

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Experimentelle Genetik
und

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
am Klinikum rechts der Isar

FLT3-regulierte, Leukämie-assoziierte Antigene als Zielstrukturen für
zytotoxische T-Lymphozyten

Bettina Brackertz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H.-R. Fries

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. J. Adamski
2. Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D.
3. apl. Prof. Dr. H. Bernhard

Die Dissertation wurde am 07.12.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 25.03.2011 angenommen.

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Experimentelle Genetik
und

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
am Klinikum rechts der Isar

FLT3-regulierte, Leukämie-assoziierte Antigene als Zielstrukturen für
zytotoxische T-Lymphozyten

Bettina Brackertz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H.-R. Fries

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. J. Adamski
2. Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D.
3. apl. Prof. Dr. H. Bernhard

Die Dissertation wurde am 07.12.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 25.03.2011 angenommen.

Meinen Eltern.

1 Einleitung	1
1.1 Die akute myeloische Leukämie	1
1.2 Das „2-Hit“-Modell der Entstehung akuter Leukämien.....	2
1.3 Rezeptortyrosinkinasen	3
1.3.1 Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen	4
1.3.2 Signaltransduktion durch Rezeptortyrosinkinasen	5
1.4 Die Rezeptortyrosinkinase FLT3	5
1.4.1 Struktur des FLT3-Rezeptors	6
1.4.2 FLT3-Expression in hämatopoietischen Zellen.....	7
1.4.3 Die Rolle von FLT3 in der Leukämogenese.....	8
1.4.4 FLT3 <i>internal tandem duplications</i> (FLT3-ITD)	8
1.4.5 Punktmutationen innerhalb der Aktivierungsschleife von FLT3	9
1.4.6 FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren.....	10
1.4.7 FLT3 als Zielstruktur in der Immuntherapie	11
1.5 Leukämie-assoziierte Antigene.....	12
1.6 Zielsetzung.....	14
2 Ergebnisse	16
2.1 Analyse des Antigenrepertoires in Abhängigkeit von der FLT3- Kinaseaktivität	16
2.1.1 Untersuchung der Expression bestimmter Leukämie-assoziiertes Antigene in RS4;11 (FLT3-WT ⁺)- und MV4;11 (FLT3-ITD ⁺)-Zellen	16
2.1.2 Analyse der Regulierung bestimmter LAAs durch die FLT3- Kinaseaktivität	17
2.1.2.1 Inhibierung der konstitutiven FLT3-Kinaseaktivität in MV4;11-Zellen	17
2.1.2.2 Stimulierung bzw. Inhibierung der FLT3-Kinaseaktivität in RS4;11-Zellen	19
2.2 Generierung von CTL-Klonen gegen Leukämie-assoziierte Antigene.....	20
2.2.1 Generierung von CTL-Klonen gegen das Antigen Rhamm	20
2.2.2 Generierung von CTL-Klonen gegen die LAAs PR-3 und Survivin.....	25
2.2.3 Erkennung von AML-Blasten durch die gegen PR-3, Rhamm bzw. Survivin gerichteten CTL-Klone.....	27
2.3 Generierung von Leukämie-reaktiven CTL-Klonen durch die Stimulierung mit DCs aus leukämischen Blasten	28
2.4 Erkennung von FLT3-ITD⁺ bzw. FLT3-WT⁺ DCs durch die generierten CTL- Klone	30
2.4.1 Klonierung von <i>FLT3-WT</i> , <i>FLT3-ITD</i> und <i>FLT3-TKD</i> in den lentiviralen Vektor pWPI	30
2.4.2 Generierung von FLT3-WT ⁺ bzw. FLT3-ITD ⁺ DCs mittels mRNA-Elektroporation ...	32
2.4.3 Erkennung von Bcr-Abl WT ⁺ und Bcr-Abl KD ⁺ DCs.....	34
2.5 Isolierung eines Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptors	36
2.6 Optimierung eines Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptors	39

3 Diskussion	43
4 Zusammenfassung	50
4 Summary	51
5 Material und Methoden	52
5.1 Material	52
5.1.1 Geräte	52
5.1.2 Chemikalien und biogene Substanzen	53
5.1.3 Radioaktive Substanzen.....	55
5.1.4 Zellkulturmedien, Zusätze und Wachstumsfaktoren	55
5.1.5 Peptide	56
5.1.6 Enzyme	56
5.1.6.1 Restriktionsenzyme	56
5.1.6.2 Polymerasen	57
5.1.6.3 Alkalische Phosphatase	57
5.1.7 Antikörper.....	57
5.1.8 Zelllinien.....	58
5.1.8.1 Adhärenz Zelllinien.....	58
5.1.8.2 Suspensionszelllinien	58
5.1.9 Oligonucleotide	59
5.1.9.1 Oligonucleotide für die RT-PCR.....	59
5.1.9.2 Oligonucleotide zum Sequenzieren.....	59
5.1.9.3 Oligonucleotide für das Einfügen von Restriktionsschnittstellen	60
5.1.9.4 Oligonucleotide für die TCR-Isolierung	60
5.1.9.5 Oligonucleotide für die TCR-Murinisierung.....	61
5.1.10 DNA- und Protein Molekulargewichtsmarker.....	61
5.1.11 DNA/RNA Aufreinigungssysteme	61
5.1.12 Sonstige Kitsysteme	61
5.1.13 Puffer- und Standardlösungen	62
5.2 Methoden	63
5.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	63
5.2.1.1 Primerkonstruktion und -synthese.....	63
5.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	64
5.2.1.3 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR).....	65
5.2.1.4 Generierung neuer Restriktionsschnittstellen mittels PCR	66
5.2.1.5 Restriktionsverdau.....	67
5.2.1.6 Dephosphorylierung.....	68
5.2.1.7 DNA-Gelelektrophorese.....	68
5.2.1.8 Isolation und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	69
5.2.1.9 Ligation von Nukleinsäuren.....	69
5.2.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in hitzekompetente Bakterien	70
5.2.1.11 Plasmid-DNA-Amplifikation in einer LB-Flüssigkultur	70
5.2.1.12 Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien	71
5.2.1.13 Kolonie-PCR.....	72
5.2.1.14 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA.....	72
5.2.1.15 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen	73
5.2.1.16 <i>in vitro</i> Transkription (IVT) von mRNA.....	73
5.2.1.17 Isolierung von humanen TCR-Genen	73
5.2.1.18 Murinisierung eines humanen TCR	78
5.2.2 Zellkultur	79
5.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien.....	79

5.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl	80
5.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	80
5.2.2.4 Generierung von immortalisierten B-Zelllinien	81
5.2.2.5 Retrovirale Transduktion.....	81
5.2.2.5.1 Transfektion von adhärennten Verpackungszellen zur Virusgewinnung	82
5.2.2.5.2 Transduktion mit retroviralem Überstand.....	82
5.2.2.6 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs).....	82
5.2.2.7 Differenzierung und Ausreifung von DCs aus Monozyten.....	83
5.2.2.8 Exogene Peptidbeladung von Zellen.....	84
5.2.2.9 Gentransfer in DC mittels mRNA-Elektroporation.....	84
5.2.2.10 Isolierung von CD8 ⁺ T-Zellen.....	84
5.2.2.11 Priming und Restimulation von CD8 ⁺ T-Zellen.....	85
5.2.2.12 Klonierung von T-Zellen.....	85
5.2.2.13 Expansion positiv getesteter T-Zellklone.....	86
5.2.3 T-Zellspezifitätstests und Analysen.....	86
5.2.3.1 ⁵¹ Cr-Freisetzungstest (Chromium release assay, CRA)	86
5.2.3.2 „hot-cold-target“-Assay	87
5.2.3.3 ELISpot-Zytokinsekretionstest.....	88
5.2.3.4 Sandwich-ELISA	89
5.2.3.5 Durchflusszytometrische Zellanalysen („FACS-Analyse“).....	90
5.2.3.5.1 Färbung auf Oberflächenmarker	90
5.2.3.5.2 Durchflusszytometrischer Nachweis von MHC/Peptid Multimerkomplexen .	91
5.2.4 Proteinbiologische Methoden	91
5.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	91
5.2.4.2 Übertragung von Proteinen auf eine Membran mit Hilfe des Western Blot/Immunblot Verfahrens	92
5.2.4.3 Färbung von membrangebundenen Proteinen mit Ponceau S.....	93
5.2.4.4 Detektion von Proteinen mit Hilfe der Immunfärbung	94
5.2.4.5 Befreiung membrangebundener Proteine von Antikörpern	94
5.2.4.6 Koloniebildungstest (colony forming assay).....	95
6 Literatur	96
Danksagung.....	106
Appendix	107

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gamma
μg	10^{-6} Gramm
μl	10^{-6} Liter
μM	10^{-6} Mol
ABL	„Abelson murine leukemia oncogene“
APC	Antigen-präsentierende Zelle („ <i>antigen presenting cell</i> “)
APS	Ammoniumpersulfat
BCR	„breakpoint cluster region“
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CD	Differenzierungscluster („ <i>cluster of differentiation</i> “)
cDNA	komplementäre DNS
CIAP	alkalische Phosphatase („ <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> “)
CTL	zytotoxische T-Zelle („ <i>cytotoxic T lymphocyte</i> “)
DC	dendritische Zellen („ <i>dendritic cell</i> “)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ELISpot	„enzyme-linked immunosorbent spot assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	„extracellular regulated kinase“
FACS	„Fluorescence-Activated Cell Sorter“
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor („ <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> “)
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor („ <i>human epidermal growth factor receptor</i> “)
HLA	„human leukocyte antigen“
IFN- α	Interferon α
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-7	Interleukin 7
IL-12	Interleukin 12
IL-15	Interleukin 15
IMDM	„Iscove's Modified Dulbecco's Media“

kb	Kilobase
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LMP	„low molecular mass polypeptide“
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („ <i>major histocompatibility complex</i> “)
min	minute
mM	10 ⁻³ Mol
MOI	„Multiplicity of infection“
mRNA	messenger RNA
ng	10 ⁻⁹ Gramm
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PE	Phycoerythrin
PGE-2	Prostaglandin E2
PI3-K	Phosphoinositol 3-Kinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ras	„rat sarcoma“
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute medium“
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetatpuffer
TAP	„transporter associated with antigen processing“
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TGF-β	„transforming growth factor“ β
TNF-α	Tumornekrosefaktor α („ <i>tumor necrosis factor α</i> “)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit („ <i>unit</i> “)
UV	Ultraviolett
VEGF	„vascular endothelial growth factor“

1 Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Sie führt zu einer zum Teil massiven Transformation unreifer Vorläuferzellen der Myelopoese, d. h. des Teils des blutbildenden Systems, der für die Bildung von Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten verantwortlich ist. Klinisch führt dies zur Expansion und Akkumulation von Blasten im Knochenmark und in der Mehrzahl der Fälle auch im Blut (Leukozytose)¹. Dieses Symptom der erhöhten Anzahl weißer Blutkörperchen und ihrer Vorstufen veranlasste Rudolf Virchow im Jahre 1845, der Erkrankung den Namen „Leukämie“ (gr.: „weißes Blut“) zu geben.

Die Ausbreitung der leukämischen Zellen in Knochenmark und Blut führt zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese, wodurch die betroffenen Patienten an Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie leiden. Insgesamt betrachtet ist die AML eine eher seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 2-3 Neuerkrankungen/100.000 im Jahr. Sie ist typischerweise eine Krankheit des mittleren und höheren Lebensalters, das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei 65 Jahren^{2,3}.

Grundlage der Diagnostik und Einteilung der AML ist die zytomorphologische und zytochemische Analyse von Ausstrichen des Knochenmarks und des peripheren Blutes. Nach der traditionellen FAB (French-American-British)-Klassifikation aus dem Jahr 1976⁴ erfolgt eine Einteilung der AML entsprechend des Reifungsgrades der Blasten und ihrer hämatopoietischen Linienzugehörigkeit. Eine Weiterentwicklung der FAB-Klassifikation stellt die WHO (world health organisation)-Klassifikation dar, die bei der AML häufig vorkommende zyto- und molekulargenetische Aberrationen mit einbezieht^{5,6}. Zudem besteht eine AML entsprechend der WHO-Kriterien bereits ab einem Blastenanteil von 20 %, während die FAB-Kriterien 30 % verlangen. Die WHO-Klassifikation unterscheidet vier Kategorien: 1. AML mit wiederkehrenden, zytogenetischen Abnormalitäten, wie z.B. t(8;21), t(15;17) oder inv(16). 2. AML mit myelodysplasieverwandten Veränderungen. 3. AML therapiebedingt. 4. AML ohne weitere Kategorie⁷. Die Identifizierung AML-spezifischer Chromosomenaberrationen und Mutationen ermöglicht im klinischen Alltag eine deutliche Verbesserung der Prognoseabschätzung⁸. Die balancierten Translokationen t(8;21) und t(15;17) sind beispielsweise mit einer guten Prognose assoziiert, während Aberrationen von Chromosom 5 oder 7 und komplexe Chromosomenanomalien in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose stehen.

1.2 Das „2-Hit“-Modell der Entstehung akuter Leukämien

Die Analyse von in AML-Patienten vorkommenden genetischen Aberrationen in Mausmodellen ergab, dass eine einzelne Mutation für die Ausprägung einer AML nicht ausreicht. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die retrovirale Transduktion von aktiviertem FLT3 oder RAS in primäre murine Knochenmarkszellen zu einem myeloproliferativen Phänotyp führt, aber keine akute Leukämie induziert⁹. Ähnliche Beobachtungen ließen sich bezüglich der Fusionsproteine AML1/ETO (t(8;21)) oder PML/RAR α (t(15;17)) machen, welche zu einer Beeinträchtigung der hämatopoietischen Entwicklung führen können, jedoch für sich alleine nicht ausreichen, um eine akute Leukämie in Mäusen zu verursachen¹⁰⁻¹².

Daher wird nach dem gegenwärtigen Modell der Leukämogenese postuliert, dass zur vollen Ausprägung einer AML mindestens zwei genetische Alterationen zusammenwirken müssen: Eine Mutation, die einen Proliferations- und/oder Überlebensvorteil für hämatopoetische Vorläuferzellen bietet (Klasse I Mutationen, z.B. aktivierende Mutationen in RAS, FLT3, KIT) sowie eine zweite „loss-of-function“ Mutation, welche die Differenzierung und die Apoptose der Zellen blockiert (Klasse II Mutationen, z.B. PML/RAR α , AML1/ETO, HOX Fusionsgene)¹³.

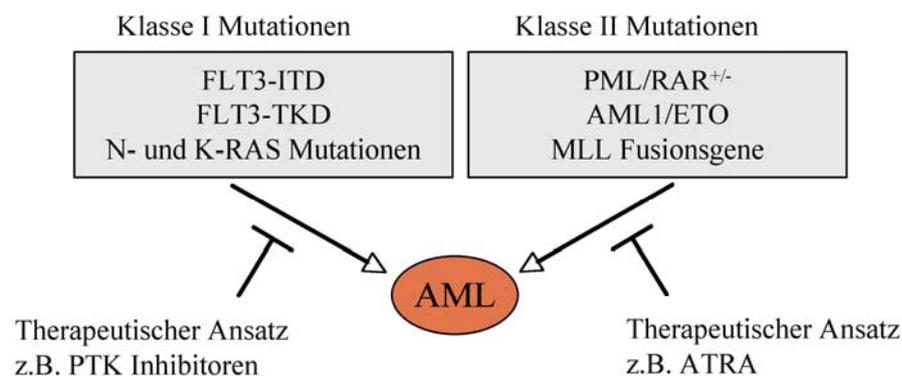


Abbildung 1: Modell zur Entstehung der akuten myeloischen Leukämie (AML). Zwei Mutationen der Klassen I und II müssen zusammenwirken, um eine AML zu induzieren. Demnach sollte der therapeutische Ansatz aus einer Kombinationstherapie bestehen, die gegen beide Klassen von Mutationen gerichtet ist (modifiziert nach Gilliland und Giffin¹⁴).

1.3 Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) sind Transmembranproteine mit einer zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne (TKD) und einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne. Die Einteilung in die 20 Subfamilien der RTK basiert auf der Sequenz der Tyrosinkinasedomäne und den strukturellen Motiven der extrazellulären Domäne^{15,16}. Einige RTK-Klassen sind nach dem natürlichen Liganden eines ihrer Mitglieder benannt.

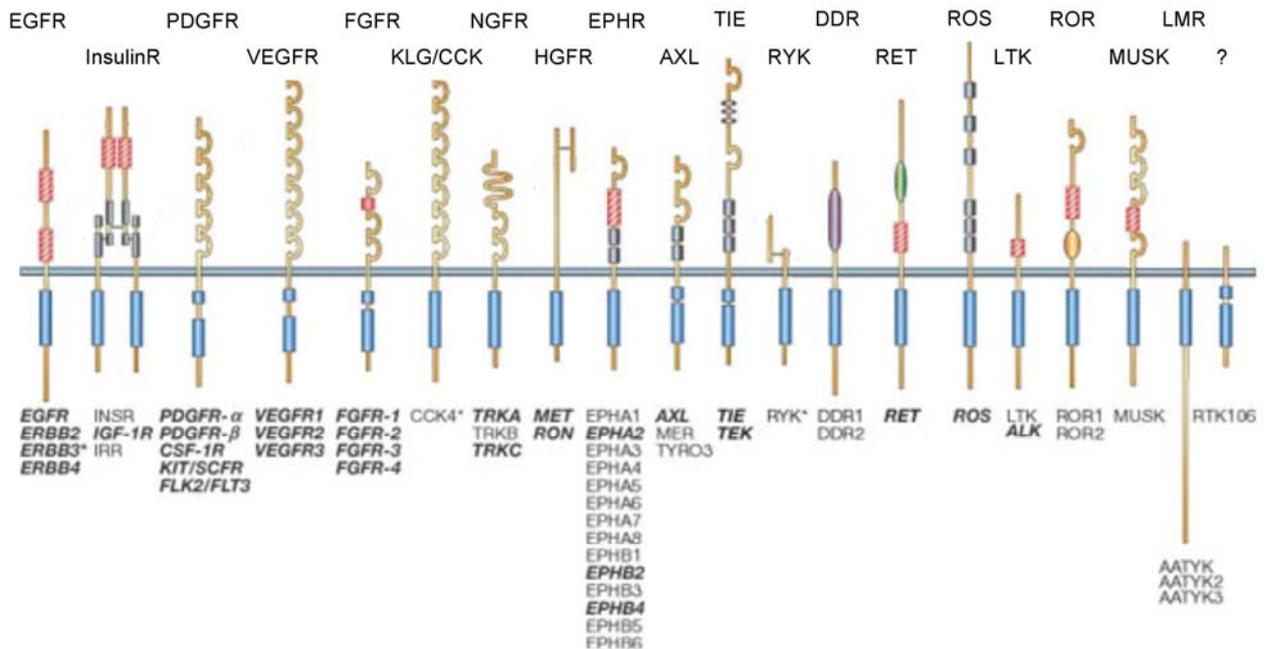


Abbildung 2.: Einteilung der humanen Rezeptortyrosinkinasen. Dargestellt ist jeweils der Prototyp der einzelnen Rezeptorfamilien. Die verschiedenen Klassen sind oben angegeben, die Mitglieder der jeweiligen Familie unten. Die kursiv gedruckten RTK stehen in Zusammenhang mit malignen Erkrankungen (nach Blume-Jensen und Hunter¹⁷).

Intrazellulär befindet sich eine Juxtamembrandomäne (JMD), welche die Transmembrandomäne von der TKD trennt. Die Kinasedomänen sind innerhalb der Tyrosinkinasen hoch konserviert¹⁸ und lassen sich in drei Strukturen einteilen: Die Aktivierungsschleife (*activation-loop, A-loop*), deren Konformation die Kinaseaktivität reguliert, die ATP-Bindungstasche (*ATP binding pocket*) und die katalytisch aktive Kinaseschleife (*catalytic loop*). Die Konformation der Aktivierungsschleife wird über die Phosphorylierung darin lokalisierter Tyrosinreste reguliert. Im inaktiven Zustand blockiert die Aktivierungsschleife sterisch die ATP-Bindungstasche. Die aus dem „N-lobe“ und „C-lobe“ bestehende Kinasedomäne ist bei manchen Rezeptortyrosinkinasen durch ein hydrophobes Kinaseinsert (KI) geteilt, dessen Funktion noch

nicht vollständig aufgeklärt ist. Die an die Kinasedomäne anschließende C-terminale Domäne enthält Autophosphorylierungsstellen, welche eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle spielen. Zudem wird dieser Domäne eine autoinhibitorische Funktion zugesprochen¹⁹.

RTK wurden im hämatopoietischen Gewebe nachgewiesen und spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Wachstums-, Differenzierungs- und Entwicklungssignalen²⁰. Neben ihrer Funktion in der normalen Hämatopoese ist gegenwärtig für mehr als die Hälfte der bislang 58 identifizierten humanen RTKs eine Assoziation mit hämatologischen Erkrankungen bekannt^{21,22}.

1.3.1 Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen

In inaktivem Zustand liegen die meisten RTK als Monomere vor. Die Konformation in der unstimulierten Form bedingt eine sterische Inhibierung der Di- bzw Oligomerisierung und somit auch der Aktivierung des Rezeptors. Daran sind vor allem die Aktivierungsschleife und die Juxtamembrandomäne mit ihrer helikalen Struktur beteiligt²³.

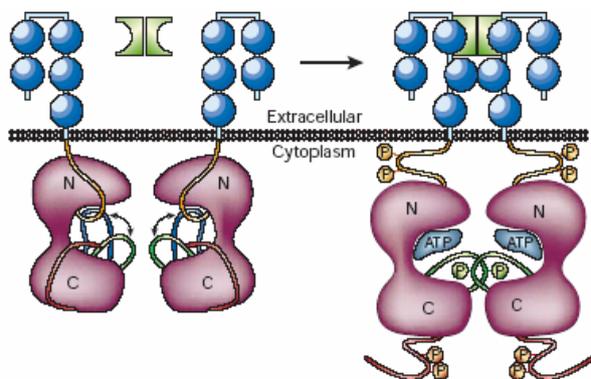


Abbildung 3: Aufbau und Aktivierung von RTKs. Links: Im inaktiven Zustand befinden sich die die Aktivierungs- und katalytische Schleife in einem Gleichgewicht zwischen Substrat-zugänglicher (grün) und Substrat-abweisender (blau) Konformation. Zusätzlich können die Juxtamembrandomäne (orange) und die C-terminale Region (rot) die Bindung des Substrat beeinträchtigen. Rechts: Die Bindung des Liganden verursacht die Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors und eine Aufhebung der inhibitorischen Konformation von Aktivierungsschleife, juxtamembraner und C-terminaler Region (nach Blume-Jensen und Hunter^{17,24}).

Bindet der Ligand an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, so bewirkt dies die Di- bzw. Oligomerisierung der RTK. Somit kommt es zur Aktivierung der Kinase durch Aufhebung der autoinhibitorischen Funktion und einer Konformationsänderung der Aktivierungsschleife.

Dadurch kann ATP an eine hoch konservierte Region des Moleküls binden und ermöglicht so die Trans-Phosphorylierung von Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren. Diese Phosphorylierung von Tyrosinresten in der Aktivierungsschleife stabilisiert deren offene Konformation, was die Anlagerung von Substraten gestattet (Abbildung 3). Zudem werden durch die Tyrosinphosphorylierung Bindungsstellen für Effektorproteine der Signaltransduktionskaskaden bereit gestellt^{15,25-27}. Nach der Aktivierung werden die Ligand-Rezeptor-Komplexe schnell internalisiert und abgebaut^{28,29}.

1.3.2 Signaltransduktion durch Rezeptortyrosinkinasen

Durch die Assoziation mit bestimmten Proteinen initiieren RTK nach ihrer Aktivierung intrazelluläre Signalkaskaden und leiten somit den externen Stimulus an zytoplasmatische oder im Zellkern lokalisierte Zielproteine weiter. Die Bindung von interagierenden Proteinen an spezifische Tyrosinreste des Rezeptors erfolgt unter anderem über nicht katalytische, hoch konservierte SH2 (Src-homology-2)-Domänen^{30,31} und PTB (Phosphotyrosine binding)-Domänen³². SH2-Domänen binden spezifisch an Aminosäuremotive, die durch bis zu sechs Aminosäuren C-terminal des Tyrosins definiert sind^{32,33}. PTB-Domänen hingegen erkennen die spezifisch zu bindenden Phosphotyrosine im Kontext mit den drei bis fünf N-terminal gelegenen Aminosäureresten³⁴. Beide Domänen befinden sich einzeln oder in Kombination mit anderen proteinbindenden Domänen in Adapterproteinen und in signalübertragenden Proteinen. Die Signalweiterleitung zwischen der aktivierten Tyrosinkinase und dem Effektorprotein erfolgt durch die Übertragung des γ -Phosphatrestes von ATP auf das Effektorprotein, welches das Signal aufgrund seiner katalytischen Aktivität in Form eines Phosphatrestes weiterleiten kann. Adapterproteine hingegen vermitteln gezielt die räumliche Nähe zwischen Kinase und Substrat, ohne selbst die Phosphatübertragung zu katalysieren^{31,35}.

