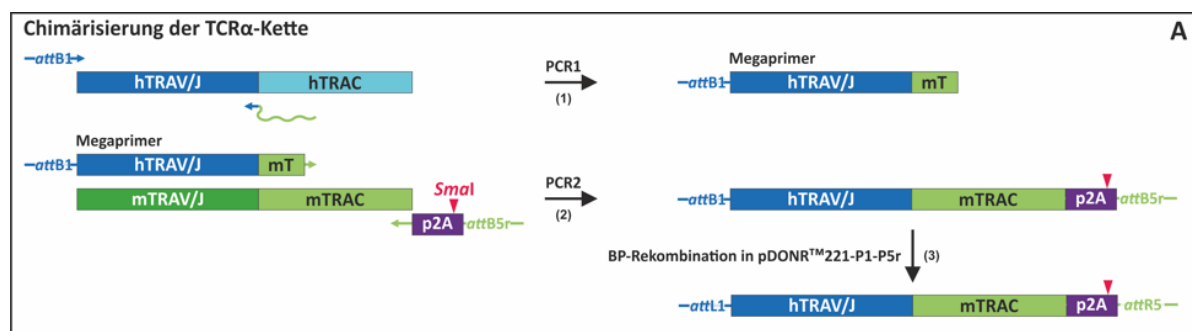
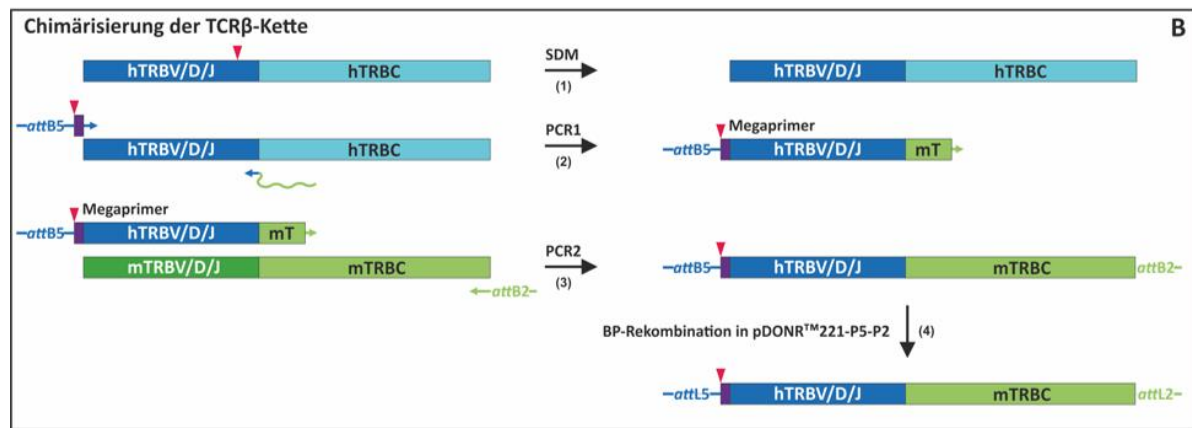
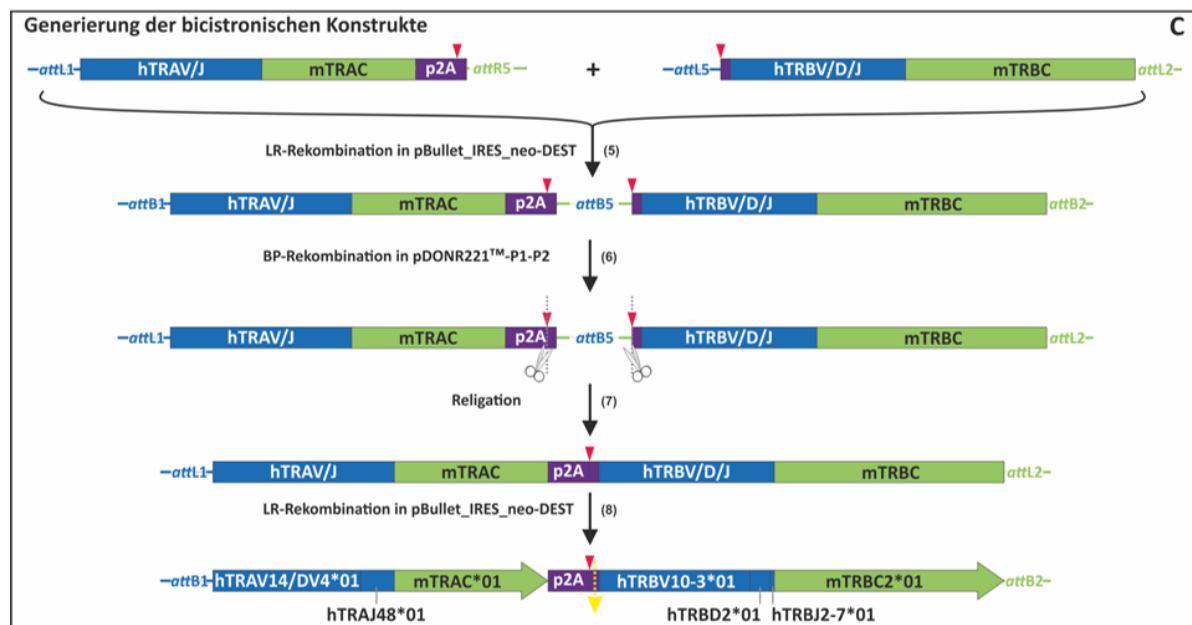


Abb. 3-4: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Chimärisierung des TCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA).

(A) Chimärisierung der TCR α -Kette. [1] In PCR1 erfolgte die Generierung des sogenannten „Megaprimers“. Dazu wurde die hTRAV/TRAJ-Domäne mit Primerpaaren amplifiziert, die an das 5'-Ende der hTRAV-Region die *attB1*-Sequenz und an das 3'-Ende der hTRAJ-Region die ersten 27 bp der mTRAC-Domäne anfügten. [2] In PCR2 wurde der in PCR1 generierte Megaprimers dazu verwendet, die komplette mTRAC-Domäne zu amplifizieren und somit die hTRAV/TRAJ-Domäne mit der mTRAC-Domäne zu fusionieren. Durch den reversen Primer wurden der mTRAC-Domäne die *attB5r*-Sequenz sowie das p2A-Element angefügt. Die Sequenz des p2A-Elements enthielt dabei zwei stille Mutationen, durch die eine *SmaI*-Schnittstelle entstand. [3] Das PCR-Produkt wurde mittels BP-Clonase-Reaktion in den Vektor pDONRTM221-P1-P5r rekombiniert (Vektorkarte siehe Abschnitt 5.2.2.2).



(B) Chimärisierung der TCR β -Kette. Die Chimärisierung der TCR β -Kette erfolgte in Analogie zur Chimärisierung der TCR α -Kette. [1] In der TRBV-Region wurde eine vorhandene *Sma*I-Schnittstelle durch ortsgerichtete Mutagenese entfernt. [2] In PCR1 wurde der „Megaprimer“ generiert. Dazu wurde die hTRBV/TRBD/TRDJ-Domäne mit Primerpaaren amplifiziert, die an das 5'-Ende der hTRBV-Region die *att*B5-Sequenz und an das 3'-Ende der hTRBJ-Region die ersten 21 bp der mTRBC-Domäne anfügten. Der 5'-Primer der hTRBV/TRBD/TRDJ-Domäne enthielt eine zusätzliche *Sma*I-Schnittstelle, gefolgt von den letzten drei Nukleotiden der p2A-Sequenz, um im späteren Verlauf eine Elimination der *att*B5-Sequenz zwischen p2A-Element und TCR β -Kette durch Restriktionsverdau zu ermöglichen. [3] In PCR2 wurde der in PCR1 generierte Megaprimer dazu genutzt, die komplette mTRBC-Domäne zu amplifizieren und dadurch die hTRBV/hTRBD/TRBJ-Domäne mit der mTRBC-Domäne zu fusionieren. Durch den reversen Primer wurde der mTRBC-Domäne die *att*B2-Sequenz angefügt. [4] Das PCR-Produkt wurde mittels BP-Clonase-Reaktion in den Vektor pDONR™221-P5-P2 rekombiniert (Vektorkarte siehe Abschnitt 5.2.2.3).



(C) Generierung der bicistronischen TCR-Konstrukte. [5] Durch die LR-Clonase-Reaktion wurden beide TCR-Ketten (TCR α -Kette aus pDONR™221-P1-P5r und TCR β -Kette aus pDONR™221-P5-P2) in den *Destination*-Vektor pBullet_IRES_neo-DEST rekombiniert (Vektorkarte siehe Abschnitt 5.2.3). [6] Das bicistronische Konstrukt, bestehend aus der chimärisierten TCR α - und TCR β -Kette, wurde mittels BP-Clonase-Reaktion zurück in den Vektor pDONR™221-P1-P2 rekombiniert (Vektorkarte siehe Abschnitt 5.2.2.1). [7] Dieser wurde mit der Restriktionsendonuklease *Sma*I verdaut und anschließend religiert. Dadurch wurden die von der *att*B5-Sequenz resultierenden 27 Nukleotide zwischen p2A-Element und dem 5'-terminalen Bereich der hTRBV-Region entfernt. [8] In einer zweiten LR-Clonase-Reaktion wurde das bicistronische Konstrukt, bestehend aus chimärisierter TCR α - und TCR β -Kette wieder in den *Destination*-Vektor pBullet_IRES_neo-DEST rekombiniert (Vektorkarte siehe Abschnitt 5.2.3). Das hieraus resultierende TCR-Konstrukt wird im Rahmen dieser Arbeit als „cTCR-1A.3/46“ bezeichnet.

▼: *Sma*I-Schnittstelle. Der gelbe Pfeil kennzeichnet die Spaltungsstelle des p2A-Peptids. m: murin; h: human; p2A: porcines 2A-Element; TCR: T-Zellrezeptor (engl. *T cell receptor*); TRAC: engl. *T cell receptor α -chain, constant domain*; TRAJ: engl. *T cell receptor α -chain, junction region*; TRAV: engl. *T cell receptor α -chain, variable region*; TRBC: engl. *T cell receptor β -chain, constant domain*; TRBD: engl. *T cell receptor β -chain, diversity region*; TRBJ: engl. *T cell receptor β -chain, junction region*; TRBV: engl. *T cell receptor β -chain, variable region*.

3.2.3 Expression des TCR-1A.3/46 und des cTCR-1A.3/46 in Jurkat-76-Zellen und in PBMC

Die grundsätzliche Möglichkeit der ektopischen Expression der nativen sowie chimärisierten TCR-Ketten aus CTL 1A.3/46 wurde zunächst durchflusszytometrisch mittels Färbung von CD3 bzw. der entsprechenden V β -Kette (TRBV10-3) nach retroviraler Transduktion oder Elektroporation von TCR-1A.3/46 und cTCR-1A.3/46 in dem Vektor pBullet_IRES_neo in die akute T-Zell-Leukämie Jurkat-76 bestätigt (**Abb. 3-5 A und B**).

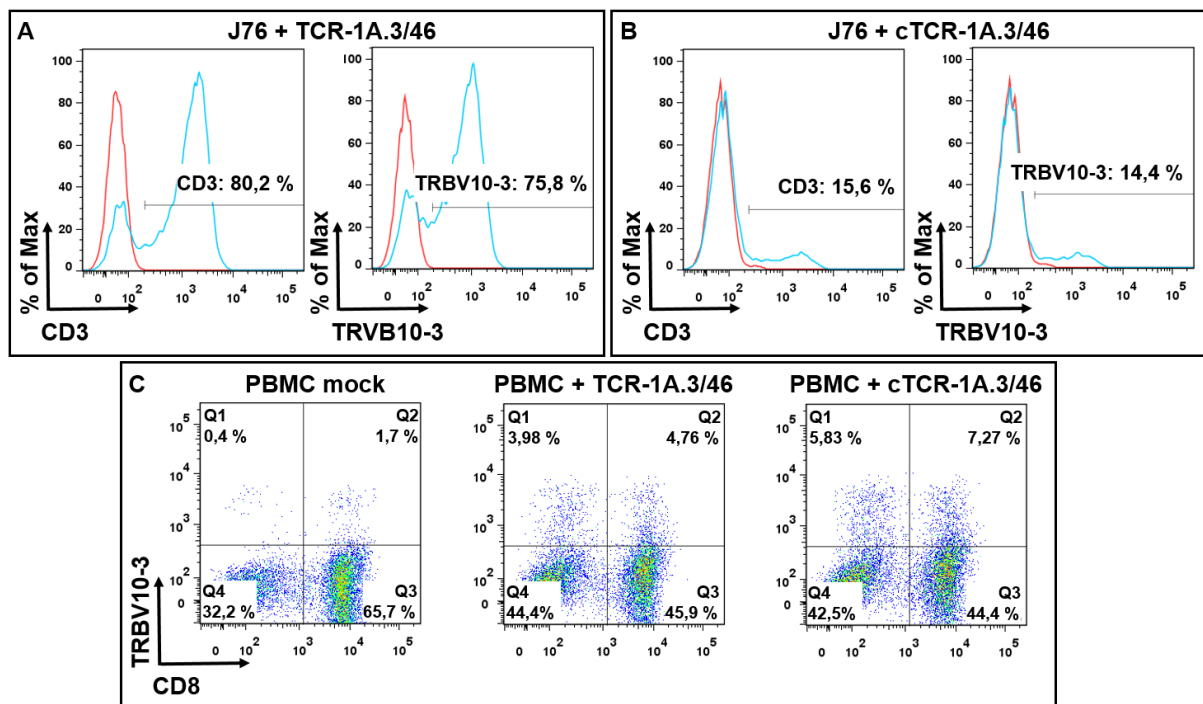


Abb. 3-5: Durchflusszytometrische Analyse der TCR-Expression. (A) CD3- und TRBV10-3-Expression 14 Tage nach retroviraler Transduktion der Zelllinie Jurkat-76 mit TCR-1A.3/46 in Vektor pBullet_IRES_neo und durchgehender Selektion mit G418 (1,6 mg/ml). (B) CD3- und TRBV10-3-Expression 24 Stunden nach Elektroporation der Zelllinie Jurkat-76 mit cTCR-1A.3/46 in Vektor pBullet_IRES_neo (C) CD8- und TRBV10-3-Expression zwei Tage nach retroviraler Transduktion von PBMC (Spender: BC 1309715) mit TCR-1A.3/46 oder cTCR-1A.3/46 in Vektor pBullet_IRES_neo und durchgehender Selektion mit G418 (0,8 mg/ml). J76: Jurkat-76. —: IgG-FITC/PE, —: CD3-FITC bzw. TRBV10-3-PE.

Zudem wurde gezeigt, dass TCR-1A.3/46 und cTCR-1A.3/46 auch auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Transduktion von PBMC eines gesunden Spenders mit dem, den jeweiligen TCR kodierenden, retroviralen Expressionsvektor pBullet-IRES_neo exprimiert werden konnten (**Abb. 3-5 C**). cTCR-1A.3/46-transgene T-Zellen wiesen dabei im Vergleich zu TCR-1A.3/46-transgenen T-Zellen zwei Tage nach der Transduktion eine höhere TRBV10-3-Expression auf (**Abb. 3-5 C**). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) war bei cTCR-1A.3/46-transduzierten PBMC im Vergleich zu TCR-1A.3/46-transduzierten PBMC um ca. 35 % erhöht (PBMC mock: MFI = 83; PBMC + TCR-1A.3/46: MFI = 233; PBMC + cTCR-1A.3/46: MFI = 312). Die beiden TCR-Konstrukte cTCR-1A.3/46+attB und cTCR-1A.3/46 zeigten weder hinsichtlich der Transfektions-/Transduktionseffizienz noch der Expressionseffizienz/-intensität signifikante Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

3.2.4 Funktionalitätstest des TCR-1A.3/46 und des cTCR-1A.3/46

3.2.4.1 Funktionalität des TCR-1A.3/46 auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen

Die Funktionalität des TCR-1A.3/46 wurde nach Transduktion humaner PBMC mit dem, den TCR-1A.3/46 kodierenden retroviralen Vektor pBullet_IRES_neo im IFN- γ -ELISpot-Assay analysiert. Dazu wurden die TCR-transgenen PBMC zunächst mit magnetischen *Micro Beads* in CD8⁺ und CD4⁺ Zellen separiert und im IFN- γ -ELISpot-Assay auf die Erkennung CSF2RA⁺ Targetzellen getestet. Sowohl TCR-1A.3/46-transgene CD8⁺ Zellen (**Abb. 3-6 A**) als auch TCR-1A.3/46-transgene CD4⁺ Zellen (**Abb. 3-6 B**) zeigten dabei spezifische Reaktivität gegenüber CSF2RA⁺ Zellen. Der Anteil IFN- γ -produzierender Zellen fiel unter CD4⁺ TCR-1A.3/46-transgenen Zellen im Vergleich zu CD8⁺ TCR-1A.3/46-transgenen Zellen jedoch wesentlich geringer aus. Die lediglich sehr schwache Erkennung der murinen Zelllinie B78H1.CSF2RA.15 sowohl durch CD4⁺ als auch durch CD8⁺ Effektoren ist vermutlich mit einer zum Zeitpunkt des Tests geringen CSF2RA-Expression der Zelllinie zu erklären.

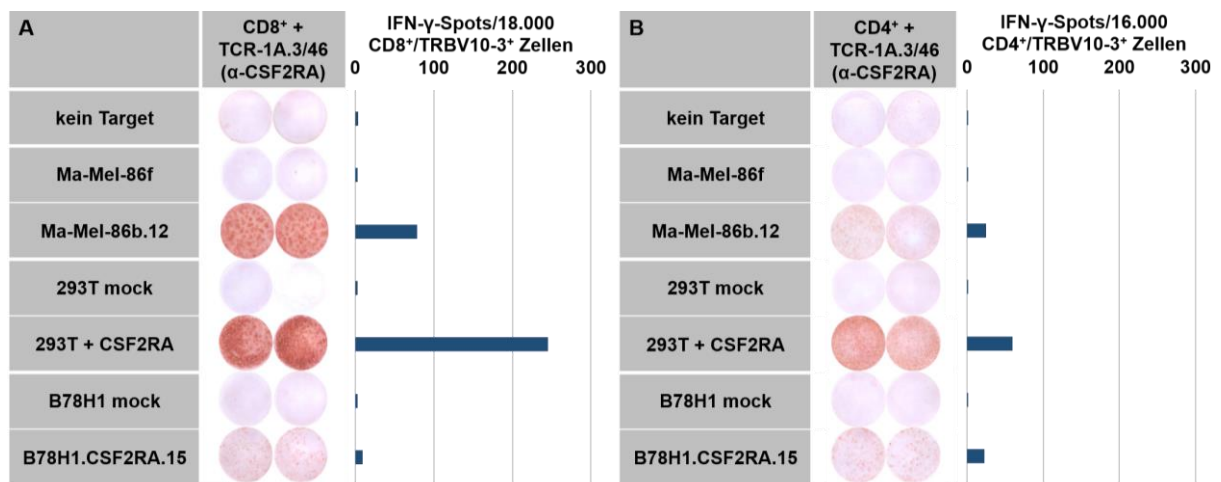


Abb. 3-6: Funktionalität des TCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) auf CD8⁺ (A) und CD4⁺ (B) T-Zellen nach retroviraler Transduktion humaner PBMC (Spender: BC 1229025) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay. (A) CD8⁺ Zellen (100.000 T-Zellen/TE; TCR-Expression: 18 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d28+5; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) und (B) CD4⁺ Zellen (100.000 T-Zellen/TE; TCR-Expression: 16 % CD4⁺/TRBV10-3⁺; d21+5; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) wurden im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay auf die Erkennung humaner und muriner Melanomlinien (50.000 Zellen/TE) und CSF2RA-transfizierter 293T-Zellen (20.000 Zellen/TE) getestet. α : anti.

Links: Originaldaten des ELISpot-Assays, **rechts:** Auswertung mittels CVIA.

3.2.4.2 Funktionalität und Spezifität des cTCR-1A.3/46

Der cTCR-1A.3/46 wurde mit drei verschiedenen Methoden auf seine Funktionalität überprüft. Im IFN- γ -ELISpot-Assay wurde zunächst die spezifische IFN- γ -Freisetzung von cTCR-1A.3/46-transgenen PBMC analysiert und im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest die Kapazität cTCR-1A.3/46-transduzierter PBMC ermittelt, CSF2RA⁺ Targetzellen zu lysieren. Der Degranulations-Assay erlaubte schließlich die Evaluation des zytotoxischen Potentials cTCR-1A.3/46-transgener T-Zellen auf Einzelzellniveau²⁴⁵.

3.2.4.2.1 IFN- γ -ELISpot-Assay

Die Funktionalität cTCR-1A.3/46-transgener PBMC wurde in mehreren unabhängigen IFN- γ -ELISpot-Assays untersucht.

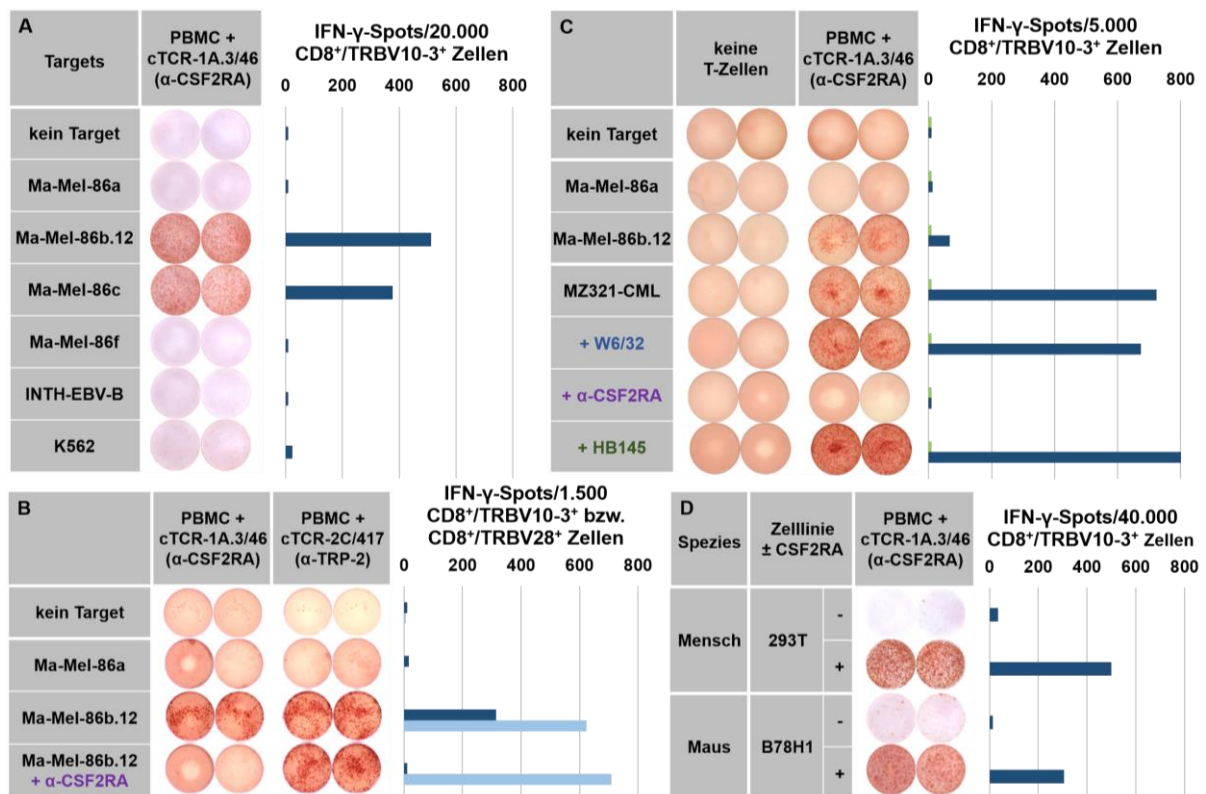


Abb. 3-7: Funktionalität des cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) nach retroviraler Transduktion humaner PBMC im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay. (A) cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA; Spender: BC #1309715; 62.893 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 31,8 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d56+5; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) wurden auf die Erkennung der angegebenen Melanomlinien (50.000 Zellen/TE) und von EBV-B-Zellen (75.000 Zellen/TE) des Melanommodells Ma-Mel-86 sowie von K562-Zellen (50.000 Zellen/TE) getestet. **(B)** CD8⁺ Zellen aus PBMC wurden nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA; Spender: BC #1309715; 3.846 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 39 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d126+6; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) bzw. cTCR-2C/417 (anti-TRP-2; Spender DY; 1.744 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 86 % CD8⁺/TRBV28⁺; d77+6) hinsichtlich der Blockierbarkeit ihrer Reaktivität gegen Ma-Mel-86b.12 (50.000 Zellen/TE) durch einen Antikörper gegen CSF2RA (Klon 12B7-17-A; 100 µg/ml) untersucht. **(C)** PBMC wurden nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA; Spender DY; 16.129 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 31 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d105+5, durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) hinsichtlich der Blockierbarkeit ihrer Reaktivität gegenüber MZ321-CML-Zellen (40.000 Zellen/TE) durch Antikörper gegen HLA-Klasse I (W6/32; 360 µg/ml), HLA-Klasse II (HB145; 260 µg/ml) und gegen CSF2RA (Klon 12B7-17-A; 50 µg/ml) analysiert. **(D)** cTCR-1A.3/46-transduzierte PBMC (Spender: BC #1309715; 816.326 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 4,9 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d7+5; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) wurden getestet auf die Erkennung humaner 293T-Zellen, transient transfiziert mit CSF2RA-cDNA durch *Lipofectamine*TM 2000, und muriner B78H1-Zellen, stabil transfiziert mit CSF2RA-cDNA.

Links: Originaldaten des ELISpot-Assays, **rechts:** Quantifizierung durch CVIA.

■: Targetzellen alleine; ■: PBMC + cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA); ■: PBMC + cTCR-2C/417 (anti-TRP-2).

α: anti; CML: chronische myeloische Leukämie; MZ: Mainz.

Die TCR-transgenen PBMC zeigten dabei das gleiche Erkennungsmuster wie die CTL, aus denen der TCR isoliert wurde. In spezifischer Weise wurden die autologen, CSF2RA⁺ Melanomlinien Ma-Mel-86b.12 und -86c erkannt; die CSF2RA⁻ Linien Ma-Mel-86a und -86f sowie die EBV-B-immortalisierte Lymphblastenzelllinie INTH-EBV-B führten zu keiner spezifischen IFN-γ-Produktion. Auch K562-Zellen als NK-Zelltarget induzierten keine IFN-γ-Freisetzung der TCR-transgenen PBMC (**Abb. 3-7 A**). Wie in **Abb. 3-7 B** gezeigt, war die Erkennung der Melanomlinie Ma-Mel-86b.12 durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA) im Vergleich zur Erkennung cTCR-2C/417-transgenen PBMC (anti-TRP-2) als Kontrolleffektoren spezifisch durch einen gegen CSF2RA gerichteten Antikörper vollständig blockierbar. Der TCR des CTL 2C/417 erkennt HLA-unabhängig das humane und murine melanozytäre Differenzierungsantigen TRP-2, welches selektiv von Melanozyten bzw. Melanomzellen exprimiert wird.

Eine Blockade der Erkennung cTCR-1A.3/46-transgener PBMC durch anti-HLA-Klasse I- oder anti-HLA-Klasse II-Antikörper (W6/32 bzw. HB145) wurde nicht beobachtet. Dies wurde exemplarisch dargestellt für die Erkennung von primären Zellen der CSF2RA⁺ chronischen myeloischen Leukämie (CML) des Patienten MZ321 durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (**Abb. 3-7 C**). Auf die Erkennung primärer CML-Zellen durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC wird in Abschnitt 3.2.5.4 detaillierter eingegangen. Außerdem reagierten cTCR-1A.3/46-transduzierte PBMC ebenso wie genuin CSF2RA-reaktive CTL in spezifischer Weise mit transient mit CSF2RA-cDNA-transfizierten Zellen verschiedener Spezies (**Abb. 3-7 D**).

3.2.4.2.2 ⁵¹Chrom-Freisetzungstest

Die lytische Kapazität cTCR-1A.3/46-transgener PBMC wurde im Vergleich mit dem CSF2RA-reaktiven CTL 1A.3/46, aus dem der gegen CSF2RA gerichtete TCR kloniert worden war, in einem 4h-⁵¹Cr-Freisetzungstests evaluiert (**Abb. 3-8 B**). Die Melanomlinien Ma-Mel-86a, -86b.12, -86c und -86f, autologe INTH-EBV-B-Zellen sowie die HLA-Klasse I-negative NK-Targetzelllinie K562 wurden dazu mit ⁵¹Cr markiert. Das nach 4-stündiger Koinkubation mit den Effektorzellen freigesetzte ⁵¹Cr wurde im Zellüberstand gemessen. Sowohl cTCR-1A.3/46-transgene PBMC als auch der parentale CTL 1A.3/46 lysierten selektiv die CSF2RA⁺ Melanomlinien Ma-Mel-86b.12 und -86c. CSF2RA⁻ Targets, wie Ma-Mel-86a, -86f, INTH-EBV-B und K562-Zellen, wurden nicht lysiert. Für beide Effektoren lag die Maximallyse bei einem E:T-Verhältnis von 60:1 bei ca. 30 %.

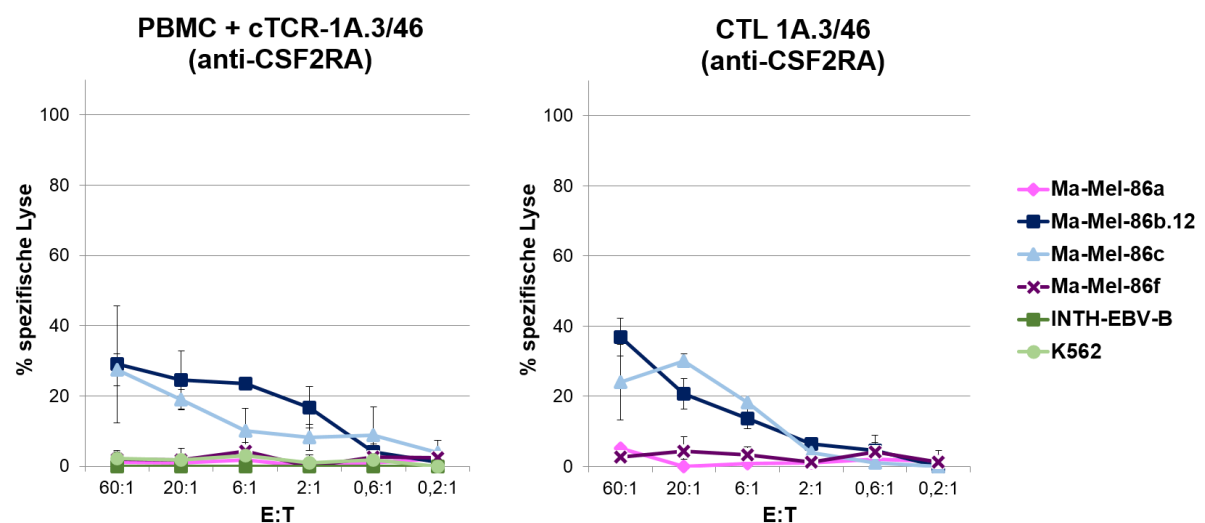


Abb. 3-8: Zytotoxizitätstest von PBMC nach retroviraler Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) im Vergleich zum CSF2RA-reaktiven CTL 1A.3/46. Die lytische Aktivität von PBMC nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (Spender: BC #1309715, TCR-Expression: 32 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d56+6; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) und von CTL 1A.3/46 (OKT3-stimuliert) wurde in einem 4h-⁵¹Cr-Freisetzungstests gegenüber den angegebenen Melanomlinien sowie der INTH-EBV-B-Zellen und K562-Zellen vergleichend getestet. Pro TE wurden 1.000 Targetzellen eingesetzt. CD8⁺/TRBV10-3⁺ T-Zellen wurden in einem E:T-Verhältnis von 0,2:1 bis 60:1 eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

3.2.4.2.3 Degranelationsassay

Im Degranulationstest wird das Maß an Zytotoxizität CD8⁺ Zellen anhand der Oberflächenexpression des Markers CD107a für zytotoxische Granula, welcher als Reaktion auf eine antigen-spezifische T-Zellstimulation an die Zelloberfläche gelangt, durchflusszytometrisch bestimmt. Da nicht alle

degranulierenden, CD8⁺ T-Zellen IFN- γ produzieren, jedoch bisher im Gegensatz zu CD4⁺ Zellen keine IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen bekannt sind, die nicht degranulieren, liefert der Degranulationsassay eine umfassendere Aussage über die tatsächliche Frequenz zytotoxischer T-Lymphozyten auf Einzelzellniveau^{245,246}. cTCR-1A.3/46-transgene PBMC wurden im Degranulationsassay auf ihr zytolytisches Potential untersucht und zeigten eine spezifische Degranulation (ca. 3 % bis 16 %) als Reaktion auf eine Stimulation mit allen getesteten CSF2RA⁺ Targetzellen (**Abb. 3-9**). CSF2RA⁻ Targetzellen führten zu keiner Degranulation der cTCR-1A.3/46-transgenen PBMC (ca. 1 %). Die unspezifische Stimulation mit *Phorbol-Myristat Azetat und Ionomycin* (PMA/I) diente dabei als Positivkontrolle für die generelle Stimulierbarkeit bzw. Degranulationsfähigkeit der T-Zellen (ca. 80 %). Die Spontandegranulation (ca. 1 %) wurde anhand unstimulierter TCR-transgener PBMC ermittelt.

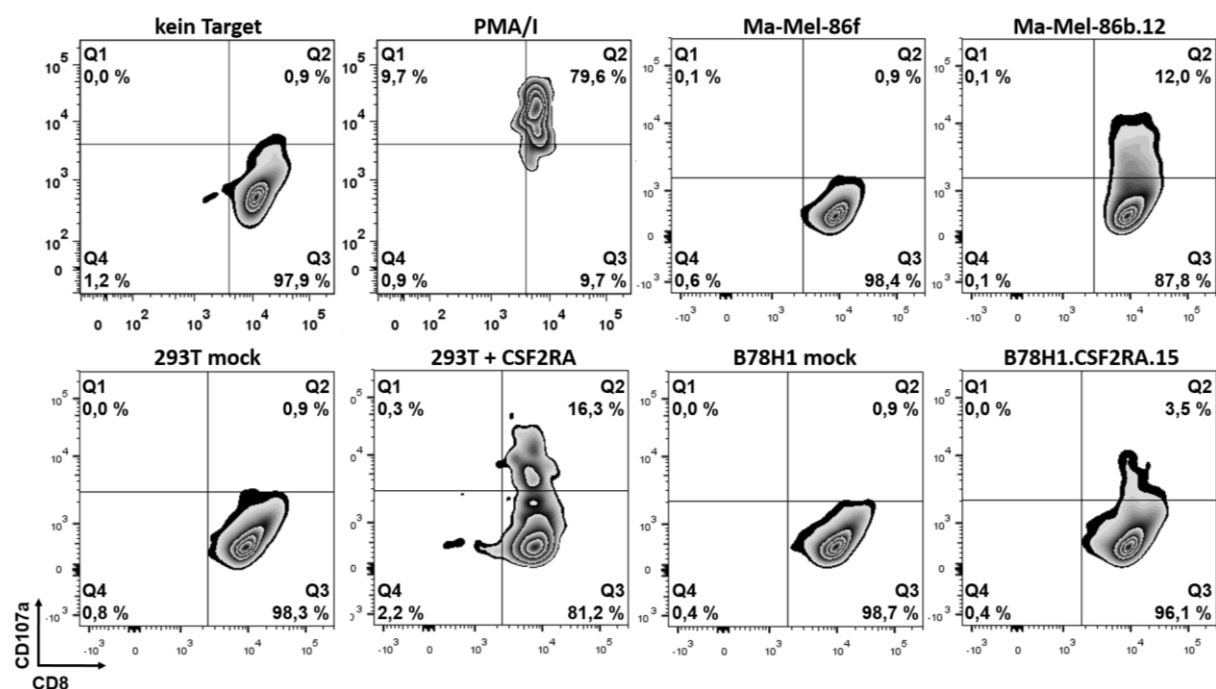


Abb. 3-9: Degranulations-Assay von PBMC nach retroviraler Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA). Das Maß der Degranulation von cTCR-1A.3/46-transgenen PBMC (Spender: BC #1309715, 1.000.000 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 20 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d21+4; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) wurde nach 24-stündiger Koinkubation mit den angegebenen humanen und murinen Melanomlinien sowie CSF2RA-cDNA-transfizierten 293T-Zellen (100.000 Zellen/TE) anhand der Oberflächenexpression des Degranulierungsmarkers CD107a durchflusszytometrisch ermittelt. Unstimulierte TCR-transgene PBMC wurden als Negativkontrolle, PMA/I-stimulierte TCR-transgene PBMC als Positivkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden in einem E:T-Verhältnis von 2:1 eingesetzt (200.000 CD8⁺/TRBV10-3⁺ T-Zellen/TE bzw. 100.000 Targetzellen/TE).

PMA: engl. *Phorbol-Myristate Acetate*; I: *Ionomycin*.

3.2.4.3 Funktionalitätsvergleich des TCR-1A.3/46 und des cTCR-1A.3/46

Um zusätzlich zur Expression (**Abb. 3-5 C**) auch die Funktionalität der verschiedenen nativen und chimärisierten CSF2RA-reaktiven TCR-Konstrukte zu vergleichen, wurden PBMC des gleichen Spenders sowohl mit TCR-1A.3/46 als auch mit cTCR-1A.3/46+attB und cTCR-1A.3/46 transduziert, unter den gleichen Bedingungen expandiert und im IFN- γ -ELISpot-Assay hinsichtlich der Erkennung von CSF2RA⁺ Targetzellen untersucht. Dabei wurde die Reaktivität TCR-transduzierter Zellen mit der

Reaktivität des T-Zellklons CTL 1A3/44 verglichen. Dieser CSF2RA-reaktive T-Zellklon exprimierte genau wie der CTL 1A.3/46, aus dem die TCR-Ketten kloniert worden waren, in durchflusszytometrischen Analysen die TCR β -Kette TRBV10-3, weswegen angenommen werden kann, dass beide CTL den gleichen TCR tragen. Wie aus **Abb. 3-10** hervorgeht, reagierten cTCR-1A.3/46-transduzierte PBMC deutlich stärker mit CSF2RA⁺ Targetzellen als TCR-1A.3/46-transduzierte PBMC. Dabei waren cTCR-1A.3/46-transduzierte PBMC mit dem CTL 1A.3/44 in jedem Fall vergleichbar. Zwischen cTCR-1A.3/46- und cTCR-1A.3/46+*attB*-transduzierten PBMC ließ sich kein Unterschied hinsichtlich Erkennungsmuster oder Erkennungsstärke ausmachen (Daten nicht gezeigt).

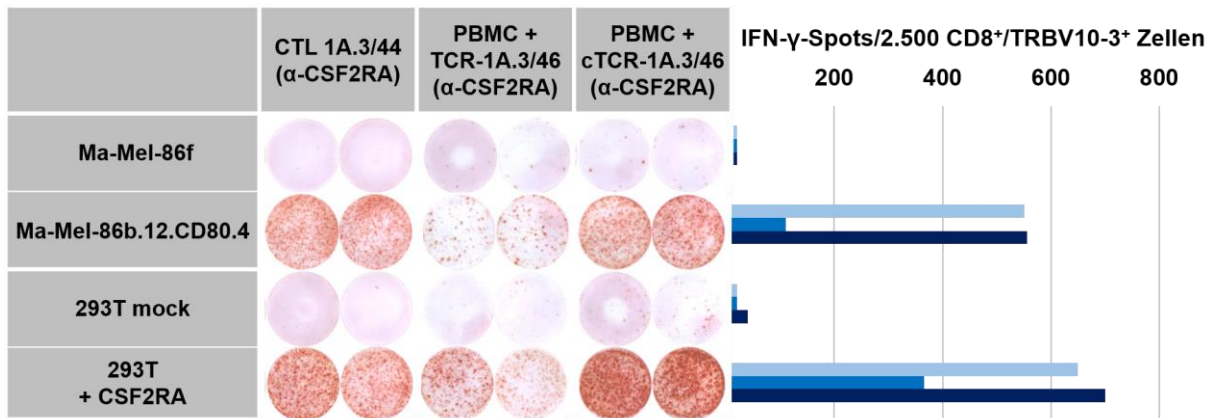


Abb. 3-10: Vergleich der Reaktivität von PBMC nach retroviraler Transduktion mit TCR-1A.3/46 oder cTCR-1A.3/46 mit der des CSF2RA-reaktiven CTL 1A.3/44 im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay. Der CTL 1A.3/44 (■; anti-CSF2RA; 2.500 Zellen/TE; OKT3-stimuliert), TCR-1A.3/46-transgene PBMC (■; anti-CSF2RA; Spender: BC #1309715; 11.904 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 21 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d14+5; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) und cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (■; anti-CSF2RA; Spender: BC #1309715; 7.142 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 35 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) wurden im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay auf ihre Reaktivität gegen die angegebenen Ma-Mel-86-Melanomlinien (50.000 Zellen/TE) sowie CSF2RA-cDNA-transfizierte 293T-Zellen (20.000 Zellen/TE) untersucht. α : anti.

Links: Originaldaten des ELISpot-Assays, **rechts:** Quantifizierung durch CVIA.