1.4 Die Rezeptortyrosinkinase FLT3

Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) wurde im Jahre 1991 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander aus murinen fetalen Leberzellen³⁶ bzw. murinen Plazentazellen kloniert³⁷. Nur kurze Zeit später folgte die Klonierung des humanen Homologs^{38,39}. Das *FLT3*-Gen ist im humanen Genom auf Chromosom 13q12, im murinen Genom auf Chromosom 5 lokalisiert. Das humane *FLT3*-Gen besteht aus 24 Exons und codiert

für ein Protein, das aus 993 Aminosäuren aufgebaut ist^{38,40}. Nach der Translation liegt FLT3 zunächst als lösliches Protein mit einer Größe von 130–143 kD vor. Erst durch die posttranslationale Glykolisierung entsteht daraus die reife, membrangebundene Form mit einer Größe von 158–160 kD^{41,42}.

FLT3 gehört zur Klasse III der Rezeptortyrosinkinase-Familie, zu welcher auch der *Colony stimulating factor* (CSF)-1 Rezeptor, *Platelet derived growth factor* (PDGFR) und der Stammzellfaktor (SCFR, c-KIT) gehören^{24,43}. Der FLT3-Rezeptor ist auch als FLK2 (*fetal liver kinase 2*), STK1 (*human stem cell kinase 1*) oder CD135 bekannt.

1.4.1 Struktur des FLT3-Rezeptors

Sämtliche Mitglieder der Klasse III-Rezeptortyrosinkinase-Familie weisen eine strukturelle Homologie auf⁴³⁻⁴⁵. Sie sind charakterisiert durch einen extrazellulären Bereich, der jeweils aus fünf immunglobulinartigen Domänen besteht, einen transmembranen Bereich, dem sich intrazellulär die juxtamembrane Domäne (JM) anschließt und der Kinasedomäne, die bei manchen Vertretern durch einen hydrophoben Kinaseeinschub zweigeteilt ist (*kinase insert domain*; KID). Die ATP-Bindungstasche befindet sich in der N-terminalen Kinasedomäne. In der C-terminalen Kinasedomäne ist die Aktivierungsschleife lokalisiert (Abbildung 4A).

Die Kristallstruktur der FLT3-Kinase in ihrer inaktiven (autoinhibierten) Form konnte im Jahr 2004 aufgeklärt werden (Abbildung 4B). Die Aktivierungsschleife liegt in ihrer geschlossenen Konformation eingebettet zwischen der N- und der C-terminalen Kinasedomäne. Die Juxtamembrandomäne dient als wichtigstes autoinhibitorisches Element der inaktiven FLT3-Kinase, da sie die ATP-Bindungstasche sterisch blockiert und eine Anlagerung des Substrates verhindert⁴⁶. Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor nimmt die Aktivierungsschleife eine offene Konformation an, welche die Bindung von ATP und Proteinsubstraten erlaubt. Die Kinase-Aktivierungsschleifen beinhalten in der Regel ein bis drei Tyrosinreste (Y589, Y591, Y599), deren Phosphorylierung wahrscheinlich für die Konformationsänderung dieser Domäne verantwortlich ist. Die aus der Bindung von ATP resultierende Autophosphorylierung des Tyrosin 842 bewirkt eine Stabilisierung der offenen Konformation der Schleife^{14,46,47}.

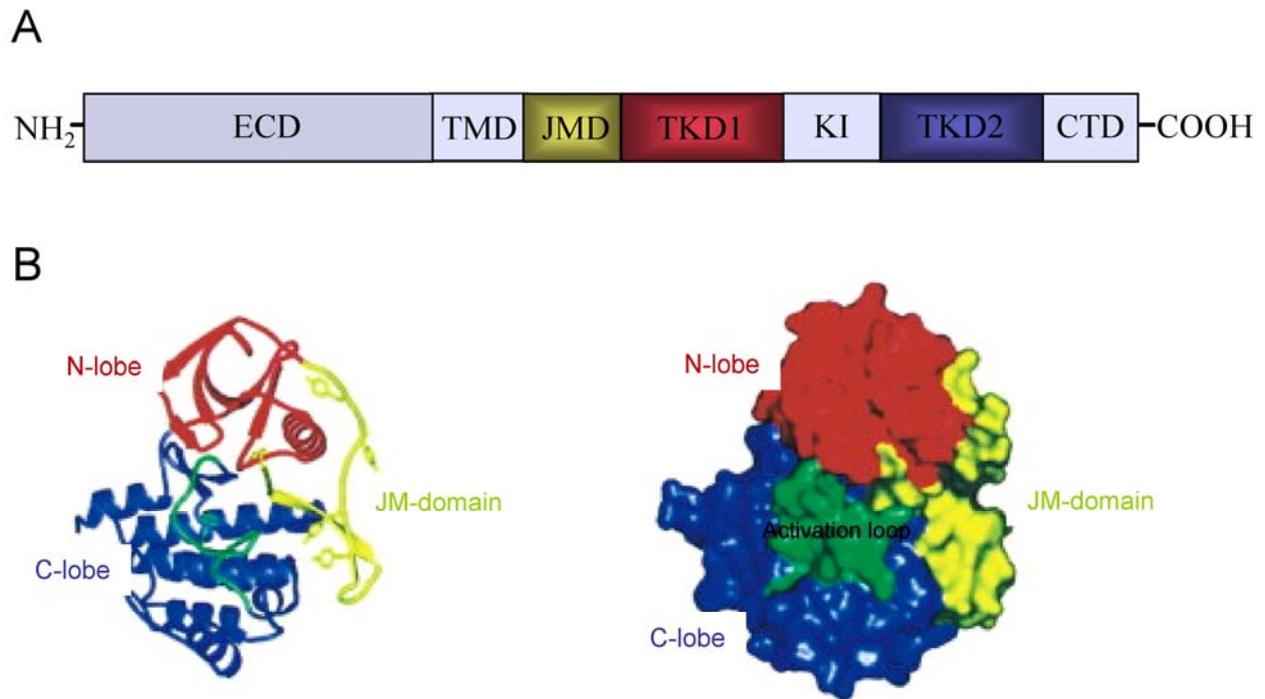


Abbildung 4: Struktur der FLT3-Tyrosinkinase. (A) Schematische Darstellung des FLT3-Rezeptors. ECD: extrazelluläre Domäne; TMD: Transmembrandomäne; JMD: Juxtamembrandomäne; TKD: Tyrosinkinasedomäne; KI: Kinaseinsert; CTD: C-terminale Domäne. (B) Kristallstruktur des intrazellulären Teils von FLT3 in autoinhibierter Form. Die Aktivierungsschleife (grün) liegt zusammengefaltet zwischen der N- (rot) und der C- (blau) terminalen Kinasedomäne vor. In diesem Zustand ist die Bindung von Substrat und ATP sterisch blockiert. Die Juxtamembrandomäne (gelb) dient als autoinhibitorisches Element und verhindert das Öffnen der Aktivierungsschleife (nach Griffith *et al.*⁴⁶).

1.4.2 FLT3-Expression in hämatopoietischen Zellen

FLT3 spielt eine wichtige Rolle in der normalen Hämatopoese und wird vor allem in frühen myeloischen und lymphatischen Progenitorzellen im Knochenmark, im Thymus und den Lymphknoten exprimiert³⁸. Die FLT3-Expression geht im Normalfall mit zunehmender Differenzierung der Zellen in die unterschiedlichen hämatopoietischen Linien verloren^{45,48}.

Die Aktivierung des FLT3-Rezeptors durch seinen Liganden bewirkt *in vitro* die Proliferation von frühen hämatopoietischen Progenitorzellen^{49,50}. Die durch FLT3 in hämatopoietischen Zellen vermittelten Effekte stehen in Zusammenhang mit verschiedenen kostimulatorischen Wachstumsfaktoren und Interleukinen. Während die ausschließliche Stimulation mit dem FLT3-Liganden (FL) die Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen nur geringfügig anregt und eine Differenzierung in Monozyten bzw. Makrophagen fördert, konnte für die Kombination von

FL mit anderen Wachstumsfaktoren eine deutlich erhöhte proliferative Aktivität sowie ein verstärktes Koloniewachstum von Progenitoren der granulozytär-monozytären Linie (CFU-GM) beobachtet werden^{51,52}. Dabei hat sich beispielsweise die Kombination aus FL, dem Stammzellfaktor (SCF, c-KIT Ligand) und Interleukin 3 (IL-3) als starker proliferativer Stimulus für myeloide Progenitoren erwiesen^{53,54}.

1.4.3 Die Rolle von FLT3 in der Leukämogenese

FLT3 wird in den leukämischen Blasten von 70–90 % der Patienten mit AML und akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) exprimiert^{45,48}. Auch in Fällen von chronisch myeloischer Leukämie (CML) konnte FLT3 während eines Blastenschubs nachgewiesen werden⁴⁰.

Die Aktivierung des FLT3-Rezeptors induziert ein anti-apoptotisches und pro-proliferatives Signal in primären AML-Blasten und spielt somit eine essentielle Rolle in der Leukämogenese⁴³. Hierbei kann eine Überexpression von FLT3-WT in Zusammenhang mit autokriner, parakriner oder endokriner Stimulierung oder eine aktivierende Mutation des FLT3-Rezeptors von Bedeutung sein^{55,56}. *FLT3* stellt das am häufigsten von Mutationen betroffene Gen bei akuten myeloischen Leukämien dar⁴⁰.

1.4.4 FLT3 *internal tandem duplications* (FLT3-ITD)

Längenmutationen (*internal tandem duplication*, ITD) innerhalb der Juxtamembrandomäne der FLT3-Kinase wurden erstmals im Jahre 1996 in AML-Patienten identifiziert⁵⁷. Bei diesen handelt es sich in der Regel um Duplikationen von Nukleotidsequenzen, die in ihrer Länge zwischen 3 und mehr als 400 Basenpaaren variieren können. Der Leserahmen bleibt immer erhalten, in einigen Fällen durch die Insertion eines zusätzlichen Nukleotids⁵⁸. FLT3-ITD Mutationen finden sich durchschnittlich bei 20–30 % der Patienten mit AML sowie bei 10–15 % der Patienten mit myelodysplastischen Syndrom^{59–62}. Bei Patienten mit ALL sind FLT3-Längenmutationen selten zu finden^{57,63–66} und in normalen hämatopoietischen Stammzellen nie⁶⁷. Die resultierende veränderte Primärstruktur des Proteins führt dazu, dass die Juxtamembrandomäne ihre autoinhibitorische Funktion nicht mehr erfüllen kann. Es kommt zu einer ligandenunabhängigen Oligo- bzw. Dimerisierung und somit zu einer konstitutiven Autophosphorylierung des Rezeptors^{60,68}. Dies führt zur Aktivierung verschiedener mitogener Signalkaskaden, u.a. des *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5)- und

mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Signalweges, sowie zu liganden-unabhängigem Zellwachstum in verschiedenen Zelllinien^{60,69-75}.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die klinische Prognose für AML-Patienten mit FLT3-ITD wesentlich schlechter ist, als für AML-Patienten, die diese Mutation nicht haben^{58,76-81}. Der zusätzliche Verlust des FLT3-Wildtyp-Allels hat eine weitere Verschlechterung der Prognose zur Folge⁸².

Die Tatsache, dass die FLT3-Kinaseaktivität bei der Entwicklung eines myeloproliferativen Phänotyps eine wichtige Rolle spielt, konnte im Mausmodell nachgewiesen werden. Die Transplantation von FLT3-ITD⁺ Knochenmark in Mäuse führt zu einer myeloproliferativen Erkrankung. Ein ähnlicher Phänotyp lässt sich nach der transgenen Expression von FLT3-ITD in Mäusen beobachten^{9,83,84}. Im Gegensatz dazu verursacht FLT3-ITD im Zusammenhang mit dem Translokationsprodukt PML-RAR α im Mausmodell eine AML-ähnliche Erkrankung⁸⁵. Diese Daten unterstützen die unter 1.2 beschriebene „2-Hit“-Hypothese, die besagt, dass neben einer Mutation des FLT3-Rezeptors noch weitere, die Differenzierung beeinflussende Mutationen notwendig sind, um eine AML zu induzieren¹⁴. Die Tatsache, dass der Großteil der FLT3-ITD⁺ Patienten einen normalen Karyotyp aufweist, legt die Vermutung nahe, dass bei diesen Patienten zusätzliche, zytogenetisch nicht nachweisbare Mutationen vorliegen⁵⁸.

1.4.5 Punktmutationen innerhalb der Aktivierungsschleife von FLT3

Punktmutationen in der Aktivierungsschleife der Tyrosinkinasedomäne (TKD) stellen nach FLT3-ITD die häufigste Klasse aktivierender Mutationen des *FLT3*-Gens dar. Am häufigsten ist die Asparaginsäure an Position 835 (D835) betroffen. In den meisten Fällen handelt es sich um Substitutionen von Tyrosin oder Histidin. Seltener werden aktivierende Mutationen der Aminosäuren Isoleucin 836 (I836) und Asparagin 841 (N841) sowie Deletions- oder Insertionsmutationen innerhalb der C-terminalen Tyrosinkinasedomäne des FLT3-Rezeptors detektiert^{72,81,86,87}.

TKD-Mutationen kommen bei ca. 6-7 % der Patienten mit einer AML vor und treten unabhängig von ITD-Mutationen auf²². Zudem können TKD-Mutationen in 3-5 % der myelodysplastischen Syndrome (MDS) sowie bei 3 % aller ALL-Fälle nachgewiesen werden^{72,81,88}.

Der Austausch von Aminosäureresten, die zur Stabilisierung der geschlossenen Konformation der Aktivierungsschleife nötig sind, führt zur Aufhebung der autoinhibitorischen Funktion der

Aktivierungsschleife. Somit kommt es zur konstitutiven Phosphorylierung des Rezeptors und zur deregulierten Aktivierung verschiedener Signalwege (siehe 1.4.4)^{72,73,75,89,90}.

Im Gegensatz zu FLT3-ITD scheinen FLT3-TKD in AML-Patienten keinen Einfluss auf die klinische Prognose zu haben^{81,91,92}.

1.4.6 FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren

Bislang wurden verschiedene FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt, deren Wirksamkeit in zahlreichen präklinischen Modellen überprüft wurde. Zu diesen zählen CEP-701⁹³, MLN518 (CT53518)⁹⁴, SU11248⁹⁵, SU5416⁹⁶ und PKC412⁹⁷.

Das Wirkprinzip der meisten Kinaseinhibitoren besteht darin, sich reversibel in der ATP-Bindungstasche anzulagern. Dies führt zu einer Blockade der enzymatischen Wirkung der Kinase und letztlich zur gezielten Unterdrückung der pathologisch verstärkten Signalweiterleitung. Der Einsatz von Kinaseinhibitoren könnte sowohl bei Überexpression der Zielkinase als auch bei deren deregulierter Aktivität sinnvoll sein⁶⁶. Ein Problem bei der Entwicklung selektiver Tyrosinkinaseinhibitoren ist die hohe Homologie der ATP-Bindungstaschen verschiedener Kinasen. Eine unspezifische Hemmung mehrerer Tyrosinkinasen könnte zahlreiche Nebenwirkungen zur Folge haben^{14,98}. Zudem führt der Einsatz sogenannter zielgerichteter Therapien oft nicht zu den erhofften spezifischen Wirkungen, da die Komplexität der Signalübertragungen hoch selektive Wirkungen nicht zulässt.

Als Monotherapie konnte mit mehreren FLT3-Inhibitoren in klinischen Phase I und II Studien ein günstiges Toxizitätsprofil sowie die biologische Wirksamkeit dieser Substanzen gezeigt werden. Anders als bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) war das Ansprechen bei AML-Patienten meist jedoch nur von kurzer Dauer und auf periphere Blasten beschränkt. Blasten im Knochenmark wurden nur in wenigen Fällen reduziert. Komplette oder dauerhafte Remissionen konnten daher nur selten beobachtet werden⁹⁹⁻¹⁰¹. Die offensichtlich rasche Resistenzentwicklung hat zur klinischen Prüfung dieser Substanzen in Kombination mit konventioneller Chemotherapie geführt¹⁰². Mehrere FLT3-Inhibitoren befinden sich derzeit in der Phase I und II und Midostaurin (PKC412) in der Phase III der klinischen Prüfung.

1.4.7 FLT3 als Zielstruktur in der Immuntherapie

Auch im Falle einer Chemo- oder Strahlentherapie kommt es häufig zur Resistenzbildung, was eine weitere Behandlung deutlich erschwert. Hinsichtlich neuer Therapieverfahren, die eine möglichst hohe selektive Wirkung gegen Krebszellen aufweisen, bieten die verschiedenen Ansätze der Krebsimmuntherapie ein vielversprechendes Potenzial. Hierzu zählen unter anderem Vakzinierungsansätze mit Peptiden sowie der adoptive T-Zelltransfer. Graf *et al.* ist es bereits gelungen, HLA-A*0101 (HLA-A1)- restringierte, zytotoxische T-Zellen gegen ein Peptidepitop der FLT3-ITD-Mutation eines AML-Patienten zu generieren¹⁰³. Aufgrund seiner vorwiegend intrazellulären Lokalisation kann man davon ausgehen, dass das FLT3-ITD-Protein nach proteosomalem Abbau über den MHC-Klasse-I Weg prozessiert und präsentiert wird¹⁰⁴. Die starken Variationen in der Länge und der Sequenz der ITD-Mutationen setzen allerdings voraus, dass für die Gesamtheit der betroffenen Patienten viele verschiedene Peptidepitope identifiziert werden müssen. Ein alternativer immuntherapeutischer Ansatzpunkt liegt in der Charakterisierung von Leukämie assoziierten Antigenen (LAA) im Hinblick auf Immunantworten und Expressionsmuster. Eine gegen ein breites Spektrum von LAAs gerichtete Immuntherapie wäre beispielsweise geeignet, um spezifisch solche Zellen anzugreifen, die bei einem Großteil der Patienten für die minimale Resterkrankung verantwortlich sind (*minimal residual disease*, MRD). Diese Art von Immuntherapie könnte somit den antileukämischen Effekt nach Chemotherapie und allogener Stammzell-Transplantation steigern und die Dauer einer durch Chemotherapie oder Bestrahlung erreichten Remission verlängern bzw. erhalten. Beispielsweise konnte bereits nachgewiesen werden, dass die konstitutiv aktive Bcr-Abl-Tyrosinkinase, die bei der Entstehung von CML eine wichtige Rolle spielt, die Expression verschiedener LAAs hochreguliert. Hierzu gehören Prame, PR-3 und HAGE¹⁰⁵. Diese Ergebnisse haben entscheidenden Einfluss auf die zukünftige Entwicklung von Immuntherapien gegen CML, da sich diese bislang auf das Bcr-Abl-Fusionsprotein als Zielstruktur konzentrierten. Sollte diese durch Kinaseaktivität induzierte Regulierung bestimmter LAAs auch auf andere Tyrosinkinasen, wie z.B. FLT3, übertragbar sein, so würde dies einen wichtigen Schritt in der Konzeption übergreifender immuntherapeutischer Strategien gegen Leukämien darstellen.

1.5 Leukämie-assoziierte Antigene

Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz immuntherapeutischer Maßnahmen ist die Expression von Leukämie- oder zumindest Linien-spezifischen Zielstrukturen auf den zu eliminierenden Krebszellen. Im letzten Jahrzehnt konnten einige Leukämie-assoziierte Antigene (LAA), die spezifische T-Zellantworten in AML-Patienten induzieren, identifiziert und charakterisiert werden. Die meisten der bislang bekannten LAAs sind in die Regulierung des Zellzyklus oder der Zellproliferation involviert¹⁰⁶. Mit dem *preferentially expressed antigen in melanoma* (Prame) wurde zum ersten Mal ein von spezifischen CTLs erkanntes Antigen definiert^{107,108}, das sowohl im malignen Melanom und anderen soliden Tumoren, als auch in 30 % der Blasten von AML-Patienten exprimiert wird¹⁰⁸. Prame bindet in Anwesenheit von Retinsäure an den Retinsäurerezeptor und inhibiert somit die Liganden induzierte Aktivierung des Rezeptors und die Transkription bestimmter, in Zellzyklus und Zelldifferenzierung involvierter Gene^{106,109}.

Wilms tumor gene 1 (WT-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der in CD34⁺ Zellen der frühen normalen Hämatopoese und in den Blasten der meisten AML-Patienten exprimiert wird^{110,111}. Grundsätzlich steht die Expression von WT-1 in AML-Blasten im Zusammenhang mit einer für den betroffenen Patienten schlechten Prognose^{112,113}. WT-1 bindet an regulatorische Sequenzen von Genen, welche für die Zelldifferenzierung oder den Prozess der Apoptose von Bedeutung sind¹⁰⁹. In HLA-A2⁺ und HLA-A24⁺ AML-Patienten konnten bereits spezifische T-Zellantworten gegen verschiedene WT-1 Peptidepitope nachgewiesen werden¹¹⁴.

Ein weiteres, in myeloischen Leukämien überexprimiertes Antigen ist die Proteinase-3 (PR-3, Myeloblastin)¹¹⁵. Es handelt sich um eine Serinprotease, die einen Bestandteil der azurophilen der neutrophilen Granulozyten und der Lysosomen der Monozyten darstellt^{116,117}. PR-3 spielt eine wichtige Rolle in den Prozessen der Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose^{118,119}. Es gibt Hinweise darauf, dass diese Protease direkt zum malignen Phänotyp leukämischer Zellen beiträgt, da die Inhibierung der Proteinase-3 die Proliferation verschiedener leukämischer Zellen unterdrückt¹²⁰. Die Bildung von Antikörpern (ANCA, *antineutrophil cytoplasmatic antibodies*) gegen PR-3 in der Wegener-Granulomatose, einer Autoimmunerkrankung des Menschen, verdeutlicht die Immunogenität dieser Protease¹²¹. Zudem konnten für ein HLA-A2-restringiertes Peptidepitop (PR-1) von PR-3 bereits spezifische Immunantworten in AML- und CML-Patienten nachgewiesen werden¹²².

Der Hyaluronsäure-Rezeptor Rhamm (*receptor for hyaluronan-mediated motility*, CD168) spielt eine wichtige Rolle bei Zellwachstum, -differenzierung und -motilität¹²³. Im normalen Gewebe wird Rhamm im Hoden, in der Plazenta und im Thymus exprimiert. Ebenso konnte eine hohe Rhamm-Expression unter anderem im Ovarialkarzinom, im Nierenzellkarzinom und in den Blasten von AML- und CML-Patienten detektiert werden¹²⁴. Mit dem HLA-A2-restringierten Peptidpitop R3 (p165-173: ILSLELMKL) konnten in AML-Patienten bereits spezifische Immunantworten durch CD8⁺ T-Zellen induziert werden¹²⁵.

Das Antigen Survivin stellt ebenfalls eine vielversprechende Zielstruktur für spezifische Immuntherapien dar. Es ist ein Apoptose-hemmendes-Protein, das häufig in humanen malignen Zellen epithelialen und hematopoietischen Ursprungs exprimiert wird¹²⁶. In den meisten ausdifferenzierten Geweben findet man keine Survivin Expression¹²⁷. In AML-Patienten wurden bereits Survivin-spezifische Immunantworten durch CD8⁺T-Zellen nachgewiesen^{128,129}.

1.6 Zielsetzung

Basierend auf Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das in CML exprimierte Fusionsprotein Bcr-Abl selbst keine messbare Immunogenität induziert. Stattdessen haben Antigene, die durch die Aktivität der Bcr-Abl-Kinase hochreguliert werden, einen wesentlichen Anteil an der T-Zell vermittelten anti-leukämischen Immunreaktion¹⁰⁵. Aus diesen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob das Prinzip der Expression bestimmter Antigene in Abhängigkeit von der Kinaseaktivität auf andere Rezeptortyrosinkinasen übertragbar ist. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des FLT3-Proteins untersucht.

Hierfür sollten zunächst die beiden leukämischen Zelllinien RS4;11 (FLT3-WT⁺) und MV4;11 (FLT3-ITD⁺) mittels RT-PCR auf die Expression bestimmter Leukämie-assoziiierter Antigene (LAA) untersucht werden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Aktivität der FLT3-Tyrosinkinase und der Regulierung der Expression verschiedener Antigene wurde in RS4;11-Zellen mit Hilfe von FLT3-Ligand bzw. FLT3-siRNA, in MV4;11-Zellen mit Hilfe des FLT3-Inhibitors SU5614 analysiert. Da die Wahl der Zielstruktur die wichtigste Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz immuntherapeutischer Maßnahmen darstellt, ist die im Rahmen dieser Arbeit geplante Aufklärung der potentiellen Regulierung bestimmter Antigene durch die FLT3-Kinaseaktivität von erheblicher Bedeutung bezüglich der zukünftigen Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze gegen AML.

Weiterhin wird in dieser Arbeit die Generierung von zytotoxischen T-Zellklonen dargestellt, die spezifisch gegen die bekannterweise in Leukämien überexprimierten Antigene PR-3, Survivin bzw. Rhamm gerichtet sind. Die nachfolgenden Spezifitätsanalysen der einzelnen T-Zellklone sollten klären, ob die einzelnen Klone die entsprechenden endogen prozessierten Epitope erkennen oder lediglich Zielzellen, die exogen mit dem jeweiligen Peptid beladen wurden. Das langfristige Ziel hierbei ist die Isolierung von antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR) für den adoptiven T-Zelltransfer. Dadurch bietet sich die Möglichkeit einer direkten Spezifitätsübertragung auf T-Zellen, z.B. auf T-Zellen von AML-Patienten, um lange und arbeitsaufwändige Verfahren zur Isolierung und Expansion spezifischer T-Zellklone aus dem Zellpool eines Patienten umgehen zu können.

Zusätzlich wurden T-Zellen von gesunden Spendern mit dendritischen Zellen (DC) von AML-Patienten stimuliert und die resultierenden Klone (CTL_{AML}-Klone) auf ihre Fähigkeit, bestimmte Peptide bzw. AML-Blasten zu erkennen, getestet.

Um die Erkennung von myeloiden Zellen durch T-Zellen in Abhängigkeit von der Aktivität der FLT3-Kinase zu analysieren, sollten sämtliche, im Rahmen dieser Arbeit generierten T-Zellklone gegen FLT3-WT⁺ sowie FLT3-ITD⁺ Zellen getestet werden. Als Zielzellen dienten in diesem Fall DC, in welche ein FLT3-WT- bzw. FLT3-ITD-Konstrukt eingebracht wurde, jeweils mit/ohne Behandlung von FLT3-Ligand bzw. FLT3-siRNA.

Schließlich sollte untersucht werden, ob es Überschneidungen im Repertoire der durch die FLT3- bzw. Bcr-Abl-Tyrosinkinase regulierten Antigene gibt. Hierfür wurden die, gegen FLT3-regulierte Antigene gerichteten, T-Zellklone sowie die CTL_{AML}-Klone gegen DC, die ein Kinase-aktives Bcr-Abl-Wildtyp-Konstrukt bzw. ein Kinase-defizientes Bcr-Abl-Konstrukt exprimieren, getestet. Sollte sich in dieser Arbeit zeigen, dass die bereits für das Bcr-Abl-Protein nachgewiesene Expression bestimmter Antigene in Abhängigkeit von der Kinaseaktivität auch auf die FLT3-Kinase übertragbar ist, so wäre dies von großer Bedeutung für die Konzeption zukünftiger, immuntherapeutischer Strategien gegen myeloische Leukämien.

2 Ergebnisse

2.1 Analyse des Antigenrepertoires in Abhängigkeit von der FLT3-Kinaseaktivität

Im nicht phosphorylierten Zustand liegt die Rezeptortyrosinkinase FLT3 in ihrer inaktiven Konformation vor. Eine Stimulation des Rezeptors durch den FLT3-Liganden (FL) bewirkt entsprechende Konformationsänderungen des Rezeptors. Somit kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des FLT3-Proteins, was zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege führt^{15,25}. Diese ligandenabhängige Regulation kann durch bestimmte Mutationen aufgehoben werden. Es ist bekannt, dass sowohl interne Tandem-Duplikationen (*internal tandem duplications*) in der Juxtamembrandomäne als auch Punktmutationen des Aspartat 835 (D835) in der Tyrosinkinasedomäne zu einer konstitutiven, Liganden-unabhängigen Aktivierung des FLT3-Rezeptors führen^{60,69-72,89}.

In der Arbeitsgruppe konnte bereits nachgewiesen werden, dass das in CML-Patienten vorliegende Fusionsprotein Bcr-Abl aufgrund seiner Kinaseaktivität zur Hochregulierung bestimmter Antigene führt, welche wiederum einen wesentlichen Anteil an einer T-Zell vermittelten anti-leukämischen Immunreaktion haben. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Kinase-defiziente Form des Bcr-Abl-Rezeptors keine Regulierung bestimmter Antigene¹⁰⁵. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob dieses Prinzip auf die FLT3-Rezeptortyrosinkinase übertragbar ist und ob es aufgrund einer ITD-Mutation im FLT3-Protein zu Unterschieden in der Antigenexpression kommt.

2.1.1 Untersuchung der Expression bestimmter Leukämie-assoziiierter Antigene in RS4;11 (FLT3-WT⁺)- und MV4;11 (FLT3-ITD⁺)-Zellen

Die Identifizierung und Charakterisierung von Leukämie-assoziierten Antigenen (LAA) ist ein wichtiger Ansatzpunkt, um spezifische Immuntherapien für Leukämiepatienten zu entwickeln. Gegenwärtig sind einige LAAs bekannt, deren MHC-restringierte Peptidpitope in AML-Patienten cytotoxische CD8⁺ T-Zellen aktivieren und somit spezifische T-Zellantworten induzieren können. Hierzu gehören die Antigene WT-1 (Wilms Tumor 1)^{112,130}, PR-3 (Proteinase 3)¹²², Rhamm (*receptor for hyaluronic acid-mediated motility*)^{109,125}, Prame (*preferentially expressed antigen of melanoma*)^{108,109} und Survivin¹²⁸.

Um zu analysieren, ob ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des FLT3-Proteins und der Expression bestimmter LAAs besteht, wurde zunächst am Beispiel der RS4;11- und der MV4;11-Zelllinie getestet, ob diese humanen, FLT3⁺ leukämischen Zelllinien die oben genannten LAAs exprimieren. Beide Zelllinien tragen die chromosomale Translokation t(4;11)(q21;q23), allerdings mit unterschiedlichen Bruchpunkten. Bei RS4;11 handelt es sich um eine FLT3-WT⁺, akute lymphoblastische Leukämie-Zelllinie, bei MV4;11 um eine FLT3-ITD⁺, akute myeloische Leukämie-Zelllinie.

Um die Expression verschiedener Antigene in diesen Zelllinien zu testen, wurde zunächst die RNA aus beiden Zelllinien isoliert (5.2.1.15). Nach reverser Transkription (5.2.1.16) wurden RT-PCR-Reaktionen mit den für die jeweiligen Antigene spezifischen Primern durchgeführt. Wie aus den Abbildungen 6 und 7 ersichtlich wird, lassen sich die LAAs WT-1, PR-3, Rhamm, Prame und Survivin sowohl in RS4;11- als auch in MV4;11-Zellen nachweisen. Allerdings ist die Expression der untersuchten LAAs in den RS4;11-Zellen deutlich schwächer als in den MV4;11-Zellen.

2.1.2 Analyse der Regulierung bestimmter LAAs durch die FLT3-Kinaseaktivität

2.1.2.1 Inhibierung der konstitutiven FLT3-Kinaseaktivität in MV4;11-Zellen

In einem weiteren Schritt sollte überprüft werden, ob zwischen der Expression der LAAs WT-1, PR-3, Rhamm, Prame und Survivin und der Aktivität der FLT3-Rezeptortyrosinkinase ein Zusammenhang besteht. Dafür wurde zunächst die Expression der genannten LAAs in MV4;11-Zellen, welche die konstitutiv aktive FLT3-ITD-Mutante exprimieren, nach Zugabe des FLT3-Tyrosinkinaseinhibitors SU5614 untersucht.

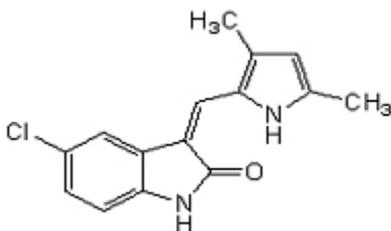


Abbildung 5: Strukturformel von SU5614 (5-Chloro-3-[(3,5-dimethylpyrrol-2-yl)methylen]-2-indolinon)

Bei SU5614 handelt es sich um einen klein-molekularen Kinaseinhibitor aus der Klasse der Indolinone. SU5614 bindet als ATP-kompetitive Substanz in der ATP-Bindungstasche der Kinase. Durch die höhere Affinität zur Kinase wird somit die Anlagerung von ATP inhibiert und die Kinase kann nicht mehr aktiviert werden^{96,131}. Auf diese Weise kann ein konstitutiv aktiver Rezeptor wie das FLT3-ITD-Protein durch SU5614 inhibiert werden¹³². Die IC₅₀-Werte von SU5614 bezüglich der FLT3-Phosphorylierung entsprechen der halbmaximalen Inhibition der Phosphorylierung, d.h. der Konzentration, welche die Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors um 50 % verringert. Für SU5614 liegen die IC₅₀-Werte bei etwa 10nM⁹⁶

Um die Abhängigkeit der Expression der verschiedenen LAAs von FLT3 zu analysieren, wurden MV4;11-Zellen für einen Zeitraum von insgesamt 72 h mit SU5614 inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde RNA aus diesen Zellen isoliert (5.2.1.15) und nach reverser Transkription (5.2.1.16) wurden PCRs mit den entsprechenden Primern durchgeführt, um die Expression der LAAs WT-1, PR-3, Rhamm, Prame bzw. Survivin zu dokumentieren.

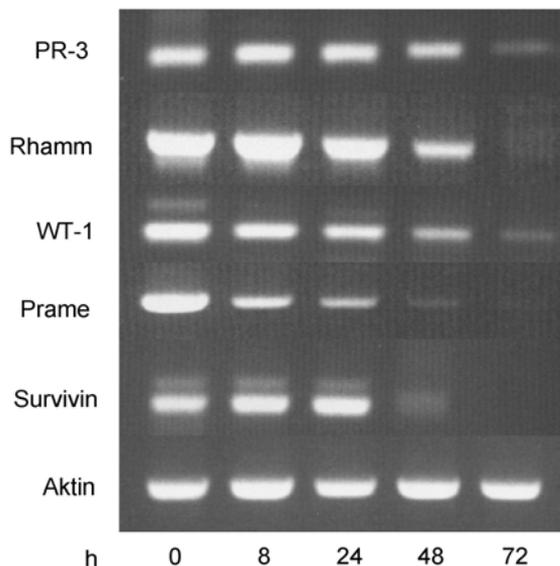


Abbildung 6: Regulation von FLT3-assoziierten Antigenen durch die FLT3-Kinaseaktivität. Nach der Behandlung von MV4;11-Zellen mit SU5614 wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten RT-PCR Reaktionen zur Analyse der Expression verschiedener FLT3-regulierter bzw. AML-assoziiierter Antigene durchgeführt. PR-3, Rhamm, WT-1, Prame und Survivin zeigen eine deutlich FLT3-Kinase-abhängige Regulation.

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich wird, zeigen MV4;11-Zellen grundsätzlich eine hohe Expression der verschiedenen Antigene. Nach der Behandlung mit SU5614 ist für alle untersuchten LAAs innerhalb eines Zeitraums von 72 h eine deutliche Abnahme der Expression zu erkennen. Die Antigene Prame und Survivin zeigen bereits nach 48 h eine deutlich abgeschwächte Expression, während die Expression von PR-3, Rhamm und WT-1 erst nach 72 h deutlich verringert ist. Als Kontrolle ist zu jedem Zeitpunkt die β -Aktinbande dargestellt.

2.1.2.2 Stimulierung bzw. Inhibierung der FLT3-Kinaseaktivität in RS4;11-Zellen

Um eine mögliche Assoziation zwischen der Aktivität der FLT3-Kinase und der Regulierung der Expression bestimmter Antigene weiter zu überprüfen, wurden RS4;11 (FLT3-WT⁺)-Zellen für einen Zeitraum von 72 h mit FL behandelt. FL gehört zu einer kleinen Gruppe von Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation früher hämatopoietischer Zellen reguliert. Bislang konnten mehrere Isoformen von FL identifiziert werden. Vorherrschend ist die transmembrane Form, welche auf der Zelloberfläche biologisch aktiv ist. Die Bindung von FL an die extrazelluläre Domäne des FLT3-Rezeptors bewirkt die Aufhebung der autoinhibitorischen Konformation und somit die Aktivierung des Rezeptors. Es kommt zur Dimerisierung der Kinase und letztlich zur Aktivierung verschiedener Signalwege^{40,133,134}.

Wie in Abbildung 7A dargestellt, zeigen RS4;11-Zellen zum Zeitpunkt Null, also ohne Behandlung mit FL, eine schwache Expression der LAAs WT-1, PR-3, Rhamm, Prame und Survivin. Die Behandlung der RS4;11-Zellen mit FL (100ng/ml) führt zu einer deutlichen Hochregulierung der Expression der untersuchten Antigene. Für Rhamm ist bereits nach achtstündiger Inkubation mit FL eine verstärkte Expression zu erkennen, für PR-3, WT-1, Prame und Survivin lässt sich nach 24 h eine deutlich stärkere Expression nachweisen.

Um diese von der Aktivität der FLT3-Tyrosinkinase abhängige Expression verschiedener LAAs weiter zu analysieren, wurden RS4;11-Zellen mit einem gegen FLT3 gerichteten siRNA-Pool transduziert und gleichzeitig mit FL behandelt. Abbildung 7B zeigt die Expression der Antigene PR-3, Rhamm, WT-1, Prame und Survivin nach 72 h. Wie bereits beschrieben, ist nach Behandlung der RS4;11-Zellen mit FL eine deutliche Hochregulierung der einzelnen LAAs erkennbar (Spur 1). Im Gegensatz dazu ist nach einer Transfektion der RS4;11-Zellen mit FLT3-siRNA und gleichzeitiger Behandlung mit

FL eine wesentlich schwächere Expression der analysierten LAAs erkennbar (Spur 2). Um sicherzugehen, dass die Transfektion selbst in den RS4;11-Zellen keine Veränderung bewirkte, wurden diese mit einer Kontroll-siRNA transduziert und mit FL behandelt (Spur 3). Hierbei zeigte sich keine Veränderung in der Expression der verschiedenen Antigene im Vergleich zu RS4;11-Zellen, die ausschließlich mit FL inkubiert wurden (Spur 1). In Spur 4 ist als Kontrolle nochmals die Expression von PR-3, Rhamm, WT-1, Prame und Survivin in unbehandelten RS4;11-Zellen dargestellt.

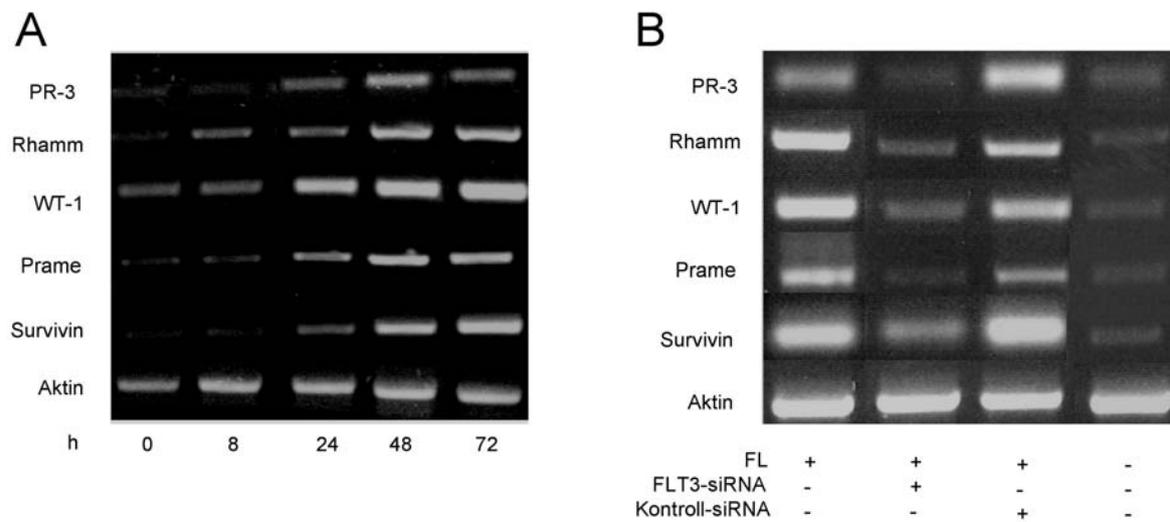


Abbildung 7: Regulation von FLT3-assozierten Antigenen durch die FLT3-Kinaseaktivität. Die Antigene PR-3, Rhamm, WT-1, Prame und Survivin zeigen eine deutlich FLT3-Kinase-abhängige Regulation. (A) Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung von RS4;11-Zellen mit FL wurden RT-PCRs von den Leukämie-assoziierten bzw. FLT3-regulierten Antigenen PR-3, Rhamm, WT-1, Prame und Survivin durchgeführt. (B) RS4;11-Zellen wurden mit FL und/oder FLT3- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und die Expression der Antigene PR-3, Rhamm, WT-1, Prame und Survivin nach 72 h mittels RT-PCR detektiert.

2.2 Generierung von CTL-Klonen gegen Leukämie-assoziierte Antigene

2.2.1 Generierung von CTL-Klonen gegen das Antigen Rhamm

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, kann der Hyaluronsäurerezeptor Rhamm, der im normalen Gewebe im Hoden, in der Plazenta und im Thymus exprimiert wird¹¹⁰ auch in leukämischen myeloiden Zellen nachgewiesen werden bzw. zum malignen Phänotyp leukämischer Zellen beitragen^{106,109}. Abbildung 7 zeigt, dass die Expression dieses Proteins direkt durch die FLT3-Kinaseaktivität induziert werden kann. Verschiedene Publikationen haben die Relevanz eines HLA-A*0201 (HLA-A2)-bindenden Peptidepitopes an Position

165–173 (Rhamm₁₆₅₋₁₇₃) zur Induktion einer Leukämie-spezifischen Immunantwort belegt^{109,125,135}.

Daher sollten T-Zellklone generiert werden, die spezifisch dieses endogen prozessierte Antigen aus Rhamm erkennen. Hierfür wurden DCs eines HLA-A2⁺ gesunden Spenders mit Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ beladen und für die Stimulierung von CD8⁺ T-Zellen eines HLA-A2⁻ Spenders verwendet. Diese allogene Stimulation der T-Zellen wurde gewählt, da es sich bei Rhamm um ein Autoantigen handelt, und daher eine Depletion Rhamm-reaktiver, also potentiell autoreaktiver, T-Zellen im Thymus nicht ausgeschlossen werden kann. Bei T-Zellen eines HLA-A2⁻ Spenders kann es nicht zu einer solchen Depletion kommen, da sich ausschließen lässt, dass diese T-Zellen bereits mit dem aus Rhamm₁₆₅₋₁₇₃/HLA-A2 bestehenden Komplex in Kontakt waren. Nach zwei Stimulationen mit Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ beladenen DCs konnte im FACS eine Rhamm-spezifische T-Zellpopulation nachgewiesen werden (Abbildung 9A). Nach der FACS-Sortierung erfolgte eine Klonierung der T-Zellpopulation mit Hilfe der Methode der „limiting dilution“ (5.2.2.12). Gut proliferierte, potentielle T-Zellklone wurden im IFN- γ -ELISpot auf die Erkennung von HLA-A2⁺ T2-Zellen, beladen mit Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ bzw. der Negativkontrolle MelanA₂₆₋₃₅, geprüft (Abbildung 8). Die beiden potentiellen CTL-Klone JG 9G5 und JG 9E5 zeigten eine hohe Reaktivität gegen Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ und wurden zusammen mit dem potentiellen CTL-Klon JG 9A4, der eine geringere Reaktivität erkennen ließ, expandiert. Der potentielle Klon JG 9F6 wurde aufgrund seiner äußerst geringen spezifischen Zytokinausschüttung nicht weitergeführt.

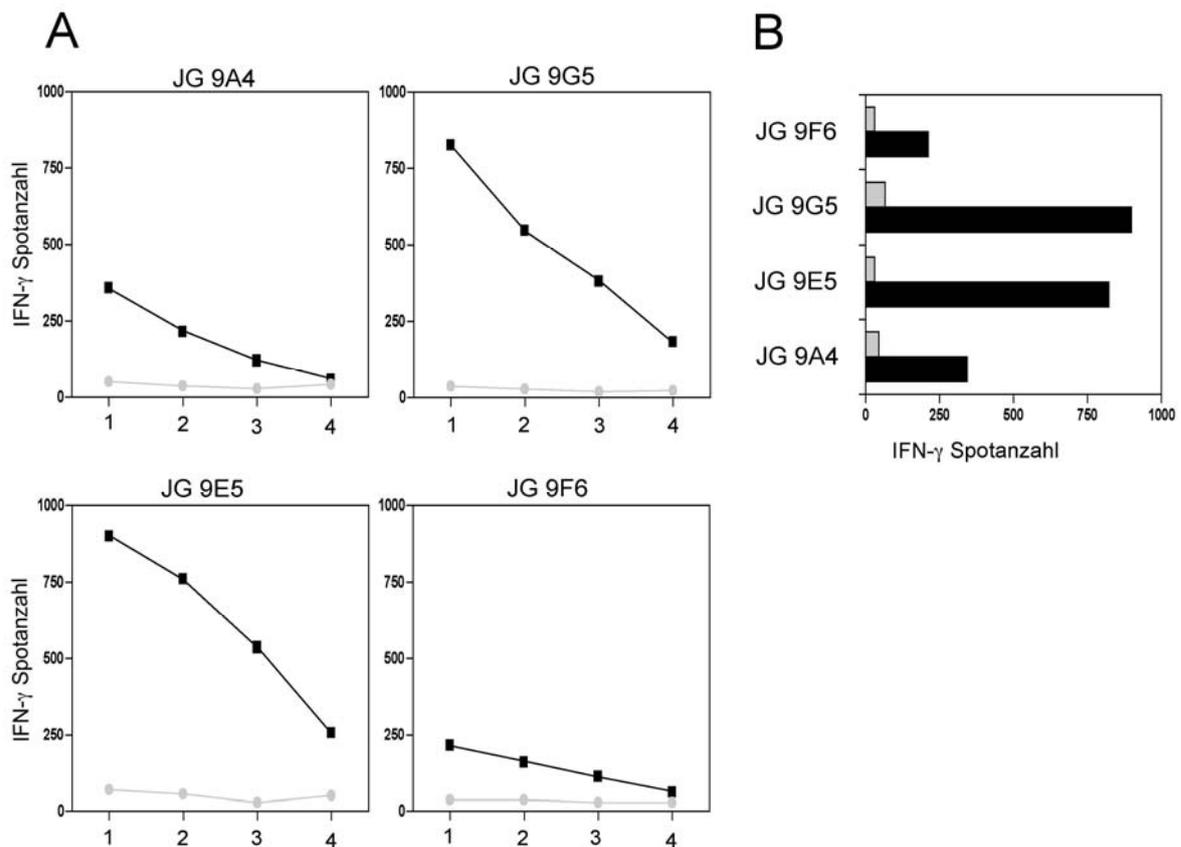


Abbildung 8: Generierung von Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellklonen. Nach der FACS-Sortierung und Klonierung wurden die T-Zellklone mittels ELISpot auf die Erkennung von Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ bzw. MelanA₂₆₋₃₅ getestet. (A) Darstellung der einzelnen T-Zellklone. Zielzellen: T2-Zellen beladen mit Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-Peptid (■) bzw. T2-Zellen beladen mit MelanA₂₆₋₃₅-Peptid (●). Die Zahlen 1 bis 4 geben die jeweilige Verdünnung der T-Zellen an: 1 = 10⁴ T-Zellen; 2 = 3,3 x 10³ T-Zellen; 3 = 10³ T-Zellen; 4 = 3,3 x 10² T-Zellen. (B) Darstellung der Reaktivität der T-Zellklone im Balkendiagramm. Zielzellen: T2-Zellen beladen mit Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-Peptid (schwarze Balken) bzw. T2-Zellen beladen mit MelanA₂₆₋₃₅ (graue Balken).