3.2.5 Erkennungsmuster hämatopoetischer Zellen durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen

Aufgrund der intrinsischen Expression von CSF2RA auf hämatopoetischen Zellen, wie beispielsweise Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und DC¹, wurden cTCR-1A.3/46-transgene PBMC auf ihre Reaktivität gegenüber normalen sowie malignen hämatopoetischen Zellen geprüft. Als Kontroll-Effektorzellen wurden hier in jedem Fall cTCR-2C/417-transgene PBMC desselben PBMC-Donors mitgeführt. Der TCR des CTL 2C/417 erkennt HLA-unabhängig das humane und murine Melanom-assoziierte Antigen TRP-2, welches als melanozytäres Protein von hämatopoetischen Zellen nicht exprimiert wird.

3.2.5.1 Erkennung verschiedener nicht maligner hämatopoetischer Zellreihen durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen

Verschiedene nicht-maligne hämatopoetische Zellen wurden auf die Erkennung durch gegen CSF2RA gerichtete cTCR-1A.3/46-transgene PBMC im IFN- γ -ELISpot-Assay getestet. Als Kontrolle dienten gegen TRP-2 gerichtete cTCR-2C/417-transgene PBMC. Die durch magnetische Zellseparation isolierten hämatopoetischen Targetzell-Subpopulationen bzw. *in vitro* durch Ausreifung von Monozyten generierte imDC (engl. **immature dendritic cells**) und mDC (engl. **mature dendritic cells**) wurden vor ihrem Einsatz im ELISpot-Assay anhand der Expression charakteristischer Oberflächenmarker durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit geprüft (vgl. Abschnitt 2.2.1.6 und Abschnitt 2.2.1.7; Daten nicht gezeigt).

cTCR-1A.3/46-transduzierte PBMC zeigten im Gegensatz zu cTCR-2C/417-transduzierten PBMC des gleichen Spenders spezifische Reaktivität gegenüber autologen Monozyten, Granulozyten, unreifen DC und reifen DC. Die stärkste Reaktivität war dabei gegen Monozyten, imDC und mDC zu beobachten (**Abb. 3-11 A-C**). Granulozyten wurden nur schwach erkannt (**Abb. 3-11 A**). Eine Blockade der Erkennung durch den HLA-Klasse I-spezifischen Antikörper W6/32 bzw. den HLA-Klasse II-spezifischen Antikörper HB145 war nicht festzustellen (Daten nicht gezeigt). Autologe CD19⁺ Zellen (**Abb. 3-11 A**) sowie autologe EBV-immortalisierte B-Zellen (Daten nicht gezeigt) wurden nicht erkannt. Gegenüber allogenen, CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen wiesen die cTCR-1A.3/46-transgenen PBMC ebenfalls keinerlei Reaktivität auf (**Abb. 3-11 D**).

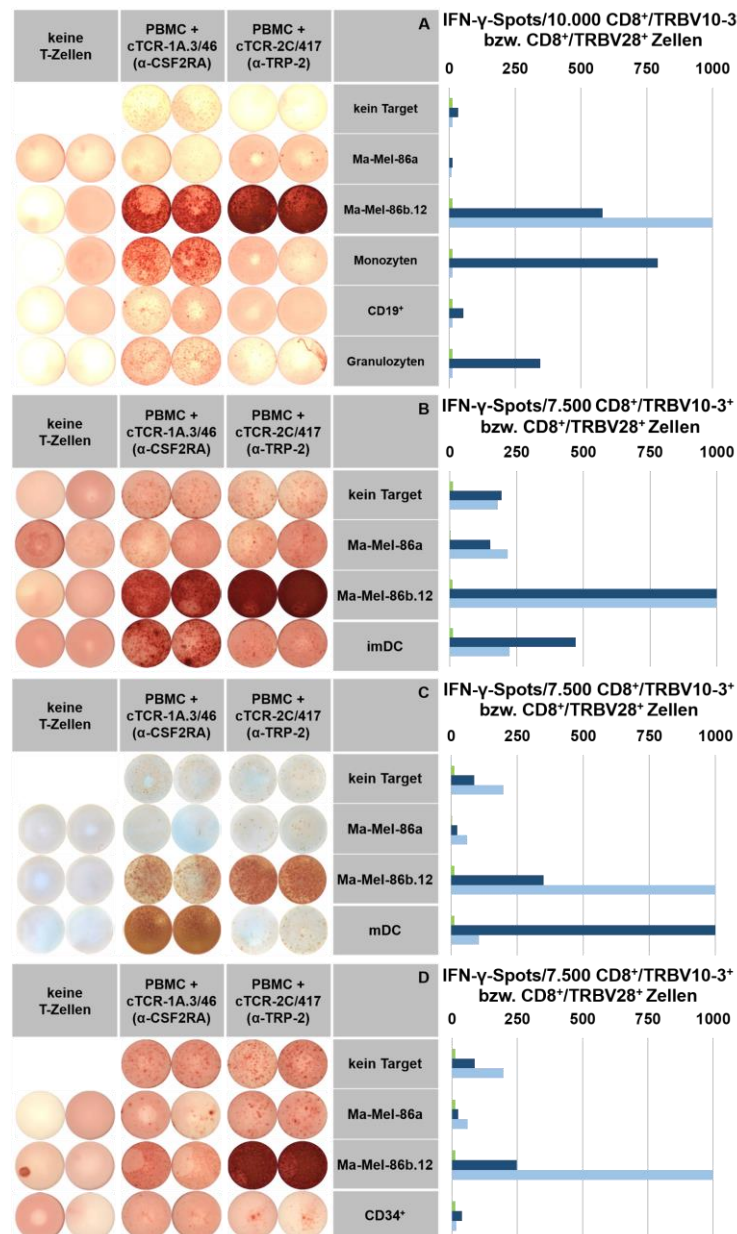


Abb. 3-11: Erkennung verschiedener hämatopoetischer Zellreihen durch PBMC nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) und cTCR-2C/417 (anti-TRP-2) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay. (A) cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (Spender: DY; 62.500 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 16 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d21+5; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) und cTCR-2C/417-transgene PBMC (Spender: DY; 21.276 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 47 % CD8⁺/TRBV28⁺; d85+5) wurden auf die Erkennung autologer Monozyten, CD19⁺ Zellen und Granulozyten (je 50.000 Zellen/TE) getestet. **(B)** cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (Spender: IC; 57.692 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 13 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d28+4; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) und cTCR-2C/417-transgene PBMC (Spender: IC; 26.785 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 28 % CD8⁺/TRBV28⁺; d28+4) wurden hinsichtlich ihrer Erkennung autologer imDC (50.000 Zellen/TE) analysiert. **(C)** cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (Spender: DY; 14.423 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 52 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d28+5; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) und cTCR-2C/417-transgene PBMC (Spender: DY; 11.194 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 67 % CD8⁺/TRBV28⁺; d28+5) wurden bezüglich der Erkennung autologer mDC (50.000 Zellen/TE) verglichen. **(D)** cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (Spender: IC; 31.250 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 24 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d21+4; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) und cTCR-2C/417-transgene PBMC (Spender: IC; 140.186 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 5,35 % CD8⁺/TRBV28⁺; d21+4) wurden auf die Erkennung allogener CD34⁺ Zellen (50.000 Zellen/TE) getestet.

Kontroll-Zielzellen: Ma-Mel-86a (CSF2RA⁺, TRP-2⁻; 50.000 Zellen/TE) als Negativkontrolle und Ma-Mel-86b.12 (CSF2RA⁺, TRP-2⁺; 50.000 Zellen/TE) als Positivkontrolle für beide TCR-Konstrukte.

Links: Originaldaten des ELISpot-Assays, **rechts:** Quantifizierung durch CVIA.

■: Targetzellen alleine; ■: PBMC + cTCR-1A.3/46; ■: PBMC + cTCR-2C/417.

α : anti; imDC: unreife dendritische Zellen (engl. *immature dendritic cells*); mDC: reife dendritische Zellen (engl. *mature dendritic cells*).

3.2.5.2 Erkennung von Leukämie-Zelllinien durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen

Dreizehn Leukämiezelllinien unterschiedlichen Ursprungs wurden auf ihre Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA) im Vergleich zu cTCR-2C/417-transgenen PBMC (anti-TRP-2) im IFN- γ -ELISpot-Assay analysiert (**Abb. 3-12**).

Eine spezifische Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC war dabei gegenüber allen getesteten AML-Zelllinien der Subtypen FAB M3 (**akute Promyelozyten-Leukämie**, APL; 1/1), FAB M4 (2/2) und FAB M5 (4/4) sowie einer von zwei CML-Linien festzustellen. Die Erkennung war durch den anti-HLA-Klasse I-Antikörper W6/32 nicht zu blockieren. AML-Linien der FAB-Subtypen M2, M6 und M7, von denen je eine analysiert wurde, sowie eine getestete ALL-Linie wurden nicht erkannt. Die CSF2RA-Expression der Targetzelllinien wurde durchflusszytometrisch sowie mittels RT-PCR (**reverse Transkriptase-PCR**) analysiert. Eine Erkennung der Zelllinien durch cTCR-1A.3/46-transduzierte PBMC korrelierte dabei mit der CSF2RA-Expression der Targetzellen.

Auffällig war die Erkennung der Linie THP-1 und NB4 durch gegen TRP-2 gerichtete cTCR-2C/417-transgene PBMC in zweifacher Hinsicht. Es war nicht von einer Expression des melanosomalen Proteins TRP-2 in AML-Zellen auszugehen und die Erkennung von NB4 bzw. THP-1 war zumindest teilweise durch W6/32 blockierbar. Letzteres gilt nicht für die Erkennung von TRP-2 durch diesen TCR. Auch der T-Zellklon CTL 2C/147, aus dem oben genannter TCR kloniert worden war, erkannte THP-1, wobei diese Reaktivität bei Einsatz geringerer Effektorzellzahlen sogar vollständig mit W6/32 blockierbar war (Daten nicht gezeigt). Dies wurde als Kreuzreaktivität des TRP-2-reaktiven cTCR-2C/417 gegenüber einem Allo-MHC:Peptid-Komplex interpretiert. In folgenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass der TCR des CTL 2C/417 ein noch unbekanntes Peptid, präsentiert über die Allo-MHC-Moleküle HLA-C*03:03 bzw. HLA-C*03:04 erkannte (Daten nicht gezeigt).

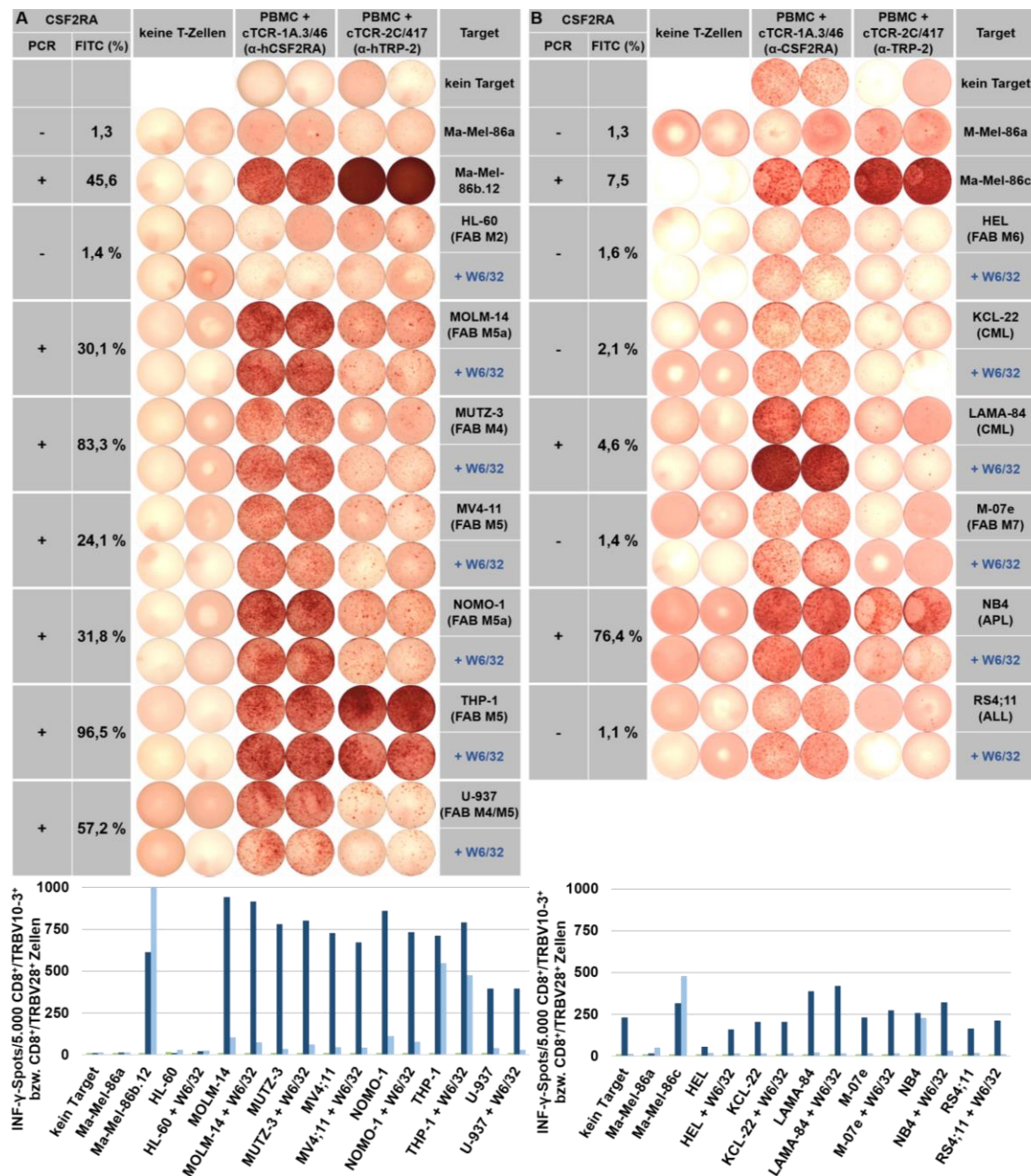


Abb. 3-12: Testung verschiedener Leukämiezelllinien auf Erkennung durch cTCR-1A.3/46- (anti-CSF2RA) bzw. cTCR-2C/417- (anti-TRP-2) transduzierte PBMC im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay. (A) cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (Spender: DY; 83.333 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 6 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d91+5; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) und cTCR-2C/417-transgene PBMC (Spender: DY; 83.333 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 6 % CD8⁺/TRBV28⁺; d91+5) wurden auf die Erkennung der angegebenen allogenen Leukämiecelllinien (75.000 Zellen/TE) sowie deren Blockade durch W6/32 (anti-HLA-Klasse I; 360 µg/ml) getestet. (B) cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (Spender: DY; 50.000 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 20 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d35+6; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) und cTCR-2C/417-transgene PBMC (Spender DY; 14.285 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 70 % CD8⁺/TRBV28⁺; d28+6) wurden hinsichtlich der Erkennung weiterer allogener Leukämiecelllinien (50.000 Zellen/TE) sowie der Blockade ihrer Reaktivität durch W6/32 (anti-HLA-Klasse I; 450 µg/ml) untersucht.

Kontroll-Zielzellen: Ma-Mel-86a (CSF2RA⁻, TRP-2⁻; 50.000 Zellen/TE) als Negativkontrolle und Ma-Mel-86b.12 (CSF2RA⁺, TRP-2⁺; 50.000 Zellen/TE) bzw. Ma-Mel-86c (CSF2RA⁺, TRP-2⁺; 50.000 Zellen/TE) als Positivkontrolle für beide TCR-Konstrukte.

Die CSF2RA-Oberflächenexpression der getesteten Linien wurde durchflusszytometrisch bestimmt und CSF2RA-mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen.

Oben: Originaldaten des ELISpot-Assays, **unten:** Quantifizierung durch CVIA.

■: Targetzellen alleine; ■: PBMC + cTCR-1A.3/46; ■: PBMC + cTCR-2C/417.

α: anti; ALL: akute lymphatische Leukämie; APL: akute Promyelozyten-Leukämie; CML: chronische myeloische Leukämie; FAB: Französisch-Amerikanisch-Britisches Klassifikationssystem zur Einteilung von AML.

Um die unter Abschnitt 3.2.5.1 erhaltenen Daten bezüglich der Erkennung von Monozyten, imDC und mDC durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA) in einem leicht reproduzierbaren System zu bestätigen, wurde die Leukämiezelllinie MUTZ-3 als Targetzelle genutzt. Diese weist prinzipiell einen monozytären Phänotyp auf, kann jedoch durch die Inkubation mit GM-CSF-, IL-4-, TNF α -, IL-1 β -, IL-6- und PGE₂-enthaltende Zytokincocktails zu imDC- bzw. mDC-ähnlichen Zellen ausdifferenziert werden (vgl. Abschnitt 2.2.1.20)^{217,218}. Die verschiedenen Differenzierungsstadien wurden anhand der Oberflächenexpression der Marker CD14, CD83 und CD86 (Abb. 3-13 B) sowie CD34, CD40, CD54 und CD80 (Daten nicht gezeigt) durchflusszytometrisch validiert. In Übereinstimmung mit den in Abschnitt 3.2.5.1 gezeigten Daten wurden sowohl monozytäre MUTZ-3-Zellen, als auch zu imDC oder mDC differenzierte MUTZ-3-Zellen spezifisch von cTCR-1A.3/46-transgenen PBMC (anti-CSF2RA) im IFN- γ -ELISpot-Assay erkannt. Eine Blockade der Erkennung durch den HLA-Klasse I-spezifischen Antikörper W6/32 war nicht festzustellen (Abb. 3-13 A). Das Erkennungsmuster ließ sich mit dem TRVB10-3⁺, CSF2RA-reaktiven CTL 1A.3/4 bestätigen (Daten nicht gezeigt).

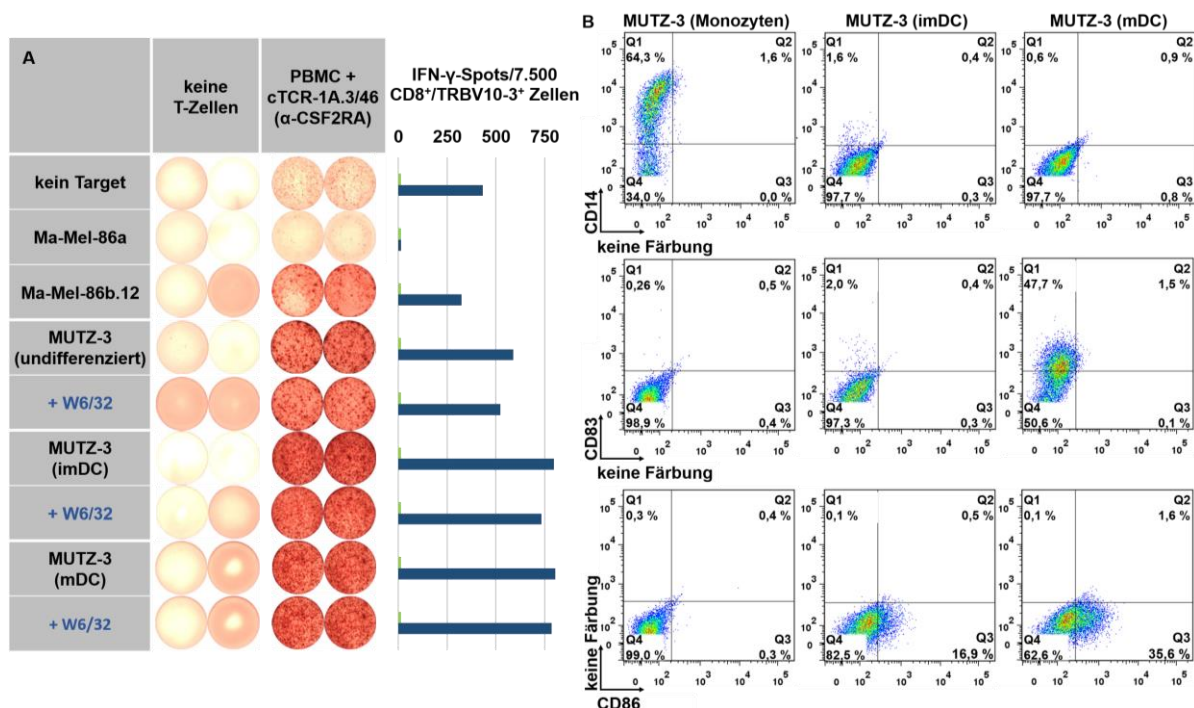


Abb. 3-13: Erkennung un- sowie ausdifferenzierter MUTZ-3-Zellen durch PBMC nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay. (A) Es wurde die Erkennung von undifferenzierten MUTZ-3-Zellen sowie von zu imDC und mDC ausdifferenzierten MUTZ-3-Zellen (je 50.000 Zellen/TE) durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (Spender: BC #1309715; 11.363 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 66 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d14+6; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) sowie die Blockade deren Reaktivität durch W6/32 (α -HLA-Klasse I; 180 μ g/ml) getestet. **Links:** Originaldaten des ELISpot-Assays, **rechts:** Quantifizierung durch CVIA. ■: Targetzellen alleine; ■: PBMC + cTCR-1A.3/46. **(B)** Der Differenzierungsstatus der MUTZ-3-Zellen wurde durchflusszytometrisch anhand der Oberflächenmarker CD14, CD83 und CD86 evaluiert.

α : anti; imDC: unreife dendritische Zellen (engl. *immature dendritic cells*); mDC: reife dendritische Zellen (engl. *mature dendritic cells*).

3.2.5.3 Erkennung von primären AML-Zellisolaten durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen

Acht primäre AML-Zellisolate vom FAB-Subtyp M4 oder M5 (Französisch-Amerikanisch-Britisches Klassifikationssystem zur Einteilung akuter myeloischer Leukämien) wurden auf die Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA) im Vergleich zu cTCR-2C/417-transgenen PBMC (anti-TRP-2) vom gleichen Spender im IFN- γ -ELISpot-Assay getestet. Alle AML-Zellisolate wurden spezifisch

durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC erkannt (**Abb. 3-14**). Nach 20h-Vorinkubation der AML-Zellisolate mit 30.000 IU/ml GM-CSF war deren Erkennung durch T-Zellen gegen CSF2RA gegenüber unbehandelten AML-Zellen um 22-56 % reduziert (detaillierte Informationen über die Blockade HLA-unabhängiger, CSF2RA-reaktiver T-Zellen durch GM-CSF finden sich in Abschnitt 3.3.2.2). Die Expression von CSF2RA war durchflusszytometrisch sowie durch RT-PCR bei allen hier getesteten AML-Zellisolaten nachweisbar.

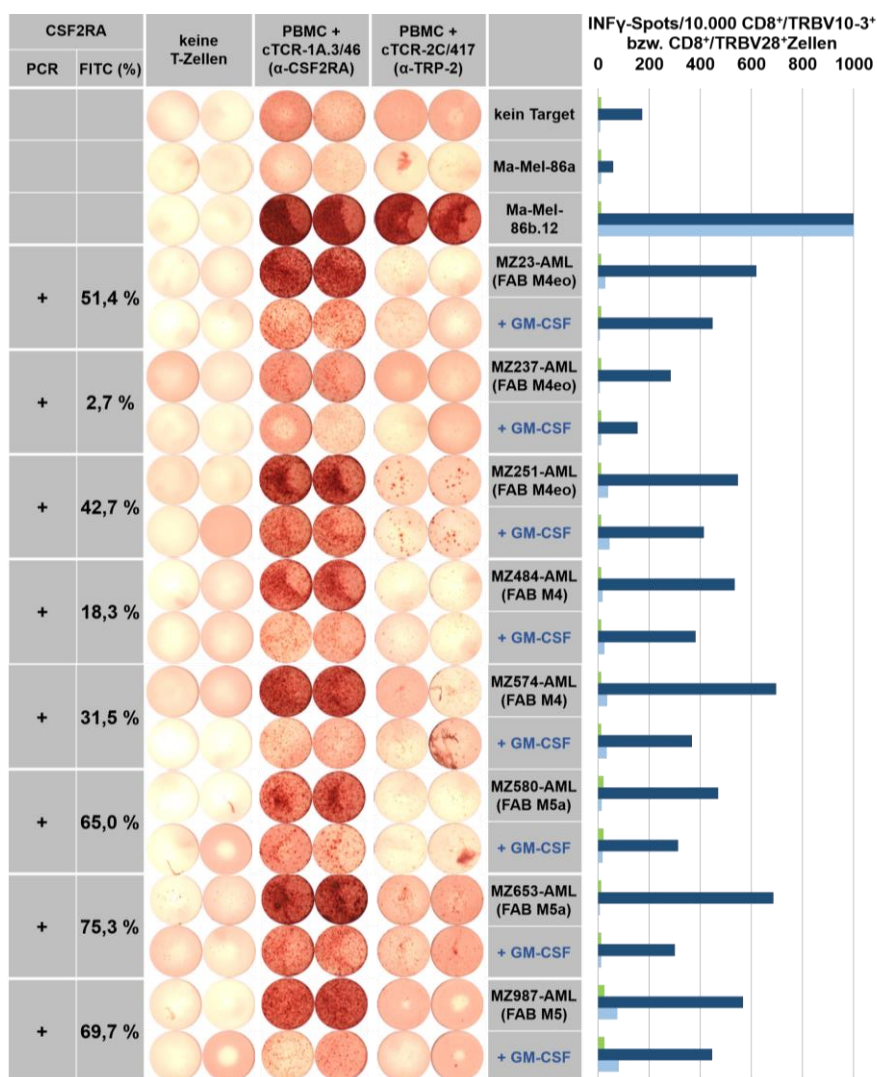


Abb. 3-14: Testung primärer AML-Zellisolate auf Erkennung durch PBMC nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) oder cTCR-2C/417 (anti-TRP-2) im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay. Die angegebenen primären AML-Zellisolate (FAB M4 oder M5; 50.000 Zellen/TE) wurden auf ihre Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC untersucht (anti-CSF2RA; Spender: IC; 125.000 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 8 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d63+4, durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) bzw. cTCR-2C/417 (anti-TRP-2; Spender: IC; 37.037 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 27 % CD8⁺/TRBV28⁺; d63+4) sowie hinsichtlich der Blockade ihrer Erkennung durch Präinkubation mit GM-CSF (30.000 IU/ml). Zusätzlich wurde die CSF2RA-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt und vorliegende CSF2RA-mRNA durch RT-PCR nachgewiesen.

Links: Ergebnisse der Expressionsanalysen; **Mitte:** Originaldaten des ELISpot-Assays; **rechts:** Quantifizierung durch CVIA.

Kontroll-Zielzellen: Ma-Mel-86a (CSF2RA⁻, TRP-2⁻; 50.000 Zellen/TE) als Negativkontrolle und Ma-Mel-86b.12 (CSF2RA⁺, TRP-2⁺; 50.000 Zellen/TE) als Positivkontrolle für beide TCR-Konstrukte.

■: Targetzellen alleine; ■: PBMC + cTCR-1A.3/46; ■: PBMC + cTCR-2C/417.

α: anti; AML: akute myeloische Leukämie; FAB: Französisch-Amerikanisch-Britisches Klassifikationssystem zur Einteilung von AML; GM-CSF: engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*; MZ: Mainz.

3.2.5.4 Erkennung von primären CML-Isolaten durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen

Neben primären AML-Isolaten wurden auch zwölf primäre CML-Zellisolat auf die Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA) im Vergleich zu cTCR-2C/417-transgenen PBMC (anti-TRP-2) im IFN- γ -ELISpot-Assay analysiert.

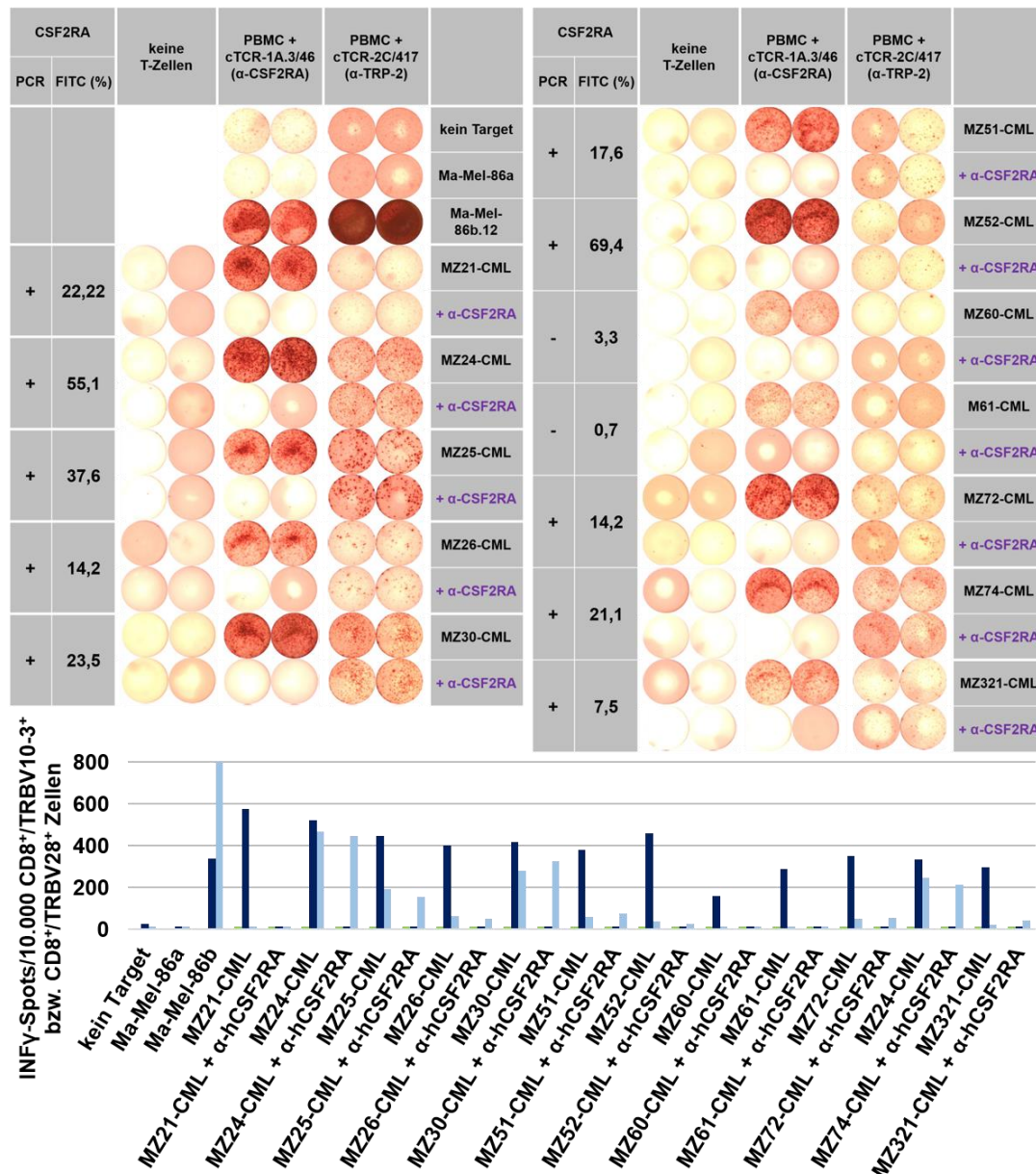


Abb. 3-15: Testung primärer CML-Zellisolat auf Erkennung durch PBMC nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) oder cTCR-2C/417 (anti-TRP-2) im 20h-IFN- γ -ELISpot-Assay. Die angegebenen primären CML-Zellisolat (50.000 Zellen/TE) wurden auf ihre Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA; Spender IC; 83.333 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 12 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d56+5, durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) bzw. cTCR-2C/417-transgene PBMC (anti-TRP-2; Spender IC; 31.250 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 32 % CD8⁺/TRBV28⁺; d70+5) untersucht sowie hinsichtlich der Blockade ihrer Erkennung durch anti-CSF2RA (Klon 12B7-17-A; 50 μ g/ml) getestet. Zusätzlich wurde die CSF2RA-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt und vorliegende CSF2RA-mRNA durch RT-PCR nachgewiesen.

Oben: Ergebnisse der Expressionanalysen und Originaldaten des ELISpot-Assays; **unten:** Quantifizierung durch CVIA.

Kontroll-Zielzellen: Ma-Mel-86a (CSF2RA⁻, TRP-2⁻; 50.000 Zellen/TE) als Negativkontrolle und Ma-Mel-86b.12 (CSF2RA⁺, TRP-2⁺; 50.000 Zellen/TE) als Positivkontrolle für beide TCR-Konstrukte.

■: Targetzellen alleine; ■: PBMC + cTCR-1A.3/46; ■: PBMC + cTCR-2C/417.

α: anti; CML: chronische myeloische Leukämie; MZ: Mainz.

Davon wurden alle primären CML-Zellisolate spezifisch von cTCR-1A.3/46-transduzierten PBMC erkannt (**Abb. 3-15**). Die Reaktivität war durch Antikörper gegen CSF2RA blockierbar. Das Erkennungsmuster der cTCR-1A.3/46-transgenen PBMC war identisch zu dem Erkennungsmuster des TRBV10-3⁺ CSF2RA-reaktiven T-Zellklons CTL 1A.1/503 (Daten nicht gezeigt). Alle primären CML-Zellisolate exprimierten laut Durchflusszytometrie und laut RT-PCR CSF2RA. MZ60-CML und MZ61-CML wiesen lediglich eine CSF2RA-Oberflächenexpression von 3,3 % bzw. 0,7 % auf. Die geringe Expression korrelierte mit einer schwachen Erkennung durch CSF2RA-reaktive T-Zellen.

Zusammenfassung: Aus dem CSF2RA-reaktiven CTL 1A.3/46 wurde ein HLA-unabhängiger, CSF2RA-reaktiver TCR kloniert. Seine Expression und Funktionalität nach retroviraler Transduktion in humane PBMC konnte bestätigt und durch Chimärisierung optimiert werden. cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen erkannten spezifisch nicht nur die CSF2RA⁺ Melanomlinien des Melanommodells Ma-Mel-86, mit *CSF2RA*-cDNA transfizierte Zelllinien verschiedener Spezies sowie autologe Monozyten, imDC, mDC und Granulozyten, sondern auch acht von dreizehn allogenen Leukämiezelllinien unterschiedlichen Ursprungs sowie alle getesteten primären, allogenen AML- (8/8) und CML-Zellisolate (12/12). Allogene CD34⁺ Zellen und autologe CD19⁺ Zellen bzw. EBV-immortalisierte B-Zellen wurden nicht erkannt.

3.3 Analyse des HLA-unabhängigen Erkennungsmechanismus von CSF2RA durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen

Eine HLA-unabhängige Antigenerkennung durch CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen wurde bisher nur für wenige Antigene beschrieben. Die ihrer Erkennung unterliegenden Mechanismen sind im Detail nur in einem Fall sicher aufgeklärt, der nicht direkt auf CSF2RA oder TRP-2 übertragbar ist (vgl. Abschnitt 1.1.3). Deshalb sollte in einem zweiten Teil dieser Arbeit der molekulare Mechanismus der HLA-unabhängigen Erkennung von CSF2RA näher charakterisiert werden.

3.3.1 Erkennung von löslichem CSF2RA durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen

Hanada *et al.* gelang es 2011, den bisher einzigen T-Zellvermittelten, HLA-unabhängigen Erkennungsmechanismus im Detail aufzuklären⁴⁰. Dabei wird das Antigen TRAIL zunächst durch Proteasespaltung solubilisiert⁴⁰. Erst nach Dimerisierung von solTRAIL mit DR4 jedoch erfolgt eine Erkennung durch CD4⁺ T-Zellen (vgl. Abschnitt 1.1.3)⁴⁰. Da auch von CSF2RA lösliche Isoformen existieren bzw. eine Proteasespaltung bedingte Solubilisierung von membranständigen CSF2RA in der Literatur beschrieben ist, wären Analogien zum publizierten, HLA-unabhängigen Erkennungsmechanismus von TRAIL auf Nierenzellkarzinomzellen auch für eine Erkennung von CSF2RA durch CD8⁺ T-Zellen denkbar.

In einem ersten Schritt wurde daher die Erkennung von löslichem CSF2RA (solCSF2RA, engl. **soluble CSF2RA**) durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA) analysiert. Von den drei publizierten löslichen CSF2RA-Isoformen, die sich alle im C-terminalen Bereich von der membranständigen CSF2RA-Isoform a unterscheiden und durch das Fehlen einer Transmembrandomäne ausgezeichnet sind, konnte in den von CSF2RA-reaktiven T-Zellen erkannten Melanomlinien Ma-Mel-86b und Ma-Mel-86c durch Transkriptomsequenzierung lediglich die Expression der Isoform c (NM_172247.2; NP_758450.1; Sequenz siehe Abschnitt 5.1.4) nachgewiesen werden, wenn auch in wesentlich geringeren Maße im Vergleich zur membranständigen Isoform a (NM_006140.4; NP_006131.2). Die FPKM-Werte (engl. *fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*) der membranständigen CSF2RA-Isoform a lagen für Ma-Mel-86b bei 32,8 und für Ma-Mel-86c bei 23,3 wohingegen sie für die lösliche CSF2RA-Isoform c für Ma-Mel-86b lediglich bei 2,6 und für Ma-Mel-86c bei 1,9 lagen (persönliche Mitteilung [REDACTED]). Die beiden anderen löslichen Isoformen (CSF2RA-Isoform b: NM_172246.2, NP_758449.1 und CSF2RA-Isoform e: NM_172249.2, NP_758452.1) wurden in den Melanomlinien nicht exprimiert, weshalb sich die Analyse im Rahmen dieser Arbeit auf solCSF2RA-Isoform c beschränkte.

Die für solCSF2RA-Isoform c kodierende cDNA wurde aus den durch CSF2RA-reaktive T-Zellen erkannten MZ653-AML-Zellen (**Abb. 3.14**) isoliert und mittels Gateway®-Technologie in pcDNA-3.1-DEST kloniert (Daten nicht gezeigt). Vierundzwanzig Stunden nach transienter Transfektion der Expressionszelllinie Expi293F mit der für solCSF2RA-Isoform c kodierenden cDNA wurden sowohl die Zellen als auch der Kulturüberstand direkt auf die Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC im IFN- γ -ELISpot-Assay getestet. Die solCSF2RA-Isoform c-Transfektanten wurden im Vergleich zu CSF2RA-Isoform a-transfizierten Expi293F-Zellen nur sehr schwach erkannt (ca. 4 %; **Abb. 3-16 A**). Der Überstand von mock-, CSF2RA-Isoform a- bzw. solCSF2RA-Isoform c-transfizierten Expi293F-Zellen induzierte *per se* keine IFN- γ -Produktion der TCR-transduzierten PBMC (Daten nicht gezeigt). Auch die Beladung von mock-transfizierten Expi293F-Zellen mit Überstand von solCSF2RA-Isoform c-

transfizierten Expi293F-Zellen führte zu keiner Erkennung durch TCR-transgene T-Zellen (**Abb. 3-16 A**).

Wie durchflusszytometrische Analysen zeigten (**Abb. 3-16 B**), wurden beide Isoformen 24 Stunden nach Transfektion der Expi293F-Zellen exprimiert, wobei CSF2RA-Isoform a (ca. 80 %, MFI: 2460) bei einem wesentlich größeren Anteil der Zellen nachweisbar war als solCSF2RA-Isoform c (ca. 40 %, MFI: 1240). Im Western Blot wurde 48 Stunden nach Transfektion die Expression von CSF2RA-Isoform a im Expi293F-Zelllysate bestätigt, im Überstand war keine CSF2RA-Isoform a-Expression feststellbar. SolCSF2RA-Isoform c hingegen war sowohl im Expi293F-Zelllysate als auch im Überstand nachweisbar, wobei solCSF2RA-Isoform c aus den Zelllysaten ein geringeres Molekulargewicht hatte als solCSF2RA-Isoform c aus dem Überstand (**Abb. 3-16 C**).