Im Anschluss daran folgte ein ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit den expandierten Klonen 9A4, 9G5 und 9E5. Wie aus Abbildung 9B hervorgeht, konnte für alle drei Klone lytische Aktivität gegenüber den mit Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ beladenen T2-Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war keine lytische Aktivität gegenüber den als Negativkontrolle dienenden, mit MelanA₂₇₋₃₅ beladenen T2-Zellen zu beobachten. Da T-Zellen, die mit einem bestimmten Peptid stimuliert wurden, erfahrungsgemäß dennoch nicht immer in der Lage sind, das endogen prozessierte Peptidepitop zu erkennen^{136,40}, wurde überprüft, ob die generierten CTL-Klone auch das endogen prozessierte Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-Epitop erkennen. Hierfür wurden die drei Klone jeweils zusammen mit der Rhamm exprimierenden, HLA-A2⁺ Zelllinie K562-A2 im Lyseassay getestet. Abbildung 9B zeigt eindeutig eine spezifische Erkennung dieser Zelllinie durch die drei CTL-Klone, wobei die maximale

Lyse des Klons 9A4 bei über 60 %, des Klons 9G5 bei ca. 50 % und die des Klons 9E5 bei 40 % liegt. Diese Beobachtungen bestätigen eine endogene Prozessierung des Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-Epitops ebenso wie eine Tumor-lytische, nicht nur Peptid-spezifische Aktivität der getesteten Klone und somit das Potential des Rhamm-Antigens als Zielstruktur für eine anti-leukämische Immuntherapie.

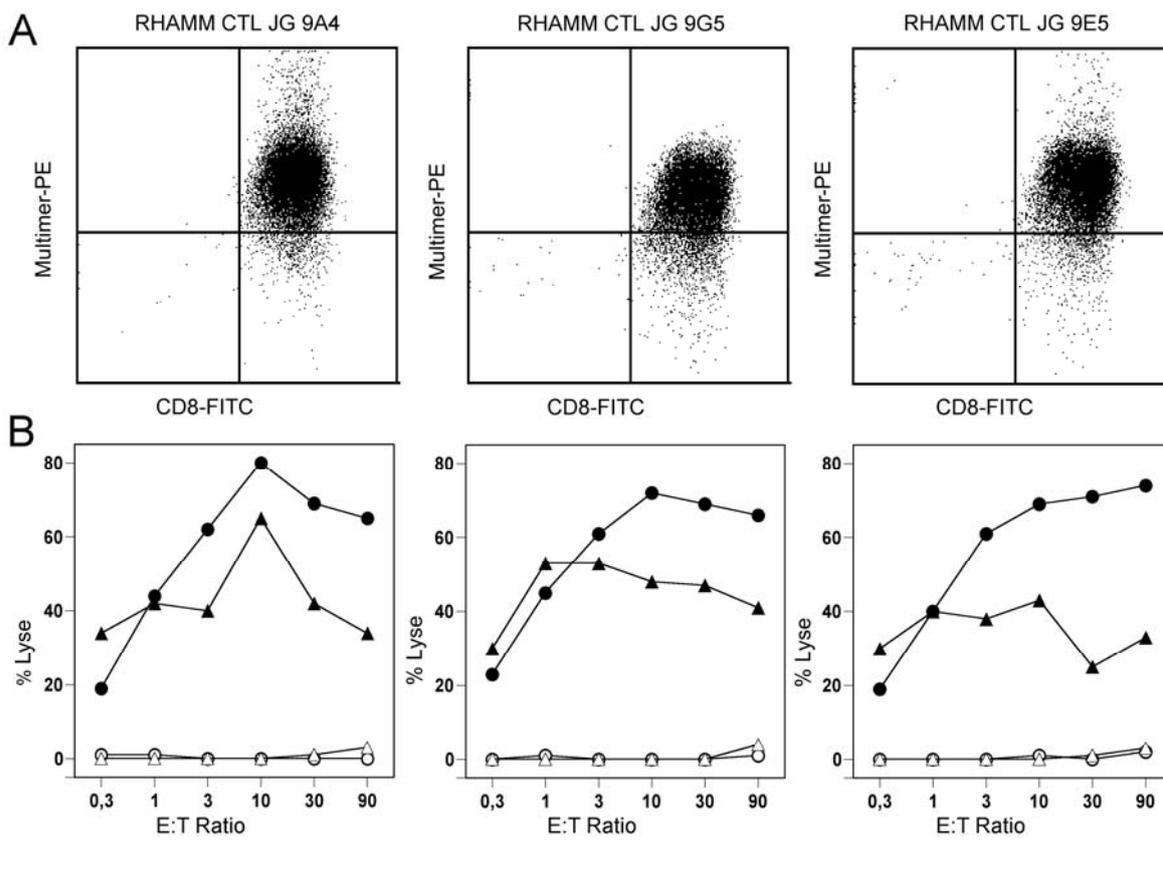


Abbildung 9: Generierung von Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-spezifischen CD8⁺ T-Zellklonen. (A) Multimer-Analyse der verschiedenen Rhamm-spezifischen CTL-Klone nach Färbung mit dem relevanten Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-Tetramer. (B) ⁵¹Cr-Freisetzungstest der drei Rhamm-spezifischen Klone. Zielzellen: T2-Zellen beladen mit Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-Peptid (●) oder HIV₄₇₆₋₄₈₄-Peptid (○), K562-Zellen (△) und K562-A2-Zellen (▲).

Um die HLA-A2-Restriktion sowie die tumorlytische Aktivität der drei für Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ spezifischen CTL-Klone 9A4, 9G5 und 9E5 zu bestätigen und eine Kreuzreaktivität gegen ein mögliches anderes, von den K562-A2-Zellen präsentiertes Epitop auszuschließen, wurde anschließend ein sogenannter „hot-cold-target“-Assay durchgeführt (5.2.3.2). Dabei handelt es sich um einen modifizierten ⁵¹Cr-Freisetzungstest, bei welchem die CTL-Klone jeweils zunächst mit unmarkierten, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ beladenen T2-Zellen kokultiviert und danach mit ⁵¹Cr markierten K562-A2-Zellen inkubiert wurden. Sollte ausschließlich eine CTL-Reaktivität gegen das Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-Epitop bestehen, so wäre die Aktivität der CTL-

Klone nach der Inkubation mit den unmarkierten, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ beladenen T2-Zellen erschöpft und bei anschließender Inkubation mit der Tumorzelllinie K562-A2 keine ⁵¹Cr-Freisetzung messbar. Die Vorinkubation mit MelanA₂₇₋₃₅ beladenen T2-Zellen sollte, bei ausschließlicher Reaktivität des Klons gegen Rhamm₁₆₅₋₁₇₃, die Lysierung der anschließend zugegebenen K562-A2-Zellen nicht beeinflussen.

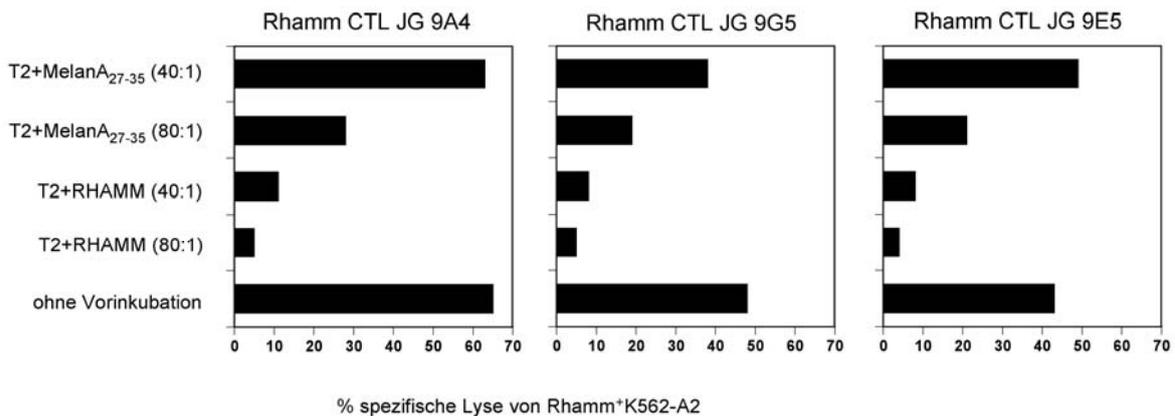


Abbildung 10: „hot-cold-target“-Assay mit den gegen Rhamm gerichteten CTL-Klonen 9A4, 9G5 und 9E5. % Lyse bezeichnet die Lyse der ⁵¹Cr markierten K562-A2-Zellen. Das Verhältnis von K562-A2-Zellen zu CTLs betrug 40:1 bzw. 80:1. Als Positivkontrolle dienten CTLs, die nicht mit T2-Zellen vorinkubiert wurden (untere Reihe).

In Abbildung 10 ist das Ergebnis dieses Versuches dargestellt. Die drei CTL-Klone 9A4, 9G5 und 9E5 wurden mit den T2-Zellen jeweils in einem Verhältnis (Zielzellen:Effektorzellen) von 40:1 und 80:1 zusammengesetzt. Nach einer Vorinkubation mit Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ beladenen T2-Zellen zeigten die drei getesteten CTL-Klone bei einem Verhältnis von 80:1 eine zu vernachlässigende lytische Aktivität von ca. 5 % gegenüber K562-A2-Zellen. Bei einem Verhältnis von 40:1 lag die lytische Aktivität mit ca. 10 % ebenfalls in einem zu vernachlässigbaren Bereich, im Vergleich zu der oben dargestellten Lyse von bis zu 70 % nach der Vorinkubation mit MelanA₂₇₋₃₅ beladenen T2-Zellen. Die Beladung der T2-Zellen mit dem irrelevanten MelanA₂₇₋₃₅-Peptid hatte bei einem Verhältnis von 40:1 keinen Einfluss auf die Reaktivität der Klone, sie entsprach der Reaktivität gegenüber unbeladenen T2-Zellen. Bei einem Verhältnis von 80:1 war die Reaktivität in diesem Fall nur etwa halb so hoch.

2.2.2 Generierung von CTL-Klonen gegen die LAAs PR-3 und Survivin

Neben dem Hyaluronsäurerezeptor Rhamm konnten unter anderem die Serinprotease PR-3, das Apoptose-hemmende Protein Survivin, der Transkriptionsfaktor WT-1 sowie das an den Retinsäurerezeptor bindende Antigen Prame in leukämischen myeloiden Zellen nachgewiesen werden^{106,109}. Abbildung 7 zeigt, dass die Expression dieser Proteine direkt durch die FLT3-Kinaseaktivität induziert werden kann. Für alle genannten Antigene wurden bereits HLA-A2-bindende Peptidepitope publiziert, was die Relevanz dieser LAAs bei der Induktion einer Leukämie-spezifischen Immunantwort belegt^{125,128,137}.

Nach der erfolgreichen Generierung von spezifisch gegen Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ gerichteten CTL-Klonen sollten daher Klone generiert werden, welche spezifisch die HLA-A2-restringierten Epitope von PR-3 an Position 169–177 (PR-3₁₆₉₋₁₇₇ = PR-1), von Survivin an Position 95–104 (Survivin₉₅₋₁₀₄), von WT-1 an Position 126-134 (WT-1₁₂₆₋₁₃₄) bzw. von Prame an Position 300-309 (Prame₃₀₀₋₃₀₉) erkennen. Hierfür wurden, analog zur Generierung der gegen Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ gerichteten CTL-Klone, DCs eines HLA-A2⁺ gesunden Spenders mit PR-1, Survivin₉₅₋₁₀₄, Prame₃₀₀₋₃₀₉ oder WT-1₁₂₆₋₁₃₄ beladen und für die Stimulierung von CD8⁺ T-Zellen eines HLA-A2⁻ Spenders verwendet.

Nach zwei Stimulationen konnten sowohl für PR-1, als auch für Survivin₉₅₋₁₀₄ im FACS spezifische T-Zellpopulationen nachgewiesen werden. Eine Isolierung von Prame₃₀₀₋₃₀₉- bzw. WT-1₁₂₆₋₁₃₄-spezifischen T-Zellpopulationen war auch nach mehrmaligen Versuchsansätzen nicht möglich. Ebenso wenig führte die T-Zell-Stimulierung durch DCs beladen mit den alternativen, ebenfalls bereits publizierten, HLA-A2-restringierten Peptidepitopen von Prame an Position 100-108 (Prame₁₀₀₋₁₀₈) bzw. von WT-1 an Position 235-243 (WT-1₂₃₅₋₂₄₃) zu einer erfolgreichen Isolierung von Prame₁₀₀₋₁₀₈- bzw. WT-1₂₃₅₋₂₄₃- spezifischen T-Zellpopulationen.

Nach der FACS-Sortierung erfolgte die Klonierung der PR-1-, bzw. Survivin₉₅₋₁₀₄-spezifischen T-Zellpopulation mit Hilfe der Methode der limitierenden Verdünnung (5.2.2.12). Nach der FACS-Analyse (Abbildung 11A) wurde die Peptidspezifität der einzelnen Klone im IFN- γ -ELISA getestet. Der Vollständigkeit halber wurde der unter 2.2.1 beschriebene, gegen Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ gerichtete CTL-Klon 9E5 auch im ELISA mitgeführt. Als Zielzellen dienten T2-Zellen, beladen mit PR1, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃, Survivin₉₅₋₁₀₄ oder dem irrelevanten Peptid HIVpol₄₇₆₋₄₈₄. Wie aus Abbildung 11B hervorgeht, konnte für alle Klone nach der Inkubation mit dem jeweils relevanten Peptid eine hohe IFN- γ -Sekretion nachgewiesen werden. Das als Negativkontrolle dienende HIV-Peptid wurde nicht erkannt.

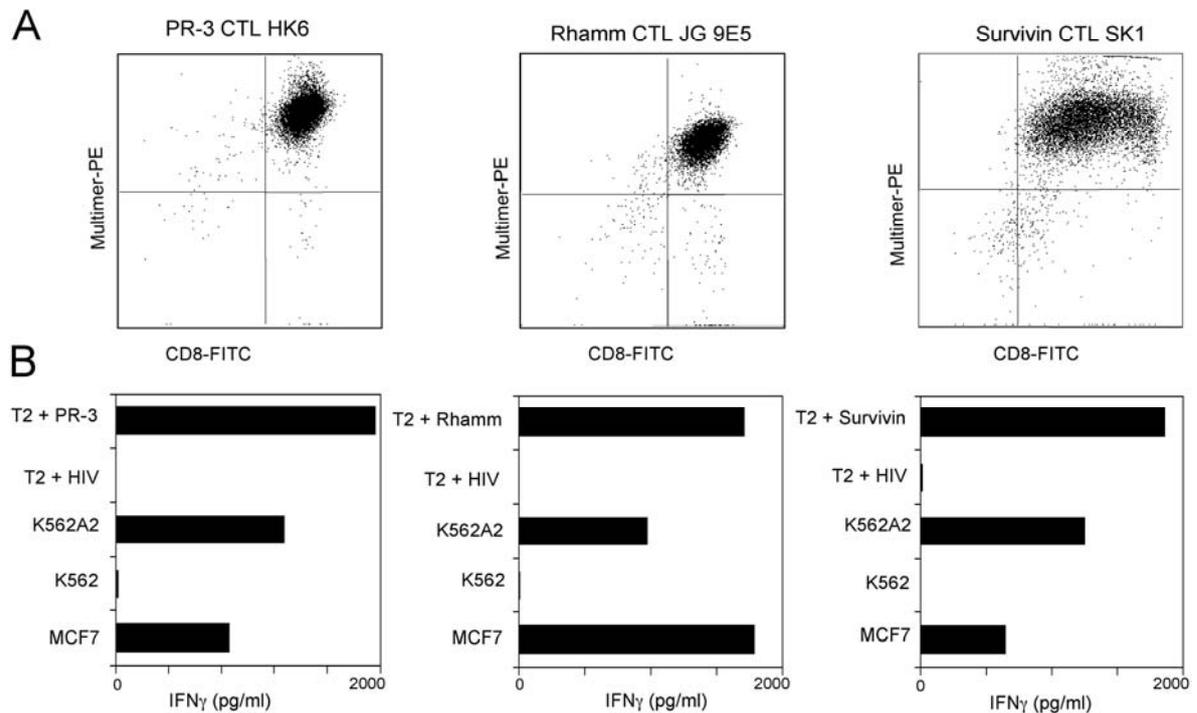


Abbildung 11: Generierung von PR-1-, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃- bzw. Survivin₉₅₋₁₀₄-spezifischen CD8⁺ T-Zellklonen. (A) Multimer-FACS-Analyse der verschiedenen CTL-Klone nach Färbung mit dem relevanten PR-1-, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃- bzw. Survivin₉₅₋₁₀₄-Tetramer. (B) ELISA der CTL-Klone. Zielzellen: T2-Zellen beladen mit PR-1-, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃- oder Survivin₉₅₋₁₀₄-Peptid und irrelevantem HIV₄₇₆₋₄₈₄-Peptid, K562-A2-, K562- und MCF7-Zellen.

Weiterhin sollte getestet werden, ob die verschiedenen Klone auch das endogenprozessierte PR3-, Rhamm- bzw. Survivin-Epitop erkennen. Dafür wurden die Klone mit den beiden, Proteinase-3, Rhamm und Survivin exprimierenden, HLA-A2⁺ Zelllinien K562-A2 und MCF7 getestet. Wie in Abbildung 11B dargestellt, konnte für die getesteten Klone eine spezifische Erkennung von leukämischen K562-A2-Zellen und der Mamma-Karzinom-Zelllinie MCF7, nicht aber von der als Negativkontrolle verwendeten, HLA-A2⁻ Zelllinie K562 nachgewiesen werden. Diese spezifische Erkennung bestätigte sich auch im ⁵¹Cr-Freisetzungstest. Alle drei Klone zeigten lytische Aktivität gegenüber der leukämischen Zelllinie K562-A2, nicht aber gegenüber K562-Zellen (Abbildung 12A).

In einem weiteren Ansatz sollte die funktionale Avidität der verschiedenen Klone gegen ihr jeweiliges Epitop getestet werden. Hierfür wurden die Klone im IFN- γ -ELISA mit T2-Zellen, die mit dem jeweiligen Peptid in unterschiedlichen Verdünnungen von 10⁻⁵M bis 10⁻¹⁶ M beladen worden waren, inkubiert. Der PR-1-reaktive Klon ließ eine hohe Avidität gegen das PR1-Peptid mit einer halbmaximalen IFN- γ -Sekretion von 10⁻¹⁰ M erkennen

(Abbildung 12B). Der Rhamm- und der Survivin-reaktive Klon hingegen zeigten eine relativ geringe Avidität mit einer halbmaximalen IFN- γ -Sekretion von 10^{-7} M bis 10^{-6} M (Abbildung 12B).

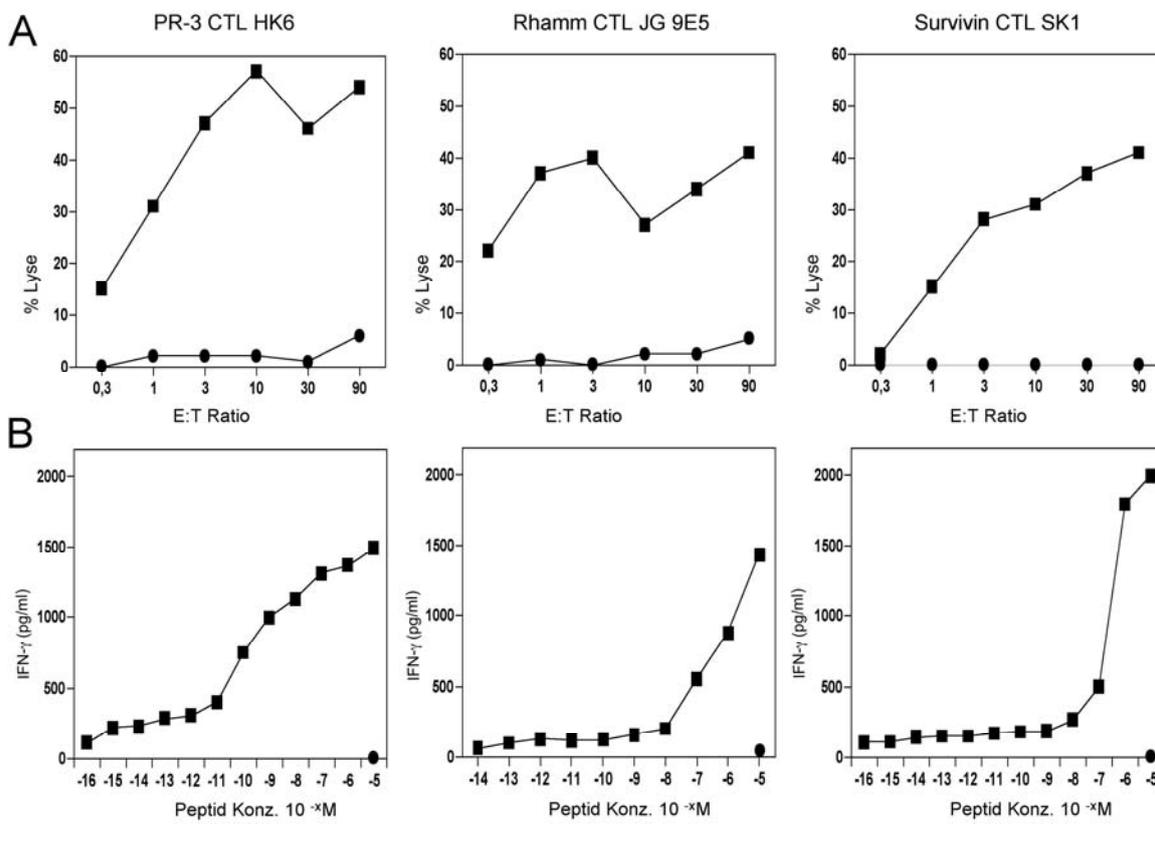


Abbildung 12: Analyse der gegen PR-1-, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃- bzw. Survivin₉₅₋₁₀₄-gerichteten CTL-Klone. (A) ^{51}Cr -Freisetzungstest der drei verschiedenen CTL-Klone. Zielzellen: K562-A2-Zellen (■) und K562-Zellen (●). (B) ELISA der generierten CTL-Klone. Zielzellen: T2-Zellen beladen mit PR-1-, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃- bzw. Survivin₉₅₋₁₀₄-Peptid, jeweils in einer Peptidkonzentration von 10^{-5} M bis 10^{-16} M. Als Negativkontrolle wurden T2-Zellen mit dem irrelevantem HIV₄₇₆₋₄₈₄-Peptid beladen.

2.2.3 Erkennung von AML-Blasten durch die gegen PR-3, Rhamm bzw. Survivin gerichteten CTL-Klone

Wie bereits gezeigt werden konnte, kommt es aufgrund der Aktivität der FLT3-Rezeptortyrosinkinase zu einer Hochregulierung bestimmter LAAs (Abbildung 7). Zahlreiche Publikationen belegen die Expression der Antigene PR-3, Rhamm und Survivin in leukämischen Zellen von AML-Patienten^{109,115,138}. Da diese Antigene bereits spezifische Immunantworten in Leukämiepatienten induzieren konnten, stellen sie für die Entwicklung spezifischer, anti-leukämischer Immuntherapien wichtige Zielstrukturen dar^{109,139}. Im

Folgenden sollten die im Rahmen dieser Arbeit generierten, gegen PR-1, Rhamm bzw. Survivin gerichteten CTL-Klone auf die Erkennung von AML-Blasten getestet werden.

Dafür wurden die verschiedenen CTL-Klone im IFN- γ -ELISA mit primären Blasten einer HLA-A2⁺ Patientin mit FLT3-ITD⁺ AML kokultiviert. Primäre Blasten einer HLA-A2⁻ Patientin dienten als Negativkontrolle. Wie in Abbildung 13 dargestellt, zeigten die getesteten CTL-Klone nach der Inkubation mit den HLA-A2⁺ FLT3-ITD⁺ Blasten eine hohe IFN- γ -Sekretion, nicht aber nach der Inkubation mit HLA-A2⁻ Blasten.

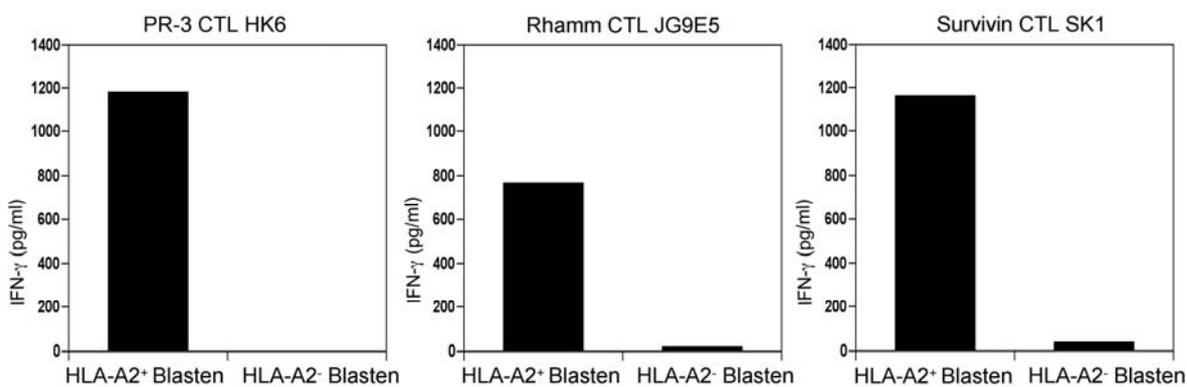


Abbildung 13: Reaktivität der gegen PR-1-, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃- bzw. Survivin₉₅₋₁₀₄-gerichteten CTL-Klone gegenüber AML-Blasten. Die verschiedenen CTL-Klone wurden mit Blasten einer HLA-A2⁺ Patientin mit FLT3-ITD⁺ AML sowie mit Blasten einer HLA-A2⁻ AML-Patientin inkubiert und im ELISA auf ihre IFN- γ -Sekretion getestet.

2.3 Generierung von Leukämie-reaktiven CTL-Klonen durch die Stimulierung mit DCs aus leukämischen Blasten

Eine weitere Methode zur Generierung Leukämie-reaktiver CTL-Klone beruht auf der Stimulierung von CD8⁺ T-Zellen mit DCs aus leukämischen Blasten. Es wurde bereits nachgewiesen, dass DCs aus AML-Blasten in der Lage sind, Leukämie-spezifische, zytolytische Aktivität in autologen Lymphozyten zu induzieren^{140,141}. Daher wurden zunächst DCs aus den Blasten einer HLA-A2⁺ Patientin mit FLT3-ITD⁺ AML isoliert, differenziert und ausgereift und zur Stimulierung von CD8⁺ T-Zellen eines gesunden, HLA-A2⁻ Spenders verwendet. Da die Spezifität der resultierenden T-Zellpopulationen aufgrund des Versuchsaufbaus unbekannt war, wurde nach zwei Stimulationen ein IFN- γ -ELISpot durchgeführt, in welchem T2-Zellen beladen mit PR1, Survivin₉₅₋₁₀₄, WT-1₁₂₆₋₁₃₄, Prame₃₀₀₋₃₀₉, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ oder HIVpol₄₇₆₋₄₈₄ bzw. leukämische K562-A2- und K562-Zellen als Zielzellen dienten. Da keine der getesteten T-Zellpopulationen eine spezifische

Erkennung von einem der getesteten Peptidepitope zeigte, folgte die Klonierung derjenigen T-Zellpopulationen, die eine spezifische Erkennung von K562-A2-Zellen erkennen ließen. Die Reaktivität der drei resultierenden CTL_{AML}-Klone ist in Abbildung 14A dargestellt. Alle drei Klone zeigten im IFN- γ ELISpot spezifische Reaktivität gegen die HLA-A2⁺ leukämischen Zelllinien K562-A2 und BV173, nicht aber gegen HLA-A2⁻ K562-Zellen.

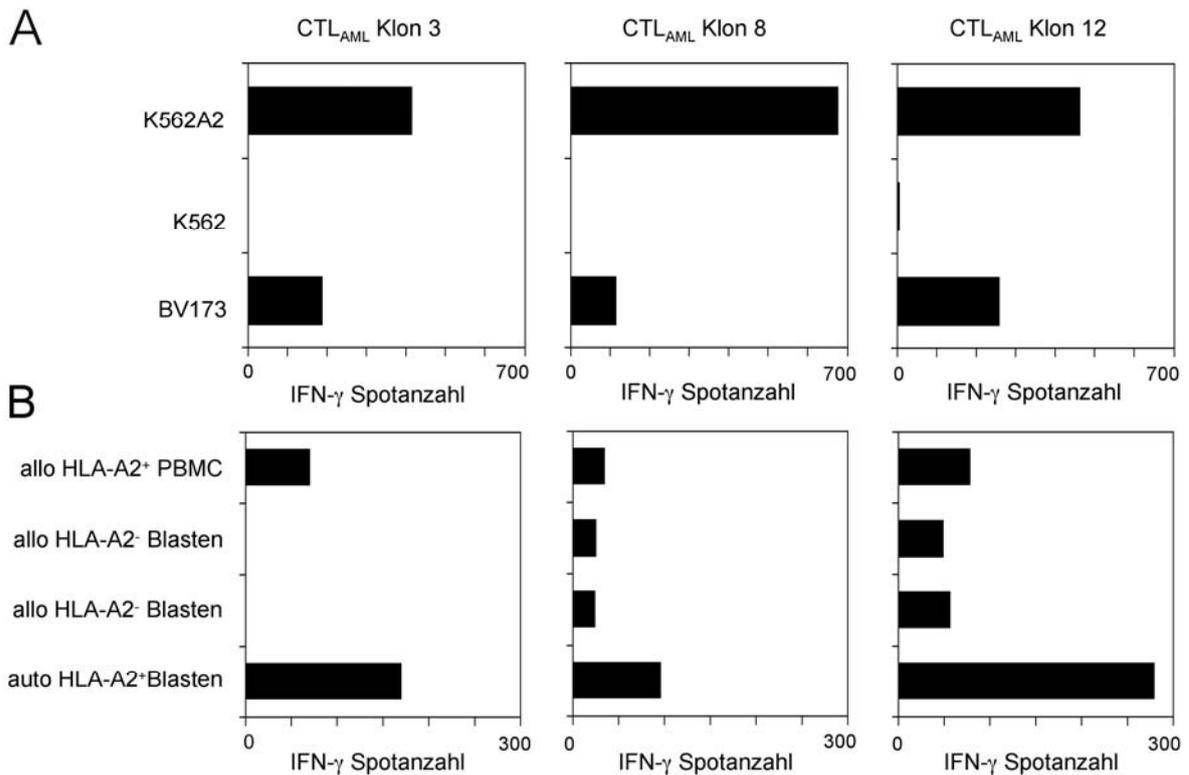


Abbildung 14: ELISpot-Analyse der generierten CTL_{AML}-Klone. Aus den Blasten einer HLA-A2⁺ Patientin mit FLT3-ITD⁺ AML isolierte DCs wurden zur Stimulierung von CD8⁺ T-Zellen eines gesunden, HLA-A2⁻ Spenders verwendet. Die resultierenden Klone wurden im IFN- γ -ELISpot Assay auf die Erkennung von leukämischen Zellen getestet. (A) Als Zielzellen dienten die Zelllinien K562-A2, K562 bzw. BV173. (B) Als Zielzellen wurden allogene, HLA-A2⁺ PBMCs oder HLA-A2⁻ AML-Blasten sowie autologe HLA-A2⁺ AML-Blasten verwendet.

Weiterhin sollten die generierten CTL_{AML}-Klone auf eine spezifische Erkennung von HLA-A2⁺ Blasten getestet werden. Wie in Abbildung 14B zu erkennen ist, zeigten die CTL_{AML}-Klone eine geringe Reaktivität gegen HLA-A2⁺ PBMC und HLA-A2⁻ Blasten. Im Gegensatz dazu ließ sich nach der Kokultivierung mit HLA-A2⁺ leukämischen Blasten eine hohe IFN γ -Sekretion nachweisen.

2.4 Erkennung von *FLT3-ITD*⁺ bzw. *FLT3-WT*⁺ DCs durch die generierten CTL-Klone

Wie in Abbildung 7 dargestellt, führt die Aktivität der FLT3-Rezeptortyrosinkinase zu einer Hochregulierung der Expression der LAAs PR-3, Rhamm und Survivin. *FLT3-WT*⁺ Zellen zeigen eine geringe Expression der genannten Antigene, erst nach der Stimulierung des FLT3-Rezeptors durch Zugabe von FL kommt es zu einer verstärkten Expression von PR-3, Rhamm und Survivin. Im Gegensatz dazu ist in *FLT3-ITD*⁺ Zellen, in welchen die FLT3-Kinase konstitutiv aktiv vorliegt, eine grundsätzlich hohe Expression der untersuchten LAAs zu beobachten (Abbildung 6).

Im Folgenden sollte analysiert werden, ob die verschiedenen, im Rahmen dieser Arbeit generierten CTL-Klone hinsichtlich der Erkennung von *FLT3-WT*⁺ bzw. *FLT3-ITD*⁺ Zellen Unterschiede aufweisen. Als Zielzellen, die FLT3 in seiner Wildtyp oder in seiner oben beschriebenen mutierten Form exprimieren, wurden DCs gewählt, die transient mit *FLT3-WT*- oder *FLT3-ITD*-mRNA bzw. stabil mit Hilfe eines lentiviralen Vektors transfiziert werden sollten.

2.4.1 Klonierung von *FLT3-WT*, *FLT3-ITD* und *FLT3-TKD* in den lentiviralen Vektor pWPI

Als Lentiviren bezeichnet man eine Gruppe von Retroviren, die, im Gegensatz zu den meisten Retroviren, eine lytische Wirkungsweise entfalten können. Aufgrund ihrer Charakteristika stellen die Lentiviren besonders gut geeignete Vektoren für den Gentransfer in eukaryotische Zellen dar. Lentivirale Vektoren sind in der Lage, ruhende und sich nicht teilende Zellen effizient und stabil zu infizieren^{142,143} und ihr genetisches Material in das Zielzellgenom zu integrieren. Dies führt zu einer stabilen Langzeitexpression des Zielgens in den infizierten Zellen und deren Tochterzellen. Eine weitere Eigenschaft, welche lentivirale Vektoren besonders geeignet für die Gentherapie macht, ist die Tatsache, dass Lentiviren, wenn überhaupt, nur eine geringe Entzündungs- und Immunantwort auslösen^{144,145}.

In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe replikationsinkompetenter lentiviraler Vektoren für verschiedene Studien, meist für gentherapeutische Ansätze, hergestellt. Replikationsinkompetente Vektoren sind in der Lage Zielzellen einmalig zu infizieren, können aber in den Zielzellen nicht weiter replizieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die cDNA von *FLT3-WT*, *FLT3-ITD* bzw. *FLT3-TKD* in den replikationsdefizienten, selbst-

inaktivierenden lentiviralen Vektor pWPI von *Addgene* kloniert werden. Anschließend sollten diese in den lentiviralen Vektor eingebauten cDNA-Moleküle als Alternative zu der, unter 2.4.2 beschriebenen, transienten Transfektion mit mRNA, in DCs exprimiert werden, um eine stabile Langzeitexpression zu gewährleisten.

Hierfür wurde zunächst die cDNA von *FLT3-WT*, welche in den pCDNA3.1 (+) ZEO-Vektor inseriert vorlag, mittels *PmeI*-Verdau aus diesem Vektor ausgeschnitten und mit dem lentiviralen, durch *PmeI* linearisierten Vektor pWPI ligiert.

Ein analoges Vorgehen erfolgte bei der Klonierung der FLT3-Mutanten *FLT3-ITD* und *FLT3-TKD* in den lentiviralen Vektor pWPI. *FLT3-ITD* lag inseriert in den PCR-BluntII-TOPO Vektor vor und wurde über die Restriktionsstellen *BamHI* und *PstI* ausgeschnitten. Nach der Herstellung von *blunt-ends* mit Hilfe des Klenow-Fragments konnte *FLT3-ITD* mit dem *PmeI*-verdauten lentiviralen Vektor pWPI ligiert werden. *FLT3-TKD* lag in dem Vektor MIY-TKD-D835Y-GFP vor und konnte nach Verdau mit *HpaI* direkt in den Zielvektor pWPI kloniert werden.

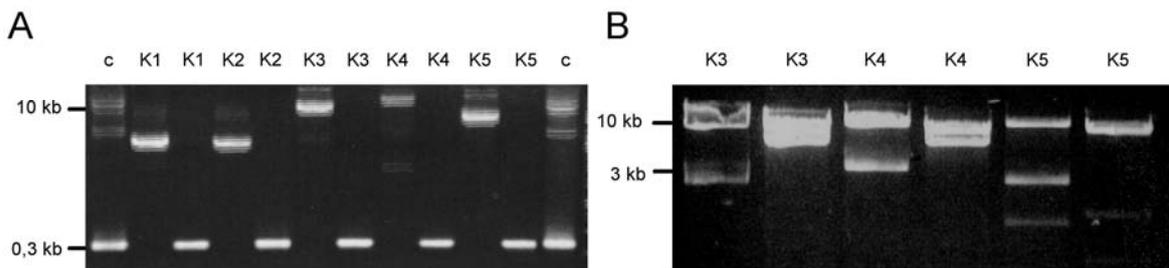


Abbildung 15: Die Klonierung der cDNA von *FLT3-WT* in den lentiviralen Vektor pWPI. *FLT3-WT* wurde mittels *PmeI* aus dem Vektor pCDNA3.1 (+) ZEO ausgeschnitten und mit dem lentiviralen, durch *PmeI* linearisierten Vektor pWPI ligiert. (A) Nach der Transformation in kompetente Bakterien wurde der Zielvektor aus 5 Bakterienklonen K1-K5 isoliert und mittels PCR mit den entsprechenden Primern auf das *FLT3-WT* Insert untersucht. Links ist jeweils der Vektor in unverdautem Zustand, rechts das PCR-Produkt aufgetragen. Die erste und letzte Spur zeigen die Positivkontrolle für das *FLT3-WT* Insert. (B) Der aus Klon 3-5 isolierte Vektor wurde zusätzlich mit *PstI* (jeweils links aufgetragen) und *Sall* (jeweils rechts aufgetragen) verdaut. Alle drei Klone tragen das entsprechende Insert und wurden zur Sicherheit sequenziert.

Wie in Abbildung 15 am Beispiel der in den pWPI klonierten cDNA von *FLT3-WT* dargestellt, wurde die präparierte DNA nach der Transformation in kompetente Zellen und der Isolierung der Plasmid-DNA jeweils mittels PCR-Reaktion, Testverdau und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

Da sich die beschriebene Klonierung der verschiedenen FLT3-Konstrukte in den lentiviralen Vektor pWPI als schwierig und langwierig erwies, wurde parallel dazu bereits eine transiente Transfektion von DCs mit mRNA durchgeführt (2.4.2).

2.4.2 Generierung von FLT3-WT⁺ bzw. FLT3-ITD⁺ DCs mittels mRNA-Elektroporation

Da es sich bei der transienten Transfektion von DCs um eine in der Arbeitsgruppe etablierte Methode handelt, die sich bereits in verschiedenen Ansätzen als sehr effizient erwiesen hat, wurden auch in diesem Fall DCs als Zielzellen gewählt, welche mit *in vitro*-transkribierter (IVT)-mRNA von FLT3-WT bzw. FLT3-ITD transfiziert werden sollten.

Eine besonders wichtige Rolle bei der Transfektion der DCs spielt die Stabilität der mRNA. Ist diese instabil, so kann es sein, dass ein transfiziertes mRNA-Molekül vor seiner Degradation nicht häufig genug von Ribosomen translatiert wird. Eine daraus resultierende geringe Menge an FLT3-WT bzw. FLT3-ITD Protein pro Zelle kann zur Folge haben, dass keine ausreichende Menge an FLT3-WT bzw. FLT3-ITD oder FLT3-WT- bzw. FLT3-ITD-regulierten Proteinen nach proteosomalem Abbau auf MHC-Moleküle geladen und präsentiert wird. Folglich kann nach Kontakt mit T-Zellen keine spezifische Immunreaktion initiiert werden.

Eine effiziente Translation von mRNA erfordert prinzipiell eine 7-Methylguanylat-Gruppe, die sog. Cap-Gruppe in 5'-Richtung („upstream“) des codierenden Bereichs. Der so genannte Poly(A)-Schwanz in 3'-Richtung („downstream“) des codierenden Bereichs trägt ebenfalls zur Initiierung der Translation bei, hat aber vor allem einen wesentlichen Anteil an der Stabilisierung der mRNA. Sowohl Cap-Struktur als auch Poly(A)-Schwanz sind Bestandteile der verwendeten IVT-mRNA. Zur weiteren Optimierung der mRNA-Stabilität wurde die Erkenntnis genutzt, dass der Einschub einer untranslatierten Sequenz des *Xenopus* β -Globin Genes zwischen codierenden Bereich und Poly(A)-Schwanz die Stabilität der mRNA entscheidend verbessert¹⁴⁶. Das Patent auf diese Art der mRNA-Stabilisierung hält die Firma CureVac (Tübingen).

Die cDNA von *FLT3-WT*, *FLT3-ITD* und *FLT3-TKD* wurde mittels PCR mit den Restriktionsschnittstellen für *HindIII* und *XbaI* versehen, um eine Klonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA 3.1/Zeo (+) zu ermöglichen. Die IVT der β -Globin stabilisierten mRNA (sog. RNActive) wurde anschließend von der Firma CureVac übernommen.

Um die Reaktivität der generierten CTL-Klone gegen FLT3-WT⁺ bzw. FLT3-ITD⁺ Zellen zu analysieren, wurden DCs mit 25 µg FLT3-WT- bzw. FLT3-ITD-RNA elektroporiert. Um zu prüfen, ob in den FLT3-WT⁺ DCs eine Aktivität der FLT3-Tyrosinkinase vorhanden war, wurden FLT3-WT⁺ DCs sowohl mit, als auch ohne Zugabe von FL, mit den gegen PR-3, Rhamm und Survivin gerichteten CTL-Klonen im ELISA kokultiviert. Wie in Abbildung 16 dargestellt, zeigten die CTL-Klone in Anwesenheit von FLT3-WT⁺ DCs keine bzw. nur eine sehr geringe IFN- γ -Sekretion. Im Gegensatz dazu war eine hohe Reaktivität gegen FLT3-WT⁺ DCs zu erkennen, die zuvor mit FL behandelt worden waren.

Derselbe Versuchsansatz wurde mit den drei CTL_{AML}-Klonen, welche durch die Stimulierung mit DCs aus Blasten generiert worden waren (2.3), durchgeführt. In diesem Fall war nur bei einem der drei Klone (Klon #3) nach der Inkubation mit FLT3-WT⁺ DCs, die mit FL behandelt worden waren, die Sekretion von IFN- γ zu erkennen. Die anderen beiden CTL_{AML}-Klone (Klon #8 und Klon #12) zeigten weder gegen FLT3-WT⁺ DCs noch gegen FLT3-WT⁺ DCs in Kombination mit FL eine Reaktivität (Abbildung 16).

Weiterhin ließ sich für die gegen PR-3, Rhamm und Survivin gerichteten CTL-Klone und für den CTL_{AML}-Klon #3 eine spezifische Erkennung von FLT3-ITD⁺ DCs nachweisen. Diese Erkennung war unabhängig von der Behandlung mit FL. Bezüglich der CTL_{AML}-Klone #8 und #12 konnte auch in diesem Fall keine Reaktivität induziert werden.

Um die Auswirkungen einer Herunterregulierung von FLT3-WT zu untersuchen, wurde derselbe FLT3-siRNA Pool verwendet, der bereits benutzt wurde, um das Expressionsmuster verschiedener LAAs in RS4;11-Zellen zu analysieren (2.1.2.3). Nach einer Transfektion der FLT3-WT⁺ DCs mit FLT3-siRNA und anschließender Kokultivierung mit den gegen PR-3, Rhamm und Survivin gerichteten CTL-Klonen sowie mit den CTL_{AML}-Klonen ließ sich bei keinem der getesteten Klone eine Reaktivität erkennen. Dieselbe Beobachtung ergab sich, wenn die FLT3-WT⁺ DCs mit FLT3-siRNA transfiziert und zusätzlich mit FL behandelt worden waren (Abbildung 16).

Hierbei konnte eine deutliche, von der Bcr-Abl-Kinaseaktivität abhängige Hochregulierung der Antigene Prame, PR-3 und HAGE beobachtet werden¹⁰⁵.

Im Folgenden sollte getestet werden, ob die CTL-Klone, welche gegen die, durch die FLT3-Kinaseaktivität regulierten Antigene PR-3, Rhamm und Survivin gerichtet sind, mit BCR-ABL exprimierenden DCs kreuzreagieren, ob PR-3, Rhamm und Survivin also auch durch BCR-ABL hochreguliert werden. Im Fall der AML-reaktiven T-Zellklone kann so geklärt werden, ob die gleichen T-Zell-erkannten Antigene durch verschiedene Tyrosinkinase hochreguliert werden.

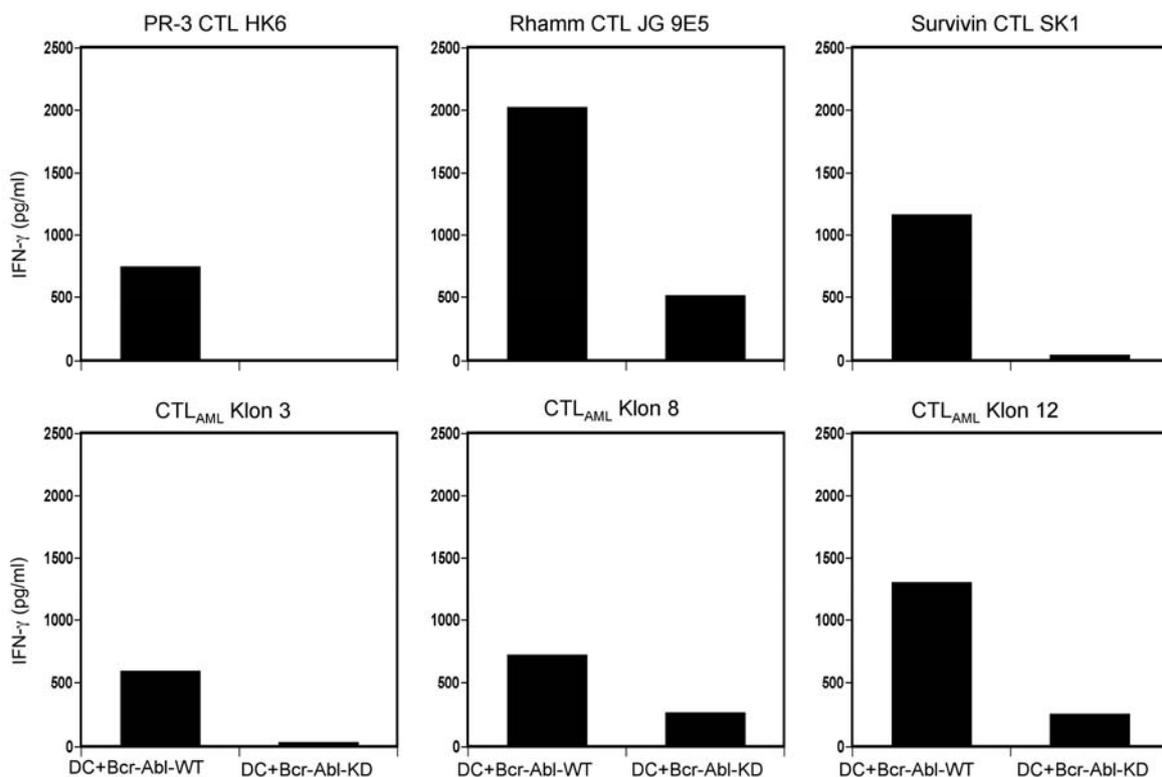


Abbildung 17: Analyse der T-Zellreaktivität gegen Bcr-Abl-regulierte Antigene. Um zu analysieren, ob die durch die FLT3-Kinaseaktivität regulierten Antigene auch durch die Bcr-Abl-Kinaseaktivität reguliert werden, wurden DCs mit Bcr-Abl-WT- bzw. Bcr-Abl-KD-RNActive elektroporiert und im IFN- γ -ELISA als Zielzellen eingesetzt. Als Effektorzellen dienten die gegen PR-1-, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃- bzw. Survivin₉₅₋₁₀₄-gerichteten CTL-Klone (A) bzw. die CTL_{AML}-Klone (B).

Um dies zu überprüfen, erfolgte zunächst die Elektroporation von Bcr-Abl-WT- bzw. Bcr-Abl-KD-RNActive in DCs. Anschließend wurden die elektroporierten DCs jeweils mit den gegen PR-3, Rhamm bzw. Survivin gerichteten CTL-Klonen bzw. den drei CTL_{AML}-Klonen #3, #8 und #12 im ELISA zusammengesetzt und bezüglich ihrer IFN- γ -Freisetzung analysiert. Wie in Abbildung 17 dargestellt, zeigten die gegen PR-3, Rhamm bzw. Survivin

gerichteten CTL-Klone eine hohe Reaktivität gegen Bcr-Abl-WT⁺ DCs, nicht aber gegen Bcr-Abl-KD⁺ DC. Dieselbe Beobachtung ließ sich für die CTL_{AML}-Klone #3, #8 und #12 machen. Für Klon #8 und #12, welche zuvor keine Erkennung von FLT3-WT⁺ DCs gezeigt hatten (Abbildung 16), war, ebenso wie für Klon #3, eine hohe Reaktivität gegen Bcr-Abl-WT⁺ DCs, nicht aber gegen Bcr-Abl-KD⁺ DC nachweisbar.