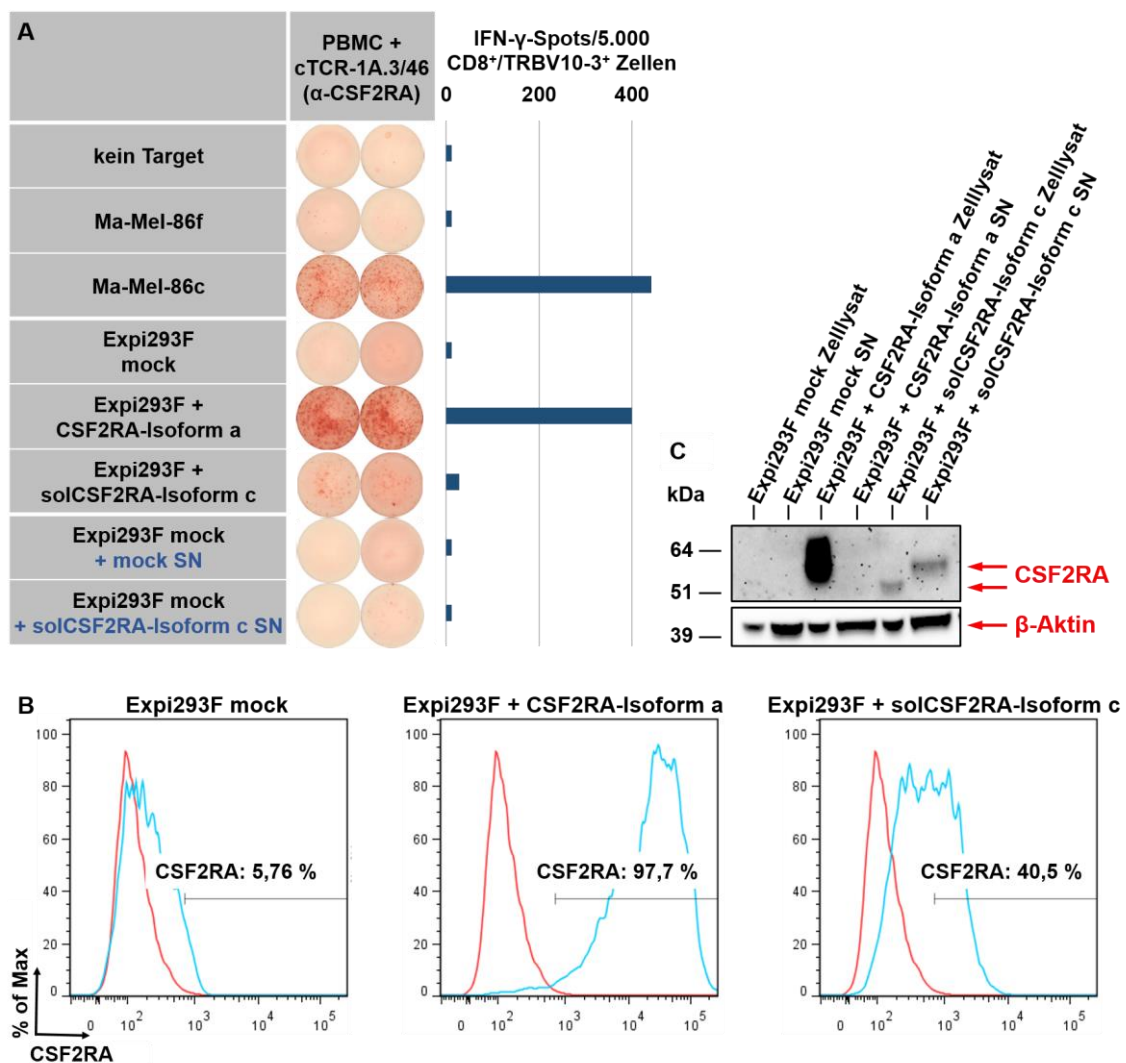


Abb. 3-16: Expression von solCSF2RA-Isoform c in Expi293F-Zellen und Erkennung durch PBMC nach Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay. (A) Die Erkennung von solCSF2RA-Isoform c 24 Stunden nach transienter Transfektion von Expi293F-Zellen mittels *ExpiFectamine*TM durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA; Spender: DY; 71.428 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 7 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d77+6; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) wurde im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay analysiert. Sowohl die transfizierten Zellen (50.000 Zellen/TE) als auch der Überstand (80 µl/TE) der Transfektanten wurde getestet. Die Zelllinie Ma-Mel-86f (CSF2RA⁺; 50.000 Zellen/TE) wurde als Negativkontrolle und die Zelllinie Ma-Mel-86c (CSF2RA⁺; 50.000 Zellen/TE) als Positivkontrolle eingesetzt. **Links:** Originaldaten des ELISpot-Assays, **rechts:** Quantifizierung durch CVIA. **(B)** Die Expression von solCSF2RA wurde durchflusszytometrisch ermittelt (—: IgG-FITC/PE; —: anti-CSF2RA-FITC; Antikörper: anti-CSF2RA; Klon 12B7-17-A) sowie **(C)** im Western Blot bestätigt (aufgetragen wurden je 15 µg Gesamtprotein bzw. 0,5 ml gefällter Überstand; Antikörper: anti-CSF2RA; Klon 12B7-17-A). α: anti; sol: löslich (engl. *soluble*); SN: Überstand (engl. *supernatant*).

Das veränderte Laufverhalten von solCSF2RA-Isoform c im Zellysat ist vermutlich mit einem veränderten Glykosylierungsmuster zu erklären. Die CSF2RA-Isoform a weist elf potentielle N-Glykosylierungsstellen innerhalb der extrazellulären Domäne auf. Da sich solCSF2RA-Isoform c von CSF2RA-Isoform a lediglich hinsichtlich der Transmembrandomäne und im C-terminalen Bereich unterscheidet, sollte auch solCSF2RA-Isoform c über diese elf potentiellen N-Glykosylierungsstellen verfügen (vgl. Abschnitt 5.1.4). Zusätzlich sind für CSF2RA-Isoform a bzw. solCSF2RA-Isoform c auch O-Glykosylierungen oder andere posttranslationale Proteinmodifikationen denkbar. Die Glykosylierungen, bei der zum Teil hochkomplexe Oligosaccharidstrukturen aufgebaut und dem Protein angefügt werden, erfolgt dabei während der Proteinsynthese innerhalb des endoplasmatischen Reticulums bzw. im Golgi-Komplex. Erst nach der vollständigen und korrekten Glykosylierung eines Proteins wird dieses sekretiert. Es ist daher anzunehmen, dass solCSF2RA-Isoform c im Zellysat in noch unvollständig glykosylierter Form vorlag und daher ein geringeres Molekulargewicht aufwies, als die vollständig glykosylierte solCSF2RA-Isoform c im Zellüberstand.

3.3.2 Erkennung des GM-CSF-Rezeptor-Komplexes durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen

Der **GM-CSF-Rezeptor** (GM-CSFR) setzt sich zusammen aus einer α - und einer β -Kette (CSF2RA bzw. CSF2RB). Erst durch Oligomerisierung mit CSF2RB erlangt CSF2RA dabei eine hohe Affinität zum Liganden GM-CSF. Es konnte jedoch weder durch Transkriptom-Sequenzierung noch durch PCR oder durchflusszytometrische Analysen eine Expression von CSF2RB in den durch CSF2RA-reaktive T-Zellen erkannten, CSF2RA⁺ Melanomlinien Ma-Mel-86b und Ma-Mel-86c detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine Inhibierung der Erkennung von CSF2RA durch simultane Expression der GM-CSF-Rezeptor- β -Kette als weitere Hypothese für den HLA-unabhängigen Erkennungsmechanismus war daher naheliegend. Die Erkennung von CSF2RA durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC sowie durch den CSF2RA-reaktiven, TRBV10-3⁺ CTL 1A.3/4 wurde daher in Abhängigkeit der Koexpression von CSF2RB und der Präsenz von GM-CSF im Detail analysiert.

3.3.2.1 Erkennung des GM-CSF-Rezeptors durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen

Von CSF2RB existieren zwei publizierte membranständige Isoformen, von denen sich CSF2RB-Isoform X1 lediglich durch eine Insertion von sechs zusätzlichen Aminosäuren im extrazellulären Bereich von CSF2RB-Isoform 1 unterscheidet (CSF2RB-Isoform 1: NM_000395.2, NP_000386.1; CSF2RB-Isoform X1: XM_005261340.1, XP_005261397.1; Sequenzen siehe Abschnitt 5.1.4). In einem ersten Schritt wurden mittels der Gateway®-Technologie bicistronische Konstrukte hergestellt, kodierend für CSF2RA und CSF2RB-Isoform 1 bzw. CSF2RA und CSF2RB-Isoform X1, jeweils separiert durch das p2A-Element (Sequenz siehe Abschnitt 5.1.3). Die simultane Expression beider GM-CSF-Rezeptor-Ketten wurde durchflusszytometrisch nach transienter Transfektion in 293T-Zellen bestätigt (**Abb. 3-17 A**).

Bezüglich der Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC im IFN- γ -ELISpot-Assay zeigten die bicistronischen Konstrukte keinen signifikanten Unterschied zu lediglich mit CSF2RA-cDNA transient transfizierten 293T-Zellen. 293T-Zellen, die ausschließlich mit CSF2RB-Isoform 1- oder CSF2RB-Isoform X1-cDNA transfiziert wurden, wurden nicht erkannt (**Abb. 3-17 B**).

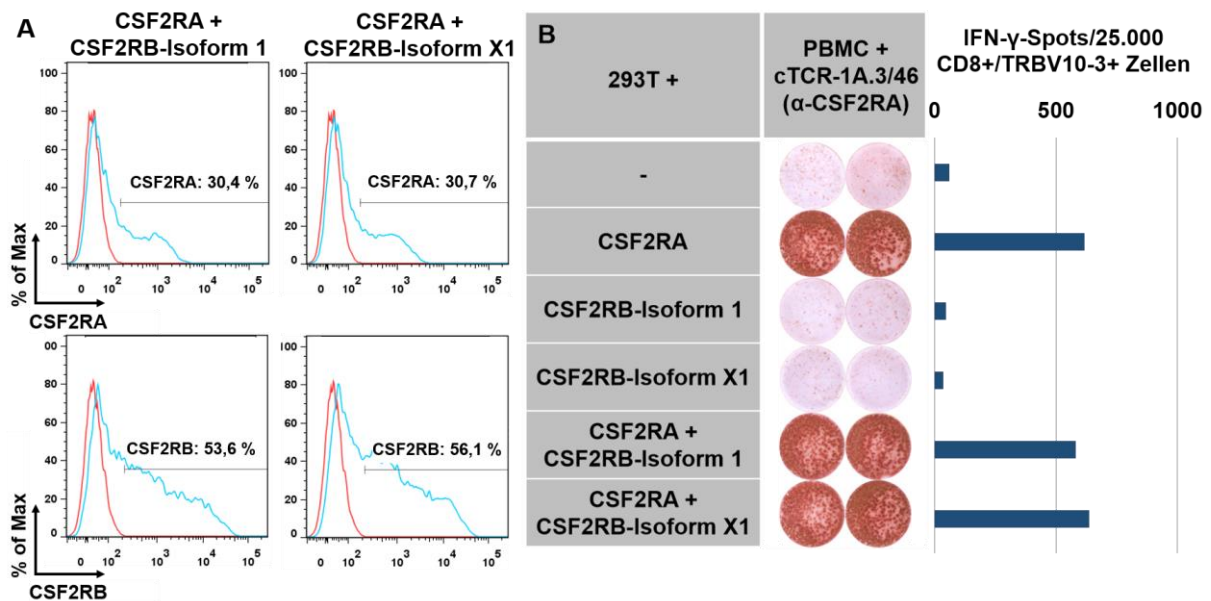


Abb. 3-17: Expression von bicistronischen CSF2RA/CSF2RB-Konstrukten und Erkennung der Transfektanten durch PBMC nach retroviraler Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay. (A) Die Oberflächenexpression von CSF2RA und CSF2RB wurde 24 Stunden nach transien-ter Transfektion von 293T-Zellen mit CSF2RA/CSF2RB-Isoform 1- und CSF2RA/CSF2RB-Isoform X1-cDNA durch *Lipofectamine™ 2000* durchflusszytometrisch analysiert (—: IgG-FITC/PE, —: CSF2RA-FITC bzw. CSF2RB-PE; Antikörper: anti-CSF2RA; Klon 12B7-17-A bzw. anti-human-CD131; Klon 1C1. **(B)** Die Erkennung von CSF2RA in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von CSF2RB nach transien-ter Transfektion von 293T-Zellen mit CSF2RA-, CSF2RB-Isoform 1-, CSF2RB-Isoform X1-, CSF2RA/CSF2RB-Isoform 1- und CSF2RA/CSF2RB-Isoform X1-cDNA mittels *Lipofectamine™ 2000* durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA; BC #1309715; 67.567 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 37 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d49+4; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) wurde im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay analysiert. α: anti.

Links: Originaldaten des ELISpot-Assays, **rechts:** Quantifizierung durch CVIA.

3.3.2.2 Erkennung des GM-CSFR/GM-CSF-Komplexes durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen

Zwar wurde von Woodcock *et al.* eine Liganden-unabhängige Oligomerisierung von CSF2RA und CSF2RB gezeigt²⁴⁷, der für die Zytokinrezeptorfamilie klassische Weg der Assemblierung hoch-affiner GM-CSF-Rezeptorkomplexe erfolgt jedoch erst nach Bindung des Liganden GM-CSF an CSF2RA^{160,161}. Die Erkennung von CSF2RA in Kombination mit CSF2RB und GM-CSF durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA) bzw. den CSF2RA-reaktiven, TRBV10-3⁺ CTL 1A.3/4 wurde daher im Detail analysiert. Dazu wurden 293T-Zellen mit CSF2RA-cDNA oder den bicistronischen Konstrukten (CSF2RA/CSF2RB-Isoform 1 bzw. CSF2RA/CSF2RB-Isoform X1, vgl. Abschnitt 3.1.2.1) transient transfiziert und für 24 Stunden mit GM-CSF (30.000 IU/ml) vorinkubiert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend im Vergleich zu unbehandelten Transfektanten im IFN-γ-ELISpot-Assay auf Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC bzw. CTL 1A.3/4 getestet. Auch während des IFN-γ-ELISpot-Assays wurden die vorbehandelten Zellen erneut mit GM-CSF (30.000 IU/ml) stimuliert. Wie in **Abb. 3-18 A** gezeigt, fiel die Erkennung von 293T-Zellen, die sowohl CSF2RA als auch CSF2RB exprimierten und mit GM-CSF vorinkubiert wurden, deutlich geringer aus als die der unbehandelten GM-CSFR-transfizierten 293T-Zellen (Blockade um ca. 45-75 %). Die Erkennung von 293T-Zellen, die lediglich CSF2RA exprimierten, war nur in wesentlich geringerem Maße durch eine Vorinkubation mit GM-CSF blockierbar. Eine vergleichbare Blockade der CSF2RA-Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC nach Inkubation mit GM-CSF konnte auch für primäre AML-Zellisolate (Blockade

ca. 35-55 %; **Abb. 3-18 B**, vgl. **Abb. 3-14**) und mDC (Blockade ca. 40 %; **Abb. 3-18 C**) bestätigt werden, die *per se* sowohl die α - als auch die β -Kette des GM-CSF-Rezeptors exprimieren sollten.

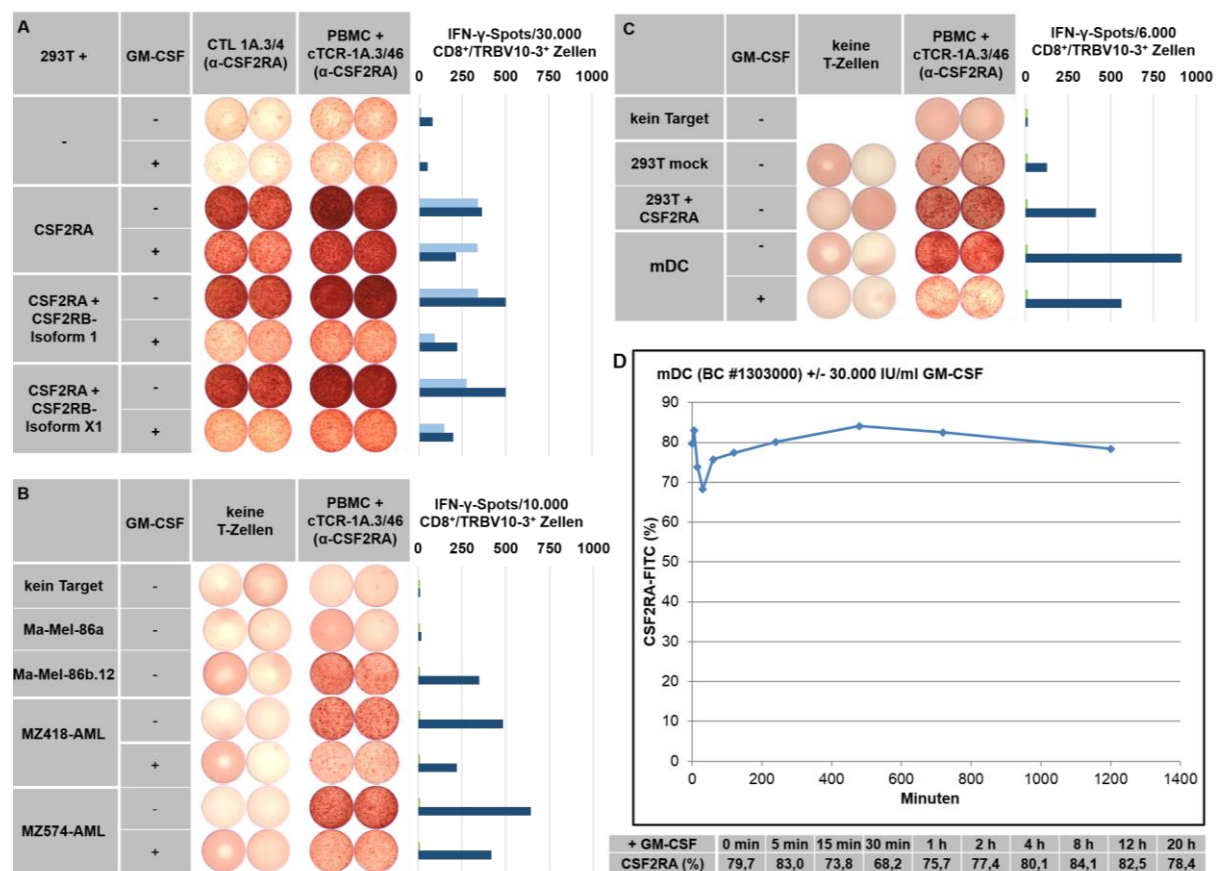


Abb. 3-18: Erkennung von CSF2RA in Kombination mit CSF2RB und GM-CSF durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA) bzw. CTL 1A.3/4 (anti-CSF2RA) im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay. (A) 293T-Zellen wurden transient mittels *Lipofectamine™ 2000* mit CSF2RA-, CSF2RA/CSF2RB-Isoform 1- oder CSF2RA/CSF2RB-Isoform X1-cDNA transfiziert und für 20 Stunden mit 30.000 IU/ml GM-CSF inkubiert. Die Transfektanten (20.000 Zellen/TE + 30.000 IU/ml GM-CSF) wurden anschließend auf die Erkennung durch den CSF2RA-reaktiven, TRBV10-3⁺ CTL 1A.3/4 (30.000 Zellen/TE) bzw. cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA; Spender: DY; 81.081 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 37 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d84+4; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay analysiert. **(B)** Die Erkennung von allogenen, primären AML-Isolaten (50.000 Zellen/TE + 30.000 IU/ml GM-CSF) nach 24 Stunden Inkubation mit GM-CSF (30.000 IU/ml) durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA; Spender HT; 16.666 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 36 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d70+5; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) wurde im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay getestet. **(C)** Die Erkennung allogener mDC (50.000 Zellen/TE + 30.000 IU/ml GM-CSF; Spender: BC #1303000) nach 24 Stunden Inkubation mit GM-CSF (30.000 IU/ml) durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (anti-CSF2RA; Spender HT; 13.888 CD8⁺ Zellen/TE; TCR-Expression: 72 % CD8⁺/TRBV10-3⁺; d49+6; durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) wurde im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay analysiert. **(D)** Der zeitliche Verlauf der CSF2RA-Oberflächenexpression auf mDC während der Inkubation mit GM-CSF (30.000 IU/ml) wurde durchflusszytometrisch ermittelt.

Bei ELISpot-Assays **Links**: Originaldaten des ELISpot-Assays, **rechts**: Quantifizierung durch CVIA.

Kontroll-Zielzellen: Ma-Mel-86a (CSF2RA⁻, 50.000 Zellen/TE) als Negativkontrolle und Ma-Mel-86b.12 (CSF2RA⁺, 50.000 Zellen/TE) als Positivkontrolle für das eingesetzte TCR-Konstrukt.

■: Targetzellen alleine; ■: PBMC + cTCR-1A.3/46; ■: CTL 1A.3/46.

α: anti; AML: akute myeloische Leukämie; GM-CSF: engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*; mDC: reife dendritische Zellen (engl. *mature dendritic cells*); MZ: Mainz.

Die spezifische IFN-γ-Produktion cTCR-2C/417-transgener PBMC (anti-TRP-2) desselben Spenders bzw. von TRP-2-reaktiven CTL, welche als Negativkontrolle mitgeführt wurden, ließ sich durch

Prä-Inkubation mit GM-CSF nicht blockieren (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass die verminderte Erkennung nach GM-CSF-Inkubation auf einer GM-CSF-initiierten Rezeptor-Internalisierung beruht, wurde die CSF2RA-Oberflächenexpression auf mDC für 20 Stunden nach GM-CSF-Gabe durchflusszytometrisch zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (**Abb. 3-18 D**). Ein Minimum der CSF2RA-Oberflächenexpression war 30 min nach GM-CSF-Gabe zu beobachten (ca. 70 % CSF2RA-Oberflächenexpression; entspricht einer Reduktion um ca. 10 %); nach vier Stunden entsprach die CSF2RA-Oberflächenexpression wieder dem Ausgangswert (ca. 80 %).

Zusammenfassung: Die lösliche CSF2RA-Isoform c wurde durch mit dem CSF2RA-reaktiven cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen nicht erkannt. Die membranständige CSF2RA-Isoform a führte auch bei gleichzeitiger Koexpression von CSF2RB zu einer Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC bzw. den CSF2RA-reaktiven, TRBV10-3⁺ CTL 1A.3/4. Die Assemblierung des vollständigen GM-CSF-Rezeptor-Komplexes (CSF2RA + CSF2RB + GM-CSF) jedoch resultierte in einer Blockade der Erkennung CSF2RA⁺ Targetzellen durch CSF2RA-reaktive T-Zellen.

3.3.3 Rolle von CD8 für die HLA-unabhängige Erkennung von CSF2RA und TRP-2

Für eine effektive Aktivierung der meisten T-Lymphozyten wird neben der Bindung zwischen TCR und Peptid:MHC-Komplex auch die Interaktion der Korezeptoren CD4 oder CD8 mit dem MHC-Molekül benötigt. Letztere dient vor allem der Stabilisierung des TCR-MHC-Komplexes und der Rekrutierung der für die Initiation der Signaltransduktion erforderlichen LCK (engl. *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*; vgl. Abschnitt 1.1.2)^{1,248}. Tikhonova *et al.* war es jedoch gelungen, aus MHC- und Korezeptor-defizienten Mäusen (QUAD-KO.Bcl-2Tg) T-Zellen zu isolieren, die beispielsweise das murine CD155 in HLA-unabhängiger Weise erkannten⁴¹. Sie schlussfolgerten, dass die Korezeptoren einem ursprünglich breiteren $\alpha\beta$ -T-Zellrepertoire die MHC-Restriktion während der Thymusselektion sozusagen aufzwingen, indem sie die für eine erfolgreiche Signaltransduktion benötigte LCK dem TCR nur dann zugänglich machen, sofern eine gleichzeitige Interaktion von Korezeptoren und MHC-Molekülen erfolgt²⁴⁹. Es stellte sich daher die Frage, ob bzw. welche Rolle der Korezeptor CD8 für die Aktivierung der HLA-unabhängigen CTL des Melanommodells Ma-Mel-86 spielt.

3.3.3.1 Vergleich der CD8-Sequenzen HLA-abhängiger und HLA-unabhängiger T-Zell-Klone

Um eine Beteiligung von CD8 an der Antigenerkennung HLA-unabhängiger CTL zu evaluieren, war es zunächst nötig, durch Expressions- und Sequenzanalysen aufzuklären, ob HLA-unrestringierte CTL das gleiche CD8 exprimieren wie HLA-abhängige CTL. Die membranständige CD8 α -Variante (CD8 α -Variante 1; NM_001145873.1 bzw. NM_001768.6; NP_001139345.1 bzw. NP_001759.3; Sequenz siehe Abschnitt 5.1.5) des HLA-unabhängigen, CSF2RA-reaktiven, TRBV10-3⁺ CTL 1A.1/506 (TCR-Sequenz identisch zu TCR-1A.3/46) wies dabei keine Unterschiede zur publizierten Sequenz auf. In der CD8 β -Sequenz ließen sich auf einem Allel zwei bekannte, nicht-synonyme Polymorphismen (rs2228022 und rs35555413; **Abb. 3-19 B**) feststellen. Um einen Einfluss der SNP (Einzelnukleotidpolymorphismus, engl. *single nucleotide polymorphism*) auf die Funktionalität des HLA-unabhängigen, CSF2RA-reaktiven CTL-Klons auszuschließen, wurde die Expression sowie Sequenz der drei membranständigen

CD8 β -Varianten (Variante 2: NM_172213.3, NP_757362.1; Variante 3: NM_172101.3, NP_742099.1; Variante 5: NM_004931.4, NP_004922.1; Sequenzen siehe Abschnitt 5.1.5) von fünf HLA-abhängigen CTL-Klonen (mindestens vier verschiedene Spezifitäten und vier unterschiedliche TCR) und fünf HLA-unabhängigen CTL-Klonen (mindestens drei verschiedene Spezifitäten und fünf unterschiedliche TCR) aus dem Melanommodell Ma-Mel-86 sowie fünf HLA-abhängigen CTL-Klonen (mindestens fünf verschiedene Spezifitäten und vier unterschiedliche TCR) aus dem Melanommodell D14-MEL verglichen. Wie exemplarisch für einen HLA-abhängigen und einen HLA-unabhängigen CTL-Klon aus dem Melanommodell Ma-Mel-86 in **Abb. 3-19 A** gezeigt, wurden in allen 15 getesteten CTL-Klonen alle membranständigen CD8 β -Varianten exprimiert. In allen HLA-abhängigen sowie HLA-unabhängigen CTL-Klonen des Melanommodells Ma-Mel-86 waren die beiden Polymorphismen auf einem Allel und somit in allen CD8 β -Varianten zu finden, wohingegen in keinem der CTL-Klone des Melanommodells D14-MEL Unterschiede zur Referenzsequenz festzustellen waren (**Abb. 3-19 C**).

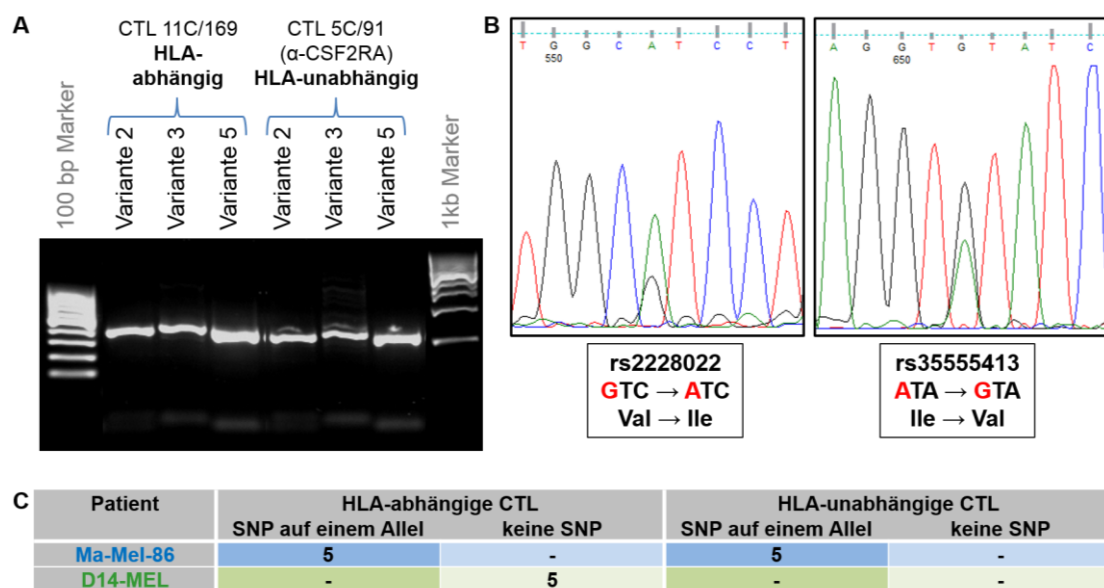


Abb. 3-19: Übersicht über die CD8 β -Expressionsanalysen und Sequenzierungsergebnisse. (A) Zehn CTL-Klone aus dem Melanommodell Ma-Mel-86 und fünf CTL-Klone aus dem Melanommodell D14-MEL wurden auf die Expression der verschiedenen membranständigen CD8 β -Varianten (CD8 β -Variante 2, -Variante 3 und -Variante 5) getestet. Aus den CTL-Klonen wurde dafür RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Template für PCR-Reaktionen mit für die einzelnen CD8 β -Isoformen spezifischen Primern. Gezeigt ist das Expressionsmuster exemplarisch für je einen HLA-restringierten (CTL 11C/169; unbekanntes Antigen) und einen HLA-unrestringierten CTL-Klon (CTL 5C/91, anti-CSF2RA, TRBV10-3⁺). (B) Exemplarisches Chromatogramm der SNP rs2228022 und rs35555413 nach Sequenzierung von CD8 β -Variante 2 aus CTL 5C/91 (anti-CSF2RA). Analog dazu wiesen alle CD8 β -Varianten von allen getesteten HLA-abhängigen sowie HLA-unabhängigen CTL-Klonen des Melanommodells Ma-Mel-86 die gleichen SNP auf. (C) Zusammenfassende Übersicht der CD8 β -Sequenzierungsergebnisse der CTL aus den Melanommodellen Ma-Mel-86 und D14-MEL. α : anti; SNP: Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. *single nucleotide polymorphism*).

3.3.3.2 Auswirkung einer OKT8-Blockade auf die HLA-unabhängige Erkennung von CSF2RA und TRP-2

Neben dem Sequenzabgleich der CD8 α - und CD8 β -Varianten wurden HLA-abhängige und HLA-unabhängige CTL-Klone aus dem Melanommodell Ma-Mel-86 auch bezüglich der Blockade ihrer Reaktivität durch anti-CD8-Antikörper (OKT8) im IFN- γ -ELISpot-Assay verglichen. Der HLA-abhängige CTL 2C/255 (anti-CSPG4) war dabei durch OKT8 vollständig blockierbar. Der HLA-abhängige CTL 5C/119 (anti-Tyrosinase), die HLA-unabhängigen, CSF2RA-reaktiven, TRBV10-3⁺ CTL 5C/91

und -1A.3/46 sowie die beiden HLA-unabhängigen, TRP-2-spezifischen CTL 11C/171 (TRBV27) und -2C/417 (TRBV28) wurden um bis zu ca. 65 % blockiert (**Abb. 3-20 A und B**).

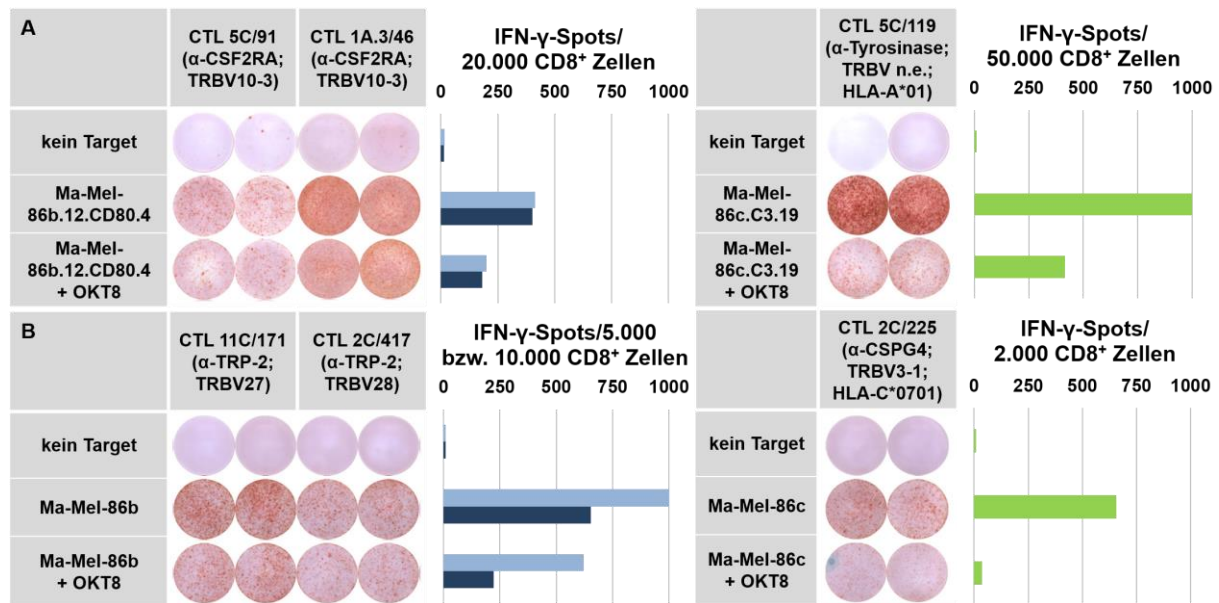


Abb. 3-20: OKT8-Blockade HLA-unabhängiger und HLA-abhängiger CTL im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay. (A) Die OKT8-Blockade der Reaktivität der HLA-unabhängigen, TRBV10-3⁺ CSF2RA-reaktiven CTL 5C/91 (●) und -1A.3/46 (■) (je 20.000 Zellen/TE, OKT3-stimuliert) im Vergleich zum HLA-abhängigen Tyrosinase-reaktiven CTL 5C/119 (■; 5.000 Zellen/TE) gegenüber den Melanomlinien Ma-Mel-86b.12.CD80.4 bzw. Ma-Mel-86c.C3.19 (je 50.000 Zellen/TE) wurden im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay analysiert. (B) Die OKT8-Blockade der Reaktivität der HLA-unabhängigen TRP-2-reaktiven CTL 11C/171 (■; 10.000 Zellen/TE, TRBV27⁺, OKT3-stimuliert) und 2C/417 (■; 5.000 Zellen/TE, TRBV28⁺, OKT3-stimuliert) im Vergleich zum HLA-abhängigen CSPG4-reaktiven CTL 2C/225 (■; 2.000 Zellen/TE, TRBV3-1⁺, OKT3-stimuliert) gegenüber der Melanomlinien Ma-Mel-86b bzw. Ma-Mel-86c (je 50.000 Zellen/TE) wurde im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay untersucht. α: anti; n.e.: nicht ermittelt.

Links: Originaldaten des ELISpot-Assays, **rechts:** Quantifizierung durch CVIA.

3.3.3.3 Funktionalität des CSF2RA-reaktiven und des TRP-2-reaktiven TCR nach Transduktion muriner, CD8-positiver und CD8-negativer Splenozyten

Abschließend wurde die Funktionalität der HLA-unabhängigen T-Zellrezeptoren cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) bzw. cTCR-2C/417 (anti-TRP-2) nach Transduktion muriner C57BL6/J- (BL6) und QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten analysiert. Im Gegensatz zu BL6-Splenozyten exprimieren QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten weder MHC-Klasse I- oder MHC-Klasse II-Moleküle noch die Korezeptoren CD4 und CD8²⁴⁹ und sollten daher ermöglichen, einen Aufschluss über die Korezeptorabhängigkeit HLA-abhängiger und -unabhängiger TCR zu geben.

Zunächst war es dafür nötig, die Expression und Funktionalität der T-Zellrezeptoren cTCR-1A.3/46 bzw. cTCR-2C/417 auf murinen Zellen nach Transduktion wildtypischer (wt) BL6-Splenozyten zu validieren. Wie aus **Abb. 3-21 A** ersichtlich, wurden beide TCR nach retroviraler Transduktion von BL6-Splenozyten exprimiert (cTCR-1A.3/46: 15,1 % Gesamt-TRBV10-3-Expression; cTCR-2C/417: 17,2 % Gesamt-TRBV28-Expression). Von cTCR-2C/417-transgenen BL6-Splenozyten wurde die humane TRP-2⁺ Melanomlinie Ma-Mel-86b.12 im Gegensatz zur humanen TRP-2⁻ Melanomlinie Ma-Mel-86a allenfalls schwach, die murine TRP-2⁺ Melanomlinie B78H1.TRP-2.5 im Vergleich zur murinen TRP-2⁻ Melanomlinie B78H1 jedoch sehr deutlich (ca. das Fünffache des Hintergrunds) im IFN-γ-ELISpot-Assay erkannt. cTCR-1A.3/46-transgene BL6-Splenozyten erkannten die CSF2RA⁺ Melanomlinien

Ma-Mel-86b.12 und B78H1.CSF2RA.15 allenfalls schwach (weniger als das Eineinhalbfache des Hintergrunds) im Vergleich zu den CSF2RA⁺ Melanomzelllinien Ma-Mel-86a und B78H1 (**Abb. 3-21 B**).

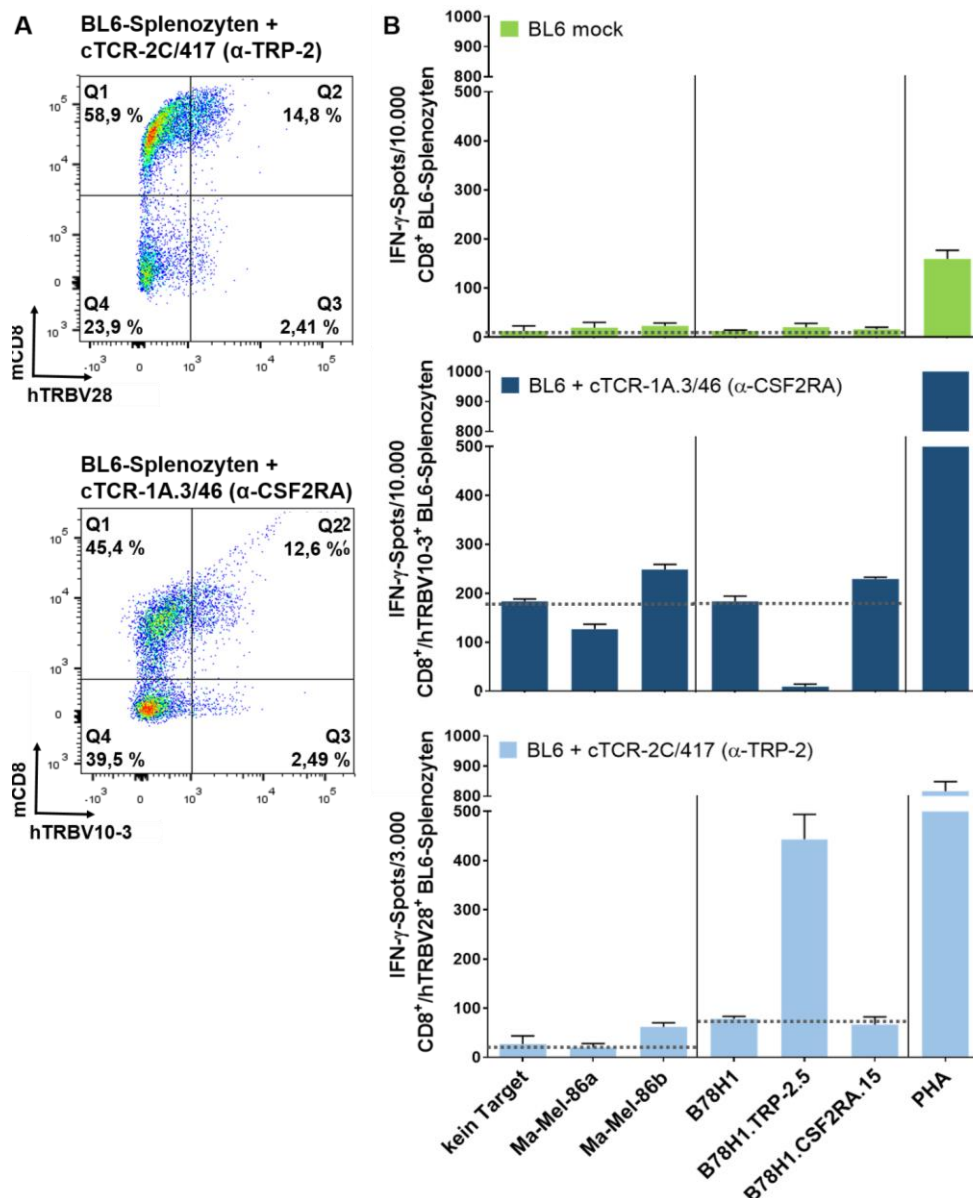


Abb. 3-21: TCR-Expression (A) und Funktionalität muriner BL6-Splenozyten im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay (B) nach retroviraler Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) bzw. cTCR-2C/417 (anti-TRP-2). (A) Die Oberflächenexpression von cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) bzw. cTCR-2C/417 (anti-TRP-2) wurde zwei Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Die Reaktivität von cTCR-1A.3/46-transgenen (anti-CSF2RA; 79.365 Zellen/TE; TCR-Expression: 12,6 % mCD8⁺/hTRBV10-3⁺; d0+5, durchgehend selektioniert mit 0,8 mg/ml G418) und cTCR-2C/417-transgenen BL6-Splenozyten (anti-TRP-2; 20.270 Zellen/TE; TCR-Expression: 14,8 % mCD8⁺/hTRBV28⁺; d0+5) im Vergleich zu mock-transduzierten BL6-Splenozyten (10.000 mCD8⁺ Zellen/TE; d0+5) gegen die angegebenen humanen Melanomlinien und die murine Melanomlinie B78H1 nach stabiler Transfektion mit CSF2RA bzw. TRP-2-cDNA (je 50.000 Zellen/TE) wurde im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay ermittelt.

■: BL6-Splenozyten, mock-transduziert; ■: BL6-Splenozyten + cTCR-1A.3/46; ■: BL6-Splenozyten + cTCR-2C/417.

α: anti; BL6: Mausstamm C57BL6/J wt.

Bevor Splenozyten von QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäusen (**Abb. 3-22 A**; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von [REDACTED]) auf die TCR-Expression und -Funktionalität nach retroviraler Transduktion beurteilt werden konnten, war es zunächst nötig, den zu erwartenden Phänotyp der Splenozyten zu überprüfen. Neben ihrer

Defizienz bezüglich $\beta 2M$, H2-Ab1, CD4 und CD8 α (QUAD-KO) sind QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäuse zusätzlich transgen für humanes *BCL-2* (hBcl-2). Bedingt durch die fehlende Korezeptor-Expression und vermutlich der damit einhergehenden stärkeren TCR-Signaltransduktion wird in einem Großteil der QUAD-KO-Thymozyten Apoptose ausgelöst und eine T-Zellreifung unterbunden²⁴⁹. Der daraus resultierenden Verminderung der $\alpha\beta$ -T-Zellen in QUAD-KO-Lymphknoten um 75 % im Vergleich zu normalen BL6-Mäusen wurde durch Insertion des humanen antiapoptotischen *BCL-2*-Gens in QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäusen entgegengewirkt²⁴⁹. Die Präsenz des humanen *BCL-2*-Gens wurde mittels PCR nachgewiesen (**Abb. 3-22 B**). Die Milzen von hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäusen waren im Vergleich zu hBcl-2⁻ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäusen ca. um das Vierfache vergrößert (**Abb. 3-22 C**). Durchflusszytometrische Analysen von hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten bestätigten die fehlende Expression von CD4, CD8 sowie der für den BL6-Hintergrund charakteristischen MHC-Moleküle H2-K^b und H2-IA^b (**Abb. 3-22 D**). H2-D^b-Moleküle waren in geringen Mengen (< 5 %) auf der Oberfläche zu detektieren, was jedoch in Übereinstimmung mit den bereits publizierten Ergebnissen steht^{249,250}.