2.5 Isolierung eines Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptors

Das Ziel der Generierung von CTL-Klonen, die gegen LAAs gerichtet sind, liegt in der Isolierung der spezifischen T-Zellrezeptoren (TCR) der CTL-Klone. Nach der Klonierung in einen retroviralen Vektor können beliebige primäre T-Zellen mit dem LAA-spezifischen TCR infiziert werden. Dadurch können für ein bestimmtes Antigen unspezifische T-Zellen in Antigen-spezifische T-Zellen moduliert werden.

Da die Isolierung von CTL-Klonen, die sich gegen Antigene richten, die durch FLT3 reguliert werden, ein langwieriger Prozess ist, wurde die Methodik der TCR-Isolierung anhand eines bereits in der Arbeitsgruppe vorliegenden, gegen Her2-gerichteten CTL-Klons (KW63) etabliert¹³⁶. Her2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*, erb-B2, c-erbB2) gehört wie FLT3 ebenfalls zu den Tyrosinkinasen und wird nach Amplifikation ebenfalls zu einem Onkogen.

Der CTL-Klon KW63 ist durch Stimulierung von HLA-A2⁺ CD8⁺ T-Zellen mit autologen DCs (transfiziert mit Her2-mRNA) generiert worden¹³⁶. Da ein T-Zellrezeptor jeweils aus einer alpha- und einer beta-Kette besteht (Abbildung 18A) wurde jeweils ein Versuchsansatz für jede der beiden Ketten durchgeführt. Um die Rezeptoren isolieren zu können, wurden die Sequenzen der beiden Ketten mit Hilfe einer Adaptors-vermittelten PCR ermittelt. Dafür wurde zunächst die RNA des KW63-Klons isoliert (5.2.1.15) und die mRNA in cDNA umgeschrieben (5.2.1.16). Anschließend wurde eine RACE-PCR durchgeführt, bei der ein Adaptor-spezifisches und ein Oligonukleotid, welches in der bekannten konstanten Region der alpha- bzw. beta-Kette bindet, verwendet wurden. So kann gewährleistet werden, dass nur die TCR-spezifischen Gene amplifiziert werden. Nach Aufreinigung wurden die 5'-Sequenzen der alpha- und beta-Kette bestimmt und spezifische Primer entworfen, die in der 5'-Region der variablen Kette binden und zugleich entsprechende Schnittstellen enthalten, um eine anschließende Klonierung der TCR-alpha- bzw. der TCR-beta-Kette in den retroviralen Zielvektor pMP71-PRE zu ermöglichen (Abbildung 18B).

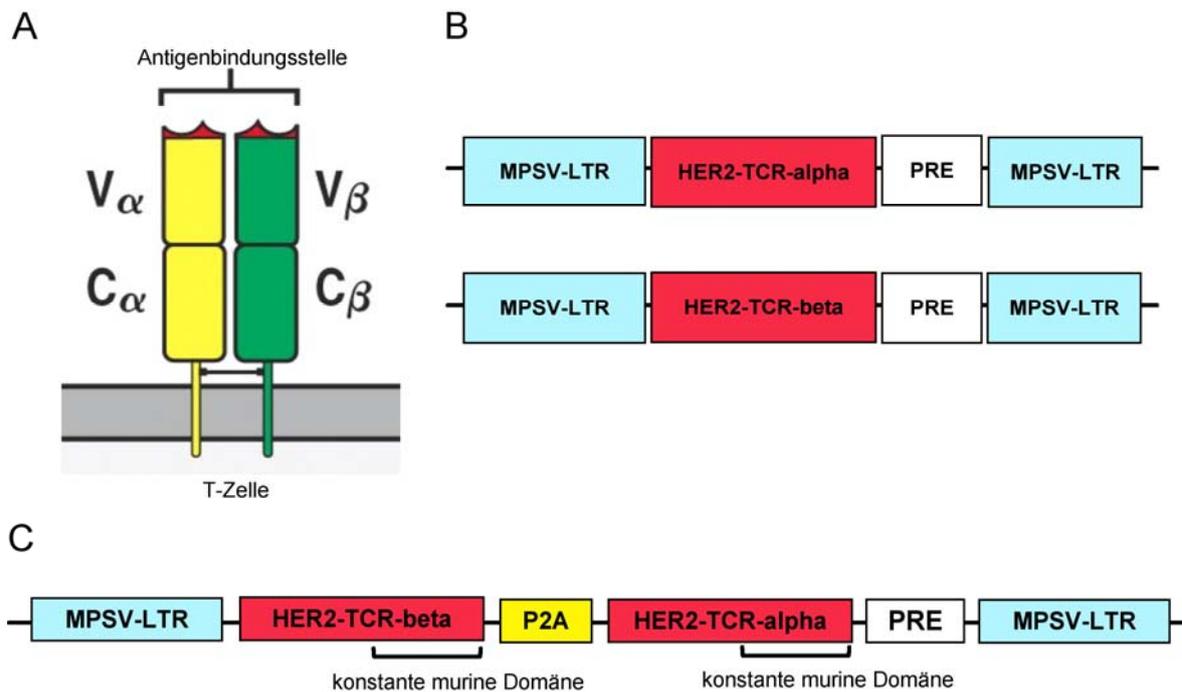


Abbildung 18: Generierung eines murinisierten TCR. (A) Die Struktur des T-Zell-Rezeptors (TCR). Das TCR-Heterodimer besteht aus den beiden Transmembranglykoproteinketten alpha (α) und beta (β), die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Der extrazelluläre Teil jeder Kette besteht aus einer variablen und einer konstanten Domäne. (B) Für die Transfektion primärer T-Zellen wurden beide Ketten des gegen Her2 gerichteten TCR KW63 jeweils in den retroviralen Vektor pMP71-PRE kloniert. (C) Nach der Murinisierung der konstanten Regionen der TCR-alpha- und beta-Kette wurden beide TCR-Ketten durch einen P2A-Linker miteinander verbunden und in den retroviralen Vektor pMP71-PRE kloniert.

Die Produkte der abschließenden RT-PCR der beiden Gesamtketten wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Es zeigten sich Banden in der zu erwarteten Größe von 843 bp für die alpha-Kette und 942 bp für die beta-Kette. Die vollständige Sequenzierung und anschließende BLAST-Suche (www.ensembl.org/index.html) der alpha- und beta-Kette ergaben folgende Zusammensetzungen (Nomenklatur nach IMGT):

TCR-alpha : TRAV14/DV4 - TRAJ6 - TRAC

TCR-beta : TRBV7-9 - TRB2-3 - TRBD1 - TRBC2

Tabelle 1: Sequenzanalyse der alpha- und beta-Kette des HER2-TCR-KW63

HER2-TCR-KW63	Sequenz
alpha-Kette	<p>ATGTCACCTTCTAGCCTGCTGAAGGTGGTCACAGCTTCACTGTGGCTAGGACCTGGCATTGCCAGAAAG ATAACTCAAACCCACCAGGAATGTTTCGTGCAGGAAAAGGAGGCTGTGACTCTGGACTGCACATATGA CACCAGTGATCAAAGTTATGGTCTCTTCTGGTACAAGCAGCCCAGCAGTGGGGAAATGATTTTTCTTAT TTATCAGGGGTCTTATGACGAGCAAAATGCAACAGAAGGTCGCTACTCATTGAATTCCAGAAGGCAA GAAAATCCGCCAACCTTGTCACTCCGCTTCAAACTGGGGGACTCAGCAATGTATTCTGTGCAATGA GAGATGCATCAGGAGGAAGCTACATACCTACATTGGAAGAGGAACCAGCCTTATTGTTCATCCGTAT ATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTA TTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAAGTAAGGATTCTGTATGTATATCACAGACAAA ACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGA CTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCAGCCCAGAAAAG TTCCTGTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAAGCTTTGAAAACAGATACGAACCTAAACTTTCAAACCTGT CAGTGATTGGGTCCGAATCCTCCTCTGAAAGTGCCGGGTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGT GTCCAGCTGA</p>
beta-Kette	<p>ATGGGCACCAGCCTCCTCTGCTGGATGGCCCTGTGTCTCCTGGGGGCAGATCACGCAGATACTGGAGT CTCCCAGAACCCAGACACAAGATCACAAAGAGGGGACAGAATGTAACCTTCAGGTGTGATCCAATTT CTGAACACAACCGCCTTTATTGGTACCGACAGACCCTGGGGCAGGGCCCAGAGTTTCTGACTFACTTCC AGAATGAAGCTCAACTAGAAAAATCAAGGCTGCTCAGTGATCGGTTCTCTGCAGAGAGGCCTAAGGGA TCTTTCTCCACCTTGGAGATCCAGCGCACAGAGCAGGGGGACTCGGCCATGTATCTCTGTGCCAGCAGC CCCCGGACAGACTTACAGATACGCAGTATTTGGCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCT GAAAAACGTGTTCCACCCGAGGTGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAA AGGCCACACTGGTATGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAAT GGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAAGCACAGACCCGAGCCCCCTCAAGGAGCAGCCCCGCCCTCAATG ACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCAC TTCCGCTGCAAGTCCAGTTCTACGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACC CGTACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTCACTCCGAGTCTTACC AGCAAGGGTCTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTGTATGCCGTG TGGTCAGTGCCCTCGTGCTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAG</p>

Die Klonierung der HER2-TCR-KW63 alpha- bzw. beta-Kette erfolgte in den Vektor pMP71-PRE, ein Retrovirus, das auf dem MPSV (Myeloproliferatives Sarkomavirus) und dem MESV (murines Stammzellvirus) basiert und durch eine PRE Insertion (Woodchuck Hepatitisvirus post-transkriptionelles regulatorisches Element) eine erhöhte Transgenexpression aufweist (Abb. 18B). Zusammen mit den Plasmiden, die für die Membranproteine (env), die gruppenspezifischen Antigene (gag) und die viralen Enzyme (pol) kodieren, wurden die beiden Einzelketten HER2-KW63-TCR-alpha und HER2-KW63-TCR-beta in HEK293T-Zellen transfiziert und der nach 48 h gebildete Virusüberstand für die Infektion von HLA-A2⁺ CD8⁺ T-Zellen verwendet. Die transduzierten CD8⁺ T-Zellen wurden mit einem Her-2₃₆₉₋₃₇₇-spezifischen Multimer angefärbt und mittels FACS-Messung analysiert. Auch nach mehrmaliger Wiederholung mit verschiedenen Chargen konnten keine Her2-positiven T-Zellen detektiert werden. Diese Beobachtung konnte bereits bei dem Ursprungsklon KW63 gemacht werden. Trotz der negativen Reaktion im FACS zeigt der Klon Reaktivität gegen das Peptid Her2₃₆₉₋₃₇₇ und HLA-A2⁺ Her2⁺ Zelllinien¹³⁶. Daher wurden die mit dem HER2-TCR-KW63

transduzierten $CD8^+$ T-Zellen mit T2-Zellen, die zuvor mit Her2₃₆₉₋₃₇₇, Her3₃₅₆₋₃₆₄, Her4₃₆₁₋₃₆₉ bzw. HIV_{pol476-484} beladen worden waren, kokultiviert und im ELISA auf ihre IFN- γ -Sekretion getestet. Wie in Abbildung 19 dargestellt, zeigten die transduzierten T-Zellen eine hohe Reaktivität gegen Her2₃₆₉₋₃₇₇. Zudem konnte eine wesentlich geringere, aber eindeutige Reaktivität gegen Her3₃₅₆₋₃₆₄ nachgewiesen werden, was mit den bereits für den Klon KW63 gemachten Beobachtungen übereinstimmt¹³⁶. Nach Inkubation mit Her4₃₆₁₋₃₆₉ und HIV_{pol476-484} ließ sich keine IFN- γ -Sekretion detektieren. Die Fähigkeit der HER2-TCR-KW63-positiven $CD8^+$ T-Zellen, endogen prozessiertes Her2₃₆₉₋₃₇₇ zu erkennen, wurde ebenfalls mittels IFN- γ -ELISA untersucht. Als Zielzellen diente in diesem Fall die Her2-exprimierende humane Brustkrebs-Zelllinie MCF7. Nach der Inkubation mit MCF7-Zellen zeigten die HER2-TCR-KW63-positiven $CD8^+$ T-Zellen jedoch keine Reaktivität, obwohl der Klon KW63 diese sehr gut erkannt hatte¹³⁶.

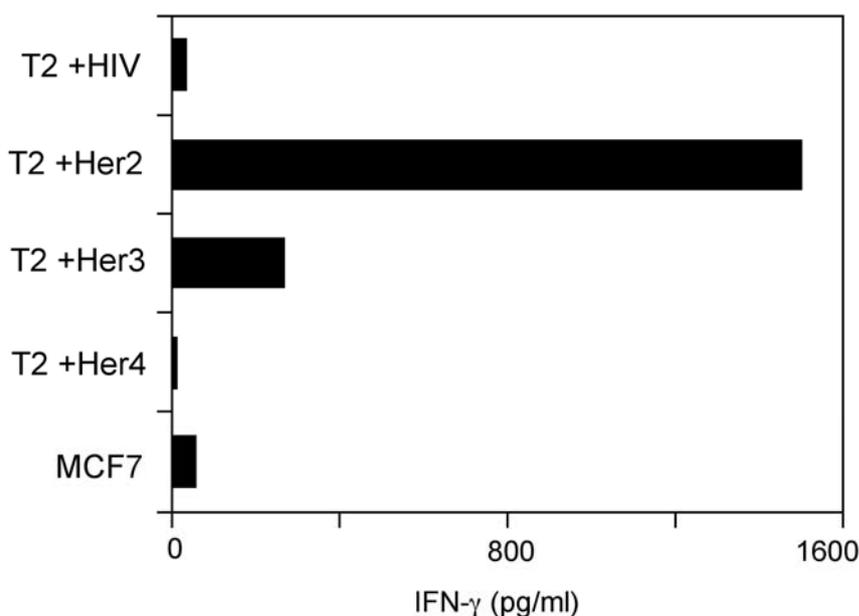


Abbildung 19: Analyse der mit dem gegen Her2 gerichteten TCR KW 63 transduzierten $CD8^+$ T-Zellen. Die transduzierten $CD8^+$ T-Zellen wurden mit T2-Zellen, gepulst mit Her2₃₆₉₋₃₇₇, Her3₃₅₆₋₃₆₄, Her4₃₆₁₋₃₆₉ bzw. HIV_{pol476-484} und mit der Her2-exprimierenden Zelllinie MCF7 im ELISA kokultiviert. Die IFN γ -Sekretion wurde am nächsten Tag aus dem Überstand gemessen.

2.6 Optimierung eines Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptors

Bislang konnte am Beispiel verschiedener humaner TCRs gezeigt werden, dass die partielle Murinisierung eines humanen TCR, d. h. der Austausch der C-Regionen des humanen TCRs durch die entsprechenden murinen C-Regionen, zu einer höheren

funktionalen Avidität von TCR-transduzierten humanen T-Zellen führt¹⁴⁷. Zudem verringert die Murinisierung eines humanen TCRs die Bildung von „gemischten“ TCRs, d.h. die Paarung von exogenen und endogenen TCR Ketten, da humane und murine C-Regionen nicht sehr effizient aneinander binden¹⁴⁸. Weiterhin verspricht man sich von der Murinisierung eines humanen TCR, das die Erkennung körpereigener Antigene vermieden werden kann.

Aus den oben aufgeführten Gründen und da der HER2-TCR-KW63 zu einem späteren Zeitpunkt noch *in vivo* getestet werden soll, erfolgte die Murinisierung des HER2-spezifischen TCR KW63. Hierfür wurden zuerst die variablen Regionen der alpha- und der beta-Kette sowie die konstanten Regionen der murinen Ketten mittels PCR amplifiziert. In einer weiteren PCR-Reaktion wurden die variable, humane alpha-Kette mit der konstanten, murinen alpha-Kette sowie die variable, humane beta-Kette mit der konstanten, murinen beta-Kette zusammengesetzt. Das finale PCR-Produkt enthält die beiden Ketten, durch einen P2A-Linker miteinander verbunden, und *NotI*- bzw. *EcoRI*-Restriktionsstellen, welche die Klonierung in den pMP71-PRE Vektor ermöglichen.

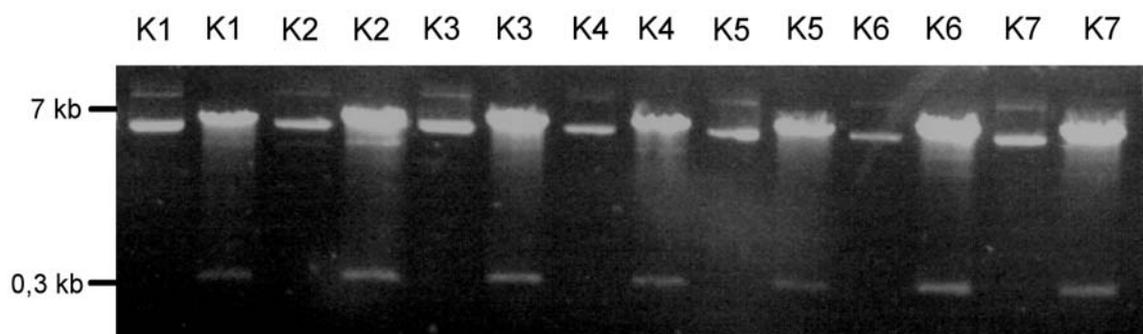


Abbildung 20: Klonierung der durch den P2A-Linker verbundenen, murinisierten beta- und alpha-Kette des TCR KW63 in den retroviralen Vektor pMP71. Im Zuge der Murinisierung des humanen TCR KW63 wurden dessen V α - und V β -Region amplifiziert und mit der murinen, ebenfalls zuvor amplifizierten C α - bzw. C β -Region fusioniert. Die so entstandenen PCR-Produkte wurden miteinander ligiert, so dass das finale PCR-Produkt die murinisierte beta- und alpha-Kette des TCR KW63 enthält, die durch einen P2A-Linker miteinander verbunden sind. Dieses finale PCR-Produkt wurde in den retroviralen Vektor pMP71-PRE kloniert. Nach der Transformation in kompetente Bakterien wurde der Zielvektor aus 7 Bakterienklonen K1-K7 isoliert und mittels PCR mit den entsprechenden Primern auf das gewünschte Insert untersucht. Links ist jeweils der Vektor in unverdautem Zustand, rechts das PCR-Produkt aufgetragen. Alle Klone tragen das entsprechende Insert, zur Sicherheit wurde Klon 2 sequenziert und für alle folgenden Transfektionsansätze verwendet.

Die Orientierung der Ketten (beta-P2A-alpha) wurde bewusst so gewählt, da bereits nachgewiesen werden konnte, dass diese Anordnung der TCR-Ketten eine optimale TCR-Expression und –Funktionalität ermöglicht¹⁴⁹.

Durch einen Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *PstI* (Abbildung 20) und Sequenzierung des Gesamtkonstrukts wurde die gewünschte Orientierung sichergestellt, und ausgeschlossen, daß Mutationen vorliegen.

Der murinisierte HER2-TCR-KW63 (Abbildung 18C) wurde ebenfalls in HEK293T-Zellen transfiziert und mit dem Virusüberstand HLA-A2⁺ CD8⁺ T-Zellen transduziert. Auch in diesem Fall konnten nach Färbung mit einem Her2₃₆₉₋₃₇₇ spezifischen Multimer mittels FACS-Analyse keine TCR-Her2⁺ T-Zellen detektiert werden. Wiederum wurde die Funktionalität der transduzierten CD8⁺ T-Zellen in einem IFN- γ -ELISA getestet. Dazu wurden die transduzierten CD8⁺ T-Zellen mit folgenden Zielzellen kokultiviert: T2-Zellen beladen mit Her2₃₆₉₋₃₇₇, Her3₃₅₆₋₃₆₄ bzw. HIV_{po1476-484}, MCF7 Zellen (HER2⁺) oder SKMel-37 Zellen (HER2⁺). Für SKMel-37-Zellen konnte anhand von durchflusszytometrischen Messungen eine Her2-Expression nachgewiesen werden. Auch in der Literatur wurde bereits das Vorkommen von ErbB-Rezeptoren in Melanomzellen beschrieben¹⁵⁰.

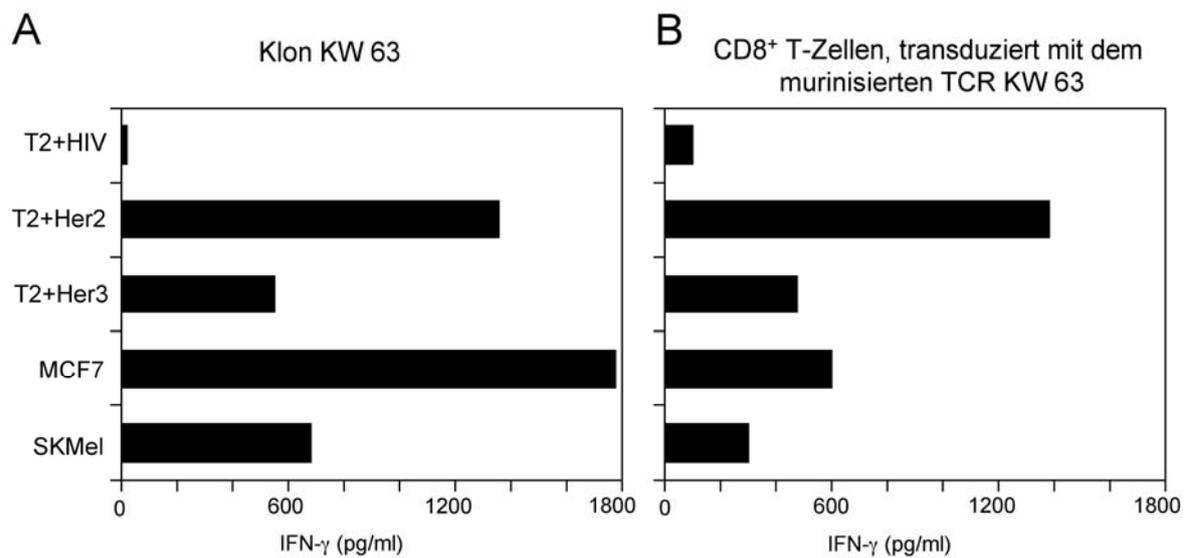


Abbildung 21: Analyse des Her2 spezifischen CTL-Klons KW63 sowie von, mit dem TCR KW63 transduzierten, CD8⁺ T-Zellen. (A/B) Der CTL-Klon KW63 bzw. die transduzierten CD8⁺ T-Zellen wurden mit T2-Zellen gepulst mit Her2₃₆₉₋₃₇₇, Her3₃₅₆₋₃₆₄ bzw. HIV₄₇₆₋₄₈₄ und mit den Her2-exprimierenden Zelllinien MCF7 und SKMel-37 im ELISA kokultiviert. Die IFN- γ -Sekretion wurde am nächsten Tag aus dem Überstand gemessen.

Wie in Abbildung 21B dargestellt, zeigten die transduzierten CD8⁺ T-Zellen erwartungsgemäß eine hohe Reaktivität gegenüber Her2₃₆₉₋₃₇₇ und eine eindeutige, aber geringere Reaktivität gegenüber Her3₃₅₆₋₃₆₄. Das als Negativ-Kontrolle dienende HIV-Peptid wurde nicht erkannt. Die Inkubation der transduzierten T-Zellen mit MCF7-Zellen oder SKMel-37-Zellen führte wiederum zu einer hohen IFN- γ -Sekretion. Zum Vergleich ist in Abbildung 21A der Ursprungsklon KW63 neben den transduzierten CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Die Tatsache, dass der Ursprungsklon KW63 eine wesentlich höhere Erkennung der MCF7- und SKMel-37-Zellen zeigt, ist wahrscheinlich auf die relativ geringe Transduktionseffizienz der CD8⁺ T-Zellen mit dem murinisierten TCR KW63 zurückzuführen. Die tatsächliche Transduktionsrate konnte nicht analysiert werden, da sich der Rezeptor nicht mit dem passenden Multimer anfärben läßt. In einem nächsten Schritt soll der HER2-TCR-KW63 in einem *in vivo* Modell untersucht werden, was jedoch in dem zeitlichen Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr möglich war.