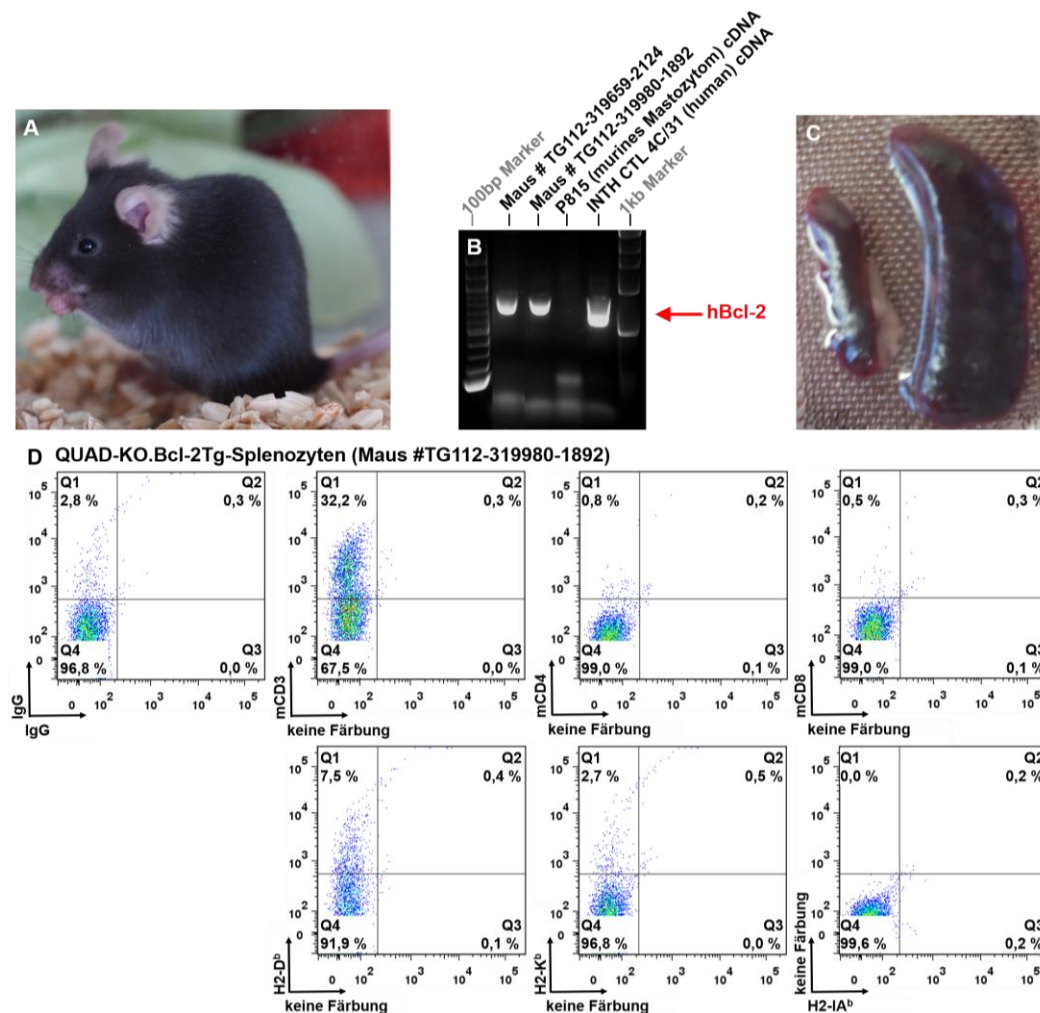


Abb. 3-22: Genotypisierung der QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäuse und Charakterisierung der Splenozyten. (A) QUAD-KO.Bcl-2Tg-Maus (#TG112-319980-1892) (B) Genotypisierungs-PCR von QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäusen auf humanes *BCL-2*. cDNA des murinen Mastrozytoms PB15 wurde als Negativkontrolle, cDNA eines humanen CTL-Klons (4C/31) als Positivkontrolle eingesetzt. (C) Milz einer hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Maus (rechts; #TG112-319980-1892) im Vergleich zur Milz einer hBcl-2⁻ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Maus (links; #STHO-00007). (D) Splenozyten der QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäuse wurden bezüglich der Oberflächenexpression von CD3, CD4, CD8 sowie der murinen MHC-Klasse I- (H2-D^b und H2-K^b) und MHC-Klasse II-Moleküle (H2-IA^b) durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind repräsentativ die Daten von Splenozyten einer hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Maus (#TG112-319980-1892).

hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten waren schlechter retroviral transduzierbar als BL6-Splenozyten. Fünf Tage nach der Transduktion waren nur noch etwa 5 % der Splenozyten vital. Sowohl cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) als auch cTCR-2C/417 (anti-TRP-2) wurden exprimiert, wenn auch die Transduktionseffizienz mit 9,2 % Gesamt-TRBV10-3- bzw. 12,3 % Gesamt-TRBV28-Expression sehr gering ausfiel (**Abb. 3-23 A**).

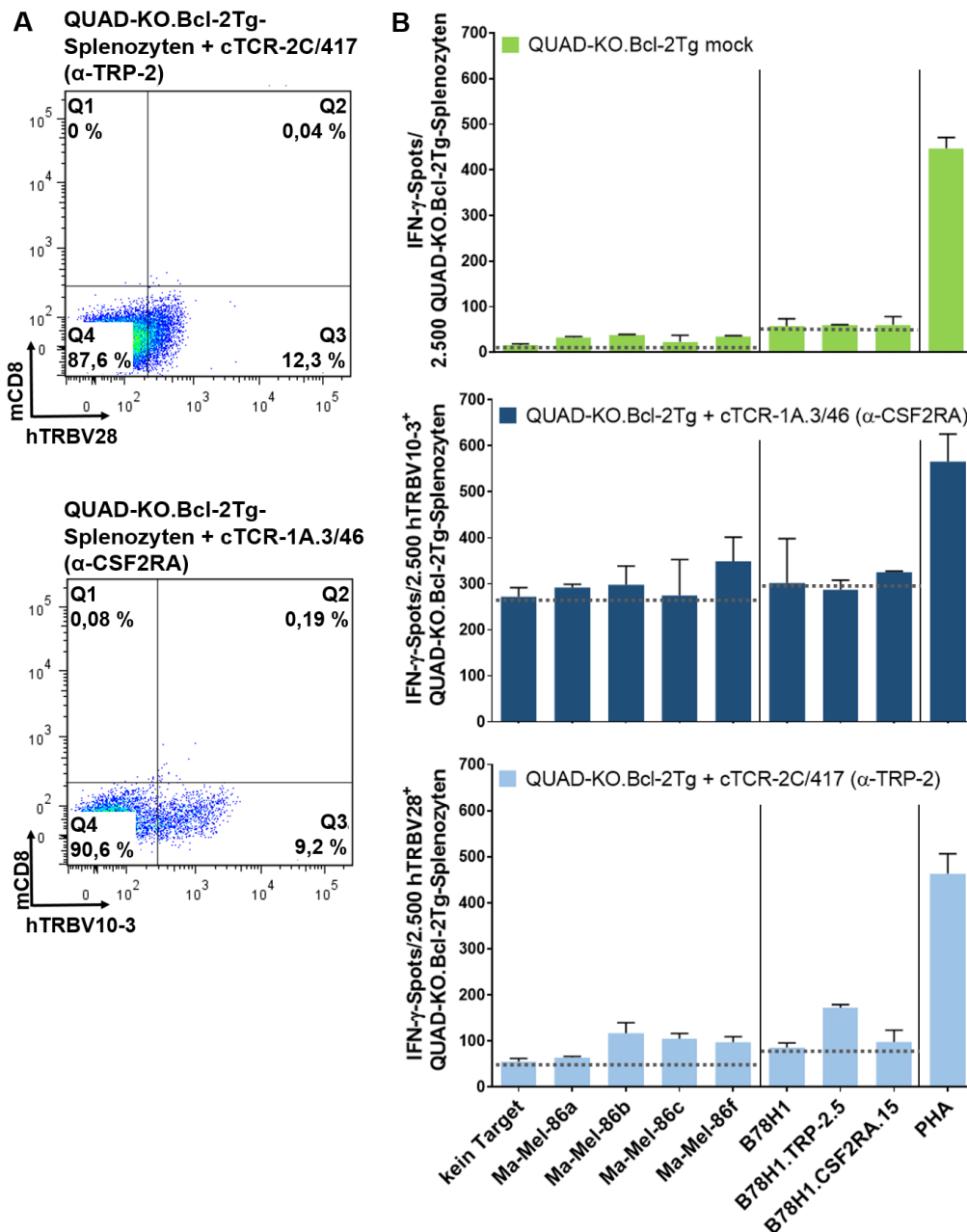


Abb. 3-23: TCR-Expression (A) und Funktionalität muriner QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay (B) nach retroviraler Transduktion mit cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) oder cTCR-2C/417 (anti-TRP-2). (A) Die Oberflächenexpression von cTCR-1A.3/46 (anti-CSF2RA) bzw. cTCR-2C/417 (anti-TRP-2) wurde drei Tage nach Transduktion durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Die Reaktivität von cTCR-1A.3/46-transgenen QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten (anti-CSF2RA; 27.173 Zellen/TE; TCR-Expression: 9,2 % hTRBV10-3⁺; d0+5; durchgehend selektiert mit 0,8 mg/ml G418) und cTCR-2C/417-transgenen QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten (anti-TRP-2; 20.325 Zellen/TE; TCR-Expression: 12,3 % hTRBV28⁺; d0+5) im Vergleich zu mock-transduzierten QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten (2.500 Zellen/TE; TCR-Expression: hTRBV10-3⁺; 0 % hTRBV28⁺; d0+5) gegen die Melanomlinien aus dem Melanommodell Ma-Mel-86 und die murine Melanomlinie B78H1 nach stabiler Transfektion mit CSF2RA- bzw. TRP-2-cDNA (je 50.000 Zellen/TE) wurde im 20h-IFN-γ-ELISpot-Assay ermittelt. α: anti.

■: QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten, mock-transduziert; ■: QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten + cTCR-1A.3/46; ■: QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten + cTCR-2C/417.

Die cTCR-2C/417-transgenen QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten zeigten im IFN- γ -ELISpot-Assay eine Erkennung der murinen TRP-2-positiven Melanomzelllinie B78H1.TRP-2.5 (ca. das Zweifache des Hintergrunds) sowie eine schwache Reaktivität gegenüber den TRP-2-positiven Melanomlinien Ma-Mel-86b.12, -86c und -86f (ca. das Eineinhalb- bis Zweifache des Hintergrunds). CSF2RA-positive Targetzellen wurden von cTCR-1A.3/46-transgenen QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten nicht erkannt. Als Reaktion auf eine unspezifische Stimulation mit **Phytohäm**agglutinin (PHA) waren cTCR-1A.3/46-transgene QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten jedoch in der Lage, vergleichbare Mengen an IFN- γ zu sekretieren wie mock- oder cTCR-2C/417-transduzierte QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten (**Abb. 3-23 B**).

Zusammenfassung: Hinsichtlich Expression und Sequenz von CD8 α und der drei membranständigen Varianten von CD8 β (Varianten 2, 3 und 5) ließen sich für verschiedene HLA-unabhängige CTL (darunter auch zwei CSF2RA-reaktive CTL) des Melanommodells Ma-Mel-86 keinerlei Unterschiede im Vergleich zu verschiedenen HLA-abhängigen CTL des gleichen Melanommodells nachweisen. Durch OKT8 waren die HLA-unabhängigen CSF2RA- und TRP-2-reaktiven CTL ebenso wie der HLA-abhängige, Tyrosinase-reaktive CTL 5C/119 etwa halbmaximal blockierbar. Bei dem HLA-abhängigen, CSPG4-reaktiven CTL 2C/225 führte der anti-CD8-Antikörper zu einer vollständigen Blockade der IFN- γ -Freisetzung. Der TRP-2-reaktive TCR cTCR-2C/417 erkannte auch nach Transduktion Korezeptor- sowie MHC-defizienter, muriner Splenozyten schwach TRP-2⁺ Targetzellen. cTCR-1A.3/46-transgene BL6-Splenozyten erkannten CSF2RA⁺ Targetzellen allenfalls schwach, wohingegen cTCR-1A.3/46-transduzierte hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten keinerlei spezifische Funktionalität gegenüber CSF2RA⁺ Targetzellen aufwiesen. CD8 scheint somit zwar an HLA-unabhängiger Antigenerkennung beteiligt zu sein bzw. diese zu fördern, zumindest für TRP-2 ist jedoch auch in Abwesenheit von CD8 eine HLA-unabhängige Erkennung möglich.

4 Diskussion

Seit der Entdeckung des ersten menschlichen T-zellerkannten, tumorassoziierten Antigens (TAA) MAGE-A1⁸² wurde eine Vielzahl weiterer TAA beschrieben und regelmäßig kommen weitere hinzu. So wurden beispielsweise im Jahr 2013 29 neue TAA in die *Cancer Immunity*-Datenbank aufgenommen, die die strengen Richtlinien für die Anerkennung als valide TAA und damit für eine potentielle therapeutische Anwendung erfüllen²⁵¹. Bisherige Versuche, Patienten mit den aussichtsreichsten dieser Kandidaten-TAA therapeutisch zu vakzinieren, verliefen enttäuschend²⁵². Alle Vakzinierungsversuche zielten auf die Aktivierung „konventioneller“ HLA-restringierter T-Zellen ab. Dies schränkt einerseits das Patientenzielkollektiv auf Patienten mit dem passenden HLA-Typ ein. Andererseits bleibt die Therapie wirkungslos gegen Tumore, die das relevante HLA-Allel, einen HLA-Haplotyp oder die HLA-Expression komplett verloren haben – Alterationen, die zu den häufigsten *Immune Escape*-Mechanismen zählen (vgl. Abschnitt 1.2.2). Abhilfe könnten hier TAA schaffen, die unabhängig von der Präsenz von HLA-Molekülen durch T-Zellen in spezifischer Weise erkannt werden. Zwei solche HLA-unabhängig erkannten TAA, CSF2RA und TRP-2, konnten im Melanommodell der Patientin Ma-Mel-86 identifiziert werden (vgl. Abschnitt 1.3.1)⁴³. Insbesondere CSF2RA ist aufgrund seines breiten Expressionsspektrums in Malignomen unterschiedlichen Ursprungs ein interessantes Kandidatenantigen für tumorimmuntherapeutische Anwendungen (vgl. Abschnitt 1.3.2)⁴³. Da bisher nur wenige TAA dieses Typs bekannt und näher untersucht sind, waren wesentliche Ziele dieser Arbeit, den TCR aus CSF2RA-reaktiven CTL-Klonen zu klonieren, seine Funktionalität zu validieren und gegebenenfalls zu optimieren, den zugrundeliegenden molekularen Erkennungsmechanismus von CSF2RA näher zu charakterisieren und sein immuntherapeutisches Potential für einen TCR-Transfer anhand seines Erkennungsmusters zu analysieren.

4.1 Der TCR des CSF2RA-reaktiven CTL 1A.3/46

Da die wenigen im Vorfeld isolierten CSF2RA-reaktiven CTL-Klone schlecht expandierbar waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst zusätzliche CSF2RA-reaktive CD8⁺ CTL-Klone aus tumorreaktiven MLTC generiert und expandiert, um schließlich eine TCR-Klonierung zu ermöglichen. Aus zwei verschiedenen MLTC, die Reaktivität gegenüber den autologen CSF2RA⁺ Melanomzelllinien Ma-Mel-86b und -86c sowie mit CSF2RA-cDNA transfizierten 293T-Zellen aufwiesen, konnten insgesamt 25 CTL-Klone generiert werden, die gegen CSF2RA gerichtet waren (vgl. **Tabelle 3-1**). Diese erkannten im IFN- γ -ELISpot-Assay spezieübergreifend sowohl den autologen CSF2RA⁺ Melanomzellklon Ma-Mel-86b.12 als auch den murinen Melanomzellklon B78H1.CSF2RA.15, der mit CSF2RA-cDNA stabil transfiziert worden war (vgl. **Abb. 3-1 A**). Beide Melanomlinien waren MHC-Klasse I-defizient, wodurch die HLA-unabhängige Erkennung von CSF2RA durch CTL bestätigt wurde. Alle CTL-Klone exprimierten laut Durchflusszytometrie die TCR-V β -Kette TRBV10-3 (vgl. **Abb. 3-1 B**) ebenso wie die im Rahmen der Dissertation von [REDACTED] (geborene [REDACTED]) generierten CSF2RA-reaktiven CTL⁴³. Sie exprimierten keine $\gamma\delta$ -TCR, für die ebenfalls eine HLA-unabhängige Erkennung charakteristisch ist¹. Außerdem exprimierten die CSF2RA-reaktiven CTL nicht die NK-Zellmarker CD16, CD56 und NKG2D (engl. *Natural killer group 2, member D*), weshalb nicht von einem NK-Zell-ähnlichen Erkennungsmechanismus auszugehen war (Daten nicht gezeigt)¹. Die Erkennung war zudem mit anti-CD3-Antikörpern blockierbar. Dies deutete auf eine TCR-vermittelte Erkennung hin (Daten nicht gezeigt).

Der CSF2RA-reaktive CTL 1A.3/46 zeichnete sich von allen im Rahmen dieser Arbeit generierten CTL-Klonen durch besonders schnelles Wachstum und starke, spezifische Reaktivität im IFN- γ -ELISpot-Assay aus und wurde daher für die TCR-Klonierung ausgewählt (vgl. Abschnitt 3-1). Die Klonierung des TCR erfolgte analog zu Birkholz *et al.*²³⁸. Sequenzierungen ergaben die in **Abb. 3-3 A** gelisteten V-, D-, J- und C-Regionen und *complementarity determining regions* (CDR).

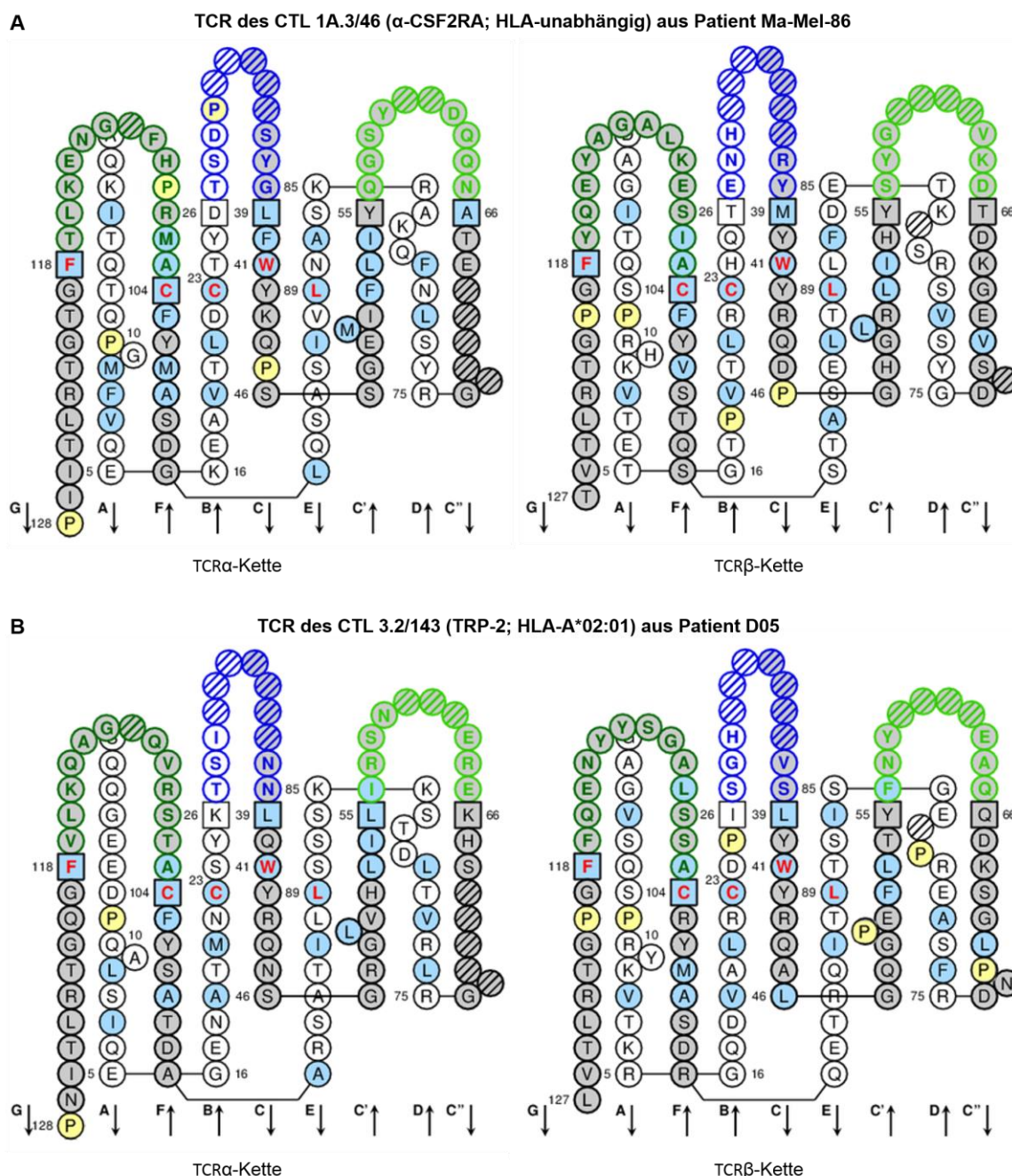


Abb. 4-1: Vergleichende IMGT/Collier de Perles-Darstellung der V-Domänen des (A) TCR von CTL 1A.3/46 (gegen CSF2RA, HLA-unabhängig, Patientin Ma-Mel-86) und des (B) TCR von CTL 3.2/143 (gegen TRP-2, restringiert durch HLA-A*02:01, Patient D05). ■: hydrophobe Aminosäuren bzw. Tryptophane, die an dieser Position in mindestens 50 % aller analysierten TCR-Ketten auftreten, ■: Prolin, —: CDR1, —: CDR2, —: CDR3, Aminosäuren in roter, fetter Schrift kennzeichnen die fünf konservierten Positionen einer V-Domäne: das erste, konservierte Cystein (23C), das konservierte Tryptophan (41W), das hydrophobe Leucin (89L), das zweite, konservierte Cystein (104C) und das konservierte Phenylalanin (118F). Quadratisch umrandete Aminosäuren stellen die Ankerpositionen dar, die die CDR abgrenzen. Schraffierte Positionen entsprechen nach der IMGT-Nummerierung Lücken²⁵³. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die β -Faltblattstränge und ihre jeweilige Richtung. (Die verwendete Nummerierung richtet sich nach dem IMGT-System^{239,253,254}; IMGT: <http://www.imgt.org>)

Im Vergleich zu TCR von klassischen, HLA-abhängigen CTL des gleichen Melanommodells⁴³ bzw. zu in der IMGT-Datenbank publizierten TCR-Sequenzen ließen sich dabei keinerlei Besonderheiten, wie beispielsweise hinsichtlich der Länge der CDR oder bezüglich der fünf konservierten Aminosäuren einer V-Domäne (23C, 41W, 89L, 104C, 118F) feststellen. Eine Veranschaulichung der räumlichen Struktur der V-Domäne der beiden TCR-Ketten des TCR-1A.3/46 und ihrer CDR im Vergleich zu einem konventionellen, HLA-restringierten CTL (CTL 3.2/143 aus Patient D05; anti-TRP-2; restringiert durch HLA-A*02:01) bietet die zweidimensionale „Perlenketten“-Darstellung (*Collier de Perles*, **Abb. 4.1**)²⁵⁵.

In der Literatur werden zwei grundlegende Mechanismen kontrovers diskutiert, die die MHC-Restriktion der T-Zellen zu erklären versuchen^{256,257}. Die erste Theorie (Keimbahnmodell) besagt, dass aufgrund der Koevolution von TCR und MHC-Molekülen keimbahnkodierte Aminosäuren in den variablen Domänen der TCR diese HLA-Abhängigkeit aufzwingen. Diese Sicht wird durch Kristallstrukturanalysen, Sequenzvergleich und Mutagenese-Experimente untermauert^{258–261}. Dadurch bedingt wurden in den variablen Domänen der TCR Aminosäuren konserviert, die in der Lage sind, an MHC-Moleküle zu binden, wohingegen Aminosäuren, die nicht dazu befähigt sind, eliminiert wurden. Der HLA-unabhängige TCR-1A.3/46 weist sowohl in seiner β -Kette (Y29, Y46, Y48, D54, Nummerierung nach Arden *et al.*²⁴⁰) als auch in seiner α -Kette (S51, Nummerierung nach Arden *et al.*²⁴⁰) Aminosäuren auf, die mit einer MHC-Bindung in Verbindung gebracht werden (vgl. Abschnitt 5.1.1 und Abschnitt 5.1.2)^{259,261,262}. Die entsprechenden Aminosäuren (Y46, Y48, E54, Nummerierung nach Arden *et al.*²⁴⁰) der CDR2 β konnten jedoch auch in einem murinen, HLA-unabhängigen TCR (A11) gefunden werden, der das murine CD155 in Abhängigkeit von Konformation und Glykosylierung erkennt⁴¹. Durch Mutagenese der entsprechenden Aminosäuren wurde für diesen TCR sogar gezeigt, dass die konservierten Aminosäuren auch für eine HLA-unabhängige Ligandenerkennung unerlässlich sind.

Die zweite Hypothese entspricht einem Selektionsmodell und besagt, dass MHC-Abhängigkeit einem ursprünglich breiteren TCR-Spektrum während der Thymusselektion durch die Korezeptoren CD4 und CD8 aufgezwungen wird²⁴⁹. Dies ist damit zu erklären, dass für eine erfolgreiche Initiierung der TCR-Signalkaskade die src-Kinase LCK benötigt wird, welche mit dem intrazellulären Teil der Korezeptoren assoziiert ist (vgl. Abschnitt 1.1.2). Somit steht LCK dem TCR nur zur Verfügung bzw. befindet sich in dessen unmittelbarer Nähe, wenn neben der Interaktion des TCR mit seinem Antigen auch eine Bindung der Korezeptoren an die MHC-Moleküle erfolgt^{41,249,256,263–265}. Da einschließlich des CTL 1A.3/46 alle HLA-unabhängigen, CSF2RA-reaktiven CTL-Klone in durchflusszytometrischen Versuchen CD8 exprimierten (Daten nicht gezeigt), waren hierzu detailliertere Analysen nötig, auf die unter Abschnitt 4.3.3 ausführlicher eingegangen wird.

Beim Sequenzvergleich des TCR-1A.3/46 mit anderen publizierten HLA-unabhängigen TCR fiel auf, dass seine TRAV-Region (TRAV14/DV4*01) der gleichen Subgruppe angehört wie die TRAV-Region des TCR HC/2G-1 (TRAV14/DV4*02), der von CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird und HLA-unabhängig lösliches TRAIL (solTRAIL) erkennt (vgl. Abschnitt 1.1.3)²⁶⁶. Die beiden Allele unterscheiden sich lediglich in je einer Aminosäure innerhalb von CDR1 bzw. CDR2. Aus 34 funktionalen TRAV-Subgruppen weisen die Gene der Subgruppe TRAV14/DV4 neben Genen aus vier weiteren Subgruppen (TRAV23/DV6, TRAV29/DV5, TRAV36/DV7, TRAV38-2/DV8) die Besonderheit auf, dass sie sowohl mit TRAJ-Segmenten als auch mit TRDD-Segmenten rekombinieren und daher TCR α -Ketten oder TCR δ -Ketten bilden können²³⁹. So wurden beispielsweise aus einem nach Knochenmarktransplantation anhaltend immundefizienten CML-Patienten CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺

$\gamma:\delta$ -T-Zellen isoliert, deren TCR δ -Kette die Region TRAV14/DV4 beinhaltet^{267,268}. Möglicherweise könnten TRAV14/DV4⁺ TCR somit eine intrinsische Tendenz haben, Liganden nicht nur als Teil von $\gamma:\delta$ -sondern auch von $\alpha:\beta$ -T-Zellrezeptoren unabhängig von MHC-Molekülen zu erkennen. Invariante TCR-Repertoires wurden für verschiedene, nicht HLA-restringierte Zellsubpopulationen, wie beispielsweise V α 24-J α 18⁺ NKT-Zellen^{12,269}, V α 7.2-J α 33⁺ MAITs (engl. *mucosal-associated invariant T cells*)²⁷⁰ oder die murinen V γ 5-V δ 1⁺ DETCs²⁷¹ (engl. *dendritic epidermal $\gamma:\delta$ -T cells*) nachgewiesen. Eventuell könnte die TCR-Region TRAV14/DV4 somit als „Marker“ dienen, gezielt nach weiteren HLA-unabhängigen TCR zu suchen.

Beide Ketten des TCR-1A.3/46 wurden als bicistronisches Konstrukt, separiert durch das p2A-Element, in den retroviralen Vektor pBullet_IRES_neo kloniert (vgl. **Abb. 3-3 B**). Transduziert in Empfänger-T-Zellen sorgt das nur 22 Aminosäuren lange p2A-Element im Vergleich zur sehr viel längeren *internal ribosomal entry site* (IRES), für ein äquimolares Expressionsverhältnis beider TCR-Ketten. Dies beruht darauf, dass bei der Translation des p2A-Elements im Gegensatz zur IRES kein zweites Ribosom rekrutiert wird, um das zweite Protein zu synthetisieren. Es wird ein durchgehender Polypeptidstrang erstellt, bei dem lediglich die Ausbildung einer bestimmten Peptidbindung durch *ribosome skipping* ausgespart wird²⁷². Und tatsächlich wurden die Vorteile des 2A-Elements gegenüber der Verwendung von IRES-Sequenzen für einen TCR-Transfer hinsichtlich Expression und Funktionalität gezeigt²⁷³. Das p2A-Element wurde gegenüber anderen 2A-Elementen wie dem des Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV, engl. *food-and-mouth disease virus*), des equinen Rhinitis A Virus (ERAV) oder dem *Thosea asigna* Virus 2A (T2A) bevorzugt, da laut Kim *et al.* p2A in humanen Zelllinien die höchste Spaltungseffizienz aufweist²⁷⁴. Der retrovirale Expressionsvektor pBullet_IRES_neo bietet insbesondere den Vorteil, dass sich aufgrund seines Neomycinresistenzgens TCR-transgene Zellen selektionieren und somit gezielt anreichern lassen. Der Vektor hat sich bereits für den retroviralen Transfer verschiedener TCR als geeignetes Vehikel erwiesen^{275,276}. Zusätzlich wurde der TCR-1A.3/46 durch Austausch der humanen konstanten Domänen beider TCR-Ketten mit ihren murinen, Codon-optimierten homologen Gegenstücken chimärisiert (cTCR-1A.3/46, vgl. **Abb. 3-4**). Mit den dafür verwendeten konstanten murinen Domänen war es Voss *et al.* bereits möglich, die Funktionalität eines gp100-scTCR (Einzelketten-TCR, engl. *single chain TCR*) erheblich zu verbessern²⁷⁷.

Die Exprimierbarkeit sowohl der TCR α - als auch der TCR β -Kette beider Konstrukte (TCR-1A.3/46 und cTCR-1A.3/46) wurde nach retroviraler Transduktion/Transfektion der T-Zellleukämielinie Jurkat-76 bestätigt (vgl. **Abb. 3-5 A und B**). Diese weist eine Defizienz der endogenen TCR α - und TCR β -Ketten auf, wodurch eine Fehlpaarung exogener und endogener TCR-Ketten ausgeschlossen werden kann, und der CD3-TCR Komplex lediglich an die Zelloberfläche gelangt, sofern ein exogener TCR, bestehend aus zwei exprimierbaren Ketten, eingebracht wird²⁰⁸. Nach Transduktion humaner PBMC zeigte sich in der Durchflusszytometrie, dass beide TCR-Konstrukte sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ Zellen exprimiert werden (vgl. **Abb. 3-5 C**). Wie erwartet und schon für verschiedene andere TCR gezeigt^{244,278,279}, führte die Transduktion von PBMC mit cTCR-1A.3/46 zu höherer TCR-Expression als mit TCR-1A.3/46 (vgl. **Abb. 3-5 C**). Die höheren Expressionsraten sind dabei zum Teil mit der für die murinen konstanten TCR-Domänen durchgeführten Codon-Optimierung zu erklären. Die Codon-Optimierung basiert auf dem Phänomen der „*Codon Usage*“, die eine artspezifische, präferierte Verwendung von bestimmten, synonymen Basentriplets postuliert, welche mit der jeweiligen tRNA-Konzentration innerhalb der Zelle korreliert und somit einen direkten Einfluss auf die Translationsrate

hat. Durch gezielte Veränderung der synonymen Codons kann auf diese Art und Weise die Expressionsrate im entsprechenden Organismus erhöht werden²⁸⁰. Durch zusätzlich eingefügte Cysteinreste innerhalb der murinen konstanten Domänen und der damit ermöglichten Ausbildung einer weiteren Disulfidbrücke wurde die Paarungsstabilität beider TCR-Ketten weiter erhöht^{243,244}. Eine Murinisierung unterbindet zudem weitestgehend die Fehlpaarung exogener und endogener TCR-Ketten, da murine TRAC-Domänen präferentiell mit murinen TRBC-Domänen dimerisieren^{244,278,279,281,282}. Damit einhergehend wurde nach vollständiger oder teilweiser Murinisierung eine erhöhte Avidität bzw. Funktionalität der TCR beobachtet. Dies ist wahrscheinlich dadurch begründet, dass die chimärisierten TCR besser dazu in der Lage sind, mit den endogenen TCR um den für die Oberflächenexpression und Signaltransduktion elementaren CD3-Komplex zu konkurrieren²⁷⁹. Eine erkennbar verbesserte Funktionalität im IFN- γ -ELISpot-Assay konnte auch für den cTCR-1A.3/46 im Vergleich zum TCR-1A.3/46 gezeigt werden (vgl. **Abb. 3-10**). Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass bei gleicher Anzahl eingesetzter TRBV10-3⁺ T-Zellen cTCR-1A.3/46-transgene T-Zellen aufgrund verminderter Fehlpaarungen mit endogenen TCR-Ketten mehr funktionale TCR-Dimere exprimierten als TCR-1A.3/46-transgene T-Zellen, woraus eine verstärkte Erkennung CSF2RA⁺ Targetzellen resultiert. Auch war der Anteil IFN- γ -produzierender Zellen von cTCR-1A.3/46-transgenen PBMC, verglichen mit dem CSF2RA-reaktiven CTL vergleichbar bis leicht erhöht (vgl. **Abb. 3-10**), weshalb davon auszugehen ist, dass der optimierte cTCR-1A.3/46 nicht nur bezüglich seines Erkennungsmusters sondern auch hinsichtlich Affinität und Avidität dem parentalen TCR des CTL entspricht bzw. diesen möglicherweise sogar übertrifft.

Auch verbleibt, im Gegensatz zum TCR-1A.3/46 und zum cTCR-1A.3/46+attB, bei dem cTCR-1A.3/46 im Vergleich zum parentalen TCR des CTL 1A.3/46 anstelle der neun aus den Gateway®-Rekombinationssequenzen resultierenden Aminosäuren lediglich das aus der Spaltung des p2A-Elements resultierende Prolin am N-terminalen Ende der TCR β -Kette (vgl. **Abb. 3-3 B** und **Abb. 3-4 C**). Das Risiko eines veränderten Erkennungsmusters bzw. einer verminderten Affinität/Avidität zum Zielantigen aufgrund der überschüssigen Aminosäuren im variablen TCR-Bereich des cTCR-1A.3/46 ist daher minimal. Ein negativer Einfluss der am C-Terminus der TCR α -Kette verbleibenden Aminosäuren des p2A-Peptids (vgl. **Abb. 3-3 B** und **Abb. 3-4 C**) auf die Funktionalität verschiedener TCR konnte bisher nicht festgestellt werden^{283,284}. Aus diesen Gründen stellt der funktionale cTCR-1A.3/46 für eine potentielle klinische Anwendung das vielversprechendste der drei verschiedenen TCR-Konstrukte dar.

4.2 Spezifität und zytolytisches Potential des CSF2RA-reaktiven cTCR-1A.3/46

Zur Analyse der Funktionalität und Spezifität des CSF2RA-reaktiven cTCR-1A.3/46 diente nicht nur der IFN- γ -ELISpot-Assay, sondern auch die Testung seines zytolytischen Potentials gegenüber CSF2RA⁺ Targetzellen sowohl direkt im Chromfreisetzungstest als auch indirekt, aber dafür auf Einzelzellniveau, im Degranulations-Assay.

cTCR-1A.3/46-transgene PBMC waren nicht nur dazu in der Lage, im Chromfreisetzungstest die CSF2RA⁺ Melanomlinien des Melanommodells Ma-Mel-86 selektiv zu lysieren (vgl. Abschnitt 3.2.4.2.2), sondern degranulierten auch in spezifischer Weise nach einer Stimulation mit den CSF2RA⁺ Melanomlinien des Melanommodells Ma-Mel-86 bzw. mit 293T-Zellen nach Transfektion mit CSF2RA (vgl. Abschnitt 3.2.4.2.3). Die HLA-Unabhängigkeit cTCR-1A.3/46-transgener PBMC wurde durch die Erkennung CSF2RA⁺ und HLA⁻ Targetzellen, CSF2RA⁺ Targetzellen verschiedener Spezies sowie die Erkennung CSF2RA⁺ Zellen in Anwesenheit blockierender anti-HLA-Antikörper im IFN- γ -ELISpot-Assay verifiziert (vgl. Abschnitt 3.2.4.2.1).

Darüber hinaus erkannte der cTCR-1A.3/46 im IFN- γ -ELISpot-Assay nicht nur die CSF2RA⁺ Melanomlinien des Modells Ma-Mel-86, sondern auch ein breites Spektrum von chronischen und akuten myeloischen Leukämiezelllinien unterschiedlicher Subtypen, welche sowohl nach durchflusszytometrischen Analysen als auch auf mRNA-Ebene CSF2RA exprimierten (vgl. Abschnitt 3.2.5.2). Die akute Myelomonozytenleukämie-Zelllinie MUTZ-3 (FAB M4) wurde dabei sowohl in ihrer monozytären Form erkannt als auch nach *In vitro*-Differenzierung zu imDC und mDC (vgl. **Abb. 3-13**). Für hämatopoetische Malignome myeloiden Ursprungs, bei denen der GM-CSF-Rezeptor zu einer Proliferation der entsprechenden Zellen führt, ist CSF2RA- bzw. GM-CSF-Rezeptor-Expression bekannt^{183,285–288}. Myeloide Malignome stellen daher vielversprechende Targets für eine potentielle klinische Anwendung des cTCR-1A.3/46 dar. So konnten Graf *et al.* zeigen, dass vor allem AML-Zellen vom FAB-Subtyp M4 und M5 signifikant höhere GM-CSF-Rezeptor-Expressionslevels aufweisen²⁸⁵, was sich mit dem Erkennungsmuster cTCR-1A.3/46-transgener T-Zellen deckt. Alle getesteten Leukämiezelllinien vom FAB-Subtyp M4 und M5 exprimierten auch nach eigenen Analysen CSF2RA und wurden durch cTCR-1A.3/46-transgene T-Zellen erkannt (vgl. **Abb. 3-12**).

AML-Zelllinien vom FAB-Subtyp M2 (akute myeloblastische Leukämie mit Ausreifung), M6 (Erythroleukämie) und M7 (Megakaryoblastenleukämie) wurden nicht erkannt (vgl. **Abb. 3-12**). Da jedoch für die entsprechenden im Labor vorhandenen, getesteten Linien (HL-60, HEL, M-07e) weder durchflusszytometrisch noch mittels RT-PCR eine Expression der α -Kette des GM-CSF-Rezeptors nachgewiesen werden konnte, war eine Erkennung durch CSF2RA-reaktive CTL nicht zu erwarten. Die Megakaryozytenleukämiezelllinie M-07e ist zwar ursprünglich auf einen breit gefächerten Zytokin-Cocktail, der auch GM-CSF enthält²¹³, angewiesen, was auf eine CSF2RA-Expression hinweist. Ein Überwachsen der Zytokin-unabhängigen Zellen kann jedoch innerhalb weniger Wochen auch ein Wachstum ohne Zytokinsupplementierung ermöglichen (Quelle: DSMZ; [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-104.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-104.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192); abgerufen am 19.01.2015). Auch für die Leukämiezelllinie HL-60 ist in der Literatur eine deutliche Expression von CSF2RA sowie die Abhängigkeit von GM-CSF beschrieben. Es ist jedoch anzunehmen, dass auch bei dieser Zelllinie im Laufe der Langzeitkultur im Labor die GM-CSF-unabhängigen Klone selektioniert wurden oder die Zellen durch Akkumulation von zusätzlichen Mutationen ihr Genexpressionsprofil verändert haben bzw. eine CSF2RA-Expression erst durch anderweitige Stimuli

erneut initiiert werden muss. So ist beispielsweise beschrieben, dass durch DMSO-Inkubation bei HL-60-Zellen eine Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten möglich ist²⁰⁵, wodurch die GM-CSF-Rezeptor-Expression um das bis zu 20-fache heraufreguliert wird²⁸⁹ und dass erst DMSO-induzierte HL-60-Zellen neben primären neutrophilen Granulozyten die höchste GM-CSF-Rezeptor-Dichte von 500 bis 800 GM-CSF-Bindestellen pro Zelle auf ihrer Oberfläche aufweisen²⁹⁰.

Für wenige maligne Lymphome bzw. deren Vorläuferzellen ist CSF2RA-Expression in der Literatur beschrieben^{183,291}. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur eine einzige ALL-Zelllinie (RS4;11) getestet werden. In eigenen Analysen wurde jedoch keine CSF2RA-Expression der Zelllinie festgestellt. In Übereinstimmung dazu wurden RS4;11-Zellen nicht durch TCR-transgene T-Zellen erkannt (vgl. **Abb. 3-12**).

In Übereinstimmung mit den Resultaten zur Erkennung von stabilen Leukämiezelllinien erkannten cTCR-1A.3/46-transgene PBMC zudem alle getesteten, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinlevel CSF2RA⁺, primären AML- (FAB M4 und M5) und CML-Zellisolate (vgl. Abschnitt 3.2.5.3 und Abschnitt 3.2.5.4). Für eine Vielzahl solider Malignome, wie beispielsweise Melanome sowie Prostata-, Lungen-, Kolon-, Kopf-Hals-, Nieren-, Magen- und Ovarialkarzinomzelllinien wurde eine CSF2RA- bzw. GM-CSF-Rezeptor-Expression beschrieben^{166,185–190}. Dazu passend wurde eine Erkennung von Pankreas-, Lungen-, Ovarial- und Gallenblasenkarzinomlinien durch CSF2RA-reaktive CTL bereits in vorhergehenden Versuchen gezeigt⁴³. Es ist daher anzunehmen, dass auch diese Zellen von cTCR-1A.3/46-transduzierten PBMC erkannt und zerstört werden können.

Auch normale CSF2RA⁺ hämatopoetische Zellen der myeloiden Reihe (Granulozyten, Monozyten, primäre imDC und mDC) wurden durch cTCR-1A.3/46 erkannt, nicht aber normale hämatopoetische Zellen der lymphatischen Reihe (z.B. CD19⁺ Zellen), für die bisher auch keine CSF2RA-Expression bekannt ist (vgl. **Abb. 3-11 A, B und C**). Auch für andere lymphatische Zellen, wie T- oder NK-Zellen ist in der Literatur keine Expression des GM-CSF-Rezeptors oder seiner Komponenten beschrieben, weshalb sich vermuten lässt, dass auch diese Zellen einer Zerstörung durch cTCR-1A.3/46-transgene T-Zellen entgehen würden.

CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen wurden von cTCR-1A.3/46-transgenen PBMC nicht erkannt (vgl. **Abb. 3-11 D**). Dies steht in Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Daten, die besagen, dass ein Großteil Linienmarker-negativer CD34⁺ und CD34⁺ CD38⁻ hämatopoetischer Stammzellen kein CSF2RA exprimiert, sondern den Rezeptor erst im Laufe der Differenzierung hochreguliert^{183,292,293}.

4.3 Analyse des Erkennungsmechanismus von CSF2RA durch cTCR-1A.3/46

4.3.1 Keine HLA-unabhängige Erkennung von löslichem CSF2RA

In einem zweiten Teil dieser Arbeit lag das Interesse darin, den der HLA-unabhängigen Erkennung von CSF2RA zugrundeliegenden Mechanismus ausführlicher zu analysieren. Ein besseres Verständnis dessen würde eventuell eine gezielte Suche nach weiteren HLA-unabhängigen Antigenen erleichtern. Hanada *et al.* beschrieben 2011 die HLA-unabhängige Erkennung von TRAIL nach proteolytischer Solubilisierung und Bindung an DR4 durch CD4⁺ T-Zellen (vgl. Abschnitt 1.1.3)⁴⁰. Ein analoger Mechanismus wäre auch für CSF2RA denkbar. So existieren von CSF2RA verschiedene, auf alternativem Spleißen basierende, lösliche Isoformen (vgl. Abschnitt 3.3.1), deren Expression in einer Vielzahl von Zelltypen, wie beispielsweise myeloiden Leukämiezellen, Monozyten, Makrophagen, synovialen Fibroblasten und Plazentagewebe nachgewiesen wurde^{289,294–296}. Darüber hinaus wurde für CSF2RA das sogenannte *ectodomain shedding* beschrieben, wobei durch proteolytische Spaltung die extrazelluläre Domäne des Rezeptors von der Membran freigesetzt wird^{297,298}. Wie für andere Zytokinrezeptoren, wie beispielsweise den IL-6-Rezeptor oder den TNF-Rezeptor bereits gezeigt, können lösliche Rezeptoren die Aktivität des entsprechenden Zytokins in vielerlei Hinsicht modulieren²⁹⁹. So können sie die freien Liganden im Serum abfangen und dadurch deren Bindung an ihre membranständigen Rezeptoren verhindern oder aber durch Bindung ihrer Liganden deren Stabilität erhöhen²⁹⁹. Inflammatorische Mediatoren, wie PMA, LPS (Lipopolysaccharide) oder GM-CSF führen *in vitro* zudem zu einer dosisabhängigen Hochregulation der solCSF2RA-Sekretion. Insbesondere in AML-Patienten der FAB-Subtypen M4 oder M5 ließen sich im Vergleich zu gesunden Spendern oder ALL-Patienten stark erhöhte solCSF2RA-Level im Serum detektieren^{300–302}.

Die Expression von solCSF2RA-Isoform c konnte im Rahmen dieser Arbeit zudem in den von cTCR-1A.3/46-transgenen PBMC erkannten Melanomlinien Ma-Mel-86b und Ma-Mel-86c sowie verschiedenen primären AML-Zellisolaten, wie beispielsweise MZ653-AML, nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 3.3.1). Ähnlich dem von Hanada *et al.* aufgedeckten Erkennungsmechanismus von solTRAIL wäre somit grundsätzlich auch eine Erkennung von solCSF2RA möglich. Die Expression der löslichen Isoform c in den Melanomlinien des Modells Ma-Mel-86 fiel im Vergleich zur membranständigen Isoform a zwar wesentlich geringer aus, jedoch beschränkten sich die mRNA-Expressionsanalysen lediglich auf alternative Spleißformen. Das aus *ectodomain shedding* der membranständigen Isoform a resultierende lösliche CSF2RA wurde bei mRNA-basierten Expressionsanalysen naturgemäß nicht berücksichtigt, weshalb keine detaillierte Aussage darüber gemacht werden konnte, wieviel lösliches CSF2RA tatsächlich im Überstandsmedium vorlag. Dass zumindest die erkannten Melanomlinien Ma-Mel-86b und Ma-Mel-86c eine Vielzahl an membranständigen Matrixmetalloproteasen exprimieren, wie beispielsweise MMP15, MMP16, MMP17 oder auch die für die Spaltung von TRAIL relevante MMP14, die für eine Solubilisierung des membranständigen CSF2RA verantwortlich sein könnten, zeigten Transkriptomsequenzierungen der Melanomlinien (persönliche Mitteilung [REDACTED]). SolCSF2RA-Isoform c-transfizierte Expi293F-Zellen wurden im Vergleich zu CSF2RA-Isoform a-transfizierten Zellen jedoch nur sehr schwach durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC erkannt (vgl. **Abb. 3-16 A**). Da weder der Überstand solCSF2RA-transfizierter Expi293F alleine noch nach Beladung mock-transfizierter Expi293F-Zellen zu einer IFN-Sekretion der cTCR-1A.3/46-transgenen PBMC führte (vgl. **Abb. 3-16 A**), ist anzunehmen, dass solCSF2RA als lösliches Protein von den T-Zellen nicht erkannt

wird. Die Präsenz von solCSF2RA in Zelllysaten und Zellüberstand transfizierter Zellen, wenn auch aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens im Zelllysate vermutlich zumindest teilweise unvollständig glykosyliert, konnte mittels Western Blot bestätigt werden (vgl. **Abb. 3-16 C**). Die Beteiligung eines präsentierenden Oberflächenrezeptors, analog zu DR4 bei der Erkennung löslichen TRAILS, an der HLA-unabhängigen Erkennung von CSF2RA ist unwahrscheinlich, da Zelllinien aller getesteten Spezies (Maus, Mensch, Affe, Hamster) nach ektopischer CSF2RA-Expression von CSF2RA-reaktiven T-Zellen erkannt wurden (vgl. **Abb. 3-1 A**, **Abb. 3-6** und **Abb. 3-7**)⁴³. Ein weiteres für die Erkennung benötigtes Protein müsste daher evolutionär hoch konserviert sein bzw. ein hohes Maß an Homologie zwischen den einzelnen Spezies aufweisen. Zudem sind für CSF2RA, über GM-CSF, CSF2RB und eventuelle Syndecan-2 hinaus¹⁷⁵, im Gegensatz zu einer Vielzahl an intrazellulären Bindungspartnern bisher keine weiteren extrazellulären Interaktionspartner bekannt. Selbst die Bindung von solCSF2RA an CSF2RB ist lediglich möglich, wenn beide Proteine von derselben Zelle exprimiert werden, wohingegen exogenes solCSF2RA nicht an CSF2RB binden kann³⁰³. Auch die beschriebenen Interaktionen von CSF2RA mit der membranständigen Tyrosinkinase KIT³⁰⁴ oder dem Lamininrezeptor, welcher neben Syndecan-2 ebenfalls mit Metastasierung in Verbindung gebracht wird, beruhen auf intrazellulären Bindungen^{174,177,178}. Die Bindung von löslichem CSF2RA an andere membranständige Proteine ist daher nach derzeitigem Wissens- und Erkenntnisstand unwahrscheinlich.

Interessant wären jedoch Analysen, ob solCSF2RA dazu in der Lage ist, eine Erkennung von membranständigem CSF2RA durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC zu blockieren. Neben der Blockade der Erkennung CSF2RA⁺ Targetzellen von CSF2RA-reaktiven T-Zellen durch anti-CSF2RA-Antikörper (K12B7-17A, vgl. **Abb. 3-7** und **Abb. 3-15**) würde dies einen weiteren Beweis für die direkte Erkennung von CSF2RA durch CD8⁺ T-Zellen liefern. So könnte beispielsweise der Einfluss des aufgereinigten Überstands solCSF2RA-Isoform c-transfizierter Expi293F-Zellen auf das lytische Potential CSF2RA-reaktiver T-Zellen im Chromfreisetzungstest evaluiert werden. Aber auch eine direkte Visualisierung der Interaktion von CSF2RA mit dem cTCR-1A.3/46 innerhalb der immunologischen Synapse wäre mithilfe von rekombinantem CSF2RA denkbar. So ist es zum Beispiel durch das in der Arbeitsgruppe um Michael Dustin entwickelte Synapsenmodell (engl. *supported planar bilayer model*) möglich, Interaktionen zwischen T-Zelle und APC direkt mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper zu detektieren, nachdem der entsprechende Ligand quantitativ in auf Deckgläsern aufgebrachte Lipid-Doppelschichten eingebunden und den T-Zellen präsentiert wurde^{305,306}. Die Generierung und Testung trunkierter CSF2RA-Konstrukte könnte darüber hinaus Aufschluss liefern, welcher Teil des Proteins das von den T-Zellen erkannte Epitop darstellt.

Da bisher keine membranständigen Bindungspartner von CSF2RA bekannt sind, deren Interaktion lediglich auf einer extrazellulären Bindung beruht und solCSF2RA-Isoform c nicht durch cTCR-1A.3/46-transduzierte PBMC erkannt wird, ist davon auszugehen, dass der molekulare, HLA-unabhängige Erkennungsmechanismus von CSF2RA sich grundlegend von dem von TRAIL unterscheidet, indem membranständiges CSF2RA als solches von den HLA-unabhängigen T-Zellen erkannt wird.

4.3.2 HLA-unabhängige Erkennung des GM-CSF-Rezeptor-Komplexes

Alle erkannten Melanomlinien des Melanommodells Ma-Mel-86 sowie alle allogenen Melanomzelllinien exprimierten laut RT-PCR zwar CSF2RA, jedoch nicht CSF2RB (persönliche Mitteilung [REDACTED]). Darüber hinaus ist in der Literatur beschrieben, dass auch CSF2RA alleine durch Steigerung

der Glucose-Aufnahme in Melanomzellen bzw. durch eine antiapoptotische Wirkung, wie dies für Embryonen gezeigt wurde, eine potentiell vorteilhafte Rolle für die Tumorgenese spielt (vgl. Abschnitt 1.3.2)^{169,173,191,192}. Da außerdem für eine optimale GM-CSF-vermittelte Signaltransduktion die Assemblierung eines komplizierten Dodekamerkomplexes, bestehend aus vier GM-CSF-Molekülen, vier α - und vier β -Ketten vonnöten ist¹⁶², wäre denkbar, dass dadurch das erkannte Epitop nicht mehr frei zugänglich für die T-Zellen ist und somit die Koexpression der β -Kette des GM-CSF-Rezeptors die Erkennung von CSF2RA durch CSF2RA-reaktive T-Zellen inhibiert⁴³. In einem funktionalen GM-CSF-Rezeptor-Komplex sind CSF2RA und CSF2RB zu gleichen Anteilen involviert¹⁶². Ein gewisser Anteil an freiem, für die T-Zellen zugänglichem CSF2RA auf der Zelloberfläche könnte, bedingt durch eine Sequestrierung von CSF2RB durch die α -Ketten des IL-3- bzw. IL-5-Rezeptors, jedoch ständig präsent sein. Dies würde eine Erkennung von normalen sowie malignen myeloischen, hämatopoetischen Zellen, die üblicherweise neben der α -Kette auch die β -Kette des GM-CSF-Rezeptors an ihrer Oberfläche exprimieren, erklären.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch eindeutig demonstriert, dass eine gleichzeitige, äquimolare Expression der GM-CSF-Rezeptor- β -Kette alleine keinen Einfluss auf die Erkennung der α -Kette durch CSF2RA-reaktive T-Zellen hat (vgl. Abschnitt 3.3.2.1). 293T-Zellen, die nach Transfektion sowohl CSF2RA als auch CSF2RB ektopisch exprimierten, wurden von cTCR-1A.3/46-transgenen PBMC in gleichem Maße erkannt, wie 293T-Zellen, welche lediglich die α -Kette exprimierten (vgl. **Abb. 3-17**). Erst nachdem durch simultane Zugabe des Liganden GM-CSF eine Ausbildung des kompletten GM-CSF-Rezeptor-Komplexes ermöglicht wurde, kam es zu einer Blockade der spezifischen Erkennung von AML, mDC sowie 293T-Zellen nach transienter Transfektion mit CSF2RA- und CSF2RB-cDNA durch CSF2RA-reaktive T-Zellen (vgl. **Abb. 3-18**).

GM-CSF führte auch bei Targetzellen, die nur die α -Kette des GM-CSF-Rezeptors exprimierten, zu einer Blockade der Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen. Diese Blockade fiel jedoch weitaus geringer aus als für Zellen, die beide GM-CSF-Rezeptor-Ketten exprimierten (vgl. **Abb. 3-18**). Dies ist mit der deutlich geringeren Affinität von GM-CSF zur α -Kette ($K_D = 0,8$ bis $1,2$ nM) im Vergleich zum α : β -Heterodimer ($K_D = 1$ bis 20 pM) zu erklären^{160,161}. Eine Verminderung der IFN- γ -Freisetzung durch CSF2RA-reaktive T-Zellen aufgrund einer GM-CSF-induzierten Rezeptorinternalisierung der Targetzellen wurde ausgeschlossen, da die lediglich kurzzeitig um ca. 10 % auf ca. 70 % abfallende CSF2RA-Expression auf der Zelloberfläche von mDC eine Verminderung der IFN- γ -Produktion der Effektoren um ca. 40 % nicht erklärte. Ähnlich wie für murines CSF2RA beschrieben³⁰⁷, war bereits nach vier Stunden das Ausgangsniveau der CSF2RA-Expression auf der Zelloberfläche durch Rezeptorrecycling oder -neusynthese wiederhergestellt (vgl. **Abb. 3-18 D**). Da im IFN- γ -ELISpot-Assay eine Koinkubation von T- und Targetzellen jedoch generell über einen Zeitraum von mindestens 20 Stunden erfolgte, ist die ausgeprägte Blockade durch GM-CSF nicht durch Liganden-induzierte GM-CSF-Rezeptor-Internalisierung zu erklären.

Ob die Blockade der Erkennung von CSF2RA⁺ Targetzellen durch CSF2RA-reaktive T-Zellen nach GM-CSF-Inkubation jedoch im Sinne einer kompetitiven Inhibition auf einer einfachen Abschirmung der TCR-Bindestelle aufgrund der GM-CSF-Interaktion mit CSF2RA beruht, oder durch Ligandenbindung im Sinne einer allosterischen Inhibition eine Konformationsänderung ausgelöst wird, wodurch das von den T-Zellen erkannte CSF2RA-Epitop unkenntlich wird, bleibt dabei offen. Von GM-CSF ist bekannt, dass es innerhalb einer „Ellbogenregion“ zwischen zwei extrazellulären Domänen mit dem CSF2RA-

Molekül interagiert³⁰⁸. Ob dadurch jedoch eine Konformationsänderung ausgelöst wird, oder diese erst durch die Ausbildung des komplizierten Dodekamerkomplexes initiiert wird, ist bislang unbekannt und bedarf weiterer Strukturanalysen.

Eine Blockade der Erkennung von CSF2RA war auch durch einen anti-CSF2RA-Antikörper (K12B7-17A, vgl. **Abb. 3-7** und **Abb. 3-15**) zu erreichen. Da jedoch das exakte Epitop, das durch diesen Antikörper gebunden wird, nicht bekannt ist, lieferte auch dieser Ansatz keine Information darüber, welcher Teil von CSF2RA im Speziellen zu einer Erkennung durch CSF2RA-reaktive T-Zellen führt. Aufschluss hierüber würde einerseits die Verwendung von anti-CSF2RA-Antikörpern mit bekannten Erkennungsepitopen und ihr Einfluss auf eine Erkennung durch cTCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen liefern. Denkbar wäre außerdem die schrittweise Mutagenese der elf potentiellen N-Glykosylierungsstellen von CSF2RA (N46, N54, N99, N123, N135, N182, N195, N223, N229, N272, N305; vgl. Abschnitt 5.1.4). So konnte beispielsweise durch den Einsatz des N-Glykosylierungsinhibitors Tunicamycin die elementare Bedeutung der Proteinmodifikationen für Ligandenbindung und Funktionalität von CSF2RA gezeigt werden¹⁵⁹. Im Speziellen wurde außerdem in Patienten mit pulmonal-alveolärer Proteinose eine Mutation (G174R) identifiziert, welche das N-Glykosylierungsmuster von CSF2RA verändert und die Bindung von GM-CSF sowie die Signaltransduktion in primären, myeloiden Zellen einschränkt¹⁸¹. Sowohl die HLA-unabhängige Erkennung von MUC-1 als auch von murinem CD155 ist strikt von der Glykosylierung des Targetantigens abhängig^{37,41}. Ob ein vergleichbarer Mechanismus auch für die HLA-unabhängige Erkennung von CSF2RA verantwortlich ist, sollte daher in weiterführenden Versuchen geklärt werden.

4.3.3 Rolle von CD8 für die HLA-unabhängige Erkennung von CSF2RA

Neben der Hypothese einer durch Keimbahn-kodierte Aminosäuren bedingten, intrinsischen HLA-Abhängigkeit von TCR (vgl. Abschnitt 4.1)^{258–261} steht eine zweite Hypothese, die die HLA-Restriktion von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen zu erklären versucht, im Focus wissenschaftlicher Diskussion. Diese geht nicht von einer intrinsischen MHC-Abhängigkeit der TCR aus, sondern macht die Korezeptoren CD4 und CD8 während der Positivselektion im Thymus dafür verantwortlich, eine erfolgreiche TCR-Signaltransduktion nur bei gleichzeitiger Bindung der Korezeptoren an MHC-Moleküle der APC zu ermöglichen (vgl. Abschnitt 4.1)^{41,249,256,263–265}. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Rolle von CD8 für die HLA-unabhängige Erkennung von CSF2RA und weiterer HLA-unabhängig erkannter Antigene näher charakterisiert werden, um detaillierteren Aufschluss über den molekularen Erkennungsmechanismus und die Entstehung HLA-unabhängiger T-Zellen zu erhalten.

Alle untersuchten HLA-unabhängigen T-Zellen des Melanommodells der Patientin Ma-Mel-86 (darunter auch zwei TRBV10-3⁺ CSF2RA-reaktive CTL) exprimierten CD8. Die verschiedenen, membranständigen CD8α- bzw. β-Transkriptionsvarianten wiesen dabei im Vergleich zu HLA-abhängigen CTL des gleichen Melanommodells auf mRNA-Ebene weder hinsichtlich der Expressionsmuster noch der Gensequenzen Unterschiede auf. Auch zwei publizierte Polymorphismen der CD8β-Kette [rs2228022: GMAF (engl. *global minor allele frequency*) = 0,180 ± 18 % und rs35555413: GMAF = 0,127 ± 12,7 %] waren sowohl in HLA-abhängigen, als auch in HLA-unabhängigen CTL zu finden (vgl. Abschnitt 3.3.3.1). Da durch Klonierung die beiden Polymorphismen von den ursprünglichen Varianten zu trennen waren, ist davon auszugehen, dass beide SNP auf demselben Allel lagen. Es gab keine Unterschiede in der Expression der CD8α- und CD8β-Transkriptionsvarianten und sowohl HLA-abhängige als auch HLA-unabhängige CTL

exprimierten beide Allele der CD8 β -Ketten, weshalb ein Struktur-bedingter Einfluss des CD8-Korezeptors auf die HLA-unabhängige Erkennung der untersuchten CTL-Klone ausgeschlossen werden kann.

Antikörper gegen CD8 blockierten die Reaktivität HLA-unabhängiger CTL-Klone gegen TRP-2 und CSF2RA im IFN- γ -ELISpot-Assay um bis zu ca. 65 % (vgl. Abschnitt 3.3.3.2). Dieser Effekt war vergleichbar mit der Blockade des HLA-abhängigen, Tyrosinase-reaktiven CTL-Klons 5C/119. Dies spricht dafür, dass der Korezeptor CD8 zumindest teilweise auch an der HLA-unabhängigen Antigenerkennung von T-Zellen gegen TRP-2 und CSF2RA beteiligt bzw. für diese förderlich ist. Es war jedoch keine vollständige Blockade der Reaktivität zu beobachten wie bei dem HLA-abhängigen, CSPG4-reaktiven CTL-Klon 2C/225. Für HLA-abhängige CTL wurde eine inverse Korrelation der CD8-Abhängigkeit zur TCR-Affinität bzw. zur Antigendichte auf den jeweiligen APC beschrieben^{309–311}. Da in allen Tests jeweils die Targetzellen gewählt wurden, die laut durchflusszytometrischen Analysen die höchste CSF2RA-Expression aufwiesen, könnte ein Überschuss an den T-Zellen präsentierten Antigen somit die partielle Blockade durch OKT8 erklären.

Die Affinität der getesteten HLA-abhängigen bzw. HLA-unabhängigen TCR zu ihren jeweiligen Antigenen ist bisher nicht bekannt. Hoch-affine, gegen Autoantigene gerichtete T-Zellen werden normalerweise im Rahmen der Negativselektion im Thymus eliminiert. Tikhonova *et al.* ist es gelungen, murine MHC-unrestringierte TCR zu isolieren, die der Thymusselektion entgangen waren und ihr Antigen mCD155 mit einer sehr hohen Affinität von ca. 200 nM erkannten⁴¹. Diese Affinität entspricht in etwa der Affinität, mit der Antikörper ihr Antigen erkennen und übertrifft die Affinität von konventionellen TCR (10–200 μ M) bei weitem⁴¹. Vergleichbar hohe Affinitäten wären daher auch für die HLA-unabhängigen TCR des Melanommodells Ma-Mel-86 denkbar. Dies würde erklären, warum keine vollständige Blockade der CTL durch OKT8 zu beobachten war. Detaillierte Analysen der Affinität, wie beispielsweise die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie wären jedoch nötig, um diese Hypothese zu bestätigen³¹².

Ein weiterer Hinweis dafür, dass CD8 an der Antigenerkennung HLA-unabhängiger T-Zellen zumindest teilweise beteiligt ist, lässt sich anhand des von den T-Zellen ausgeübten Effektormechanismus ableiten. Für CD8-unabhängige, MHC-restringierte, murine CTL wurde postuliert, dass diese T-Zellen ihre Effektorfunktion weitestgehend via Fas/FasL-Interaktion, nicht aber über die Perforin/Granzym-Signalkaskade vermitteln³¹³. cTCR-1A.3/46-transgene PBMC (vgl. **Abb. 3.9**) sowie cTCR-2C/417-transgene PBMC (Daten nicht gezeigt) degranulierten jedoch auch infolge einer Stimulation mit CSF2RA⁺ bzw. TRP-2⁺ Targetzellen in spezifischer Art und Weise. Sie waren demnach sehr wohl dazu in der Lage, die Perforin/Granzym-Signalkaskade zu initiieren. Eine vollständige CD8-Unabhängigkeit der HLA-unabhängigen T-Zellen ist daher unwahrscheinlich.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur OKT8-Blockade stehen auch die Resultate zur Funktionalität des TCR-1A.3/46 nach retroviralem Transfer in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen (vgl. Abschnitt 3.2.4.1). Der TCR wies zwar in beiden Kompartimenten spezifische Reaktivität gegenüber CSF2RA⁺ Targetzellen auf, der Anteil an IFN- γ -freisetzenden T-Zellen fiel jedoch für CD4⁺ TCR-1A.3/46-transduzierte T-Zellen wesentlich geringer aus als für CD8⁺ TCR-1A.3/46-transgene T-Zellen (vgl. **Abb. 3-6**), woraus sich ebenfalls schließen lässt, dass der Korezeptor CD8 bei der HLA-unabhängigen

Antigenerkennung von CSF2RA zumindest teilweise involviert zu sein scheint bzw. diese fördert, jedoch nicht zwingend dafür erforderlich ist.

Um die CD8-Abhängigkeit HLA-unrestrictierter T-Zellklone weiter zu analysieren, wurde zudem die Funktionalität des CSF2RA-reaktiven cTCR-1A.3/46 und des TRP-2-reaktiven cTCR-2C/417 nach Transduktion muriner MHC- und Korezeptor-defizienter QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten im Vergleich zu murinen, TCR-transgenen BL6-Splenozyten analysiert (vgl. Abschnitt 3.3.3.3). Für die Transduktion QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten wurden dabei lediglich Zellen von hBcl-2⁺ Tieren verwendet, da hBcl-2 aufgrund seiner antiapoptotischen Wirkung die Positivselektion im Thymus der QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäuse signifikant verbessert²⁴⁹. Dies war auch an den deutlich vergrößerten Milzen von hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäusen im Vergleich zu den Milzen von hBcl-2⁻ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäusen erkennbar (vgl. **Abb. 3-22 C**). Wie erwartet, wiesen die QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten in durchflusszytometrischen Analysen keinerlei Expression von CD4, CD8, H2-K^b und H2-IA^b auf (vgl. **Abb. 3-22 D**). Die sehr geringe, residuale Expression von H2-D^b von weniger als 5 % ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass H2-D^b-Moleküle teilweise auch ohne β 2M zur Zelloberfläche transportiert werden können^{314–316} oder eine Oberflächenexpression auf das eventuell im Zellkulturmedium vorhandene exogene, bovine β 2M zurückzuführen ist²⁵⁰. Der cTCR-2C/417 zeigte sowohl nach Transduktion von wt-BL6-Splenozyten als auch von hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten Reaktivität gegenüber TRP-2⁺ Targetzellen (vgl. **Abb. 3-21** und **Abb. 3-23**). Die Reaktivität gegenüber TRP-2⁺ Targetzellen fiel jedoch für cTCR-2C/417-transgene hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten (Erkennung bis zum Zweifachen des Hintergrunds) deutlich geringer aus als für cTCR-2C/417-transgene-BL6-Splenozyten (Erkennung bis zu mehr als dem Fünffachen des Hintergrunds). Der HLA-unabhängige TRP-2-reaktive TCR schien demnach zwar auch unabhängig von einer CD8-Koexpression funktional zu sein, die gleichzeitige Präsenz von CD8 führte jedoch zu einer deutlichen Verbesserung der Funktionalität. Diese Beobachtungen standen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der OKT8-Blockadeexperimente, wobei HLA-unabhängige, TRP-2-reaktive CTL eindeutig durch OKT8-Antikörper blockierbar waren, jedoch eine Restreaktivität aufrechterhielten (vgl. Abschnitt 3.3.3.2). Für den CSF2RA-reaktiven cTCR-1A.3/46 war bislang nur eine allenfalls geringe Funktionalität nach Transduktion wildtypischer BL6-Splenozyten, jedoch keine spezifische Reaktivität nach Transduktion hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten zu beobachten (vgl. **Abb. 3-21** und **Abb. 3-23**). Dies könnte jedoch auch durch die geringe Transduktionseffizienz der hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten mit dem CSF2RA-reaktiven TCR-Konstrukt bedingt sein. Im IFN- γ -ELISpot Assay wurden 10.000 CD8⁺/TRBV10-3⁺ BL6-Splenozyten pro TE eingesetzt, während von den transduzierten hBcl-2⁺ QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten lediglich 2.500 Gesamt-TRBV10-3⁺ Zellen pro TE verfügbar waren. Wie in Abschnitt 3.2.4.1 gezeigt, lag der Anteil der IFN- γ -produzierenden Zellen bei cTCR-1A.3/46-transgenen CD8⁺ Zellen wesentlich höher als bei cTCR-1A.3/46-transgenen CD4⁺ Zellen. Da eine Unterteilung der QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten in CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellsubpopulationen jedoch nicht möglich war, war die Menge an tatsächlich eingesetzten TCR-transgenen Zellen mit dem Potential für eine starke IFN- γ -Produktion nicht abschätzbar und die Ergebnisse waren daher nicht direkt vergleichbar. Zudem ist derzeit nicht bekannt, ob QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten prinzipiell im gleichen Maße dazu befähigt sind, IFN- γ freizusetzen wie wildtypische BL6-Splenozyten. Außerdem wurde durchgehend beobachtet, dass für eine vergleichbare Reaktivität prinzipiell größere Mengen CSF2RA-reaktiver T-Zellen eingesetzt werden mussten als TRP-2-reaktive T-Zellen. Aufgrund der bereits sehr hohen, unspezifischen IFN- γ -Spontanfreisetzung

cTCR-1A.3/46-transgener QUAD-KO.Bcl-2Tg-Splenozyten und der limitierten Zellzahl wäre daher denkbar, dass die geringen Unterschiede einer spezifischen IFN- γ -Produktion lediglich nicht detektierbar waren. Um eine definitive Aussage über die CD8-Abhängigkeit des CSF2RA-reaktiven TCR-1A.3/46 treffen zu können, bedarf es daher weiterer Wiederholungen des Experiments.

Murines CD8, wie es von BL6-Splenozyten exprimiert wird, kann jedoch die Funktion des humanen CD8 nicht vollständig kompensieren. So konnte beispielsweise bereits gezeigt werden, dass murine CD8-Moleküle nur schlecht mit xenogenen HLA-Molekülen interagieren können, weshalb lediglich eine suboptimale Stimulation muriner CD8⁺ T-Zellen durch humane Zellen erreicht werden kann^{317–321}. Dass sowohl der cTCR-2C/417 als auch im geringen Maße der cTCR-1A.3/46 auch nach Transduktion von BL6-Splenozyten funktional zu sein scheinen, könnte somit einen weiteren Hinweis dafür liefern, dass die HLA-unabhängigen TCR zumindest teilweise auch ohne gleichzeitige Beteiligung der CD8-Korezeptoren zu einer Erkennung TRP-2⁺ bzw. CSF2RA⁺ Zellen befähigt sind.

Um auch auf anderem Wege eine Korezeptor-Abhängigkeit des CSF2RA-reaktiven TCR zu evaluieren, könnte die Transduktion CD8⁻ $\gamma\delta$ -T-Zellen bzw. von T-Zellen nach CD8-*Knockdown* in Erwägung gezogen werden. Auch wären FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer)-Analysen bzw. Konfokalmikroskopie denkbar, um eine Kolo-kalisation von TCR und CD8 infolge einer Antigen-spezifischen TCR-Stimulation darzustellen bzw. auszuschließen³²².

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Experimenten schlussfolgern, dass nach derzeitigem Erkenntnisstand sowohl für die HLA-unabhängige Erkennung von TRP-2 als auch von CSF2RA der Korezeptor CD8 zwar teilweise involviert, jedoch nicht zwingend erforderlich zu sein scheint. Van Laethem *et al.* machten das Maß an in Abwesenheit der CD4/CD8-Korezeptoren verfügbarer „freier LCK“ während der Thymusselektion dafür verantwortlich, MHC-unabhängige Antigenerkennung im QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mausmodell zu ermöglichen^{249,263,264}. Da die HLA-unabhängigen CTL des Melanommodells Ma-Mel-86 intakte CD8-Moleküle exprimieren und diese auch teilweise an der Erkennung der Targetantigene beteiligt zu sein scheinen bzw. die HLA-unabhängige Erkennung zumindest fördern, ist diese Hypothese nicht direkt auf die HLA-unabhängigen CTL des Melanommodells übertragbar. Durch welchen alternativen Mechanismus es diesen T-Zellen ermöglicht wurde, die Thymusselektion zu umgehen, bleibt weiterhin unklar. Denkbar wäre hierfür beispielsweise, dass die HLA-unabhängige Spezifität der T-Zellen nur sekundär in der Peripherie auftrat, die T-Zellen jedoch über ihre primäre, HLA-restringierte Spezifität eine normale Thymusselektion durchlaufen konnten. Diese Theorie wird durch die Beobachtung bekräftigt, dass der TCR-2C/417 neben seiner HLA-unabhängigen Reaktivität gegenüber TRP-2 auch Reaktivität gegen ein noch unbekanntes, HLA-C*03:03/HLA-C*03:04-restringiertes Antigen aufweist (vgl. Abschnitt 3.2.5.2 und Abschnitt 4.5).

4.4 Mögliche therapeutische Anwendungen des cTCR-1A.3/46

Für eine mögliche therapeutische Anwendung des cTCR-1A.3/46 wären prinzipiell zwei unterschiedliche Ansätze denkbar. Zum einen könnte für die Therapie nicht-hämatologischer Malignome, wie beispielsweise Melanome, ein adoptiver Transfer cTCR-1A.3/46-transgener T-Zellen in Erwägung gezogen werden, sofern die Tumorbiospien CSF2RA-Expression aufweisen bzw. *in vitro* durch cTCR-1A.3/46-transgene PBMC erkannt werden. Zwar werden von dem TCR auch normale, hämatopoetische Zellen der myeloiden Reihe, wie Monozyten, DC oder Granulozyten erkannt, nicht jedoch CD19⁺ B-Zellen (vgl. Abschnitt 3.2.5.1). Da auch für weitere lymphatische Zellen wie T-Zellen oder NK-Zellen in der Literatur keinerlei CSF2RA-Expression beschrieben ist, lässt sich vermuten, dass auch diese Zelltypen durch cTCR-1A.3/46-transgene T-Zellen nicht zerstört werden. Daher wäre im Falle eines adoptiven TCR-Transfers zu keiner Zeit das Immunsystem des Patienten vollständig kompromittiert. Eine temporäre Ablation der myeloiden Hämatopoese, wie es auch für Konditionierungen vor einer HSZT der Fall ist, könnte unter Umständen jedoch in Kauf genommen werden, wenn der Vorteil einer gleichzeitigen, erfolgreichen Tumorelimination überwiegt. Auch für CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie durch die Effektoren nicht erkannt werden (vgl. **Abb. 3-11 D**). Nach erfolgter Therapie wäre somit eine Reaktivierung der normalen Myelopoese denkbar. Dazu müssten aber die CSF2RA-reaktiven T-Zellen inaktiviert werden. Dies wäre beispielsweise durch die Integration von Selbstmordgenen in den verwendeten retroviralen Expressionsvektoren zu erreichen, wodurch zu einem gewünschtem Zeitpunkt durch Induktion des Selbstmordgens gezielt und selektiv alle TCR-transgenen T-Zellen eliminiert werden könnten. Verschiedene Selbstmordgene haben sich für diese Strategie bereits als äußerst wirkungsvoll erwiesen. So kann beispielsweise die Herpes-simplex-Virus Thymidinkinase (Tk) in den retroviralen Vektor kointegriert werden. Diese phosphoryliert die bei Bedarf applizierten, ungefährlichen Vorstufen von Aciclovir oder Ganciclovir, wodurch die resultierenden Produkte Acyclo-GMP und Gancyclo-GMP die DNA-Synthese infizierter Zellen inhibieren und somit für die transduzierten T-Zellen toxisch sind. Es konnte bereits in klinischen Studien gezeigt werden, dass die Gabe von Tk-transgenen Donorlymphozyteninfusionen (DLI) nach allogener HSZT eine GvHD unter Kontrolle halten kann^{323,324}. Aber auch weitere Selbstmordgene, wie das AP20187-induzierbare Caspase9-Transgen oder durch den monoklonalen Antikörper Rituximab eliminierbare, mit CD20 ausgestattete Zellen erwiesen sich als vielversprechende Alternativen^{324–326}. Andererseits könnte auch durch den Gebrauch induzierbarer Expressionssysteme, wie beispielsweise dem *Tet-On*- oder dem *Tet-Off*-System, die Transgenexpression reguliert und einer ungewollten, überschießenden Autoimmunreaktion bei Bedarf entgegengewirkt werden^{284,327}.

In den Versuchen zu dieser Arbeit wurde gezeigt, dass GM-CSF die Erkennung von CSF2RA effizient inhibiert, sofern sowohl CSF2RA als auch CSF2RB auf der Targetzelle präsent sind und sich somit der vollständige GM-CSF-Rezeptor-Dodecamerkomplex ausbilden kann. Normale Zellen myeloischen Ursprungs, darunter Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, und DC, exprimieren üblicherweise beide Ketten des GM-CSF-Rezeptors. Für alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten Melanomlinien konnte jedoch lediglich eine Expression der α -Kette, nicht aber der β -Kette des GM-CSF-Rezeptors festgestellt werden. Dies stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen überein¹⁹². Demnach ist, wie bereits erwähnt, die α -Kette alleine dazu in der Lage, eine vermehrte Glucoseaufnahme in Melanomzellen zu vermitteln und somit einen postulierten wachstumsfördernden

Effekt auf die Tumorzellen auszuüben¹⁹². Somit könnte eine möglicherweise auftretende *on-target*-Toxizität gegenüber normalen, hämatopoetischen Zellen myeloischen Ursprungs *in vivo* eventuell durch das im Serum bzw. im Interstitium präsente GM-CSF vermindert werden. Es wäre auch grundsätzlich denkbar, durch eine zusätzliche GM-CSF-Administration diesen Effekt zu unterstützen, um eine selektive Schädigung von Tumorzellen, die nur CSF2RA exprimieren, zu erreichen.

Eine weitere potentielle Anwendung könnte der cTCR-1A.3/46 außerdem in der Konditionierungsphase vor einer Stammzelltransplantation finden. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, erkennen cTCR-1A.3/46-transgene T-Zellen ein breites Spektrum von Leukämiezelllinien sowie alle getesteten primären Leukämien myeloiden Ursprungs (vgl. Abschnitt 3.2.5.2, Abschnitt 3.2.5.3 und Abschnitt 3.2.5.4). Im Vergleich zu der häufig mit einem hohen Maß an Toxizität in Verbindung stehenden, sehr aggressiven Chemo- und/oder Strahlentherapie, insbesondere im Rahmen einer myeloablativen Konditionierung, wäre durch den Transfer cTCR-1A.3/46-transgener T-Zellen aufgrund der selektiven Eliminierung hämatopoetischer Zellen myeloischen Ursprungs mit wesentlich geringeren Nebenwirkungen zu rechnen. Auch gegenüber üblichen nicht-myeloablativen Konditionierungsregimen könnte der Transfer CSF2RA-reaktiver T-Zellen bei Malignomen der Myelopoese Vorteile mit sich bringen. Zwar sind bei nicht-myeloablativen Konditionierungen bzw. Konditionierungen mit reduzierter Intensität die durch Toxizität bedingte Morbidität und Mortalität im Vergleich zu myeloablativen Konditionierungen vermindert, jedoch resultieren diese Konditionierungsregime auch in erhöhten Rezidivraten³²⁸. Da man vermuten kann, dass durch cTCR-1A.3/46-transgene T-Zellen bereits in der Konditionierungsphase selektiv myeloische Zellen und damit auch die malignen Blasten eliminiert werden, sollte auch die minimale Resterkrankung sehr gering ausfallen. Gleichzeitig ist anzunehmen, dass auch das in Verbindung mit einer Konditionierung stehende hohe Infektionsrisiko reduziert ist, da das Immunsystem aufgrund der selektiven Wirkung CSF2RA-reaktiver T-Zellen auf myeloide Zellen zu keiner Zeit vollständig supprimiert wird. Sofern die *in vivo* präsenten GM-CSF-Level eine Erkennung der malignen hämatopoetischen Zellen, die sowohl die α - als auch die β -Kette des GM-CSF-Rezeptors exprimieren sollten, blockieren (vgl. Abschnitt 3.2.5.3 und Abschnitt 3.3.2.2), könnte eine zusätzliche Administration von blockierenden GM-CSF-Antikörpern Abhilfe schaffen. Konkret könnte in diesem Fall zum Beispiel der Antikörper MOR103 zum Einsatz kommen, der in ersten klinischen Studien zur Therapie von rheumatoider Arthritis bereits vielversprechende Effekte erzielte und dabei gut toleriert wurde³²⁹. Zwar hätte dies auch eine Ablation normaler GM-CSFR⁺ Zellen zur Folge, eine zeitweise Eliminierung der Hämatopoese, wie sie auch für konventionelle Konditionierungsregime im Rahmen von allogenen HSZT erwirkt wird, wäre jedoch tolerierbar, sofern dabei gleichzeitig leukämische Zellen mit hoher Effizienz eliminiert würden.