3 Diskussion

Die bisherigen Standardtherapien der AML, wie die Chemotherapie bzw. die Knochenmarkstransplantation können aufgrund verschiedener Nebenwirkungen sehr belastend für den Patienten sein und nicht alle Erkrankten sprechen auf diese Therapieformen an. 80-90 % der Patienten mit AML tragen auf ihren Blasten die FLT3-Rezeptortyrosinkinase, in mindestens der Hälfte der Fälle ist diese überexprimiert^{48,151}. Darüber hinaus weisen die Tumorzellen bei ca. einem Drittel der Patienten aktivierende Mutationen in Form von internen Duplikationen (FLT3-ITD) oder Punktmutationen (FLT3-TKD) auf.¹⁵² Mutationen innerhalb des FLT3-Rezeptors, insbesondere FLT3-ITD Mutationen, bedingen eine ungünstige Prognose und stellen eine vielversprechende Zielstruktur für therapeutische Interventionen dar^{63,72}. Die Effektivität der gezielten Inhibierung einer onkogenen Kinase und deren Signalübertragung konnte bereits durch den Einsatz des Kinaseinhibitors Imatinib (STI571, Gleevec) bei Patienten mit CML und auch im Kontext von soliden Tumoren bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) gezeigt werden. Diese Erfolge führten in den letzten Jahren zur Identifizierung und Entwicklung potentieller FLT3-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren. Einige dieser Substanzen, wie beispielsweise Sorafenib (Nexavar), SU11248 und SU5416 zeigten in klinischen Phase I und II Studien biologische Wirksamkeit ohne signifikante hämatologische Toxizität^{99,153,154}. Anders als bei der Behandlung von CML-Patienten mit Imatinib war das Ansprechen bei AML-Patienten in den meisten Fällen allerdings nur von kurzer Dauer und auf periphere Blastenzahlen beschränkt. Remissionen wurden nur selten beobachtet^{95,99,155,156}. Diese offensichtlich rasche Resistenzentwicklung hat zur klinischen Prüfung dieser Substanzen in Kombination mit konventioneller Chemotherapie geführt¹⁰². Mehrere FLT3-inhibitoren befinden sich derzeit in der Phase I und II und Midostaurin (PKC412) in der Phase III der klinischen Prüfung in Kombination mit Standardchemotherapie.

Auf T-Lymphozyten basierende, immuntherapeutische Ansätze bieten Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden, wo bisherige Medikamente und medizinische Eingriffe erfolglos bleiben. Die Existenz von, gegen Myeloblasten gerichteten, zellulären und humoralen Immunantworten in AML-Patienten wurde in verschiedenen Studien eindeutig belegt^{109,139}. Beispielsweise konnten Leukämie-reaktive CTLs nach Vakzinierung mit Peptiden, die entsprechende Leukämieantigene repräsentieren, *in vivo* induziert werden und eine Leukämieprogression sowie -protektion bewirken¹⁵⁷. Ein

wichtiger Vorteil einer auf T-Zellen basierenden Immuntherapie gegenüber der Chemo- oder Strahlentherapie ist, dass T-Zellen das Potential haben, maligne Stammzellen zu eliminieren, auch wenn diese sich im ruhenden Zustand befinden¹⁵⁸. Da die Expression der FLT3-ITD bereits in CD34⁺/CD33⁻ AML-Vorläuferzellen nachgewiesen wurde, könnten bestimmte Sequenzabschnitte der FLT3-ITD als Peptidpitope für Leukämie-spezifische T-Zellen sehr geeignet sein¹⁵⁹. Einer Arbeitsgruppe aus Mainz ist es bereits gelungen, HLA-A1-restringierte, gegen das FLT3-ITD-Epitop eines AML-Patienten gerichtete, zytotoxische T-Zellen zu isolieren¹⁰³. Allerdings beinhaltet die starke Variation in der Länge der FLT3-ITD die Schwierigkeit, für eine große Bandbreite von Patienten verschiedene Peptidepitope ausfindig zu machen, um diese in Vakzinierungsansätzen oder für den adoptiven T-Zelltransfer einsetzen zu können⁵⁸. Eine potentielle Lösung für dieses Problem könnte in der Anwendung Leukämie-assoziiierter Antigene als Zielstrukturen in der Immuntherapie liegen. Für die Antigene Prame, PR-3 und HAGE wurde in CML-Patienten eine von der Bcr-Abl Kinase abhängige Expression nachgewiesen¹⁰⁵. Da einige dieser Antigene auch in AML-Blasten exprimiert werden, sollte in dieser Arbeit am Beispiel des FLT3-Rezeptors untersucht werden, ob diese, von der Bcr-Abl Kinaseaktivität abhängige Expression bestimmter LAAs auch auf andere Kinasen übertragbar ist.

Experimentell verwirklicht wurde diese Fragestellung zunächst durch die Untersuchung der leukämischen, FLT3⁺ Zelllinie RS4;11 auf die Expression der Antigene PR-3, Rhamm, WT-1, Prame und Survivin, jeweils mit und ohne Zugabe von FLT3-Ligand (FL). Auf diese Weise konnte für alle genannten Antigene eine grundsätzlich schwache Expression in RS4;11-Zellen nachgewiesen werden. Diese Expression wurde nach der Zugabe von FL deutlich stärker, was ein erster Hinweis darauf war, dass eine Assoziation zwischen der FLT3-Aktivität und der Regulation bestimmter LAAs besteht. Dieses Indiz verstärkte sich durch die Beobachtung, dass eine Nukleofektion der RS4;11-Zellen mit einem gegen FLT3 gerichteten siRNA-Pool und die gleichzeitige Zugabe von FL wiederum zu einer geringeren Expression der LAAs PR-3, Rhamm, WT-1, Prame und Survivin führten.

Um den Einfluss einer konstitutiv aktiven Mutationsvariante von FLT3 zu prüfen, wurde im Anschluss daran die Expression der Antigene PR-3, Rhamm, WT-1, Prame und Survivin in der FLT3-ITD positiven Zelllinie MV4;11 untersucht. Diese Zelllinie zeigte eine grundsätzlich starke Expression der genannten LAAs, vergleichbar mit der Expression in RS4;11-Zellen nach Behandlung mit FL. Die Inhibierung der konstitutiv aktiven FLT3-ITD durch SU5614, ein bekannter Inhibitor der FLT3-ITD Aktivität¹⁵⁵, führte zu einer deutlichen Herunterregulierung der verschiedenen Antigene. Diese Beobachtung ist analog

zu dem nach der Behandlung von WT⁺ Zellen mit FLT3-siRNA und FL beobachteten Effekt.

In den oben dargestellten Experimenten bestätigten sich bereits veröffentlichte Daten, die eine Expression von PR-3, Rhamm, WT-1, Prame und Survivin in AML-Patienten beschreiben^{109,115,160}. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression dieser LAAs in Abhängigkeit von der Aktivität der FLT3-Kinase reguliert wird. Diese Korrelation zwischen der FLT3-Kinaseaktivität und der Expression bestimmter LAAs bestätigt die Signifikanz dieser Antigene bezüglich der Entwicklung von immuntherapeutischen Strategien gegen AML. Für Rhamm und Prame beispielsweise, deren Expression im Zusammenhang mit einer günstigen Prognose steht, konnte bereits die Induktion starker T-Zellantworten in AML-Patienten nachgewiesen werden¹⁰⁹. Weiterhin ließen sich im Rahmen von klinischen Vakzinierungsstudien mit Rhamm-, PR-3- bzw. WT-1-Peptiden Immunantworten in Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen nachweisen^{109,114,135,137,161}.

Ein wichtiger Aspekt war es nun aufzuklären, ob die von der FLT3-Kinaseaktivität abhängige Expression verschiedener LAAs einen Einfluss auf die Erkennung FLT3⁺ Zellen durch T-Zellen hat. Demzufolge sollten im nächsten Schritt CD8⁺ T-Zellklone gegen bereits bekannte Peptidpitope von PR-3, Rhamm, WT-1, Prame und Survivin generiert werden. Hierfür wurden zunächst in einem allogenen Stimulationsansatz T-Zellen eines HLA-A2⁻ gesunden Spenders mit Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-beladenen DCs eines HLA-A2⁺ gesunden Spenders stimuliert, um so einer potentiell vorausgegangenen Depletion Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-reaktiver, also potentiell autoreaktiver, T-Zellen im Thymus auszuweichen. Nach dem Austesten verschiedener Stimulierungsansätze war die allogene Stimulierung zur Generierung von CTL-Klonen in der Arbeitsgruppe bereits als gängige Methode etabliert worden. Drei der nach der Klonierung isolierten, Rhamm₁₆₅₋₁₇₃-spezifischen CTL-Klone zeigten eine hohe Reaktivität gegenüber den mit Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ beladenen T2-Zellen und der HLA-A2⁺ Leukämiezelllinie K562-A2, sowohl im IFN- γ ELISA, als auch im Lyseassay. Die HLA-A2-Restriktion sowie die tumorlytische Aktivität der drei gegen Rhamm₁₆₅₋₁₇₃ gerichteten CTL-Klone konnte im „hot-cold-target“-Assay bestätigt werden und somit ließ sich auch eine Kreuzreaktivität gegen ein mögliches anderes, K562-A2-präsentiertes Epitop ausschließen. Die Beobachtung, dass die CTL-Klone bei einem Verhältnis von 80:1 (T2-Zellen:T-Zellen) nur eine halb so große lytische Aktivität zeigen, wie bei einem Verhältnis von 40:1, ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass der Anteil

an T2-Zellen bei einem Verhältnis von 80:1 zu hoch für die in der Zellsuspension vorhandenen T-Zellen ist und diese zu unspezifischer Lyse anregt.

Mit der oben dargestellten Methode der allogenen Stimulierung konnten ebenfalls PR-3₁₆₉₋₁₇₇- und Survivin₉₅₋₁₀₄- spezifische CTL-Klone generiert werden. Auch diese zeigten eine hohe IFN- γ -Reaktivität sowie eine hohe lytische Aktivität gegenüber PR-3₁₆₉₋₁₇₇- bzw. Survivin₉₅₋₁₀₄- beladenen T2-Zellen und K562-A2-Zellen.

Mittels Peptidtitration wurde für den PR-3-spezifischen CTL-Klon eine hohe Avidität mit einer halb maximalen IFN- γ -Sekretion von 10^{-10} ermittelt, während die Rhamm- bzw. Survivin-spezifischen Klone eine relativ geringe Avidität von 10^{-7} bis 10^{-6} erkennen ließen. Die Tatsache, dass die hohe Avidität eines TCRs nicht immer auf eine hohe tumorlytische Aktivität schließen lässt und andererseits eine niedrige Avidität nicht unbedingt mit einer geringen tumorlytischen Aktivität gleichgesetzt werden kann, wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits am Beispiel von Her2₃₆₉₋₃₇₇-spezifischen CTL-Klonen veröffentlicht¹³⁶.

Eine mögliche Erklärung liegt in der Vermutung, dass das endogen prozessierte und das in Lösung befindliche Peptid eine unterschiedliche Konformation aufweisen, beispielsweise aufgrund eines unterschiedlichen Glykolisierungsmusters^{162,163}. Die Konformation beider Peptide wäre in diesem Fall zwar ähnlich genug, dass sie beide erkannt werden, aber die Erkennung des endogen prozessierten Peptids wäre besser. Im Falle des Rhamm- bzw. Survivin-spezifischen CTL-Klons könnte eine bei der Stimulierung verwendete hohe Peptidkonzentration für die Generierung von für das synthetische Peptid nur niedrig aviden Klone, die das endogen prozessierte Peptid besser erkennen, verantwortlich sein.

Die Tatsache, dass alle generierten CTL-Klone auch eine hohe Reaktivität gegenüber HLA-A2⁺, ITD⁺ AML-Blasten zeigten, ist ein besonders wichtiger Aspekt im Hinblick auf die zukünftige Anwendung der isolierten T-Zellklone bzw. deren TCR für den adoptiven T-Zelltransfer.

In einem weiteren Versuchsansatz erfolgte die Stimulierung von CD8⁺ T-Zellen mit DCs aus leukämischen Blasten. Es wurde bereits nachgewiesen, dass DCs aus AML-Blasten in der Lage sind, Leukämie-spezifische zytolytische Aktivität in autologen Lymphozyten zu induzieren^{140,141}. Da die Spezifität der resultierenden T-Zellklone unbekannt war, wurden diese jeweils auf die Erkennung der HLA-A2-restringierten Peptidepitope von PR-3, Survivin, WT-1, Prame, Rhamm oder HIVpol geprüft. Keiner der getesteten CTL-Klone zeigte eine spezifische Erkennung von einem der getesteten Peptidepitope, aber alle drei

Klone zeigten spezifische Reaktivität gegenüber den HLA-A2⁺ leukämischen Zelllinien K562-A2 und BV173 sowie gegenüber FLT3-ITD⁺ AML-Blasten.

Im Anschluss daran sollte untersucht werden, ob die von der FLT3-Kinaseaktivität abhängige Expression verschiedener LAAs einen Einfluss auf die Erkennung FLT3⁺ Zellen durch die generierten CTL-Klone hat. Als Zielzellen wurden in diesem Fall HLA-A2⁺, FLT3⁺ Zellen benötigt. Da die Transfektion der Leukämiezelllinien RS4;11 bzw. MV4;11 mit einem retroviralen, das *HLA-A2*-Gen enthaltenden Vektor, sich auch nach dem Austesten und der Optimierung verschiedener Protokolle als problematisch erwies, sollten FLT3-WT bzw. FLT3-ITD in Form von mRNA in monozytäre HLA-A2⁺ DCs eines gesunden Spenders eingebracht werden. Diese Methode bietet im Vergleich zur DNA-Transfektion den Vorteil, dass das eingebrachte Gen nicht bis in den Zellkern eindringen muss, um transkribiert bzw. translatiert zu werden. Dies führt zu einer höheren Transfektionseffizienz bei gleichzeitig weniger restriktiven Transferbedingungen (beispielsweise bei Elektroporation der Zellen) und ermöglicht damit höhere Überlebensraten. Der Vorteil zur retroviralen Transduktion ist die Möglichkeit, DCs monozytären Ursprungs einzusetzen, die zum einen aus peripheren Blut isoliert werden können und damit eine wesentlich günstigere Verfügbarkeit besitzen, zum anderen ist die aus Monozyten differenzierte und ausgereifte DC-Population wesentlich homogener als beispielsweise DCs aus CD34⁺ Vorläuferzellen, mit 80 % bis 90 % Expression der jeweiligen DC-typischen Merkmale. Überdies transduzieren Retroviren vor allem sich in Teilung befindliche Zellen und sind daher ungeeignet für die Transduktion ruhender Zellen.

Der Transfer der mRNA in die DCs wurde mittels Elektroporation durchgeführt, bei der ein kurzer Stromstoß die Zytoplasmamembran permeabilisiert und die mRNA in die Zelle eintreten kann. Zur Optimierung dieser Methodik waren zuvor in der Arbeitsgruppe verschiedene Experimente mit Kontroll-mRNAs durchgeführt worden, die zum einen die hohe Effizienz bestätigten, zum anderen zeigten, dass die stimulatorischen Kapazitäten von DCs durch die Elektroporation nicht beeinflusst wurden.

Nach dem Transfer der FLT3-mRNA wurde zunächst die Aktivität von FLT3 in DCs, die mit FLT3-WT nukleofiziert worden waren, geprüft. Hierfür wurden die für PR-3, Rhamm bzw. Survivin spezifischen Klone sowie die CTL_{AML}-Klone auf die Erkennung von FLT3-WT⁺ DCs, jeweils mit und ohne Behandlung von FL, getestet. In Anwesenheit von unbehandelten FLT3-WT⁺ DCs ließen die verschiedenen CTL-Klone nahezu keine Reaktivität erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten die gegen PR-3, Rhamm bzw. Survivin

gerichteten CTL-Klone gegenüber den mit FL behandelten FLT3-WT⁺ DCs eine hohe Reaktivität. Nur einer der CTL_{AML}-Klone, Klon #3, sezernierte nach der Koinkubation mit FLT3-WT⁺ DCs, die mit FL behandelt worden waren, etwas IFN- γ . Die anderen beiden CTL_{AML}-Klone ließen keine Reaktivität erkennen.

Die drei Antigen-spezifischen CTL-Klone und CTL_{AML}-Klon #3 zeigten eine hohe, von der Behandlung mit FL unabhängige, Erkennung von FLT3-ITD⁺ DCs. Um den Effekt der Herunterregulierung von FLT3-WT zu untersuchen, wurden FLT3-WT⁺ DCs mit demselben FLT3-siRNA Pool transduziert, der auch verwendet worden war, um das Expressionsmuster der verschiedenen LAAs in RS4;11-Zellen zu analysieren. Nach der Transfektion der DCs mit FLT3-siRNA konnte für keinen der generierten Klone, unabhängig von der Behandlung mit FL, eine Reaktivität beobachtet werden

Insgesamt bestätigte sich in diesem Test die Hypothese, dass die Aktivität der FLT3-Kinase einen Einfluss auf die Expression der LAAs PR-3, Rhamm und Survivin hat. Die drei Antigen-spezifischen CTL-Klone und CTL_{AML}-Klon #3 zeigten eine von der Aktivität der FLT3-Kinaseaktivität abhängige Erkennung von FLT3⁺ DCs. Die beiden CTL_{AML}-Klone #8 und #12 scheinen ein Antigen zu erkennen, welches unabhängig von der FLT3-Aktivität ist und nur in Leukämieblasten exprimiert wird. Zugleich bestätigten die oben dargestellten Experimente die Effizienz der FLT3 mRNA-Elektroporation, da sich in der Zelle genügend FLT3-Protein anreichern kann, um in ausreichendem Maße verschiedene Adapterproteine bzw. Signalwege zu aktivieren.

In der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression der Antigene Prame, PR-3 und HAGE durch die Aktivität der Bcr-Abl Kinase induziert werden kann¹⁰⁵. Daher sollte in einem nächsten Schritt geprüft werden, ob die verschiedenen, für FLT3-regulierte LAAs spezifischen CTL-Klone mit Bcr-ABL⁺ Zielzellen kreuzreagieren. Somit kann geklärt werden, ob die gleichen T-Zell-erkannten Antigene durch verschiedene Tyrosinkinase hochreguliert werden. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden zunächst DCs entweder mit Bcr-Abl-WT mRNA oder mit einer Kinase-defizienten Bcr-Abl-KD mRNA elektroporiert. Die Kinase-defiziente Mutante von Bcr-Abl enthält eine Punktmutation an Position 1172 (K1172R) und lag in der Arbeitsgruppe bereits vor.

Sowohl die peptidspezifischen, als auch die drei CTL_{AML}-Klone ließen eine hohe Reaktivität gegenüber Bcr-Abl-WT⁺ DCs und keine oder nur eine sehr geringe Reaktivität gegenüber Bcr-Abl-KD⁺ DCs erkennen. Aus der Tatsache, dass die beiden CTL_{AML}-Klone #8 und #12 keine Erkennung von FLT3-ITD⁺ Zielzellen und mit FL behandelten FLT3-WT⁺ Zielzellen, jedoch aber eine hohe Erkennung von Bcr-Abl-WT⁺ DCs zeigten, kann

die Schlussfolgerung gezogen werden, dass diese beiden Klone spezifisch für ein Antigen sind, welches in Abhängigkeit von der Bcr-Abl-Kinaseaktivität, nicht aber von der FLT3-Kinaseaktivität reguliert wird. Im Gegensatz dazu scheint das von dem CTL_{AML}-Klon #3 erkannte Antigen sowohl durch die Aktivität der Bcr-Abl-Kinase, als auch durch die Aktivität der FLT3-Kinase reguliert zu werden. In Anbetracht der bereits in der Arbeitsgruppe erzielten Forschungsergebnisse scheinen die Antigene PR-3 und Preme sowohl in Abhängigkeit von der Bcr-Abl-, als auch von der der FLT3-Kinase reguliert zu werden. Im Gegensatz dazu wird die Expression von WT-1 nur durch die FLT3-Kinaseaktivität, nicht aber durch die Bcr-Abl-Kinaseaktivität beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sowohl einige Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede in der Regulation bestimmter LAAs durch die Bcr-Abl- und die FLT3-Kinase gibt. Ein interessanter Aspekt für die Zukunft wäre es somit herauszufinden, ob die gleichen und/oder andere Leukämie- bzw. Tumor-assoziierte Antigene durch andere Tyrosinkinase, wie beispielsweise die NPM/Alk-Kinase, reguliert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Antigene, deren Expression durch in Leukämiezellen aktive Kinasen hochreguliert wird, vielversprechende Zielstrukturen für die Entwicklung von, auf T-Zellen basierenden, immuntherapeutischen Ansätzen gegen verschiedene Formen von myeloischen Leukämien darstellen. Eine umfassende klinische Anwendung des adoptiven T-Zelltransfers ist aufgrund der Schwierigkeit, T-Zellen zu isolieren, zu kultivieren und zu charakterisieren limitiert. Dieses Problem könnte durch die Isolierung von, für bestimmte LAAs spezifische TCRs und deren anschließendem Transfer in primäre humane T-Zellen gelöst werden. Somit könnten CTL-Klone, die gegen, durch FLT3- und Bcr-Abl-regulierte LAAs gerichtet sind, wie der in dieser Arbeit generierte Rhamm- bzw. PR-3 spezifische Klon, als Ausgangspunkt für leukämiespezifische TCRs dienen. Aufgrund der Gemeinsamkeiten innerhalb des durch FLT3 und Bcr-Abl bedingten Antigen-Expressionsmodells bestünde somit die Option, eine T-Zell basierte Immuntherapie für eine große Bandbreite von Patienten mit FLT3⁺ oder Bcr-Abl⁺ myeloischer Leukämie zu ermöglichen. Die durch einen TCR-Transfer ermöglichte Spezifitätsübertragung bietet eine wesentliche Vereinfachung, um Leukämie-spezifische CTLs aus den T-Zellen eines Patienten zu generieren. Die damit einhergehende Beschleunigung des Verfahrens kann, gerade im Bezug auf ein Fortschreiten der Erkrankung, von erheblicher Bedeutung bei der Behandlung von Leukämiepatienten sein. Die Vorbereitungen für den Transfer des PR-3 und Rhamm-spezifischen TCR in primäre T-Zellen, beispielsweise die RNA-Isolierung, werden derzeit getroffen.

4 Zusammenfassung

Interne Tandem-Duplikationen (FLT3-ITD, *internal tandem duplications*) in der Rezeptortyrosinkinase FLT3 liegen bei ca. 30 % der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) vor und führen zur konstitutiven Aktivierung des FLT3-Rezeptors. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Immuntherapien zur Behandlung der AML wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der FLT3-Rezeptortyrosinkinase auf die Expression bestimmter, in AML-Patienten häufig exprimierter Leukämie-assoziiierter Antigene (LAA) untersucht.

In FLT3-Wildtyp (WT)⁺ und FLT3-ITD⁺ myeloiden Zellen ließ sich eine eindeutige Regulierung der Antigene PR-3, Rhamm, Prame, WT-1 und Survivin in Abhängigkeit von der FLT3-Kinaseaktivität feststellen. Da diese LAA potentielle Zielstrukturen für zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) darstellen, wurden im nächsten Schritt CD8⁺ CTL-Klone generiert, die endogen prozessiertes PR-3, Rhamm bzw. Survivin erkennen und eine hohe Reaktivität gegenüber AML-Blasten zeigen.

Weiterhin erfolgte die Stimulierung von CD8⁺ T-Zellen mit aus AML-Blasten gezogenen DC. Die resultierenden CTL_{AML}-Klone zeigen eine hohe Reaktivität gegenüber humanen leukämischen Zellen und AML-Blasten, ihre genaue Peptidspezifität ist nicht bekannt.

Um zu untersuchen, ob die Herunterregulierung der FLT3-Kinase zu einer geringeren Erkennung von FLT3⁺-Zellen durch die isolierten CTL-Klone führt, wurden FLT3-WT⁺ bzw. FLT3-ITD⁺ Zielzellen nach Behandlung mit FLT3-Ligand (FL) und/oder FLT3-siRNA mit den isolierten T-Zellklonen kultiviert. Die CTL-Klone und ein CTL_{AML}-Klon zeigten eine hohe Reaktivität gegenüber FLT3-ITD⁺ Zielzellen bzw. FLT3-WT⁺ Zellen, die mit FL behandelt worden waren. Zellen, in denen FLT3 herunterreguliert worden war, wurden nicht erkannt.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass das von der, in Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) exprimierten, Bcr-Abl- bzw. der FLT3-Kinase induzierte Antigenexpressionsmuster sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede aufweist. Immuntherapeutische Ansätze gegen FLT3⁺ bzw. Bcr-Abl⁺ Leukämien konzentrieren sich bislang auf das (mutierte) FLT3- bzw. Bcr-Abl-Protein als Zielstruktur. Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass Antigene, deren Expression durch die Aktivität bestimmter Kinasen in leukämischen Zellen hochreguliert wird, vielversprechende Zielstrukturen für die Entwicklung einer T-Zell basierten Immuntherapie gegen myeloische Leukämien verschiedenen Ursprungs darstellen.

4 Summary

Internal tandem duplications (ITD) of the receptor tyrosine kinase FLT3 occur in approximately 30 % of patients with acute myeloid leukemia (AML). FLT3-ITD causes constitutive activation of the FLT3 receptor and activation of downstream signaling events. In order to develop alternative immunotherapies for the treatment of AML, the influence of the FLT3 kinase on the expression of different antigens known to be expressed oftentimes in AML was analysed in this thesis.