4.5 Mögliche Sicherheitsrisiken einer therapeutischen Anwendung des cTCR-1A.3/46 und Zukunftsperspektiven

Vor einer möglichen klinischen Anwendung muss die Sicherheit, Effizienz und Spezifität des cTCR-1A.3/46 nach retroviraler Transduktion von PBMC oder T-Zellen in jedem Fall zunächst in weiteren *In vitro*-Versuchen sowie im Mausmodell evaluiert werden. CSF2RA-Expression wurde auch für nicht-hämatopoetische Zellen, wie Endothelzellen, Fibroblasten, Oligodendrozyten, Astrozyten, Neuronen, Melanozyten und Trophoblastzellen postuliert^{165–171}, weswegen die möglichen Konsequenzen eines TCR-Transfers mit dem cTCR-1A.3/46 *in vivo* im Detail analysiert werden müssen. *In vitro* konnte bisher keinerlei Kreuzreaktivität des CSF2RA-reaktiven TCR festgestellt werden. Dass jedoch auch für HLA-unabhängige TCR eine Kreuzreaktivität gegenüber HLA-restringierten Antigenen möglich ist, zeigte die Erkennung der TRP-2⁺ Leukämiezelllinie THP-1 durch den TRP-2-reaktiven cTCR-2C/417 (vgl. Abschnitt 3.2.5.2). In nachfolgenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der TCR ein noch unbekanntes Peptid, präsentiert über HLA-C*03:03 erkennt, wenn auch die Erkennung wesentlich schwächer ausfiel als die HLA-unabhängige Erkennung TRP-2⁺ Zielzellen durch den gleichen TCR (persönliche Mitteilung [REDACTED]). Da auch der parentale TRP-2-reaktive CTL 2C/417 diese Spezifität aufwies, kann ausgeschlossen werden, dass sie nur aus Fehlpaarung endogener und exogener TCR-Ketten resultierte. Unklar ist dabei weiterhin, welche der beiden Spezifitäten (HLA-unabhängige Erkennung von TRP-2 oder HLA-C*03:03/HLA-C*03:04--restringierte Erkennung eines bisher unbekannten Antigens) die ursprüngliche TCR-Spezifität darstellte.

Welche gravierenden Folgen eine unentdeckte bzw. unvorhergesehene Kreuzreaktivität oder ein nicht vollständig bekanntes Antigenexpressionsprofil für Patienten haben können, wurde kürzlich aus verschiedenen klinischen Studien klar ersichtlich. So starben zwei von neun Patienten schon wenige Tage nach dem Transfer von gegen die CG-Antigene MAGE-A3/-A9/-A12 gerichteten, TCR-transgenen T-Zellen aufgrund der bislang unbekannten Expression von MAGE-A12 im menschlichen Gehirn entsprechend einer *on-target/-off-tumor*-Toxizität³³⁰. In einer weiteren klinischen Studie starben zwei von zwei behandelten Patienten mit Stadium IIIB-Melanom bzw. Myelom ebenfalls wenige Tage nach der Gabe von genetisch modifizierten T-Zellen, die mit einem Affinitäts-optimierten anti-MAGE-A3-TCR transduziert waren, aufgrund schwerwiegender kardialer Toxizität. In nachfolgenden Studien stellte sich heraus, dass der TCR neben einem MAGE-A3-Peptid Kreuzreaktivität gegenüber einem ähnlichen Peptidantigen des in Herzmuskelzellen exprimierten Proteins Titin aufweist^{331,332}. Dies entsprach einer *off-target/-off-tumor*-Toxizität.

Im Falle des CSF2RA-reaktiven TCR wäre es ratsam, seine Reaktivität zunächst gegenüber einem weitaus breiteren Spektrum an Zelllinien bzw. primären Zellkulturen unterschiedlichsten Ursprungs *in vitro* zu evaluieren. Eine CSF2RA-Expression wird bereits für Endothelzellen, Fibroblasten, Astrozyten, Neuronen und Trophoblastzellen diskutiert^{165,167,168,170}. Auch wenn eine lediglich aus einer Kontamination mit hämatopoetischen Zellen resultierende Expression von CSF2RA dieser Gewebe nicht immer vollständig ausgeschlossen werden kann, sollten insbesondere Zellen dieses Ursprungs mit einbezogen werden. Aber auch die Analyse einer potentiellen CSF2RA-Expression auf weiteren Geweben sollte ein elementarer Bestandteil weiterführender Versuche sein. Die mögliche Zerstörung von Melanozyten, die laut RT-PCR ebenfalls CSF2RA exprimieren (persönliche Mitteilung [REDACTED])

██████████) durch adoptiv transferierte CSF2RA-reaktive T-Zellen stellt wahrscheinlich keine Hürde für eine klinische Anwendung dar, da bereits in verschiedenen klinischen Studien, in denen immuntherapeutische Ansätze gegen melanozytäre Differenzierungsantigene erprobt wurden, gezeigt wurde, dass eine daraus entstehende Vitiligo kontrollierbar und als indirekter Hinweis auf eine Schädigung der Melanomzellen sogar mit einer besseren Prognose verbunden ist^{91,333–338}.

In *In vivo*-Modellen sollte aufgrund der breit gefächerten CSF2RA-Expression auf myeloischen Zellen zuerst der Einfluss des cTCR-1A.3/46 auf die normale Hämatopoese beurteilt werden. Dazu könnten zunächst die Auswirkungen einer Transplantation cTCR-1A.3/46-transgener, autologer PBMC auf die Hämatopoese im humanisierten Mausmodell [NOD-SCID-IL2R γ ^{null} (NSG)-Mäuse transplantiert mit humanen CD34⁺ Blutstammzellen] analysiert werden³³⁹. Anschließend sollte das immuntherapeutische Potential des CSF2RA-reaktiven TCR, maligne Zellen gezielt zu eliminieren, durch den Transfer TCR-transgener T-Zellen nach Inokulation der Tiere mit HLA-übereinstimmenden AML-Isolaten oder HLA-defizienten Melanomlinien untersucht werden. Da das murine Analogon zum humanen CSF2RA von dem cTCR-1A.3/46 nicht erkannt wird (persönliche Mitteilung ██████████), wäre für die Generierung eines vollständig murinen Modells die Suche nach einem murinen TCR erforderlich, der MHC-unabhängig Maus-CSF2RA erkennt.

Auf den GM-CSFR als mögliches Zielantigen für immuntherapeutische Strategien wurde in den letzten Jahren vermehrt das Augenmerk gerichtet, insbesondere in Verbindung mit Immuntoxinen. Immuntoxine sind artifizielle Fusionsproteine bestehend aus einem für Krebszellen möglichst spezifischen Antikörperfragment (scFv, engl. *single chain variable fragment*) bzw. Liganden und einem daran gekoppelten Toxin. Nach Bindung an die Zielzelle wird das Immuntoxin durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert und das Toxin wird durch Proteasespaltung freigesetzt, wodurch die Zielzellen zerstört werden^{340,341}. Durch Fusion des GM-CSFR-Liganden GM-CSF mit verschiedenen Toxinen, wie beispielsweise dem Diphtherietoxin, Shiga-Toxin, Exotoxin A oder der Endonuklease **DNA fragmentation factor 40** (DFF40) wurden bereits sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell Erfolge hinsichtlich der Eliminierung von AML- und gastrointestinalen Karzinomzelllinien sowie primären AML-Zellisolaten erzielt^{342–347}. In einer Phase I-Studie konnte durch ein Diphtherietoxin/GM-CSF-Fusionsprotein (DT₃₈₈GMCSF) bei einigen Patienten mit rezidivierter bzw. refraktärer AML eine partielle oder vollständige Remission erwirkt werden³⁴⁸. Die dosislimitierende Toxizität stellten dabei Leberschädigungen dar³⁴⁸. Diese waren jedoch nicht durch eine direkte Einwirkung des Immuntoxins auf Hepatozyten bedingt, sondern vermutlich durch die Stimulation GM-CSFR⁺ Kupfferzellen und durch deren daraus resultierenden IL-18-Sekretion, die in Hepatozyten Apoptose induziert^{348–350}. Eine effektive Prophylaxe IL-18-induzierter Lebertoxizität konnte jedoch bereits *in vivo* durch die Applikation verschiedener Therapeutika gezeigt werden, wodurch diesem Effekt eventuell entgegengewirkt werden könnte^{348,351}. Diese Daten, sowie die klinischen Studien des therapeutischen, monoklonalen anti-CSF2RA-Antikörpers Mavrilimumab für die Therapie rheumatoider Arthritis, in denen bislang keine schwerwiegenden Nebenwirkungen festgestellt werden konnten^{352–355}, liefern erste Anhaltspunkte über die mögliche *on-target*-Toxizität eines Transfers cTCR-1A.3/46-transgener, CSF2RA-reaktiver T-Zellen. Sie erlauben jedoch keinerlei verlässlichen Aussagen über eine mögliche *off-target*-Toxizität des TCR, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass der cTCR-1A.3/46 Kreuzreaktivität gegenüber einem bisher unbekannten Antigen mit unbekannten Expressionsprofil aufweist. Die oben beschriebenen präklinischen *In vivo*-Tests im Mausmodell sind daher zwingend erforderlich, um das Potential des

cTCR-1A.3/46 für eine klinische Anwendung zu bestätigen. Die Patientin Ma-Mel-86/INTH überlebte jedoch noch beinahe fünf Jahre nachdem die PBMC isoliert worden waren, aus denen CSF2RA-reaktive CTL isoliert wurden. Sie trug demnach CSF2RA-reaktive T-Zellen über einen langen Zeitraum hinweg ohne Anzeichen für Autoimmunität in sich.

Welche immuntherapeutischen Erfolge mit dem Einsatz monoklonaler Antikörper bzw. von ebenfalls HLA-unabhängigen, CAR-transgenen T-Zellen erzielt werden können, zeigten insbesondere die Studien zum ersten für die Krebstherapie zugelassenen mAb Rituximab (anti-CD20) und zu CD19-CAR-transgenen T-Zellen für die Therapie hämatologischer Malignome^{149–151,356,357}. Da bisher alle Daten darauf hinweisen, dass CSF2RA durch den cTCR-1A.3/46, ähnlich dem murinen CD155⁴¹, als Gesamtmolekül auf der Zelloberfläche wahrscheinlich in Abhängigkeit von Konformation und Glykosylierung, jedoch unabhängig von MHC-Molekülen in einer antikörperähnlichen Art und Weise erkannt wird, könnte auch der CSF2RA-reaktive TCR eine vielversprechende Alternative für die Behandlung verschiedener Malignome, darunter unter anderem myeloische Leukämien und Melanome, darstellen.

Um eine effiziente und sichere Tumoreradikation durch cTCR-1A.3/46-transgene T-Zellen zu erzielen, sind noch zahlreiche, verschiedene Optimierungsstrategien denkbar, sofern der TCR *in vivo* keine *off-tumor*- bzw. *off-target*-Toxizität aufweist. So könnte beispielsweise durch Affinitätsreifung der CDR die Affinität des TCR zu seinem Antigen CSF2RA erhöht³⁵⁸, die TCR-Internalisierung durch Mutation der N-Glykosylierungsstellen vermindert³⁵⁹ und die Stabilität des exogenen TCR durch Insertion hydrophober Aminosäuren in den Transmembrandomänen³⁶⁰ bzw. durch Generierung einer *knob-into-hole*-Konfiguration in den konstanten Domänen²⁷⁵ verbessert werden¹⁵⁵. Auch wäre es denkbar, anstelle der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen vollständigen Chimärisierung den TCR lediglich minimal zu murinisieren, um nicht nur weiterhin einer Fehlpaarung von exogenen mit endogenen TCR-Ketten vorzubeugen, sondern auch die Immunogenität des xenogenen Anteils des TCRs zu minimieren^{282,361}. Alternativ bestünde auch die Möglichkeit, Einzelketten-TCR-Konstrukte zu generieren, bei denen die variable Domäne der TCR α -Kette über ein Linkerpeptid direkt mit der TCR β -Kette fusioniert wird, wodurch das Risiko einer Dimerisierung mit endogenen TCR-Ketten weiter minimiert werden kann^{277,362}. Zusätzlich könnten in die TCR-Konstrukte dabei, ähnlich den CAR-Konstrukten der zweiten oder dritten Generation, die Gene für kostimulatorische Moleküle oder die CD3-Ketten integriert werden, um die Funktionalität des TCR zu erhöhen und eine unzureichende CD3-Expression als limitierenden Faktor auszuschließen^{363,364}. Auch konnte gezeigt werden, dass durch Herabregulation der Expression endogener TCR durch siRNA (engl. *small interfering RNA*) oder Zinkfinger-nukleasen nicht nur die Expression der exogenen TCR sowie die spezifische Zytotoxizität TCR-transgener T-Zellen erhöht werden kann, sondern auch eine *off-target*-Toxizität erfolgreich umgangen wird^{365,366}. Des Weiteren wären Optimierungen bezüglich des retroviralen Transfervektorsystems möglich. Für retroviral transferierte Transgene, deren Expression wie die der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TCR-Konstrukte dem MoMLV-Promoter/Enhancer unterliegen, wurde beschrieben, dass die Transgenexpression aufgrund von Promotermethylierung sukzessive abnimmt, weshalb die TCR-transgenen T-Zellen im Laufe der Zeit die Reaktivität gegenüber ihren Targetzellen verlieren können^{367,368}. Außerdem konnte für MoMLV-basierte retrovirale Vektoren sowohl eine präferenzielle Integration innerhalb von CpG-Inseln als auch in direkter Umgebung zu Transkriptionsstartpunkten festgestellt werden, wodurch das insertionsbedingte Mutationsrisiko stark erhöht ist^{369,370}. Dabei wird

durch die Integration des Transgen-tragenden Virus in wichtige regulatorische Elemente oder Gene des Wirtsgenoms das Genexpressionsprofil der infizierten Zelle verändert. Welche unerwünschten Konsequenzen eine solche Insertion haben könnte, machte eine klinische SCID-Gentherapiestudie (engl. *severe combined immunodeficiency*) deutlich, bei der vier Patienten aufgrund der retroviralen Integration nahe verschiedener (Proto-)Onkogene eine T-Zell-Leukämie entwickelten³⁷¹. Abhilfe hinsichtlich einer unerwünschten Promotermethylierung sowie des Risikos der Insertionsmutagenese könnte beispielsweise die Verwendung eines lentiviralen Expressionssystems schaffen. Lentivirale Vektoren integrieren gleichmäßig über das gesamte Genom in die Wirts-DNA und verursachen damit eine geringere Gefahr für Insertionsmutagenesen als ihre onkoretroviralen Pendant^{369,372,373}. Außerdem enthalten lentivirale Promotoren einen geringeren Anteil an CpG-Dinukleotiden, weswegen sie weniger anfällig für ein Methylierungs-bedingtes Gen-*Silencing* sind^{369,374}. Ein weiterer Vorteil der Lentiviren oder auch von Adenovirus-basierten Transfersystemen ist, dass diese auch ruhende Zellen infizieren können, wodurch im Vergleich zu MoMLV-basierte Retroviren, welche nur proliferierende Zellen infizieren können, eine größere Anzahl an T-Zellen transduziert werden kann. Dadurch wäre ein therapeutischer TCR-Transfer nicht nur weniger kosten- bzw. zeitintensiv sondern auch mit einem geringeren Sicherheitsrisiko behaftet. Auch wären Nanopartikel als Transfersystem für den cTCR-1A.3/46 in Erwägung zu ziehen. Das Ziel wäre dabei, T-Zellen *in vivo* mit dem TCR auszustatten und eine *ex vivo* Manipulation der T-Zellen mit allen damit verbundenen Unsicherheiten zu umgehen. Dies wäre beispielsweise durch eine Administration von Nanopartikeln zu erreichen, die aufgrund gekoppelter Antikörper selektiv an T-Zellen binden^{375,376}. Denkbar wäre außerdem eine Verwendung von TCR-kodierender mRNA anstelle von DNA. Dazu könnte sowohl die TCR-kodierende mRNA nach Verpackung in Nanopartikeln direkt transferiert werden als auch eine Elektroporation der Effektorzellen mit der mRNA vor einer Transplantation erfolgen^{377,378}. Dies würde nicht nur die Gefahr einer Insertionsmutagenese eliminieren, sondern potentielle unerwünschte Begleiteffekte aufgrund der raschen Degradation von RNA zeitlich begrenzen^{377,378}.

Jedoch auch hinsichtlich der verwendeten Effektorzellen wären Optimierungen denkbar. So könnten beispielsweise γ : δ -T-Zellen mit dem CSF2RA-spezifischen α : β -TCR ausgestattet werden. Da diese Zellpopulation einen TCR bestehend aus einer γ - und einer δ -Kette exprimiert, ist eine Fehlpaarung mit dem exogen eingebrachten α : β -TCR vollständig ausgeschlossen^{379,380}.

Auch Virus-spezifische T-Zellen stellen vielversprechende Targets für einen TCR-Transfer dar, da durch Virus-spezifische Restimulation *in vivo* eine lang anhaltende Persistenz TCR-transgener Gedächtnis-T-Zellen erzielt werden kann^{381–384}. Ein aussichtsreicher Ansatz für den Erhalt langlebiger, TCR-transgener T-Zellen wäre andererseits die Verwendung von weniger differenzierten T-Zell-Vorläufern als Targetzellen für einen TCR-Transfer^{385–390}. Diese weisen aufgrund ihres Potentials, gezielt zu T-Zellen differenziert zu werden und der auf ihrem Selbsterneuerungspotential basierenden, möglicherweise länger andauernden Persistenz klare Vorteile gegenüber einem Transfer von peripheren, bereits differenzierten, TCR-transgenen Zellen auf¹⁵⁵.

Aufgrund der Expression von CSF2RA wäre eine Vielzahl von Malignomen, wie Melanome, myeloische Leukämien sowie Prostata-, Lungen-, Kolon-, Hirn-, Kopf-Hals-, Nieren-, Magen- und Ovarialkarzinome durch den CSF2RA-spezifischen cTCR-1A.3/46 targetierbar^{166,185–190}. Sein Zielantigen wird dabei HLA-unabhängig von dem TCR erkannt, wodurch auf HLA-Verlust oder Alterationen der Antigenprozessierungsmaschinerie basierende *Immune Escape*-Mechanismen effektiv umgangen

werden können. Für eine erfolgreiche Krebsimmuntherapie müssen jedoch noch zahlreiche weitere Barrieren überwunden werden (vgl. Abschnitt 1.2.2), weswegen das Augenmerk derzeit auf die Kombination verschiedener Immuntherapien bzw. von Immuntherapien mit Strahlen-/Chemotherapien gerichtet ist^{391–393}. Für Chemotherapeutika hat sich die Kombination verschiedener Zytostatika längst etabliert³⁹⁴. In Anbetracht der Vielzahl an Schritten, die für eine effiziente Anti-Krebs-Immunantwort adressiert werden müssen, erscheint die Kombination synergistisch wirkender Immuntherapeutika im Vergleich zu Monotherapien als äußerst vielversprechend^{391–393}. So müssen DC dazu in der Lage sein, die TAA aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren sowie die entsprechenden Signale dafür erhalten, aktiviert zu werden und in die Lymphknoten einzuwandern^{391,392}. Dort müssen sie dazu befähigt sein, die T-Zellen zu aktivieren, was unter anderem stark von einer fein aufeinander abgestimmten Interaktion von kostimulatorischen im Gegensatz zu koinhibitorischen Molekülen zwischen APC und T-Zelle abhängig ist^{391,392}. Letztere sollten daraufhin zum Tumorgewebe migrieren und dieses bestenfalls auch infiltrieren können^{391,392}. Hier müssen die T-Lymphozyten ihre Funktionalität und Effektorfunktion anhaltend ausüben können, um eine Vernichtung des Tumors zu ermöglichen^{391,392}. Aufgrund des stark einseitig geprägten Selektionsdrucks im Rahmen einer Monotherapie kann der Tumor jedoch schnell *Escape*-Mechanismen entwickeln und eine Resistenz gegenüber der entsprechenden Therapie erlangen. Synergistisch wirkende Therapieansätze, die den Tumor mit verschiedenen Mechanismen angreifen, vermindern diesen Selektionsdruck gegenüber einer einzelnen Therapie und erhöhen somit die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Tumorelimination.

So konnte zum Beispiel in einer Phase I/II-Studie gezeigt werden, dass die Kombination des monoklonalen anti-CTLA-4-Antikörpers Ipilimumab und des monoklonalen anti-PD-1-Antikörpers Nivolumab bei Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium bei gleichzeitig kontrollierbaren Nebenwirkungen in einer objektiven Ansprechrates von 53 % und raschen Tumorregressionen resultierte. Somit war die Kombination wesentlich wirksamer als die jeweiligen Antikörper in der Monotherapie^{116,395,396}. Auch für den adoptiven T-Zelltransfer wurden durch Koadministration von blockierenden monoklonalen anti-PD-1- oder anti-PD-L1-Antikörpern in präklinischen Studien deutliche Vorteile beobachtet. So konnte im B16-Melanom-Mausmodell gezeigt werden, dass anti-PD-L1-Antikörper zu einer verbesserten Aktivierung und erhöhten Persistenz der transferierten T-Zellen sowie in einer vermehrten Tumoreradikation durch CD8⁺ T-Zellen führten³⁹⁷. Auch in Kombination mit HER-2-spezifischen CAR-transgenen CD8⁺ T-Zellen führte eine simultane anti-PD-1-Therapie *in vivo* zu einer effizienteren Tumoreradikation^{398,399}. Diese Daten legen nahe, dass auch für eine erfolgreiche Therapie mit cTCR-1A.3/46-transgenen T-Zellen eine Kombination mit anderen Immuntherapiestrategien ratsam wäre, um eine effiziente und lang anhaltende Tumorremission zu erwirken.

Lediglich von der Kombination mit einer GM-CSF-basierten Therapie wäre im Hinblick auf die Behandlung hämatologischer Malignome unter Umständen abzuraten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass, sofern eine Assemblierung des vollständigen GM-CSF-Rezeptorkomplexes (CSF2RA + CSF2RB + GM-CSF) ermöglicht wird, die Reaktivität cTCR-1A.3/46-transgener PBMC gegenüber CSF2RA⁺ Targetzellen herabgesetzt ist (vgl. Abschnitt 3.3.2.2). Eine zusätzliche GM-CSF-Administration könnte somit einer gewünschten Eliminierung der Leukämiezellen durch die adoptiv transferierten TCR-transgenen T-Zellen entgegenwirken, wie bereits in Abschnitt 4.4 diskutiert wurde. Speziell hinsichtlich einer Therapie von Melanomen könnte eine GM-CSF-Administration zwar zu einer Proliferation der Tumorzellen^{400–402} und einer für die Tumorzellen förderlichen vermehrten Glucose-

und/oder Vitamin C-Aufnahme führen^{169,191,192}. Sofern, wie für Melanome bereits gezeigt, jedoch lediglich CSF2RA, nicht aber CSF2RB von den Tumorzellen exprimiert wird, wäre trotzdem zu erwarten, dass die Melanomzellen präferentiell eliminiert würden.

Als Alternative zu einem adoptiven TCR-Transfer könnten die variablen Domänen von TCR α - und TCR β -Kette (scTv, engl. *single chain TCR variable domain*) des cTCR-1A.3/46 direkt mit Radionukliden oder Toxinen wie dem Exotoxin A gekoppelt werden⁴⁰³. Ähnlich bispezifischen Antikörpern oder BiTEs (engl. *bispecific T-cell engagers*) wäre zudem analog zu scFv (engl. *single chain variable fragment*) von Antikörpern auch die Fusion der scTv-Domäne des cTCR-1A.3/46 mit Signalmediatoren, wie beispielsweise IL-2, IL-12 bzw. TNF, oder anderen scFv, wie möglicherweise des anti-CD3-scFv, denkbar^{43,403–406}. Dies hätte nicht nur den Vorteil, dass eine zeit- und kostenintensive *Ex vivo*-Manipulation der T-Zellen vermieden werden könnte, wodurch eine Umgehung des Insertionsmutageneserisikos erreicht würde. Auch würde sich die Möglichkeit bieten, bei Bedarf oder im Falle nicht tolerierbarer Nebenwirkungen die Therapie rasch zu terminieren. Darüber hinaus könnte die Generierung von scTv-Multimeren der Quantifizierung von CSF2RA-Protein auf Malignomzellen dienen und dazu beitragen, für eine Therapie in Frage kommende Patienten gezielt zu identifizieren^{43,407}

4.6 Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus dem Blut der Patientin Ma-Mel-86/INTH CTL-Klone generiert, die in HLA-unabhängiger Weise das Antigen CSF2RA erkannten. Aus einem dieser CTL-Klone wurde der TCR-1A.3/46 erfolgreich kloniert. Die Funktionalität des TCR wurde validiert und durch Chimärisierung optimiert. Ebenfalls HLA-unabhängig erkannte und lysierte der TCR nach Transduktion humaner sowie muriner T-Zellen eine Vielzahl maligner CSF2RA⁺ Zellen unterschiedlichen Ursprungs und bietet damit vielversprechende Voraussetzungen für einen therapeutischen Einsatz. So könnte ein adoptiver Transfer TCR-transgener T-Zellen beispielsweise zur Therapie solider oder hämatologischer Malignome oder als alternatives Konditionierungsregime vor einer Stammzelltransplantation zum Einsatz kommen, wodurch sowohl die mit konventionellen Therapien oft einhergehende Toxizität umgangen als auch das Rezidivrisiko vermindert werden könnte^{127,328}.

Nicht nur könnten durch Verwendung des HLA-unabhängigen TCR verschiedenste Tumor-*Immune Escape*-Mechanismen, wie beispielsweise Veränderungen der Antigenprozessierungsmaschinerie^{53,54} oder insbesondere der häufig auftretende HLA-Verlust^{52,55–57}, umgangen werden. Auch käme aufgrund der Unabhängigkeit von der HLA-Restriktion ein breites Patientenspektrum für eine adoptive Therapie mit cTCR-1A.3/46 transgenen T-Zellen in Frage.

Vorausgehende *In vivo*-Versuche in präklinischen Tiermodellen sind zunächst jedoch unerlässlich, um die Anti-Tumorreaktivität *in vivo*, aber auch das Gefahrenpotential eines TCR-Transfers evaluieren zu können. Zum einen stellt dabei die auf einer möglichen Fehlpaarung der retroviral transferierten, exogenen TCR-Ketten mit den endogenen TCR-Ketten der T-Zellen basierende *off-target*-Reaktivität ein potentiell Sicherheitsrisiko dar. Diese sollte jedoch aufgrund der erfolgten TCR-Chimärisierung weitgehend reduziert worden sein²⁴⁴. Zum anderen könnte auch eine *on-target*-Toxizität, insbesondere aufgrund der GM-CSF-Rezeptor-Expression auf verschiedenen normalen Zelltypen, wie beispielsweise hämatopoetischen Zellen¹, gravierende Auswirkungen haben. Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass durch Ausbildung des vollständigen GM-CSF-Rezeptor-Komplexes eine Blockade der Erkennung von CSF2RA erzielt werden kann, wäre durch eine Modulation der im Serum frei verfügbaren GM-CSF-Konzentration auch dieses Risiko eventuell kontrollierbar.

Hinsichtlich der Aufklärung des molekularen Erkennungsmechanismus von CSF2RA durch den cTCR-1A.3/46 konnten wichtige Aufschlüsse und Informationen erlangt werden. Es war jedoch bisher nicht möglich, den Mechanismus vollständig und im Detail aufzuklären. Zwar scheint er grundlegende Unterschiede zu dem bereits bekannten Erkennungsmechanismus des HLA-unabhängigen, soITRAIL-spezifischen CTL aufzuweisen⁴⁰, Analogien zum murinen CD155-reaktiven TCR, der sein Targetantigen ähnlich einem Antikörper zu erkennen scheint⁴¹, wären jedoch denkbar. Die Parallelen zu allen bereits bekannten Antigenen HLA-unabhängiger T-Zellen liegen allerdings darin, dass das Targetantigen für eine erfolgreiche Erkennung nach bisherigem Kenntnisstand intakt und membrangebunden an der Zelloberfläche präsentiert werden muss, um eine Erkennung durch CSF2RA-reaktive T-Zellen zu ermöglichen. Dies wird dadurch untermauert, dass lösliches CSF2RA zu keiner Erkennung durch CSF2RA-reaktive T-Zellen führte und auch die Ausbildung des heteromultimerischen GM-CSF-Rezeptor-Komplexes eine Erkennung stark reduzierte.

Die Entstehung der HLA-unabhängigen TCR-1A.3/46 und TCR-2C/417 ist jedoch weder durch das Keimbahnmodell noch durch das Selektionsmodell oder einer synergistischen Ergänzung beider Modelle²⁵⁷ direkt zu erklären, da die TCR nicht nur die typischen konservierten Aminosäuren aufweisen,

die für eine MHC-Restriktion verantwortlich gemacht werden^{259,261}, sondern die HLA-unabhängigen CTL auch intakte CD8-Moleküle exprimieren und diese an einer Erkennung der Antigene zumindest teilweise auch beteiligt sind. Die Bestimmung der Frequenz CSF2RA- bzw. TRP-2-reaktiver CTL in weiteren Patienten und in gesunden Individuen oder der Nachweis ihrer Existenz in QUAD-KO.Bcl-2Tg-Mäusen, könnte daher weitere Aufschlüsse liefern, ob die T-Zellen einer Thymusselektion entgangen sind oder ob sie ursprünglich eine andere, HLA-abhängige Spezifität aufwiesen, weswegen sie die Thymusselektion überstanden haben. In letzterem Fall würde es sich bei den HLA-unabhängigen Reaktivitäten um erst in der Peripherie manifest werdende Kreuzreaktivitäten durch Mimikri handeln. Auch wenn dies für den CSF2RA-reaktiven TCR nicht festgestellt werden konnte, exprimiert ca. 1 % der T-Zellen zwei verschiedene TCR β -Ketten und in ca. 30 % der T-Zellen werden sogar zwei unterschiedliche TCR α -Ketten exprimiert, wodurch sich zudem leicht mehrere Spezifitäten in ein und derselben T-Zelle ausbilden können^{408–410}.

Das daraus resultierende Wissen könnte Informationen darüber liefern, welche besonderen Eigenschaften HLA-unabhängige T-Zellen im Vergleich zu HLA-abhängigen CTL aufweisen, und eine gezielte Suche nach weiteren HLA-unabhängig erkannten Antigenen erleichtern. Rekombinantes CSF2RA-Protein bzw. daraus generierte Tetramere könnten wiederum dem Nachweis bzw. der Quantifizierung, der Isolation und Stimulation von CSF2RA-reaktiven T-Zellen dienen oder eine Visualisierung der direkten Interaktion zwischen CSF2RA und dem cTCR-1A.3/46 innerhalb der immunologischen Synapse ermöglichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Rahmen dieser Arbeit möglich war, einen CSF2RA-reaktiven TCR mit hoher Spezifität für sein Targetantigen zu klonieren und zu optimieren, der aufgrund seiner HLA-unabhängigen Erkennungsweise vielversprechende Vorteile für eine therapeutische Anwendung im Hinblick auf eine Vielzahl an Malignomen unterschiedlichen Ursprungs bietet.

5 Anhang

5.1 cDNA- und Aminosäuresequenzen

5.1.1 cDNA- und Aminosäure-Sequenz* TCR-1A.3/46

Leader-Sequenz	CDR	P/N-Nukleotide	konservierte Aminosäuren
variable Region	Diversitätsregion	„Junction“-Region	konstante Domäne

TCR α -Kette:

ATGTCACCTTTCTAGCCTGCTGAAGGTGGTCACAGCTTCACTGTGGCTAGGACCTGGCATTGCCCAGAAGATAACT
 CAAACCCAACCAGGAATGTTCTGTCAGGAAAAGGAGGCTGTGACTCTGGACTGCACATATGACACCACTGATCCA
 AGTTATGGTCTATTCTGGTACAAGCAGCCAGCAGTGGGGAAATGATTTTCTTATTTATCAGGGGTCTTATGAC
 CAGCAAAATGCAACAGAAGGTCGCTACTCATTGAATTTCCAGAAGGCAAGAAAATCCGCCAACCTTGTCTATCTCC
 GCTTCACAACTGGGGGACTCAGCAATGTACTTCTGTSCAATGAGACCCCACCTTTGGAAATGAGAAATTAACCTTT
 GGGACTGGAACAAGACTCACCATCATACCCAATATCCAGAACCCTGACCCGTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCT
 AAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCT
 GATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGTGGCCTGG
 AGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGC
 CCAGAAAGTTCTGTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAACTTTCAAACCTG
 TCAGTGATTGGGTTCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGCCGGGTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCC
 AGCTGA

MSLSLLKVVVASLWLGPGLIAQKITQTQPGMFVQEKEAVTLDCITYDTSDPSYGLFWYKQPSSGEMIFLIYQGSYD
 QQNATEGRYSLNFQKARKSANLVISASQLGDSAMYFCAMRPHFGNEKLTFGTGTRLTIIPNIQNPDPVAVYQLRDS
 KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS
 PESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS.

TCR β -Kette:

ATGGGCACAAGGTTGTTCTTCTATGTGGCCCTTTGTCTCCTGTGGACAGGACACATGGATGCTGGAATCACCCAG
 AGCCCAAGACACAAGGTCACAGAGACAGGAACACCAGTGACTCTGAGATGTCACCAGACTGAGAACCACCGCTAT
 ATGTACTGGTATCGACAAGACCCGGGGCATGGGCTGAGGCTGATCCATTACTCATATGGTGTAAAGATACTGAC
 AAAGGAGAAGTCTCAGATGGCTATAGTGCTCTAGATCAAAGACAGAGGATTTCTCTCTCACTCTGGAGTCCGCT
 ACCAGCTCCAGACATCTGTGTACTTCTGTSCCATCAGTGAGAGCTAGCGGGGGCCTACGAGCAGTACTTCGGG
 CCGGGCACCAAGGCTCACGGTCACAGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCA
 GAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCGACCACGTGGAG
 CTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGTCAGCACAGACCCGACGCCCTCAAGGAGCAGCCC
 GCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGCAAC
 CACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTC
 ACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTACCTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGGTC
 CTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAGTGCCTCGTG
 CTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAG

MGTRLFFFYVALCLLWTHMDAGITQSPRHKVETETGTPVTLRCHQTENHRYMYWYRQDPGHGLRLIHYSYGVKDT
 KGEVSDGYSVSRSKTEDFLLTLESATSSQTSVYFCATSEKLAGAYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEP
 EAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRN
 HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVQTIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLKATLYAVLVSA
 LMAMVKRKDSRG.

(*) Die verwendete Nummerierung richtet sich nach dem IMGT-System^{239,253,254}

5.1.2 cDNA- und Aminosäure-Sequenz cTCR-1A.3/46

Leader-Sequenz	CDR	P/N-Nukleotide	konservierte Aminosäuren
variable Region	Diversitätsregion	„Junction“-Region	konstante Domäne
Cystein für zusätzliche Disulfidbrücke			

cTCR α -Kette:

ATGTCACCTTTCTAGCCTGCTGAAGGTGGTCACAGCTTCACTGTGGCTAGGACCTGGCATTGCCAGAAAGATAACT
 CAAACCAACCAGGAATGTTCTGTCAGGAAAAGGAGGCTGTGACTCTGGACTGCACATATGACACCACTGATCCA
 AGTTATGGTCTATTCTGGTACAAGCAGCCAGCAGTGGGGAAATGATTTTTCTTATTTATCAGGGGTCTTATGAC
 CAGCAAAATGCAACAGAAGGTGCTACTCATTGAATTTCCAGAAGGCAAGAAAATCCGCCAACCTTGTCTATCTCC
 GCTTCACAACCTGGGGGACTCAGCAATGTACTTCTGTSCAATGAGA CCCCACCTTTGGAAATGAGAAATTAACCTTT
 GGGACTGGAACAAGACTCACCATCATACCCAATATCCAGAATCCTGAACCTGCCGTGTATCAGCTGAAAGATCCC
 CGGTCCAGGATTCCACACTGTGTCTGTTTACCGATTTTGATTTCCAGATTAATGTGCCATAAACAATGGAATCC
 GGGACCTTTATCACCGACAAATGTGTGCTGGATATGAAAGCCATGGATTCCAAGAGCAATGGGGCCATTGCCTGG
 TCTAATCAGACATCCTTCACATGCCAGGATATCTTTAAAGAAACCAATGCCACATAACCCCTCCTCCGATGTGCC
 TGTGATGCCACACTGACAGAAAAGTCTTTCGAAACCGATATGAATCTGAATTTTCAGAATCTGTCTGTGATGGGG
 CTGCGGATTCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGGTTTAATCTGCTGATGACACTGAGACTGTGGAGCAGC

MSLSLLKVVVTASLWLGPGLIAQKITQTQPGMFVQEKEAVTLDCTYDTS DPSYGLFWYKQPSSGEMIFLIYQGSYD
 QQNATEGRYSLNFKARKSANLVISASQLGDSAMYFCAMRPHFGNEKLTFGTGTRLTIIPNIQNPEPAVYQLKDP
 RSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKLVLDKAMD SKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVP
 CDATLTEKSFETDMNLFQNL SVMGLRILLK VAGFNLLMTLRLWSS.

cTCR β -Kette:

ATGGGCACAAGGTTGTTCTTCTATGTGGCCCTTTGTCTCCTGTGGACAGGACACATGGATGCTGGAATCACCCAG
 AGCCCAAGACACAAGGTCACAGAGACAGGAACACCAGTGACTCTGAGATGTCACCAGACTGAGAACCACCGCTAT
 ATGTACTGGTATCGACAAGATCCGGGGCATGGGCTGAGGCTGATCCATTACTCATATGGTGTATAAGATACTGAC
 AAAGGAGAAGTCTCAGATGGCTATAGTGTCTCTAGATCAAAGACAGAGGATTTCTCTCCTCACTCTGGAGTCCGCT
 ACCAGCTCCCAGACATCTGTGTACTTCTGTSCCATCAGTGAG AAGCTAGCGGGGGCTACGAGCAGTACTTCGGG
 CCGGGCACCAAGGCTCACGGTCAAGAGGACCTGCGGAACGTGACCCCCCAAGGTGTCCCTGTTCGAGCCCAGC
 AAGGCCGAGATCGCCAACAAGCAGAAAGCCACCCTGGTGTGCCCTGGCCAGGGGCTTCTTCCCCGACCACGTGGAG
 CTGTCTTGGTGGGTGAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCTCTGCACCGACCCCAAGGCTTACAAAGAGAGCAAC
 TACAGCTACTGCCTGTCTCTCCCGGCTGCGGGTGTCCGCCACCTTCTGGCACAACCCCGGAACCACTTCGGGTGC
 CAGGTGCAGTTCCACGGCCTGAGCGAAGAGGACAAGTGGCCCCAGGGCAGCCCCAAGCCGTGACCCAGAACATC
 TCCGCCGAGGCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCATCACCAGCGCCAGCTACCACAGGGCGTGTGTCTGCCACC
 ATCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACACTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGGCCTGGTGTGATGGCCATG
 GTGAAGAAAAAGAATTCTTGA

MGTRLFFYVALCLLWTHMDAGITQSPRHKVTETGTPVTLRCHQTE NHR MYWYRQDPGHGLRLIHSYGVKDT
 KGEVSDGYSVSRKTEDFLLTLESATSSQTSVYFCAISEKLAGAYEQYFGPGTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPS
 KAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRC
 QVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYHQVLSATILYEILLGKATLYAVLVSGLVLMAM
 VKKKNS.

5.1.3 cDNA- und Aminosäuresequenz p2A-Element

Der Pfeil zeigt die durch *ribosome skipping* bedingte Spaltungsstelle an.

GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT

GS GATNFSLLKQAGDVEENPG ↓ P

5.1.4 Aminosäure-Sequenz CSF2RA/CSF2RB

Transmembrandomäne

WSXWS-Motiv

Disulfidbrücke

N-Glykosylierungsstelle

Phosphorylierungsstelle

Interaktion zwischen CSF2RA und GM-CSFInteraktion zwischen CSF2RA und CSF2RB

CSF2RA-Isoform a (membranständig; NG 012280.1, NM 172245.2, NP 758448.1):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEKSDLRTVAPASSLNVRFDSTMTNLSWDCQENTTFISKCFITDKKNRVVEPRLS
 NNECSCTFREICLHEGVTFEVHVNTSQRGFQOKLLYPNSGREGTAAQNFSEFIYNADLMNCTWARGPTAPRDVQY
 FLYIRNSKRREIRCPYYIQDSGTHVGCCHLDNLSGLTSRNYFLVNGTSREIGIQFFDSLDDTKKIERFNPPSNVT
 VRCNTTHCLVRWKQPRTYQKLSYLDQYQLDVHRKNTQPGTENLLINVSGDLENRYNFPSSSEPRAKHSVKIRAAD
 VRILMSSWSAEIEFGSDDGNLGSVYIYVLLIVGTLVCGIVLGFLFKRFLRIQRLFPFPVQIKDKLNDNHEVEDE
 IIWEEFTPEEGKGYREEVLTVKEIT

CSF2RA-Isoform c (löslich; NG 012280.1, NM 172247.2; NP 758450.1):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEKSDLRTVAPASSLNVRFDSTMTNLSWDCQENTTFISKCFITDKKNRVVEPRLS
 NNECSCTFREICLHEGVTFEVHVNTSQRGFQOKLLYPNSGREGTAAQNFSEFIYNADLMNCTWARGPTAPRDVQY
 FLYIRNSKRREIRCPYYIQDSGTHVGCCHLDNLSGLTSRNYFLVNGTSREIGIQFFDSLDDTKKIERFNPPSNVT
 VRCNTTHCLVRWKQPRTYQKLSYLDQYQLDVHRKNTQPGTENLLINVSGDLENRYNFPSSSEPRAKHSVKIRAAD
 VRILMSSWSAEIEFGSLGYSGCSRQFHRSKTN

CSF2RB-Isoform 1 (membranständig; NG 008040.1, NM 000395.2, NP 000386.1):

MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETIPLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRLVNTLIRRVNEDLLEPVSC
 DLSDMPWSAAPHPRVPRRVIPCSQSFVVDVDYFSFQPDRLGLTRTLTVTLTQHVQPPEPRDLQISTDQDHFLL
 TWSVALGSPQSHWLSPGDLEFEVVYKRLQDSWEDAAILLNSTSQATLGPEHLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGR
 PSKWSPEVCWDSQPGDEAQPQNLEFFDGAAVLCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGEEECSPVLREGLGSL
 HTRRHQIPVPDPATHGQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSLNVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFEIQ
 YRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPALEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWESEARSWDTESVLPMWVLALIVI
 FLTIAVLLALRFCGIYGYRLRRKWEKIPNPSKSHLFQNGSAELWPPGMSAFTSGSPPHQGPWGSRFPELEGVF
 PVGFGDSEVSPLTIEDPKHVCDPPSGPDTPAASDLPTEQPPSPQPGPPAASHTPEKQASSFDFNGPYLGPPHSR
 SLPDILGQPEPPQEGGSQKSPPPGSLEYLCLPAGGQVQLVPLAQAMGPGQAVEVERRPSQGAAGSPSLESGGGA
 PPALGPRVGGQDQKDSVAIPMSSGDTEDPGVASGYVSSADLVFTPNSGASSVSLVPSLGLPSDQTPSLCPGLAS
 GPPGAPGPVKSGFEGYVELPPIEGRSPRSPRNNPVPPEAKSPVLNPGERPADVSPSPQPEGLLVLQQVGDYCF
 PGLGPGPLSLRSKPSSPGPGPEIKNLDQAFQVKKPPGQAVPQVPVIQLFKALKQQDYLSLPPWEVNKPGEVC

CSF2RB-Isoform X1 (membranständig; NG 008040.1, XM 005261340.1, XP 005261397.1):

MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETIPLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRLVNTLIRRVNEDLLEPVSC
 DLSDMPWSAAPHPRVPRRVIPCSQSFVVDVDYFSFQPDRLGLTRTLTVTLTQHVQPPEPRDLQISTDQDHFLL
 TWSVALGSPQSHWLSPGDLEFEVVYKRLQDSWEDAAILLNSTSQATLGPEHLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGR
 PSKWSPEVCWDSQPGDEAQPQNLEFFDGAAVLCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGSAVLLREEECSPVLR
 EGLSLHTRRHQIPVPDPATHGQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSLNVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHID
 HTFEIQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPALEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWESEARSWDTESVLPMWV
 LALIVIFLTIAVLLALRFCGIYGYRLRRKWEKIPNPSKSHLFQNGSAELWPPGMSAFTSGSPPHQGPWGSRF
 ELEGVFPVGFSDSEVSPLTIEDPKHVCDPPSGPDTPAASDLPTEQPPSPQPGPPAASHTPEKQASSFDFNGPYL
 GPPHSRSLPDILGQPEPPQEGGSQKSPPPGSLEYLCLPAGGQVQLVPLAQAMGPGQAVEVERRPSQGAAGSPSLE
 SGGGAPPALGPRVGGQDQKDSVAIPMSSGDTEDPGVASGYVSSADLVFTPNSGASSVSLVPSLGLPSDQTPSL
 CPGLASGPPGAPGPVKSGFEGYVELPPIEGRSPRSPRNNPVPPEAKSPVLNPGERPADVSPSPQPEGLLVLQQV
 GDYCFPLPGLGPGPLSLRSKPSSPGPGPEIKNLDQAFQVKKPPGQAVPQVPVIQLFKALKQQDYLSLPPWEVNKP
 EVC

5.1.5 Aminosäure-Sequenz CD8α/CD8β

CD8α-Isoform 1 (membranständig; NG 011608.2, NM 001145873.1 bzw. NM 001768.6; NP 001139345.1 bzw. NP 001759.3):

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQ
NKPKAEEGLDTRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKS
DKPSLSARYV

CD8β-Isoform 2 (membranständig; NM 172213.3, NP 757362.1):

rs2228022

rs35555413

MRPRLWLLLAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFL
ALWDSAKGTIHGEEVEQEKIIVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPT
TAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGILVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQPQG
EGVSGTFVPQCLHGYYSNTTTSQKLLNPWILKT

CD8β-Isoform 3 (membranständig; NM 172101.3, NP 742099.1):

MRPRLWLLLAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDS
AKGTIHGEEVEQEKIIVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTL
KKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGILVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQLRLHPLEKCSRMDY

CD8β-Isoform 5 (membranständig; NM 004931.4, NP 004922.1):

MRPRLWLLLAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDS
AKGTIHGEEVEQEKIIVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTL
KKRVCRLPRPETQKRRRRARLRFMKQPQGEVSGTFVPQCLHGYYSNTTTSQKLLNPWILKT

5.2 Vektorkarten

5.2.1 Vektorkarten pcDNA3.1

5.2.1.1 Vektorkarte pcDNA3.1/V5-His TOPO

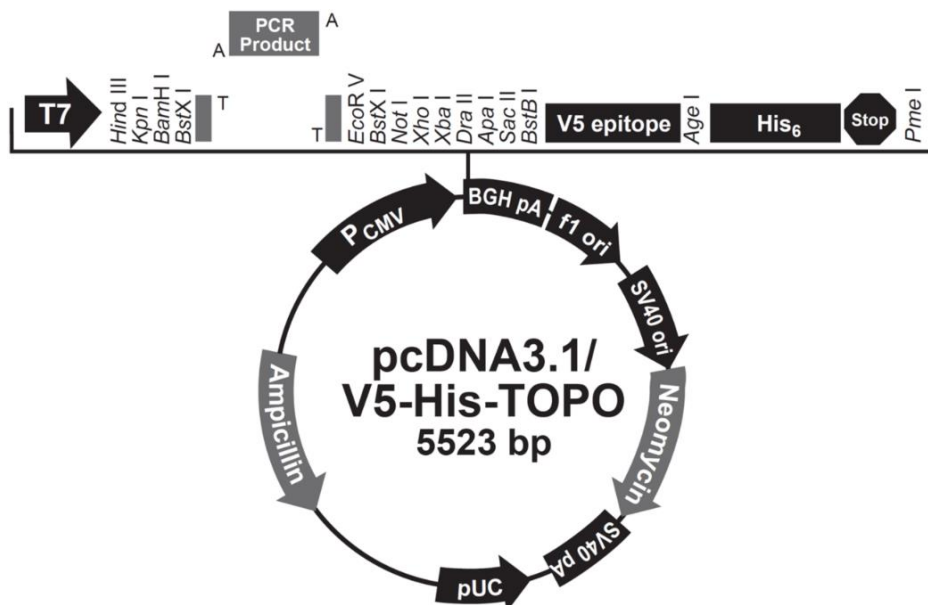


Abb. 5-1: Vektorkarte pcDNA3.1/V5-His TOPO. BGH pA: Polyadenylierungssignal des Rinder-Wachstumshormogens (engl. *bovine growth hormone*), f1 ori: Replikationsursprung (engl. *origin of replication*) des f1 Phagen, His₆: Polyhistidintag, pCMV: Promoter des humanen Cytomegalievirus, pUC: pUC-Plasmid-Replikationsursprung, SV40 ori: Replikationsursprung des *Simian Virus 40*, SV40 pA: Polyadenylierungssignal des *Simian Virus 40*, T7: RNA-Promoter des Bakteriophagen T7, V5: V5-Epitop-Tag. (Benutzerhandbuch „pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit“; Invitrogen; April 2009)

5.2.1.2 Vektorkarte pcDNA3.1-DEST

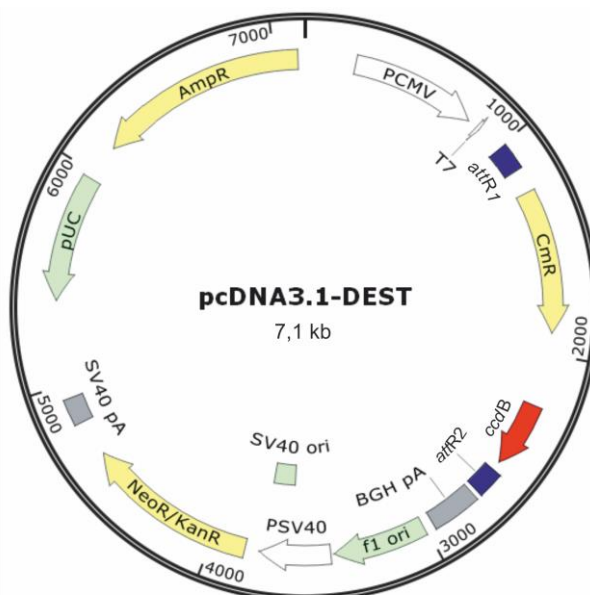


Abb. 5-2: Vektorkarte pcDNA3.1-DEST. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen, att: Rekombinationssequenz des Bakteriophagen Lambda (engl. *attachment site*), BGH pA: Polyadenylierungssignal des Rinder-Wachstumshormogens (engl. *bovine growth hormone*), ccdB: Toxigen des ccd-Systems (engl. *control of cell death*), CmR: Chloramphenicol-Resistenzgen, f1 ori: Replikationsursprung (engl. *origin of replication*) des f1 Phagen, KanR: Kanamycin-Resistenzgen, NeoR: Neomycin-Resistenzgen, PCMV: Promoter des humanen Cytomegalievirus, PSV40: Promoter des *Simian-Virus 40*, pUC: pUC-Plasmid-Replikationsursprung, SV40 ori: Replikationsursprung des *Simian-Virus 40*, SV40 pA: Polyadenylierungssignal des *Simian-Virus 40*, T7: RNA-Promoter des Bakteriophagen T7.

5.2.2 Vektorkarten pDONRTM221

5.2.2.1 Vektorkarte pDONRTM221 P1-P2

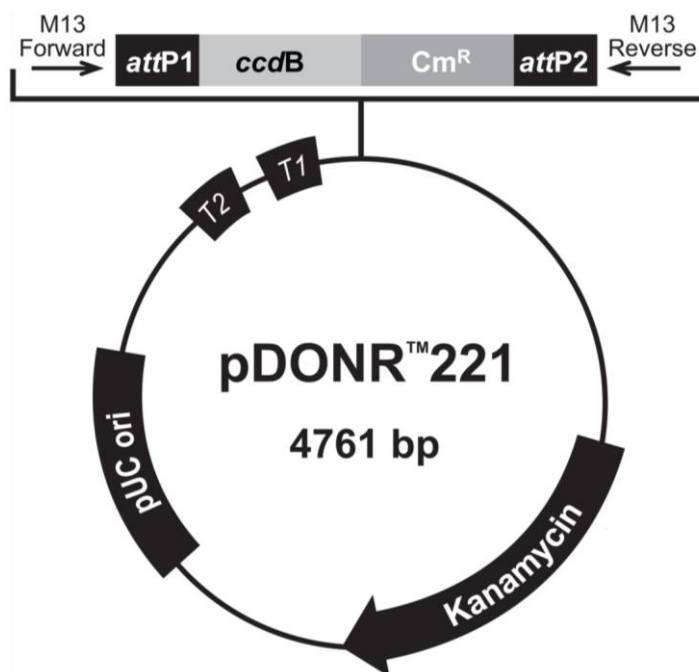


Abb. 5-3: Vektorkarte pDONRTM221 P1-P2. att: Rekombinationssequenz des Bakteriophagen Lambda (engl. *attachment site*), ccdB: Toxigen des ccd-Systems (engl. *control of cell death*), CmR: Chloramphenicol-Resistenzgen, M13: Sequenzierungsprimersequenz des Bakteriophagen M13, pUC ori: pUC-Plasmid-Replikationsursprung (engl. *origin of replication*), T2/T7: T2 und T7 Transkriptionsterminatoren des ribosomalen rRNA-Operons (*rnnB*) aus *E. coli*. (Benutzerhandbuch „MultiSite Gateway® Pro“; Invitrogen; Oktober 2006)

5.2.2.2 Vektorkarte pDONRTM221 P1-P5r

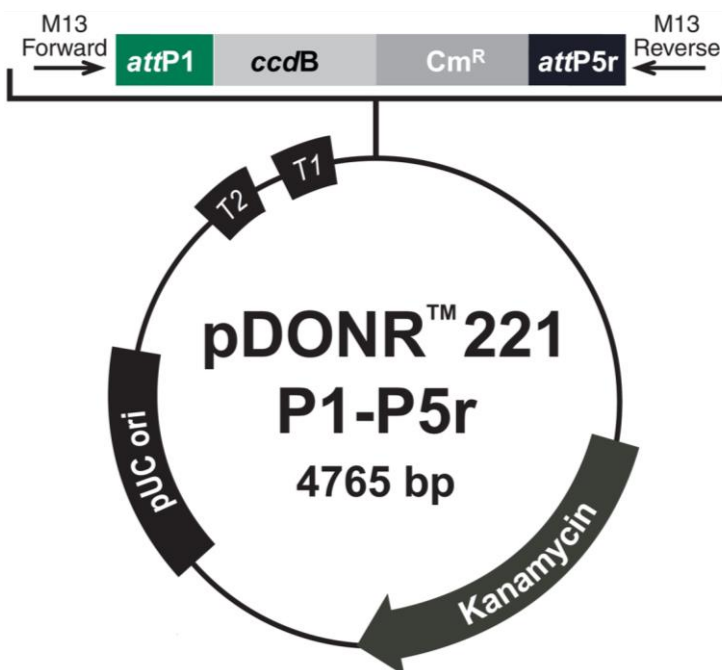


Abb. 5-4: Vektorkarte pDONRTM221 P1-P5r. att: Rekombinationssequenz des Bakteriophagen Lambda (engl. *attachment site*), ccdB: Toxigen des ccd-Systems (engl. *control of cell death*), CmR: Chloramphenicol-Resistenzgen, M13: Sequenzierungsprimersequenz des Bakteriophagen M13, pUC ori: pUC-Plasmid-Replikationsursprung (engl. *origin of replication*), T2/T7: T2 und T7 Transkriptionsterminatoren des ribosomalen rRNA-Operons (*rnnB*) aus *E. coli*. (Benutzerhandbuch „MultiSite Gateway® Pro“; Invitrogen; Oktober 2006)

5.2.2.3 Vektorkarte pDONR™221 P5-P2

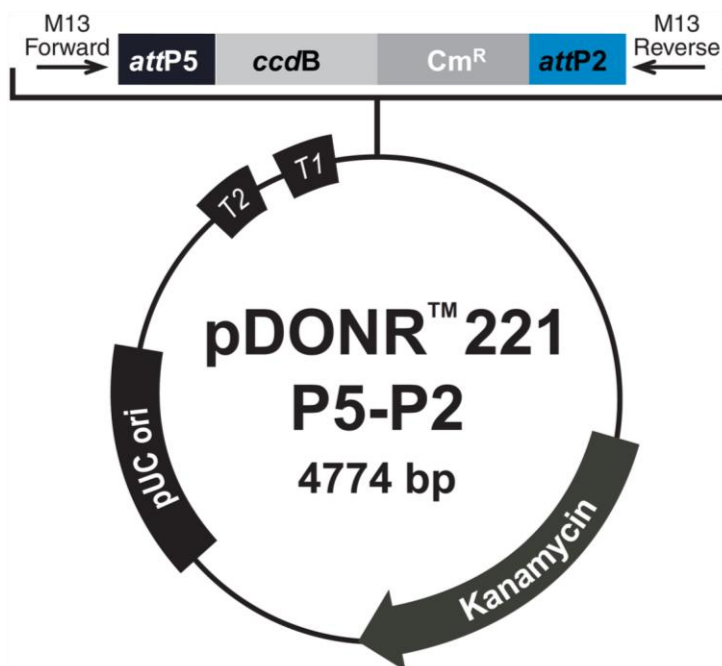


Abb. 5-5: Vektorkarte pDONR™221 P5-P2. *att*: Rekombinationssequenz des Bakteriophagen Lambda (engl. *attachment site*), *ccdB*: Toxigen des *ccd*-Systems (engl. *control of cell death*), *CmR*: Chloramphenicol-Resistenzgen, M13: Sequenzierungsprimersequenz des Bakteriophagen M13, pUC ori: pUC-Plasmid-Replikationsursprung (engl. *origin of replication*), T2/T7: T2 und T7 Transkriptionsterminatoren des ribosomalen rRNA-Operons (*rnnB*) aus *E. coli*. (Benutzerhandbuch „MultiSite Gateway® Pro“; Invitrogen; Oktober 2006)

5.2.3 Vektorkarte pBullet IRES neo-DEST

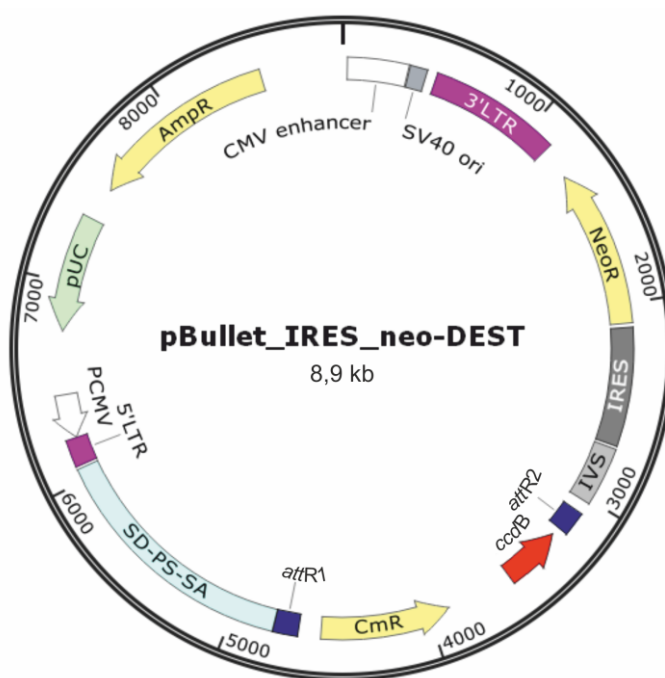


Abb. 5-6: Vektorkarte pBullet_IRES_neo-DEST. *AmpR*: Ampicillin-Resistenzgen, *att*: Rekombinationssequenz des Bakteriophagen Lambda (engl. *attachment site*), *ccdB*: Toxigen des *ccd*-Systems (engl. *control of cell death*), *CmR*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *IRES*: interne ribosomale Eintrittsstelle, *IVS*: Intron (engl. *intervening sequence*), *LTR*: retrovirale Rekombinationssequenzen (engl. *long terminal repeats*), *NeoR*: Neomycin-Resistenzgen, *PCMV*: Promoter des humanen Cytomegalievirus, *PS*: retrovirales Verpackungssignal (engl. *packaging signal*), *SV40*: Promoter des *Simian Virus 40*, *pUC*: pUC-Plasmid-Replikationsursprung, *SA*: Spleißakzeptor, *SD*: Spleißdonor, *SV40 ori*: Replikationsursprung des *Simian-Virus 40*, *SV40 pA*: Polyadenylierungssignal des *Simian Virus 40*, *T7*: RNA-Promoter des Bakteriophagen T7

5.2.4 Vektorkarte pHIT-60 und pCOLT-CALV

Die Vektoreigenschaften und Klonierungsstrategien sind in Soneoka *et al.* (1995)¹⁹⁷ und Weijtens *et al.* (1998)¹⁹⁵ beschrieben.

5.2.5 Vektorkarte pCL-ECO

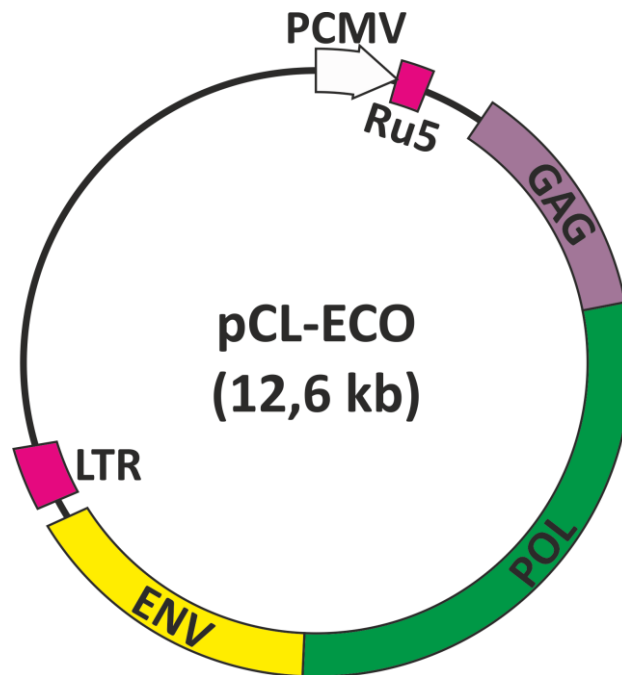


Abb. 5-7: Vektorkarte pCL-ECO. CMV: Promoter des humanen Cytomegalievirus, ENV: Gen kodierend für virale Hüllprotein (engl. *envelope*), GAG: Gen kodierend für die Strukturproteine des Virus (engl. *group-specific antigen*), POL: Gen kodierend für retrovirale Polymerase, LTR: retrovirale Rekombinationssequenzen (engl. *long terminal repeats*), Ru5: Ru5-Region der 5'-LTR. Adaptiert aus Naviaux *et al.* (1996)¹⁹⁶

5.2.6 Vektorkarte pMX

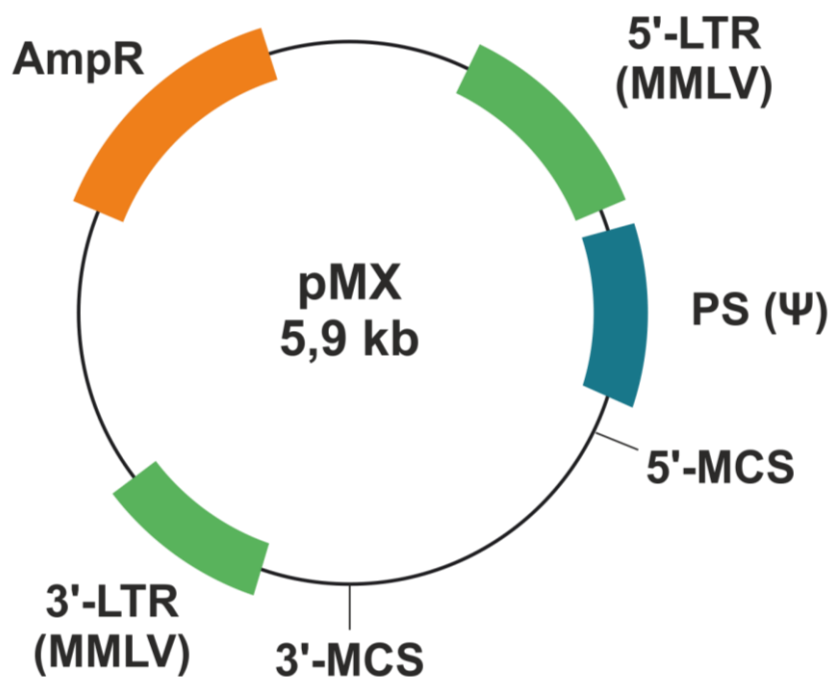


Abb. 5-8: Vektorkarte pMX. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen, LTR: engl. *long terminal repeats*, MCS: engl. *multiple cloning site*, PS: retrovirales Verpackungssignal (engl. *packaging signal*).

Literaturverzeichnis

1. Murphy, K. M. *Janeway's Immunobiology, 8th Edition*. (Garland Science, 2012).
2. Clark, R. & Kupper, T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 629–637 (2005).
3. Delves, P. J. & Roitt, I. M. The Immune System. *N. Engl. J. Med.* **343**, 37–49 (2000).
4. Kontermann, R. E. *Bispecific Antibodies*. (Springer, 2011).
5. Paul, W. E. *Fundamental Immunology*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2012).
6. Kara, E. E. *et al.* Tailored Immune Responses: Novel Effector Helper T Cell Subsets in Protective Immunity. *PLoS Pathog* **10**, e1003905 (2014).
7. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **136**, 2348–2357 (1986).
8. Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* **30**, 626–635 (2009).
9. Leahy, D. J. A structural view of CD4 and CD8. *FASEB J.* **9**, 17–25 (1995).
10. Leahy, D. J., Axel, R. & Hendrickson, W. A. Crystal structure of a soluble form of the human T cell coreceptor CD8 at 2.6 Å resolution. *Cell* **68**, 1145–1162 (1992).
11. Girardi, M. Immunosurveillance and Immunoregulation by $\gamma\delta$ T Cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 25–31 (2006).
12. Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J. & Van Kaer, L. NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 231–237 (2004).
13. Holtmeier, W. & Kabelitz, D. $\gamma\delta$ T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem. Immunol. Allergy* **86**, 151–183 (2005).
14. Van Kaer, L., Parekh, V. V. & Wu, L. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res.* **343**, 43–55 (2011).
15. McClory, S. *et al.* Evidence for a stepwise program of extrathymic T cell development within the human tonsil. *J. Clin. Invest.* **122**, 1403–1415 (2012).
16. Germain, R. N. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 309–322 (2002).
17. Schietinger, A. & Greenberg, P. D. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* **35**, 51–60 (2014).
18. Srinivasan, M. & Frauwirth, K. A. Peripheral tolerance in CD8+ T cells. *Cytokine* **46**, 147–159 (2009).
19. Curtsinger, J. M. *et al.* Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naive CD4+ and CD8+ T Cells. *J. Immunol.* **162**, 3256–3262 (1999).
20. Williams, M. A. & Bevan, M. J. Effector and Memory CTL Differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 171–192 (2007).
21. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
22. Kaech, S. M., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 251–262 (2002).
23. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
24. Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M. & Lugli, E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* **43**, 2797–2809 (2013).
25. Rudolph, M. G., Stanfield, R. L. & Wilson, I. A. How Tcrs Bind Mhcs, Peptides, and Coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 419–466 (2006).
26. Call, M. E., Pyrdol, J., Wiedmann, M. & Wucherpfennig, K. W. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* **111**, 967–979 (2002).
27. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–242 (2013).
28. Abraham, R. T. & Weiss, A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 301–308 (2004).
29. Sijts, E. J. a. M. & Kloetzel, P. M. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **68**, 1491–1502 (2011).
30. Neefjes, J., Jongsma, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 823–836 (2011).
31. Williams, D. B., Vassilakos, A. & Suh, W.-K. Peptide presentation by MHC class I molecules. *Trends Cell Biol.* **6**, 267–273 (1996).
32. Kobayashi, K. S. & van den Elsen, P. J. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 813–820 (2012).
33. Basha, G. *et al.* A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nat. Immunol.* **13**, 237–245 (2012).

34. Blander, J. M. & Nair-Gupta, P. An updated view of the intracellular mechanisms regulating cross-presentation. *Mol. Innate Immun.* **4**, 401 (2013).
35. Barnd, D. L., Lan, M. S., Metzgar, R. S. & Finn, O. J. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 7159–7163 (1989).
36. Ioannides, C. G. *et al.* Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **151**, 3693–3703 (1993).
37. Noto, H. *et al.* Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin. *Int. Immunol.* **9**, 791–798 (1997).
38. Finn, O. J. *et al.* MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.* **145**, 61–89 (1995).
39. Wang, Q. J., Hanada, K.-I. & Yang, J. C. Characterization of a novel nonclassical T cell clone with broad reactivity against human renal cell carcinomas. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 3769–3776 (2008).
40. Hanada, K., Wang, Q. J., Inozume, T. & Yang, J. C. Molecular identification of an MHC-independent ligand recognized by a human $\alpha\beta$ T-cell receptor. *Blood* **117**, 4816–4825 (2011).
41. Tikhonova, A. N. *et al.* $\alpha\beta$ T cell receptors that do not undergo major histocompatibility complex-specific thymic selection possess antibody-like recognition specificities. *Immunity* **36**, 79–91 (2012).
42. Almeida, C. A. & Barry, S. A. *Cancer: Basic Science and Clinical Aspects*. (John Wiley & Sons, 2011).
43. Lubojanski, S. Identifizierung und Charakterisierung T-zellerkannter Tumorantigene im Melanommodell MA-MEL-86. (2012).
44. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
45. Ehrlich, P. *Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung*. (1908).
46. Lawrence, H. S. *Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states: a symposium held at the New York Academy of Medicine*. (P.B. Hoeber, 1959).
47. Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13**, 1–27 (1970).
48. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
49. Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 95–109 (2002).
50. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329–360 (2004).
51. Du, C. & Wang, Y. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **30**, 12 (2011).
52. Jäger, E. *et al.* Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **71**, 142–147 (1997).
53. Heink, S., Fricke, B., Ludwig, D., Kloetzel, P.-M. & Krüger, E. Tumor cell lines expressing the proteasome subunit isoform LMP7E1 exhibit immunoproteasome deficiency. *Cancer Res.* **66**, 649–652 (2006).
54. Chen, H. L. *et al.* A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat. Genet.* **13**, 210–213 (1996).
55. Honma, S. *et al.* Biological-clinical significance of selective loss of HLA-class-I allelic product expression in squamous-cell carcinoma of the uterine cervix. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **57**, 650–655 (1994).
56. Keating, P. J. *et al.* Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br. J. Cancer* **72**, 405–411 (1995).
57. So, T. *et al.* Haplotype loss of HLA class I antigen as an escape mechanism from immune attack in lung cancer. *Cancer Res.* **65**, 5945–5952 (2005).
58. Rosenberg, S. A. *et al.* Cell transfer therapy for cancer: lessons from sequential treatments of a patient with metastatic melanoma. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* **26**, 385–393 (2003).
59. Garcia-Lora, A., Algarra, I. & Garrido, F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J. Cell. Physiol.* **195**, 346–355 (2003).
60. Lanier, L. L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 225–274 (2005).
61. Le Maux Chansac, B. *et al.* NK cells infiltrating a MHC class I-deficient lung adenocarcinoma display impaired cytotoxic activity toward autologous tumor cells associated with altered NK cell-triggering receptors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 5790–5798 (2005).
62. Doubrovina, E. S. *et al.* Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 6891–6899 (2003).
63. Groh, V., Wu, J., Yee, C. & Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**, 734–738 (2002).

64. Le Gal, F. A. *et al.* HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* **11**, 1351–1356 (1999).
65. Rajagopalan, S. & Long, E. O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.* **189**, 1093–1100 (1999).
66. Iwai, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12293–12297 (2002).
67. Pasero, C. & Olive, D. Interfering with coinhibitory molecules: BTLA/HVEM as new targets to enhance anti-tumor immunity. *Immunol. Lett.* **151**, 71–75 (2013).
68. Norde, W. J., Hobo, W., van der Voort, R. & Dolstra, H. Coinhibitory molecules in hematologic malignancies: targets for therapeutic intervention. *Blood* **120**, 728–736 (2012).
69. Strand, S. *et al.* Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion? *Nat. Med.* **2**, 1361–1366 (1996).
70. Toyoshima, T. *et al.* Expression of tumor-associated antigen RCAS1 and its possible involvement in immune evasion in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **35**, 361–368 (2006).
71. Thomas, D. A. & Massagué, J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**, 369–380 (2005).
72. Salazar-Onfray, F. Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance. *Med. Oncol.* **16**, 86–94 (1999).
73. Gabrilovich, D. I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 1096–1103 (1996).
74. Camby, I., Mercier, M. L., Lefranc, F. & Kiss, R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* **16**, 137R–157R (2006).
75. Akasaki, Y. *et al.* Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 4352–4359 (2004).
76. Fallarino, F. *et al.* The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 6752–6761 (2006).
77. Rodriguez, P. C. *et al.* L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 1232–1239 (2003).
78. Rodriguez, P. C. *et al.* Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J. Biol. Chem.* **277**, 21123–21129 (2002).
79. Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D. & Sotomayor, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 267–296 (2007).
80. Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 71–78 (2004).
81. Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P. & Adema, G. J. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* **138**, 105–115 (2013).
82. Van der Bruggen, P. *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643–1647 (1991).
83. Boon, T., Coulie, P. G. & Van den Eynde, B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol. Today* **18**, 267–268 (1997).
84. Wölfel, T. *et al.* A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **269**, 1281–1284 (1995).
85. Sharkey, M. S., Lizée, G., Gonzales, M. I., Patel, S. & Topalian, S. L. CD4(+) T-cell recognition of mutated B-RAF in melanoma patients harboring the V599E mutation. *Cancer Res.* **64**, 1595–1599 (2004).
86. Gjertsen, M. K., Bjorheim, J., Saeterdal, I., Myklebust, J. & Gaudernack, G. Cytotoxic CD4+ and CD8+ T lymphocytes, generated by mutant p21-ras (12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide and kill autologous tumour cells carrying this mutation. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **72**, 784–790 (1997).
87. Graf, C. *et al.* A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells. *Blood* **109**, 2985–2988 (2007).
88. Bosch, G. J., Joosten, A. M., Kessler, J. H., Melief, C. J. & Leeksa, O. C. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* **88**, 3522–3527 (1996).
89. Brichard, V. *et al.* The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **178**, 489–495 (1993).
90. Kawakami, Y. *et al.* Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6458–6462 (1994).

91. Daniela Cunha, F. A. P. Vitiligo: a good prognostic factor in melanoma? *Dermatol. Online J.* **15**, 15 (2009).
92. Tsang, K. Y. *et al.* Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 982–990 (1995).
93. Bos, R. *et al.* Balancing between Antitumor Efficacy and Autoimmune Pathology in T-Cell–Mediated Targeting of Carcinoembryonic Antigen. *Cancer Res.* **68**, 8446–8455 (2008).
94. Fisk, B., Blevins, T. L., Wharton, J. T. & Ioannides, C. G. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.* **181**, 2109–2117 (1995).
95. Brossart, P. *et al.* Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* **93**, 4309–4317 (1999).
96. Ohminami, H., Yasukawa, M. & Fujita, S. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood* **95**, 286–293 (2000).
97. Kessler, J. H. *et al.* 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.* **193**, 73–88 (2001).
98. Gires, O. & Seliger, B. *Tumor-Associated Antigens: Identification, Characterization, and Clinical Applications.* (John Wiley & Sons, 2009).
99. Chen, Y. T. *et al.* A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1914–1918 (1997).
100. Rickinson, A. B., Lee, S. P. & Steven, N. M. Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 492–497 (1996).
101. Rensing, M. E. *et al.* Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A *0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res.* **56**, 582–588 (1996).
102. Admon, A., Barnea, E. & Ziv, T. Tumor antigens and proteomics from the point of view of the major histocompatibility complex peptides. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2**, 388–398 (2003).
103. Sahin, U. *et al.* Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11810–11813 (1995).
104. Sahin, U., Türeci, O. & Pfreundschuh, M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 709–716 (1997).
105. Viatte, S., Alves, P. M. & Romero, P. Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: Advantages and hurdles. *Immunol. Cell Biol.* **84**, 318–330 (2006).
106. Dillman, R. O. Cancer immunotherapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* **26**, 1–64 (2011).
107. Coley, W. B. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann. Surg.* **14**, 199–220 (1891).
108. Riether, C., Schürch, C. & Ochsenbein, A. F. From ‘magic bullets’ to specific cancer immunotherapy. *Swiss Med. Wkly.* **143**, w13734 (2013).
109. Cancer Vaccines: A New Frontier in Prevention and Treatment | Cancer Network. (2007). at <<http://www.cancernetwork.com/cancer-vaccines-new-frontier-prevention-and-treatment>>
110. Berzofsky, J. A. *et al.* Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J. Clin. Invest.* **113**, 1515–1525 (2004).
111. Schlom, J. Therapeutic Cancer Vaccines: Current Status and Moving Forward. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 599–613 (2012).
112. Cheever, M. A. & Higano, C. S. PROVENGE (Sipuleucel-T) in Prostate Cancer: The First FDA-Approved Therapeutic Cancer Vaccine. *Clin. Cancer Res.* **17**, 3520–3526 (2011).
113. Graddis, T. J., McMahan, C. J., Tamman, J., Page, K. J. & Trager, J. B. Prostatic acid phosphatase expression in human tissues. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **4**, 295–306 (2011).
114. Korman, A. J., Peggs, K. S. & Allison, J. P. Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy. *Adv. Immunol.* **90**, 297–339 (2006).
115. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
116. Wolchok, J. D. *et al.* Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 122–133 (2013).
117. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Lu, W. C. & Ferrebee, J. W. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **257**, 491–496 (1957).
118. Thomas, E. D. *et al.* One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* **49**, 511–533 (1977).
119. Stone, R. M., O'Donnell, M. R. & Sekeres, M. A. Acute Myeloid Leukemia. *ASH Educ. Program Book* **2004**, 98–117 (2004).
120. Bishop, M. R. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation.* (Springer, 2009).
121. Copelan, E. A. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1813–1826 (2006).

122. Roboz, G. J. Novel Approaches to the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *ASH Educ. Program Book* **2011**, 43–50 (2011).
123. Goker, H., Haznedaroglu, I. C. & Chao, N. J. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp. Hematol.* **29**, 259–277 (2001).
124. Lee, S. J., Vogelsang, G. & Flowers, M. E. D. Chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **9**, 215–233 (2003).
125. Horowitz, M. M. et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555–562 (1990).
126. Tey, S.-K., Bollard, C. M. & Heslop, H. E. Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy. *Immunol. Cell Biol.* **84**, 281–289 (2006).
127. Baron, F. & Storb, R. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Following Nonmyeloablative Conditioning as Treatment for Hematologic Malignancies and Inherited Blood Disorders. *Mol. Ther.* **13**, 26–41 (2006).
128. Bacigalupo, A. et al. Donor lymphocyte infusions for the treatment of minimal residual disease in acute leukemia. *Rev. Bras. Hematol. E Hemoter.* **30**, 42–44 (2008).
129. Roddie, C. & Peggs, K. S. Donor lymphocyte infusion following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 473–487 (2011).
130. Provan, D. & Gribben, J. *Molecular Hematology*. (John Wiley & Sons, 2008).
131. Loren, A. W. & Porter, D. L. Donor leukocyte infusions for the treatment of relapsed acute leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **41**, 483–493 (2007).
132. Simon, T. L. et al. *Rossi's Principles of Transfusion Medicine*. (John Wiley & Sons, 2011).
133. Pedrazzoli, P., Comoli, P., Montagna, D., Demirer, T. & Bregni, M. Is adoptive T-cell therapy for solid tumors coming of age? *Bone Marrow Transplant.* **47**, 1013–1019 (2012).
134. Rosenberg, S. A. et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 4550–4557 (2011).
135. Wolf, A. M. et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **9**, 606–612 (2003).
136. Humphries, C. Adoptive cell therapy: Honing that killer instinct. *Nature* **504**, S13–S15 (2013).
137. Yee, C. et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16168–16173 (2002).
138. Mackensen, A. et al. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 5060–5069 (2006).
139. Straathof, K. C. M. et al. Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus--specific T lymphocytes. *Blood* **105**, 1898–1904 (2005).
140. Yee, C. Adoptive T-Cell Therapy for Cancer: Boutique Therapy or Treatment Modality? *Clin. Cancer Res.* **19**, 4550–4552 (2013).
141. Lei, X.-Y. et al. Knockdown of human bcl-2 gene expression enhances survival of CD8+ T cells. *Immunol. Lett.* **122**, 30–36 (2009).
142. Eaton, D., Gilham, D. E., O'Neill, A. & Hawkins, R. E. Retroviral transduction of human peripheral blood lymphocytes with Bcl-X(L) promotes in vitro lymphocyte survival in pro-apoptotic conditions. *Gene Ther.* **9**, 527–535 (2002).
143. Charo, J. et al. Bcl-2 Overexpression Enhances Tumor-Specific T-Cell Survival. *Cancer Res.* **65**, 2001–2008 (2005).
144. Shin, J. H. et al. Positive conversion of negative signaling of CTLA4 potentiates antitumor efficacy of adoptive T-cell therapy in murine tumor models. *Blood* **119**, 5678–5687 (2012).
145. Kershaw, M. H. et al. Redirecting Migration of T Cells to Chemokine Secreted from Tumors by Genetic Modification with CXCR2. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1971–1980 (2002).
146. Heczey, A. & Louis, C. U. Advances in chimeric antigen receptor immunotherapy for neuroblastoma. *Discov. Med.* **16**, 287–294 (2013).
147. Qian, X., Wang, X. & Jin, H. Cell Transfer Therapy for Cancer: Past, Present, and Future. *J. Immunol. Res.* **2014**, 525913 (2014).
148. Pulè, M. A. et al. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **12**, 933–941 (2005).
149. Kochenderfer, J. N. et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* **116**, 4099–4102 (2010).
150. Kalos, M. et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Transl. Med.* **3**, 95ra73 (2011).
151. Kochenderfer, J. N. & Rosenberg, S. A. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10**, 267–276 (2013).

152. Parkhurst, M. R. *et al.* T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **19**, 620–626 (2011).
153. Morgan, R. A. *et al.* Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* **314**, 126–129 (2006).
154. Robbins, P. F. *et al.* Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 917–924 (2011).
155. Daniel-Meshulam, I., Ya'akobi, S., Ankri, C. & Cohen, C. J. How (specific) would you like your T-cells today? Generating T-cell therapeutic function through TCR-gene transfer. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
156. Rossig, C. & Brenner, M. K. Genetic Modification of T Lymphocytes for Adoptive Immunotherapy. *Mol. Ther.* **10**, 5–18 (2004).
157. Nicole Schwinn, D. V. Interferon- γ down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int. J. Cancer* **124**, 1594 – 1604 (2008).
158. Rappold, G., Willson, T. A., Henke, A. & Gough, N. M. Arrangement and localization of the human GM-CSF receptor alpha chain gene CSF2RA within the X-Y pseudoautosomal region. *Genomics* **14**, 455–461 (1992).
159. Ding, D. X.-H., Vera, J. C., Heaney, M. L. & Golde, D. W. N-Glycosylation of the Human Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Receptor α Subunit Is Essential for Ligand Binding and Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **270**, 24580–24584 (1995).
160. Hayashida, K. *et al.* Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9655–9659 (1990).
161. Walker, F. & Burgess, A. W. Specific binding of radioiodinated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to hemopoietic cells. *EMBO J.* **4**, 933–939 (1985).
162. Hansen, G. *et al.* The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell* **134**, 496–507 (2008).
163. Cosman, D. The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine* **5**, 95–106 (1993).
164. Hamilton, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 533–544 (2008).
165. Postiglione, L. *et al.* Expression of GM-CSF receptor and 'in vitro' effects of GM-CSF on human fibroblasts. *Life Sci.* **63**, 327–336 (1998).
166. Baldwin, G. C. *et al.* Nonhematopoietic tumor cells express functional GM-CSF receptors. *Blood* **73**, 1033–1037 (1989).
167. Bussolino, F. *et al.* Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* **337**, 471–473 (1989).
168. Ridwan, S., Bauer, H., Frauenknecht, K., von Pein, H. & Sommer, C. J. Distribution of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and its receptor α -subunit in the adult human brain with specific reference to Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* **119**, 1389–1406 (2012).
169. Zambrano, A. *et al.* Expression of GM-CSF receptors in male germ cells and their role in signaling for increased glucose and vitamin C transport. *J. Cell. Biochem.* **80**, 625–634 (2001).
170. Jokhi, P. P., King, A., Jubinsky, P. T. & Loke, Y. W. Demonstration of the low affinity alpha subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSF-R alpha) on human trophoblast and uterine cells. *J. Reprod. Immunol.* **26**, 147–164 (1994).
171. Metcalf, D., Nicola, N. A., Gearing, D. P. & Gough, N. M. Low-affinity placenta-derived receptors for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor can deliver a proliferative signal to murine hemopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4670–4674 (1990).
172. Dobbs, K. B. *et al.* Regulation of pluripotency of inner cell mass and growth and differentiation of trophectoderm of the bovine embryo by colony stimulating factor 2. *Biol. Reprod.* **89**, 141 (2013).
173. Sjöblom, C., Wikland, M. & Robertson, S. A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. *Biol. Reprod.* **67**, 1817–1823 (2002).
174. Chen, J. *et al.* The laminin receptor modulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor complex formation and modulates its signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14000–14005 (2003).
175. Modrowski, D., Baslé, M., Lomri, A. & Marie, P. J. Syndecan-2 Is Involved in the Mitogenic Activity and Signaling of Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor in Osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **275**, 9178–9185 (2000).
176. Givant-Horwitz, V., Davidson, B. & Reich, R. Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Lett.* **223**, 1–10 (2005).

177. Berno, V. *et al.* The 67 kDa laminin receptor increases tumor aggressiveness by remodeling laminin-1. *Endocr. Relat. Cancer* **12**, 393–406 (2005).
178. Beauvais, D. M. & Rapraeger, A. C. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2**, 3 (2004).
179. Martinez-Moczygemba, M. *et al.* Pulmonary alveolar proteinosis caused by deletion of the GM-CSFRalpha gene in the X chromosome pseudoautosomal region 1. *J. Exp. Med.* **205**, 2711–2716 (2008).
180. Suzuki, T. *et al.* Hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by recessive CSF2RB mutations. *Eur. Respir. J.* **37**, 201–204 (2011).
181. Suzuki, T. *et al.* Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *J. Exp. Med.* **205**, 2703–2710 (2008).
182. DiPersio, J. *et al.* Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *J. Biol. Chem.* **263**, 1834–1841 (1988).
183. Jubinsky, P. T., Laurie, A. S., Nathan, D. G., Yetz-Aldepe, J. & Sieff, C. A. Expression and function of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit. *Blood* **84**, 4174–4185 (1994).
184. Goldstein, J. I. *et al.* Defective leukocyte GM-CSF receptor (CD116) expression and function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **141**, 208–216 (2011).
185. Urdinguio, R. G. *et al.* Immune-dependent and independent antitumor activity of GM-CSF aberrantly expressed by mouse and human colorectal tumors. *Cancer Res.* **73**, 395–405 (2013).
186. Rivas, C. I. *et al.* Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptors in human prostate cancer. *Blood* **91**, 1037–1043 (1998).
187. Baldwin, G. C., Benveniste, E. N., Chung, G. Y., Gasson, J. C. & Golde, D. W. Identification and characterization of a high-affinity granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor on primary rat oligodendrocytes. *Blood* **82**, 3279–3282 (1993).
188. Uemura, Y. *et al.* Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on lung cancer: roles of cyclooxygenase-2. *Oncol. Rep.* **17**, 955–961 (2007).
189. Revoltella, R. P., Menicagli, M. & Campani, D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an autocrine survival-growth factor in human gliomas. *Cytokine* **57**, 347–359 (2012).
190. Guillaume, T., Sekhavat, M., Rubinstein, D. B., Hamdan, O. & Symann, M. L. Transcription of Genes Encoding Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor, Interleukin 3, and Interleukin 6 Receptors and Lack of Proliferative Response to Exogenous Cytokines in Nonhematopoietic Human Malignant Cell Lines. *Cancer Res.* **53**, 3139–3144 (1993).
191. Spielholz, C. *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signals for increased glucose uptake in human melanoma cells. *Blood* **85**, 973–980 (1995).
192. Ding, D. X. *et al.* The alpha subunit of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor signals for glucose transport via a phosphorylation-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2537–2541 (1994).
193. Kim, J. & Dang, C. V. Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect. *Cancer Res.* **66**, 8927–8930 (2006).
194. Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR. *Publ. Online 15 August 2000 Doi10.1038/sjgt.3301253* **7**, (2000).
195. Weijtens, M. E., Willemsen, R. A., Hart, E. H. & Bolhuis, R. L. A retroviral vector system 'STITCH' in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes. *Gene Ther.* **5**, 1195–1203 (1998).
196. Naviaux, R. K., Costanzi, E., Haas, M. & Verma, I. M. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J. Virol.* **70**, 5701–5705 (1996).
197. Soneoka, Y. *et al.* A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.* **23**, 628–633 (1995).
198. Kitamura, T. *et al.* Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp. Hematol.* **31**, 1007–1014 (2003).
199. Graf, L. H., Jr, Kaplan, P. & Silagi, S. Efficient DNA-mediated transfer of selectable genes and unselected sequences into differentiated and undifferentiated mouse melanoma clones. *Somat. Cell Mol. Genet.* **10**, 139–151 (1984).
200. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59–74 (1977).
201. DuBridge, R. B. *et al.* Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 379–387 (1987).
202. Martin, P. & Papayannopoulou, T. HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science* **216**, 1233–1235 (1982).

203. Collins, S. J., Gallo, R. C. & Gallagher, R. E. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270**, 347–349 (1977).
204. Dalton, W. T. *et al.* HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* **71**, 242–247 (1988).
205. Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E. & Gallo, R. C. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2458–2462 (1978).
206. Gallagher, R. *et al.* Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **54**, 713–733 (1979).
207. Schneider, U., Schwenk, H.-U. & Bornkamm, G. Characterization of EBV-genome negative ‘null’ and ‘T’ cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* **19**, 621–626 (1977).
208. Heemskerk, M. H. M. *et al.* Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of minor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region. *Blood* **102**, 3530–3540 (2003).
209. Lozzio, C. B. & Lozzio, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321–334 (1975).
210. Kubonishi, I. & Miyoshi, I. Establishment of a Ph1 chromosome-positive cell line from chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Int. J. Cell Cloning* **1**, 105–117 (1983).
211. Kubonishi, I. *et al.* Two new human myeloid cell lines derived from acute promyelocytic leukemia and chronic myelocytic leukemia. *Gann Gan* **74**, 319–322 (1983).
212. Seigneurin, D. *et al.* Human chronic myeloid leukemic cell line with positive Philadelphia chromosome exhibits megakaryocytic and erythroid characteristics. *Exp. Hematol.* **15**, 822–832 (1987).
213. Avanzi, G. C. *et al.* M-07e human leukemic factor-dependent cell line provides a rapid and sensitive bioassay for the human cytokines GM-CSF and IL-3. *J. Cell. Physiol.* **145**, 458–464 (1990).
214. Avanzi, G. C. *et al.* Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features. *Br. J. Haematol.* **69**, 359–366 (1988).
215. Matsuo, Y. *et al.* Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23). *Leukemia* **11**, 1469–1477 (1997).
216. Hu, Z. B. *et al.* Establishment and characterization of two novel cytokine-responsive acute myeloid and monocytic leukemia cell lines, MUTZ-2 and MUTZ-3. *Leukemia* **10**, 1025–1040 (1996).
217. Nelissen, I. *et al.* MUTZ-3-derived dendritic cells as an in vitro alternative model to CD34+ progenitor-derived dendritic cells for testing of chemical sensitizers. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **23**, 1477–1481 (2009).
218. Masterson, A. J. *et al.* MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood* **100**, 701–703 (2002).
219. Lange, B. *et al.* Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines. *Blood* **70**, 192–199 (1987).
220. Lanotte, M. *et al.* NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* **77**, 1080–1086 (1991).
221. Kinoshita, S., Chen, B. K., Kaneshima, H. & Nolan, G. P. Host control of HIV-1 parasitism in T cells by the nuclear factor of activated T cells. *Cell* **95**, 595–604 (1998).
222. Stong, R. C., Korsmeyer, S. J., Parkin, J. L., Arthur, D. C. & Kersey, J. H. Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics. *Blood* **65**, 21–31 (1985).
223. Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **26**, 171–176 (1980).
224. Sundström, C. & Nilsson, K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **17**, 565–577 (1976).
225. Dauer, M. *et al.* Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 4069–4076 (2003).
226. Palacios, R. Cyclosporin A abrogates proliferation of T cells and generation of suppressor and cytotoxic T-cell function induced by Epstein-Barr virus. *Immunobiology* **160**, 321–329 (1981).
227. Wölfel, T. *et al.* Lysis of human pancreatic adenocarcinoma cells by autologous HLA-class I-restricted cytolytic T-lymphocyte (CTL) clones. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **54**, 636–644 (1993).
228. Goldstein, G. Monoclonal antibody specificity: Orthoclone OKT3 T-cell blocker. *Nephron* **46 Suppl 1**, 5–11 (1987).
229. Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G. & Brown, P. O. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* **12**, 2099–2108 (1993).

230. Dutton, R. W. Inhibitory and stimulatory effects of Concanavalin A on the response of mouse spleen cell suspensions to antigen. *J. Exp. Med.* **136**, 1445–1460 (1972).
231. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805–816 (1993).
232. Polyak, K. *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8**, 9–22 (1994).
233. Ludewig, B. & Hoffmann, M. W. *Adoptive Immunotherapy: Methods and Protocols*. (Springer Science & Business Media, 2005).
234. Britten, C. M. *et al.* 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* **259**, 95–110 (2002).
235. Betts, M. R. & Koup, R. A. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol.* **75**, 497–512 (2004).
236. Landy, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 913–949 (1989).
237. Hartley, J. L., Temple, G. F. & Brasch, M. A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* **10**, 1788–1795 (2000).
238. Birkholz, K. *et al.* A fast and robust method to clone and functionally validate T-cell receptors. *J. Immunol. Methods* **346**, 45–54 (2009).
239. Lefranc, M.-P. & Lefranc, G. *The T Cell Receptor FactsBook*. (Gulf Professional Publishing, 2001).
240. Arden, B., Clark, S. P., Kabelitz, D. & Mak, T. W. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* **42**, 455–500 (1995).
241. Harris, J. *et al.* An improved RNA amplification procedure results in increased yield of autologous RNA transfected dendritic cell-based vaccine. *Biochim. Biophys. Acta* **1724**, 127–136 (2005).
242. Zhu, Y. Y., Machleder, E. M., Chenchik, A., Li, R. & Siebert, P. D. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *BioTechniques* **30**, 892–897 (2001).
243. Cohen, C. J. *et al.* Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. *Cancer Res.* **67**, 3898–3903 (2007).
244. Cohen, C. J., Zhao, Y., Zheng, Z., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res.* **66**, 8878–8886 (2006).
245. Zaritskaya, L., Shurin, M. R., Sayers, T. J. & Malyguine, A. M. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Expert Rev. Vaccines* **9**, 601–616 (2010).
246. Betts, M. R. *et al.* Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods* **281**, 65–78 (2003).
247. Woodcock, J. M. *et al.* The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor exists as a preformed receptor complex that can be activated by GM-CSF, interleukin-3, or interleukin-5. *Blood* **90**, 3005–3017 (1997).
248. Kindt, T. J., Goldsby, R. A. & Osborne, B. A. *Kuby Immunology*. (W.H. Freeman & Co Ltd, 2007).
249. Van Laethem, F. *et al.* Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of alphabetaT cells that recognize antigens independently of the MHC. *Immunity* **27**, 735–750 (2007).
250. Zijlstra, M. *et al.* Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* **344**, 742–746 (1990).
251. Vigneron, N., Stroobant, V., Van den Eynde, B. J. & van der Bruggen, P. Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer Immun.* **13**, 15 (2013).
252. Melero, I. *et al.* Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**, 509–524 (2014).
253. Lefranc, M.-P. *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 55–77 (2003).
254. Lefranc, M. P. Unique database numbering system for immunogenetic analysis. *Immunol. Today* **18**, 509 (1997).
255. Ruiz, M. & Lefranc, M.-P. IMGT gene identification and Colliers de Perles of human immunoglobulins with known 3D structures. *Immunogenetics* **53**, 857–883 (2002).
256. Rangarajan, S. & Mariuzza, R. A. T cell receptor bias for MHC: co-evolution or co-receptors? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* (2014). doi:10.1007/s00018-014-1600-9
257. Garcia, K. C. Reconciling views on T cell receptor germline bias for MHC. *Trends Immunol.* **33**, 429–436 (2012).
258. Feng, D., Bond, C. J., Ely, L. K., Maynard, J. & Garcia, K. C. Structural evidence for a germline-encoded T cell receptor–major histocompatibility complex interaction ‘codon’. *Nat. Immunol.* **8**, 975–983 (2007).

259. Marrack, P., Scott-Browne, J. P., Dai, S., Gapin, L. & Kappler, J. W. Evolutionarily conserved amino acids in TCR V regions and MHC control their interaction. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 171–203 (2008).
260. Huseby, E. S. *et al.* How the T cell repertoire becomes peptide and MHC specific. *Cell* **122**, 247–260 (2005).
261. Scott-Browne, J. P., White, J., Kappler, J. W., Gapin, L. & Marrack, P. Germline-encoded amino acids in the $\alpha\beta$ T-cell receptor control thymic selection. *Nature* **458**, 1043–1046 (2009).
262. Marrack, P., Scott-Browne, J. P., Dai, S., Gapin, L. & Kappler, J. W. Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 171–203 (2008).
263. Van Laethem, F., Tikhonova, A. N. & Singer, A. MHC restriction is imposed on a diverse T cell receptor repertoire by CD4 and CD8 co-receptors during thymic selection. *Trends Immunol.* **33**, 437–441 (2012).
264. Van Laethem, F. *et al.* Lck Availability during Thymic Selection Determines the Recognition Specificity of the T Cell Repertoire. *Cell* **154**, 1326–1341 (2013).
265. Holland, S. J. *et al.* The T-cell receptor is not hardwired to engage MHC ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E3111–3118 (2012).
266. Wang, Q. J. *et al.* Development of a genetically-modified novel T-cell receptor for adoptive cell transfer against renal cell carcinoma. *J. Immunol. Methods* **366**, 43–51 (2011).
267. Guglielmi, P. *et al.* Use of a variable alpha region to create a functional T-cell receptor delta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5634–5638 (1988).
268. Vilmer, E. *et al.* Predominant expression of circulating CD3+ lymphocytes bearing gamma T cell receptor in a prolonged immunodeficiency after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* **82**, 755–761 (1988).
269. Dellabona, P., Padovan, E., Casorati, G., Brockhaus, M. & Lanzavecchia, A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8-T cells. *J. Exp. Med.* **180**, 1171–1176 (1994).
270. Tilloy, F. *et al.* An Invariant T Cell Receptor α Chain Defines a Novel TAP-independent Major Histocompatibility Complex Class Ib-restricted $\alpha\beta$ T Cell Subpopulation in Mammals. *J. Exp. Med.* **189**, 1907–1921 (1999).
271. Asarnow, D. M. *et al.* Limited diversity of gamma delta antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells. *Cell* **55**, 837–847 (1988).
272. Donnelly, M. L. L. *et al.* Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein ‘cleavage’ mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal ‘skip’. *J. Gen. Virol.* **82**, 1013–1025 (2001).
273. Leisegang, M. *et al.* Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **86**, 573–583 (2008).
274. Kim, J. H. *et al.* High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. *PLoS ONE* **6**, e18556 (2011).
275. Voss, R.-H. *et al.* Molecular Design of the C $\alpha\beta$ Interface Favors Specific Pairing of Introduced TCR $\alpha\beta$ in Human T Cells. *J. Immunol.* **180**, 391–401 (2008).
276. Voss, R.-H., Kuball, J. & Theobald, M. Designing TCR for cancer immunotherapy. *Methods Mol. Med.* **109**, 229–256 (2005).
277. Voss, R.-H. *et al.* Coexpression of the T-cell receptor constant alpha domain triggers tumor reactivity of single-chain TCR-transduced human T cells. *Blood* **115**, 5154–5163 (2010).
278. Voss, R.-H. *et al.* Redirection of T cells by delivering a transgenic mouse-derived MDM2 tumor antigen-specific TCR and its humanized derivative is governed by the CD8 coreceptor and affects natural human TCR expression. *Immunol. Res.* **34**, 67–87 (2006).
279. Meyerhuber, P. *et al.* Targeting the epidermal growth factor receptor (HER) family by T cell receptor gene-modified T lymphocytes. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **88**, 1113–1121 (2010).
280. Ikemura, T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evol.* **2**, 13–34 (1985).
281. Bialer, G., Horovitz-Fried, M., Ya’acobi, S., Morgan, R. A. & Cohen, C. J. Selected murine residues endow human TCR with enhanced tumor recognition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 6232–6241 (2010).
282. Sommermeyer, D. & Uckert, W. Minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 6223–6231 (2010).
283. Holst, J., Vignali, K. M., Burton, A. R. & Vignali, D. A. A. Rapid analysis of T-cell selection in vivo using T cell-receptor retrogenic mice. *Nat. Methods* **3**, 191–197 (2006).
284. Reuß, S. Safety analysis of TCR gene-modified T cells. (Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, 2012). at <<http://edoc.hu-berlin.de/docviews/abstract.php?id=39342>>

285. Graf, M. *et al.* Expression and prognostic value of hemopoietic cytokine receptors in acute myeloid leukemia (AML): implications for future therapeutical strategies. *Eur. J. Haematol.* **72**, 89–106 (2004).
286. Williams, M. D., Rostovtsev, A., Narla, R. K. & Uckun, F. M. Production of recombinant DTctGMCSF fusion toxin in a baculovirus expression vector system for biotherapy of GMCSF-receptor positive hematologic malignancies. *Protein Expr. Purif.* **13**, 210–221 (1998).
287. Papadopoulos, K. P. *et al.* Naturally processed tissue- and differentiation stage-specific autologous peptides bound by HLA class I and II molecules of chronic myeloid leukemia blasts. *Blood* **90**, 4938–4946 (1997).
288. Gasson, J. C., Kaufman, S. E., Weisbart, R. H., Tomonaga, M. & Golde, D. W. High-affinity binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to normal and leukemic human myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 669–673 (1986).
289. Heaney, M. L., Vera, J. C., Raines, M. A. & Golde, D. W. Membrane-associated and soluble granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor receptor alpha subunits are independently regulated in HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2365–2369 (1995).
290. DiPersio, J. F., Hedvat, C., Ford, C. F., Golde, D. W. & Gasson, J. C. Characterization of the soluble human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor complex. *J. Biol. Chem.* **266**, 279–286 (1991).
291. Freedman, M. H. *et al.* Autocrine and paracrine growth control by granulocyte-monocyte colony-stimulating factor of acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **81**, 3068–3075 (1993).
292. Testa, U. *et al.* Cascade transactivation of growth factor receptors in early human hematopoiesis. *Blood* **81**, 1442–1456 (1993).
293. Wognum, A. W., Westerman, Y., Visser, T. P. & Wagemaker, G. Distribution of receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on immature CD34+ bone marrow cells, differentiating monomyeloid progenitors, and mature blood cell subsets. *Blood* **84**, 764–774 (1994).
294. Raines, M. A. *et al.* Identification and molecular cloning of a soluble human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 8203–8207 (1991).
295. Williams, W. V., Vonfeldt, J. M., Rosenbaum, H., Ugen, K. E. & Weiner, D. B. Molecular cloning of a soluble form of the granulocyte--macrophage colony-stimulating factor receptor α chain from a myelomonocytic cell line. expression, biologic activity, and preliminary analysis of transcript distribution. *Arthritis Rheum.* **37**, 1468–1478 (1994).
296. Brown, C. B., Beaudry, P., Laing, T. D., Shoemaker, S. & Kaushansky, K. In vitro characterization of the human recombinant soluble granulocyte- macrophage colony-stimulating factor receptor. *Blood* **85**, 1488–1495 (1995).
297. Dello Sbarba, P. & Rovida, E. Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding. *Biol. Chem.* **383**, 69–83 (2002).
298. Prevost, J. M. *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and inflammatory stimuli up-regulate secretion of the soluble GM-CSF receptor in human monocytes: evidence for ectodomain shedding of the cell surface GM-CSF receptor alpha subunit. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 5679–5688 (2002).
299. Heaney, M. L. & Golde, D. W. Soluble receptors in human disease. *J. Leukoc. Biol.* **64**, 135–146 (1998).
300. Sayani, F. *et al.* Identification of the soluble granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor protein in vivo. *Blood* **95**, 461–469 (2000).
301. Trus, M. R. *et al.* Clinical manifestations associated with the aberrant expression of the soluble granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor in patients presenting with haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* **121**, 86–93 (2003).
302. Xiao, R. *et al.* [Expression of soluble GM-CSF-Ralpha in patients with acute myeloid leukemia]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui J. Exp. Hematol. Chin. Assoc. Pathophysiol.* **14**, 225–227 (2006).
303. Murray, E. W., Pihl, C., Morcos, A. & Brown, C. B. Ligand-independent Cell Surface Expression of the Human Soluble Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Receptor α Subunit Depends on Co-expression of the Membrane-associated Receptor β Subunit. *J. Biol. Chem.* **271**, 15330–15335 (1996).
304. Chen, J., Cárcamo, J. M. & Golde, D. W. The alpha subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor interacts with c-Kit and inhibits c-Kit signaling. *J. Biol. Chem.* **281**, 22421–22426 (2006).
305. Groves, J. T. & Dustin, M. L. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *J. Immunol. Methods* **278**, 19–32 (2003).
306. Dustin, M. L. & Depoil, D. New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 672–684 (2011).

307. Walker, F. & Burgess, A. W. Internalisation and recycling of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor on a murine myelomonocytic leukemia. *J. Cell. Physiol.* **130**, 255–261 (1987).
308. Hercus, T. R. *et al.* The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood* **114**, 1289–1298 (2009).
309. Alexander, M. A., Damico, C. A., Wietes, K. M., Hansen, T. H. & Connolly, J. M. Correlation between CD8 dependency and determinant density using peptide-induced, Ld-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **173**, 849–858 (1991).
310. Holler, P. D. & Kranz, D. M. Quantitative Analysis of the Contribution of TCR/pepMHC Affinity and CD8 to T Cell Activation. *Immunity* **18**, 255–264 (2003).
311. Laugel, B. *et al.* Different T Cell Receptor Affinity Thresholds and CD8 Coreceptor Dependence Govern Cytotoxic T Lymphocyte Activation and Tetramer Binding Properties. *J. Biol. Chem.* **282**, 23799–23810 (2007).
312. Vigan & #xf2 *et al.* Functional Avidity: A Measure to Predict the Efficacy of Effector T Cells? *J. Immunol. Res.* **2012**, e153863 (2012).
313. Genolet, R. *et al.* Duality of the murine CD8 compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E1007–1015 (2014).
314. Williams, D. B., Barber, B. H., Flavell, R. A. & Allen, H. Role of beta 2-microglobulin in the intracellular transport and surface expression of murine class I histocompatibility molecules. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **142**, 2796–2806 (1989).
315. Potter, T. A., Boyer, C., Verhulst, A. M., Golstein, P. & Rajan, T. V. Expression of H-2Db on the cell surface in the absence of detectable beta 2 microglobulin. *J. Exp. Med.* **160**, 317–322 (1984).
316. Allen, H., Fraser, J., Flyer, D., Calvin, S. & Flavell, R. Beta 2-microglobulin is not required for cell surface expression of the murine class I histocompatibility antigen H-2Db or of a truncated H-2Db. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 7447–7451 (1986).
317. Lustgarten, J. *et al.* Identification of Her-2/Neu CTL epitopes using double transgenic mice expressing HLA-A2.1 and human CD.8. *Hum. Immunol.* **52**, 109–118 (1997).
318. Irwin, M. J., Heath, W. R. & Sherman, L. A. Species-restricted interactions between CD8 and the alpha 3 domain of class I influence the magnitude of the xenogeneic response. *J. Exp. Med.* **170**, 1091–1101 (1989).
319. Kalinke, U., Arnold, B. & Hämmerling, G. J. Strong xenogeneic HLA response in transgenic mice after introducing an alpha 3 domain into HLA B27. *Nature* **348**, 642–644 (1990).
320. Samberg, N. L., Scarlett, E. C. & Stauss, H. J. The alpha 3 domain of major histocompatibility complex class I molecules plays a critical role in cytotoxic T lymphocyte stimulation. *Eur. J. Immunol.* **19**, 2349–2354 (1989).
321. LaFace, D. M. *et al.* Human CD8 transgene regulation of HLA recognition by murine T cells. *J. Exp. Med.* **182**, 1315–1325 (1995).
322. Demotte, N. *et al.* Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity* **28**, 414–424 (2008).
323. Bonini, C. *et al.* The Suicide Gene Therapy Challenge: How to Improve a Successful Gene Therapy Approach. *Mol. Ther.* **15**, 1248–1252 (2007).
324. Ciceri, F. *et al.* Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I–II study. *Lancet Oncol.* **10**, 489–500 (2009).
325. Griffioen, M. *et al.* Retroviral transfer of human CD20 as a suicide gene for adoptive T-cell therapy. *Haematologica* **94**, 1316–1320 (2009).
326. Van Loenen, M. M. *et al.* Multi-cistronic vector encoding optimized safety switch for adoptive therapy with T-cell receptor-modified T cells. *Gene Ther.* **20**, 861–867 (2013).
327. Reuß, S. *et al.* TCR-engineered T cells: A model of inducible TCR expression to dissect the interrelationship between two TCRs. *Eur. J. Immunol.* **44**, 265–274 (2014).
328. Ezzone, S. & Schmit-Pokorny, K. *Blood and Marrow Stem Cell Transplantation: Principles, Practice, and Nursing Insights.* (Jones & Bartlett Learning, 2007).
329. Behrens, F. *et al.* MOR103, a human monoclonal antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in the treatment of patients with moderate rheumatoid arthritis: results of a phase Ib/IIa randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Ann. Rheum. Dis.* (2014). doi:10.1136/annrheumdis-2013-204816
330. Morgan, R. A. *et al.* Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* **36**, 133–151 (2013).
331. Linette, G. P. *et al.* Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* **122**, 863–871 (2013).
332. Cameron, B. J. *et al.* Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells. *Sci. Transl. Med.* **5**, 197ra103 (2013).

333. Quaglino, P. *et al.* Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study. *Ann. Oncol.* **21**, 409–414 (2010).
334. Le Gal, F. A. *et al.* Direct evidence to support the role of antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma-associated vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 1464–1470 (2001).
335. Uchi, H. *et al.* Unraveling the complex relationship between cancer immunity and autoimmunity: lessons from melanoma and vitiligo. *Adv. Immunol.* **90**, 215–241 (2006).
336. Daneshpazhooh, M., Shokoohi, A., Dadban, A. & Raafat, J. The course of melanoma-associated vitiligo: report of a case. *Melanoma Res.* **16**, 371–373 (2006).
337. Wankowicz-Kalinska, A., Le Poole, C., van den Wijngaard, R., Storkus, W. J. & Das, P. K. Melanocyte-specific immune response in melanoma and vitiligo: two faces of the same coin? *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* **16**, 254–260 (2003).
338. Gogas, H. *et al.* Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N. Engl. J. Med.* **354**, 709–718 (2006).
339. André, M. C. *et al.* Long-term human CD34+ stem cell-engrafted nonobese diabetic/SCID/IL-2R gamma(null) mice show impaired CD8+ T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 2710–2720 (2010).
340. Kreitman, R. J. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J.* **8**, E532–551 (2006).
341. Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D. J. & Kreitman, R. J. Immunotoxin treatment of cancer. *Annu. Rev. Med.* **58**, 221–237 (2007).
342. Horita, H., Frankel, A. E. & Thorburn, A. Acute myeloid leukemia-targeted toxin activates both apoptotic and necroptotic death mechanisms. *PLoS One* **3**, e3909 (2008).
343. Kreitman, R. J. & Pastan, I. Recombinant toxins containing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and either pseudomonas exotoxin or diphtheria toxin kill gastrointestinal cancer and leukemia cells. *Blood* **90**, 252–259 (1997).
344. Mathew, M., Zaineb, K. C. & Verma, R. S. GM-CSF-DFF40: a novel humanized immunotoxin induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **18**, 882–895 (2013).
345. Rozemuller, H. *et al.* In vivo targeting of leukemic cells using diphtheria toxin fused to murine GM-CSF. *Leukemia* **12**, 710–717 (1998).
346. Oloomi, M., Bouzari, S. & Shariati, E. In vivo characterization of fusion protein comprising of A1 subunit of Shiga toxin and human GM-CSF: Assessment of its immunogenicity and toxicity. *Iran. Biomed. J.* **14**, 136–141 (2010).
347. Hall, P. D., Willingham, M. C., Kreitman, R. J. & Frankel, A. E. DT388-GM-CSF, a novel fusion toxin consisting of a truncated diphtheria toxin fused to human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, prolongs host survival in a SCID mouse model of acute myeloid leukemia. *Leukemia* **13**, 629–633 (1999).
348. Frankel, A. E., Powell, B. L., Hall, P. D., Case, L. D. & Kreitman, R. J. Phase I trial of a novel diphtheria toxin/granulocyte macrophage colony-stimulating factor fusion protein (DT388GMCSF) for refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **8**, 1004–1013 (2002).
349. Dinarello, C. A. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur. Cytokine Netw.* **11**, 483–486 (2000).
350. Tsutsui, H., Matsui, K., Okamura, H. & Nakanishi, K. Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases. *Immunol. Rev.* **174**, 192–209 (2000).
351. Kuinose, M. *et al.* Calcineurin antagonists inhibit interferon-gamma production by downregulation of interleukin-18 in human mixed lymphocyte reactions. *Acta Med. Okayama* **54**, 201–209 (2000).
352. Di Franco, M., Gerardi, M. C., Lucchino, B. & Conti, F. Mavrilimumab: an evidence based review of its potential in the treatment of rheumatoid arthritis. *Core Evid.* **9**, 41–48 (2014).
353. Burmester, G. R. *et al.* Mavrilimumab, a human monoclonal antibody targeting GM-CSF receptor- α , in subjects with rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase I, first-in-human study. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1542–1549 (2011).
354. Burmester, G. R. *et al.* Efficacy and safety of mavrilimumab in subjects with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1445–1452 (2013).
355. Nair, J. R., Edwards, S. W. & Moots, R. J. Mavrilimumab, a human monoclonal GM-CSF receptor- α antibody for the management of rheumatoid arthritis: a novel approach to therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **12**, 1661–1668 (2012).
356. Avivi, I., Robinson, S. & Goldstone, A. Clinical use of rituximab in haematological malignancies. *Br. J. Cancer* **89**, 1389–1394 (2003).
357. Abdulla, N. E., Ninan, M. J. & Markowitz, D. A. B. Rituximab. *BioDrugs* **26**, 71–82 (2012).
358. Chlewicki, L. K., Holler, P. D., Monti, B. C., Clutter, M. R. & Kranz, D. M. High-affinity, peptide-specific T cell receptors can be generated by mutations in CDR1, CDR2 or CDR3. *J. Mol. Biol.* **346**, 223–239 (2005).

359. Kuball, J. *et al.* Increasing functional avidity of TCR-redirected T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain. *J. Exp. Med.* **206**, 463–475 (2009).
360. Haga-Friedman, A., Horovitz-Fried, M. & Cohen, C. J. Incorporation of transmembrane hydrophobic mutations in the TCR enhance its surface expression and T cell functional avidity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**, 5538–5546 (2012).
361. Bialer, G., Horovitz-Fried, M., Ya'acobi, S., Morgan, R. A. & Cohen, C. J. Selected murine residues endow human TCR with enhanced tumor recognition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 6232–6241 (2010).
362. Chung, S., Wucherpfennig, K. W., Friedman, S. M., Hafler, D. A. & Strominger, J. L. Functional three-domain single-chain T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 12654–12658 (1994).
363. Ahmadi, M. *et al.* CD3 limits the efficacy of TCR gene therapy in vivo. *Blood* **118**, 3528–3537 (2011).
364. Zhang, T., He, X., Tsang, T. C. & Harris, D. T. Transgenic TCR expression: comparison of single chain with full-length receptor constructs for T-cell function. *Cancer Gene Ther.* **11**, 487–496 (2004).
365. Provasi, E. *et al.* Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat. Med.* **18**, 807–815 (2012).
366. Okamoto, S. *et al.* Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer Res.* **69**, 9003–9011 (2009).
367. Niwa, O., Yokota, Y., Ishida, H. & Sugahara, T. Independent mechanisms involved in suppression of the Moloney leukemia virus genome during differentiation of murine teratocarcinoma cells. *Cell* **32**, 1105–1113 (1983).
368. Hoebe, R. C., Migchielsen, A. A., van der Jagt, R. C., van Ormondt, H. & van der Eb, A. J. Inactivation of the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position. *J. Virol.* **65**, 904–912 (1991).
369. Sinn, P. L., Sauter, S. L. & McCray, P. B. Gene Therapy Progress and Prospects: Development of improved lentiviral and retroviral vectors – design, biosafety, and production. *Gene Ther.* **12**, 1089–1098 (2005).
370. Wu, X., Li, Y., Crise, B. & Burgess, S. M. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* **300**, 1749–1751 (2003).
371. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* **118**, 3132–3142 (2008).
372. Trono, D. Virology. Picking the right spot. *Science* **300**, 1670–1671 (2003).
373. Montini, E. *et al.* Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat. Biotechnol.* **24**, 687–696 (2006).
374. Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y. & Verma, I. M. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2140–2145 (2002).
375. Gunn, J. *et al.* A multimodal targeting nanoparticle for selectively labeling T cells. *Small Wein. Bergstr. Ger.* **4**, 712–715 (2008).
376. Dinauer, N. *et al.* Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes. *Biomaterials* **26**, 5898–5906 (2005).
377. Schaft, N. *et al.* A new way to generate cytolytic tumor-specific T cells: electroporation of RNA coding for a T cell receptor into T lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother. Cll* **55**, 1132–1141 (2006).
378. Zhao, Y. *et al.* High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **13**, 151–159 (2006).
379. Van der Veken, L. T. *et al.* Alphabeta T-cell receptor engineered gammadelta T cells mediate effective antileukemic reactivity. *Cancer Res.* **66**, 3331–3337 (2006).
380. Saito, T. *et al.* Surface expression of only gamma delta and/or alpha beta T cell receptor heterodimers by cells with four (alpha, beta, gamma, delta) functional receptor chains. *J. Exp. Med.* **168**, 1003–1020 (1988).
381. Marr, L. A., Gilham, D. E., Campbell, J. D. M. & Fraser, A. R. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: double trouble for tumours: bi-functional and redirected T cells as effective cancer immunotherapies. *Clin. Exp. Immunol.* **167**, 216–225 (2012).
382. Rossig, C., Bollard, C. M., Nuchtern, J. G., Rooney, C. M. & Brenner, M. K. Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T-cell receptors: potential for improved immunotherapy. *Blood* **99**, 2009–2016 (2002).
383. Murphy, A. *et al.* Antitumor activity of dual-specific T cells and influenza virus. *Cancer Gene Ther.* **14**, 499–508 (2007).
384. Schmitt, T. M., Ragnarsson, G. B. & Greenberg, P. D. T Cell Receptor Gene Therapy for Cancer. *Hum. Gene Ther.* **20**, 1240–1248 (2009).

385. Van Lent, A. U. *et al.* Functional human antigen-specific T cells produced in vitro using retroviral T cell receptor transfer into hematopoietic progenitors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 4959–4968 (2007).
386. Zhao, Y. *et al.* Extrathymic generation of tumor-specific T cells from genetically engineered human hematopoietic stem cells via Notch signaling. *Cancer Res.* **67**, 2425–2429 (2007).
387. Lei, F. *et al.* In vivo programming of tumor antigen-specific T lymphocytes from pluripotent stem cells to promote cancer immunosurveillance. *Cancer Res.* **71**, 4742–4747 (2011).
388. Alajez, N. M., Schmielau, J., Alter, M. D., Cascio, M. & Finn, O. J. Therapeutic potential of a tumor-specific, MHC-unrestricted T-cell receptor expressed on effector cells of the innate and the adaptive immune system through bone marrow transduction and immune reconstitution. *Blood* **105**, 4583–4589 (2005).
389. Yang, L. & Baltimore, D. Long-term in vivo provision of antigen-specific T cell immunity by programming hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4518–4523 (2005).
390. Demirer, T. *et al.* Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells: an emerging treatment modality for solid tumors. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **5**, 256–267 (2008).
391. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480–489 (2011).
392. Spranger, S. & Gajewski, T. Rational combinations of immunotherapeutics that target discrete pathways. *J. Immunother. Cancer* **1**, 16 (2013).
393. Drake, C. G. Combination immunotherapy approaches. *Ann. Oncol.* **23**, viii41–viii46 (2012).
394. Necchi, A. *et al.* Combination of Paclitaxel, Cisplatin, and Gemcitabine (TPG) for Multiple Relapses or Platinum-Resistant Germ Cell Tumors: Long-Term Outcomes. *Clin. Genitourin. Cancer* **12**, 63–69.e1 (2014).
395. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
396. Topalian, S. L. *et al.* Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454 (2012).
397. Pilon-Thomas, S., Mackay, A., Vohra, N. & Mule, J. J. Blockade of PD-L1 Enhances the Therapeutic Efficacy of Combination Immunotherapy Against Melanoma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 3442–3449 (2010).
398. John, L. B., Kershaw, M. H. & Darcy, P. K. Blockade of PD-1 immunosuppression boosts CAR T-cell therapy. *Oncoimmunology* **2**, e26286 (2013).
399. John, L. B. *et al.* Anti-PD-1 Antibody Therapy Potently Enhances the Eradication of Established Tumors By Gene-Modified T Cells. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5636–5646 (2013).
400. Berdel, W. E., Danhauser-Riedl, S., Steinhauser, G. & Winton, E. F. Various human hematopoietic growth factors (interleukin-3, GM-CSF, G-CSF) stimulate clonal growth of nonhematopoietic tumor cells [see comments]. *Blood* **73**, 80–83 (1989).
401. Dedhar, S., Gaboury, L., Galloway, P. & Eaves, C. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor active on a variety of cell types of nonhemopoietic origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 9253–9257 (1988).
402. Mueller, M. M. *et al.* Autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human gliomas with tumor progression. *Am. J. Pathol.* **155**, 1557–1567 (1999).
403. Boulter, J. M. & Jakobsen, B. K. Stable, soluble, high-affinity, engineered T cell receptors: novel antibody-like proteins for specific targeting of peptide antigens. *Clin. Exp. Immunol.* **142**, 454–460 (2005).
404. Card, K. F. *et al.* A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 345–357 (2004).
405. Epel, M., Ellenhorn, J. D., Diamond, D. J. & Reiter, Y. A functional recombinant single-chain T cell receptor fragment capable of selectively targeting antigen-presenting cells. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **51**, 565–573 (2002).
406. Fishman, M. N. *et al.* Phase 1 trial of ALT-801, an interleukin-2/T cell receptor fusion protein targeting p53 (aa264-272)/HLA-A*0201 complex, in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 7765–7775 (2011).
407. Zhu, X. *et al.* Visualization of p53264–272/HLA-A*0201 Complexes Naturally Presented on Tumor Cell Surface by a Multimeric Soluble Single-Chain T Cell Receptor. *J. Immunol.* **176**, 3223–3232 (2006).
408. Padovan, E. *et al.* Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* **262**, 422–424 (1993).
409. Balomenos, D. *et al.* Incomplete T cell receptor V beta allelic exclusion and dual V beta-expressing cells. *J. Immunol.* **155**, 3308–3312 (1995).
410. Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor beta chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *J. Exp. Med.* **181**, 1587–1591 (1995).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form an einer anderen Universität oder in einem anderen Fachbereich vorgelegt.

Datum, Ort

Katharina Kukla