First, the expression of different leukemia associated antigens (LAA) was analysed in FLT3-wild type (WT)⁺ and FLT3-ITD⁺ myeloid cells. It could be demonstrated that known antigens, such as PR-3, Rhamm, Prame, WT-1 and Survivin are upregulated by constitutively active FLT3-ITD as well as FLT3-WT activated by FLT3 ligand (FL). These FLT3-regulated antigens can serve as potential targets for cytotoxic T lymphocytes (CTL). Therefore, in a further approach, CTL clones were isolated which are able to recognize endogenously processed PR-3, Rhamm and Survivin, respectively. Besides, these clones performed high IFN- γ secretion in the presence of AML blasts.

In a further approach, to analyse whether FLT3-ITD⁺ leukemic blasts were capable of inducing a primary CTL response, CD8⁺ T lymphocytes were stimulated with blast derived DC. The three resulting CTL_{AML}-clones showed high reactivity against leukemic cells and AML-blasts, their peptide specificity is not known.

To analyse whether downregulation of the FLT3 kinase was also leading to a lower recognition by the different CTL and CTL_{AML}-clones, dendritic cells (DC) were electroporated with FLT3-WT- or FLT3-ITD-mRNA and cultivated with the different clones. The three CTL clones and one of the CTL_{AML}-clones showed high recognition of FLT3-ITD⁺ DC as well as of FLT3-WT⁺ DC in the presence of FL. Downregulation of FLT3 led to the abolishment of CTL recognition.

Finally, it could be demonstrated that there analogies as well as differences in the LAA expression pattern caused by the FLT3 and the Bcr-Abl kinase which is expressed in patients with chronic myeloid leukemia (CML).

As far, immunotherapeutic approaches against FLT3⁺ and Bcr-Abl⁺ leukemia, respectively concentrate on the (mutated) FLT3 or Bcr-Abl protein as target structure. The results described above point that antigens which are upregulated by the activity of certain kinases in leukemic cells are promising targets for the development of a T cell based immunotherapy against myeloid leukemia of different origin.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte

Agarosegel Elektrophoresammer	Kodak, New Haven, USA
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
¹³⁷ Caesium -Strahlenquelle (33300 GBq)	Buchler, Braunschweig
CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen
Durchflusszytometer (EPICS®XL)	Beckman-Coulter, Krefeld
Elektroporator	Biorad, Hercules, USA
Elisa Reader Emax	Molecular Devices, MWG-Biotech, Ebersberg
ELISpot-Kamera, DX 950P	Sony, Japan
ELISpot-Mikroskop, Axioplan 2	Zeiss, Hallbergmoos
Entwickler Hyperprocessor	Amersham, Braunschweig
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
KS ELISpot, Version 4.1.103	Zeiss, Hallbergmoos
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Magnetrührgerät IKAMG RH	Janke & Kunkel, Staufen
Multi-Gel Long Elektrophoresammer	Biometra, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter Φ32	Beckman, Fullerton, USA
Refrigerated Incubator-Shaker Innova	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	Holten, Gydevang, Dänemark
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen

Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen
Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge GS-6K	Beckman, Fullerton, USA

5.1.2 Chemikalien und biogene Substanzen

2-Amino-9-Ethylcarbazol-(AEC-)Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamid/ Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aqua Spüllösung	Delta Select, Pfullingen
Bactoagar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Complete™ Protease Inhibitor Tabletten	Boehringer, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Deisenhofen

Hypaque Ficoll	Biochrom GmbH, Berlin
5-Fluorouracil	Ribosepharm GmbH, München
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Fluka, Deisenhofen
Glycerol-2-phosphat	Aldrich Chemical Company, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Heparin, Liquemin®	Roche, Grenzach-Whylen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumbicarbona	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumcarbonat	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumdextransulfat	Farmacia, Freiburg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe

Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trockenmilchpulver	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

5.1.3 Radioaktive Substanzen

Natriumchromat	MP Biochemicals, Irvine, USA
----------------	------------------------------

5.1.4 Zellkulturmedien, Zusätze und Wachstumsfaktoren

AB-Serum	Valley Biomedical, Winchester, VA, USA
AIM-V	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Humanes β 2-Microglobulin	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Cyclosporin A, Sandimmun®	Novartis, Nürnberg
DMEM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Diphtherietoxin	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
G 418 (Neomycin)	PAA, Pasching, Österreich
Rekombinanter humaner Granulozyten- Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	CellGenix, Freiburg
Interleukin-1 β	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Proleukin (Interleukin-2)	Chiron, Emeryville, CA, USA
Interleukin-4	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-6	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-7	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-12	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-15	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
L-Glutamin, 200 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Lipofectamine™ 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5 % Opti-MEM®	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Miniprostin E2, PGE2	Pharmacia, Erlangen
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Humaner Tumornekrosefaktor α	Roche, Mannheim
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
X-VIVO 15	Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien

5.1.5 Peptide

HIV ₄₇₆₋₄₈₄ (ILKEPVHGV)	Biosyntan, Berlin
MelanA ₂₆₋₃₅ (EAAGIGILTV)	"
PR1 ₁₆₉₋₁₇₇ (VLQELNVN)	"
Rhamm ₁₆₅₋₁₇₃ (ILSLELMKL)	"
Survivin ₉₅₋₁₀₄ (ELTLGEFLKL)	"
HER2 ₃₆₉₋₃₇₇ (KIFGSLAFL)	"
WT-1 ₂₃₅₋₂₄₃ (CMTWNQMNL)	"
WT-1 ₁₂₆₋₁₃₄ (RMFPNAPYL)	"
Prame ₁₀₀₋₁₀₈ (VLDGLDVLL)	"
Prame ₁₄₂₋₁₅₁ (SLYSFPEPEA)	"

5.1.6 Enzyme

5.1.6.1 Restriktionsenzyme

<i>Bam</i> HI (20 U/ μ l)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Eco</i> RI (10 U/ μ l)	Roche, Mannheim
<i>Eco</i> RV (10 U/ μ l)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Hind</i> III (10 U/ μ l)	Roche, Mannheim

<i>Hpa I</i> (5 U/ μ l)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Kpn I</i> (10 U/ μ l)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Nhe I</i> (10 U/ μ l)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
CIAP, alkalische Phosphatase(20-30 U/ μ l)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Eco RI</i> (10 U/ μ l)	Roche, Mannheim
<i>Hind III</i> (10 U/ μ l)	Roche, Mannheim
<i>Kpn I</i> (10 U/ μ l)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Xba I</i> (20 U/ μ l)	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Xma I</i> (10 U/ μ l)	Roche, Mannheim
<i>Xho I</i> (10 U/ μ l)	Roche, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
CIAP, alkalische Phosphatase(20-30 U/ μ l)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.1.6.2 Polymerasen

Herculase [®] Enhanced DNA Polymerase	Stratagene, Austin, USA
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.1.6.3 Alkalische Phosphatase

CIAP, alkalische Phosphatase (20-30 U/ μ l)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
---	----------------------------

5.1.7 Antikörper

Anti-human CD8, FITC-konjugiert	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-human IgG, FITC-konjugiert	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-human IgG, PE-konjugiert	"
Anti-HLA-A2, FITC-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Anti-HLA-A2, unkonjugiert	"
Anti-HLA-DR, PE-konjugiert	"
Anti-human CD80, PE-konjugiert	"
Anti-human CD83, PE-konjugiert	"
Anti-human CD86, PE-konjugiert	"
Anti-human CD86, FITC-konjugiert	"

Anti-human Interferon- γ , mAb 1-D1K	Mabtech, Stockholm, Schweden
Anti-human Interferon- γ , mAb 7-B6-1-	"
Biotin	
HER2p369-377-Tetramer	"
MelanAp26-35-Tetramer	"
PR-3p169-177-Tetramer	"
Rhammp165-173-Tetramer	"
Survivinp95-104-Tetramer	"

5.1.8 Zelllinien

5.1.8.1 Adhärenzte Zelllinien

SK-MEL-29	HLA-A2 ⁻ , HER2 ⁺ Melanomzelllinie
SK-MEL-37	HLA-A2 ⁻ , HER2 ⁺ Melanomzelllinie
HEK293T	menschliche embryonale Nierenzellen
MCF7	HLA-A2 ⁻ , HER2 ⁺ Mammakarzinomzelllinie

5.1.8.2 Suspensionszelllinien

K562	Erythroblastäre Zelllinie, HLA-Klasse I
K562tA2	Erythroblastäre Zelllinie, stabil mit HLA-A2 transfiziert
BV-173	CML-Zelllinie, HLA-A2 ⁺
SM-LCL	HLA-A2 ⁺ , EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinie
T2	HLA-A2 ⁺ , TB lymphoblastoide Hybridomzelllinie, TAP-defizient
C1RtA2	EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinie ohne HLA-I, HLA-A2 transfiziert

5.1.9 Oligonucleotide

5.1.9.1 Oligonucleotide für die RT-PCR

β-ACTIN	GGCATCGTGATGGACTCCG
β-ACTINas	GCTGGAAGGTGGACAGCGA
WT-1	TAACCACACAACGCCCATC
WT-1as	AAAACCTTCGTTACAGTCC
Proteinase3	CGGCCACATAACATTTGCAC
Proteinase3_as	TGGCACATCCCCAGATCA C
Prame	CTGTACTCATTTCAGAGCCAGA
Prame_as	TATTGAGAGGGTTTCCAAGGGGT
Rhamm	CAGGTCACCCAAAGGAGTCTCG
Rhamm_as	CAAGCTCATCAGTGTTTGC
Survivin	ACCACCGCATCTCTACATTC
Survivin_as	GCTCTTTCTCTGTCCAGTTTC
F3_fmKZ	GCCACCATGCCGGCGTTGG
F3_foKZ	ATGCCGGCGTTGGCGCGC
F3_r	GCCTACGAATCTTCGACCTGAG
FLT3_fausZellen	CAGGCGGCATCGCAGGGCTG
FLT3_rausZellen	CCTGAGAAGGCCTTGGATGCAG

5.1.9.2 Oligonucleotide zum Sequenzieren

EF1a_fwd	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC
FLT3_forsequ	GCTGCCGCTGCTCGTTGT
FLT3_revsequ	GTCGACCAGCACTTGCAGTGT
PhEF1A_for	GTCCTCAGCCGTCGCTTCA
M13_for	CAGGAAACAGCTATGAC
M13_rev	GTA AACGACGGCCAG
FLT3_for	CGGTGATATCCTCGAGCCCATC
FLT3_rev	GTAAGCTTGGGCCCTCTAGAGC
FLT3_for_in	GCGTTCCAGAGCCGATCGTG
FLT3_rev_in	GTGGCAATGTGGTCTGAGGAG

FLT3_for2_in	GCAATCATAAGCACCAGCCAGG
FLT3_rev2_in	GTATGCACAGCACTTGACCAGG
FLT3_for3	GGTCAAGTGCTGTGCATAC
FLT3_for4	GCAATGCCCCGTCTGCCTG
FLT3_for5	GACAGCTCTGAAAGAGAGGC
FLT3_rev3	CGTTAGCATCAACCGGAATGC

5.1.9.3 Oligonucleotide für das Einfügen von Restriktionsschnittstellen

Hind-FLT3-Fw	CCCAAGCTTGGGATGCCGGCGTTGGCG CGC
FLT3-Xba-Rv	GCTCTAGAGCCTACGAATCTTCGACC
FLT3_for1Hindgp	CCCAAGCTTGGGATGCCGGCGTTGGCGCGC
Xho-Kozak-Tkd-Fw	AATCTCGAGATCCACCATGCCGCGCTTGGCGCG
Tkd-Xho-Rv	TTACTCGAGTAACTACGAATCTTCGACCTAGC
FLT3_Xma_Fw	ATTCCCGGGAATTCCACCATGCCGGCGTTGGCG CG
FLT3_Xma_Rv	TTAATCCCGGGAATCTACGAATCTTCGACCGA GC
FLT3_revXba2	GCTCTAGAGCCTACGAATCTTCGACTTCGACCT GAGCCTGC
FLT3_forHindIII	CCCAAGCTTGGGGCCACCATGCCGGCGTTGC GC

5.1.9.4 Oligonucleotide für die TCR-Isolierung

Not-Kozak-TRAV14/DV4	AGGCGGCCGCCACCATGTCACCTTTCTAGCCTG
Not-Kozak-TRBV7-9	AGGCGGCCGCCACCATGGGCACCAGCCTCCTC
revTRBC2-EcoRI	TGGAATTCCTAGCCTCTGGAATCCTTTCTC
revTRBC1-EcoRI	TGGAATTCTCAGAAATCCTTTCTCTTGACC
revTRAC1-EcoRI	TGGAATTCTCAGCTGGACCACAGCCGCAGC

5.1.9.5 Oligonucleotide für die TCR-Murinisierung

P2AVa_fwd	CGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATG
P2A_rev	CATGGGACCGGGGTTTTCTTCCACG
hVb_rev	CTTGGGTGGAGTCACGTTTCTCAGGTCCTC
mCb_fwd	GAGGACCTGAGAAACGTGACTCCACCCAAG
hVa_rev	CTGGTACACGGCAGGTTTCAGGGTTCTGGAT
mCa_fwd	ATCCAGAACCCTGAACCTGCCGTGTACCAG
fwd	CCCTCTCTCCAAGCTCACTT
rev	CAAATATGGGAATAAATGGCGGTAAGATGC

5.1.10 DNA- und Protein Molekulargewichtsmarker

100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
1 kb DNA-Molekulargewichtsmarker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
1 kb Plus DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rainbow Protein-Molekulargewichtsmarker	Amersham Biosciences, Braunschweig

5.1.11 DNA/RNA Aufreinigungssysteme

QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep [®] Spinminiprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] Spin Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim
RNeasy	Qiagen, Hilden

5.1.12 Sonstige Kitsysteme

BD OptEIA [™] Human IFN- γ ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, USA
BD OptEIA [™] Human TNF- α ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, USA

5.1.13 Puffer- und Standardlösungen

Ampicillin-Stammlösung:	50 mg/ml in ddH ₂ O
Coating-Puffer (ELISA)	8,4 g NaHCO ₃ 3,56 g Na ₂ CO ₃ ad 1 l A.d.
DNS-Probenpuffer (10-fach):	50 % Glycerin 0,2 % Bromphenolblau 0,5 M EDTA in ddH ₂ O
Erythrozyten-Lyse-Puffer	8,3 g Ammoniumchlorid 1,0 g Kaliumcarbonat 37 mg EDTA
FACS-Puffer:	1 % BSA in PBS
Luria-Bertani (LB) Medium (flüssig):	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Hefeextrakt 1 % NaCl in ddH ₂ O pH 7,0 ,autoklavieren
LB-Medium (fest):	1,5 % Bacto-Agar in LB-Medium (flüssig)
Lysis-Puffer	10mM Tris/HCl (pH 7,5) 130 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5 % Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH 7) 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM NaF 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml ddH ₂ O
MACS-Puffer:	1 x PBS (pH 7,2) 0,5 % BSA 2 mM EDTA
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4 % SDS in ddH ₂ O
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS in ddH ₂ O

SDS-Probenpuffer (2-fach):	1 M Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM DTT 4 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glycin in ddH ₂ O
SOC-Medium:	2 % Bacto-Trypton 0,5 % Bacto-Hefeextrakt 0,5 % 1M NaCl 0,5 % 1M KCl in ddH ₂ O mit 1M NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren 1 % 2M Glukose (frisch zugegeben) 1 % 2M MgCl ₂ (frisch zugegeben) sterilfiltrieren (0,2µm Filter)
Stopp-Lösung (ELISA)	2 N H ₂ SO ₄
TAE-Puffer (10-fach):	0,4 M Tris 1,1 % Essigsäure 2 % 0,5 M EDTA (pH 8) in ddH ₂ O
Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS in ddH ₂ O 20 % Methanol in ddH ₂ O
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4 % SDS in ddH ₂ O

5.2 Methoden

5.2.1 Molekularbiologische Methoden

5.2.1.1 Primerkonstruktion und –synthese

Primer sind kurze Oligonukleotide, die in der Regel zwischen 15 und 25 Basenpaaren lang sind und mit einer spezifischen Zielsequenz Basenpaare bilden, so dass eine Polymerase die Synthese des komplementären Stranges an dieser Stelle beginnen kann. Innerhalb eines Primers bzw. eines Primerpaares sollten keine komplementären Sequenzabschnitte vorkommen, um die Bildung von Haarnadeln oder Dimerisierung zu verhindern. In der Regel endet das 3'-Ende eines Primers mit Guanin (G) oder Cytosin (C), da die Bindung zwischen diesen Basen chemisch stabiler ist als zwischen Adenosin (A) und Thymin (T). Der GC-Gehalt liegt im Idealfall zwischen 40 und 60 %. Die Schmelztemperatur (T_M)

eines Primerpaares sollte sich nicht um mehr als 5°C unterscheiden und zwischen 55°C und 65°C liegen. Sie lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$T_M = \text{Anzahl (C+G)} \times 4^\circ\text{C} + \text{Anzahl (A+T)} \times 2^\circ\text{C} \text{ (Wallace Regel)}$$

Zieht man von der Schmelztemperatur 2-5°C ab, so erhält man die Temperatur, bei der sich die Primer an den jeweiligen DNA-Strang anlagern. Ist diese zu niedrig, kommt es zu einer unspezifischen Hybridisierung der Primer, ist diese zu hoch, binden die Primer gar nicht. Soll das PCR-Produkt in einen Vektor kloniert werden, so sollte der 5'-Primer die gleiche Restriktionsschnittstelle wie der Vektor besitzen. An die Restriktionsschnittstelle sollten in 5'-Richtung weitere zwei bis fünf Basen angefügt werden, um die Aktivität der Enzyme zu erhöhen. Zudem können N-terminale Tags eingeführt werden, die nach der Expression zum Beispiel die Separation überexprimierter rekombinanter Proteine von Wildtypproteinen ermöglichen. 3'-Primer sollten ebenfalls geeignete Restriktionsstellen aufweisen. Zudem können sie C-terminale Tags enthalten. Als Stoppcodon für den Elongationsabbruch dient häufig das Triplet TAA. Die bei dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Gene Runner“ konstruiert und von der Firma MWG, Ebersberg bezogen.

5.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht eine vielfache Amplifikation von geringsten Mengen DNA aus einem bestimmten Abschnitt des Genoms.¹⁶⁴ Kary B. Mullis bekam 1993 den Nobelpreis für Chemie für die Entwicklung dieser Technik. Voraussetzung ist, dass bestimmte Randsequenzen, die den Abschnitt flankieren, bekannt sind. Diese Sequenzen werden benötigt um dazu komplementäre Oligonukleotide zu synthetisieren, wobei deren Basensequenz jeweils zu einem der beiden Stränge komplementär ist.

Die zwei DNA-Oligonukleotide dienen als Primer bei der nun folgenden *in vitro*-DNA-Synthese durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Da die Primer flankierend an den entgegengesetzten Punkten der zu vervielfältigenden Sequenz liegen, bestimmen sie auch die Enden der amplifizierten Region.

Ablauf eines PCR-Reaktionszyklus:

5. **Trennung** der DNA-Doppelhelix durch kurzes Erhitzen auf 96°C.

6. **Primerannealing:** Die Primer binden beim Abkühlen an die komplementären DNA-Einzelstränge (50-60°C).
7. **Replikation** der beiden DNA-Stränge durch die Polymerase: Die downstream (in 3' Richtung) von den Primern gelegenen DNA-Abschnitte werden selektiv neu synthetisiert (72°C), wobei etwa 100 Basen in 10 s synthetisiert werden

Üblicherweise werden 20-30 Reaktionszyklen nacheinander durchgeführt, wobei zu beachten ist, dass mit steigender Zyklenzahl auch die Fehlerrate größer wird.

In jedem Zyklus wird die im vorherigen Zyklus synthetisierte DNA verdoppelt, da bei jeder Wiederholung die neu synthetisierten Fragmente wiederum als Matrize dienen. Man geht daher theoretisch von einer exponentiellen Vermehrung der DNA mit der Anzahl n der Reaktionszyklen aus (2^n).

Vor Eintritt in den ersten Zyklus liegt noch ein Denaturierungsschritt bei 94°C und nach den Zyklen ein relativ langer DNA-Syntheseschritt bei 72°C, der die Replikation vervollständigen soll.

<u>50µl-PCR-Ansatz:</u>	37 µl	steriles ddH ₂ O
	5 µl	Taq-Polymerase-Puffer (10 x), ohne MgCl ₂
	1 µl (0,4 mM)	dNTP mix
	3 µl (1,5 mM)	MgCl ₂ stock solution: 25 mM MgCl ₂
	1 µl (0,2 µM)	Primer 1 (downstream)
	1 µl (0,2 µM)	Primer 2 (upstream)
	1 µl	template DNA (~ 100 ng)
	1 µl (~1U)	Taq-Polymerase

Die PCR bietet zudem die Möglichkeit, entweder an den Rand des PCR-Produktes Restriktionsschnittstellen einzubauen oder DNA gezielt zu mutieren („*site-directed mutagenesis*“). Die Sequenz der Schnittstellen muss dazu lediglich als Überhang an die beiden Primer angefügt werden bzw. Primer konstruiert werden, die die einzufügende Mutation tragen.

5.2.1.3 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)

Unter RT-PCR versteht man die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA mit Hilfe der sog. Reversen Transkriptase und anschließender PCR. In der vorliegenden Arbeit wurde, ausgehend von 1 µg Gesamt-RNA mit Hilfe der sogenannten M-MLV-Reversen

Transkriptase mit einem Oligo-(dT)₁₅ Primer vom 3'-Ende der poly(A)-mRNA her einzelsträngige cDNA synthetisiert

5.2.1.4 Generierung neuer Restriktionsschnittstellen mittels PCR

Wenn für eine Umklonierung von cDNA aus einem Vektor in einen anderen keine geeigneten Restriktionsschnittstellen vorhanden sind, kann man diese durch eine PCR mit entsprechenden Primern einfügen. Diese Methode musste für die Klonierung von *FLT3-WT*, *FLT3-ITD* und *FLT3-TKD* in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo (+) angewendet werden.

Die mit den DNA-Strängen komplementären Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass sie die jeweiligen Sequenzen der Restriktionsschnittstellen sowie zusätzliche Nucleotide zum besseren Schneiden der Restriktionsenzyme am 5'-Ende enthalten. In alle Sense-Primer wurde eine Kozak-Sequenz eingefügt, die der Erhöhung der Proteinexpression dienen soll.

Die folgenden Restriktionsschnittstellen wurden generiert: *NotI* und *PstI*.

Komponenten der PCR-Reaktion:

Plasmid (ca. 100 ng)

Primer (10 pmol/ml)

Primer (10 pmol/ml)

dNTPs (0,4 mM)

10 x Herculase-Puffer

Herculase (1U)

(Es ist unbedingt darauf zu achten, das Enzym zuletzt der Reaktion zuzusetzen, da seine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität ohne dNTP-Moleküle Matrize und Primer abbaut.)

Standardbedingungen für die Amplifikation:

94°C, 2 min

94°C, 30 s

20 – 35 x 55°C, 30 s

72°C, 1 min/1 kb DNA

72°C, 10 min

Im Anschluss an die PCR erfolgte ein Restriktionsverdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen.

5.2.1.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind spezifische Endonukleasen, die an spezifischen, meist palindromartigen Sequenzen doppelsträngige DNA spalten, indem sie in jedem Strang eine Phosphodiester-Bindung lösen¹⁶⁵. Sogenannte „*blunt ends*“ (=stumpfe Enden) entstehen, wenn die Schnittstellen auf dem DNA-Doppelstrang genau einander gegenüber liegen. Sind die Schnittstellen auf den DNA-Strängen gegeneinander versetzt, so entstehen überhängende „*sticky ends*“, die zueinander komplementär sind.

Restriktionsenzyme haben natürlicherweise die Funktion, zellfremde DNA, z.B. von Phagen, zu zerstören, wobei die zelleigene DNA an den Erkennungsstellen der Enzyme methyliert und somit vor der Endonukleaseaktivität der Enzyme geschützt ist.

Wichtig bei einem Restriktionsverdau im Labor sind die korrekt eingestellten Pufferbedingungen, da die Enzyme anderenfalls entweder komplett oder teilweise inaktiviert werden könnten.

Ablauf eines Restriktionsverdaus

20 µl Restriktionsansatz:

2-3 µl (~1µg)	DNA
2 µl	10 x Puffer für Restriktionsenzym
2 µl	Restriktionsenzym (10 U/µl)
ad 20 µl Endvolumen	steriles ddH ₂ O

Dieser Ansatz wird für einige Stunden bis zu einer Nacht bei 37°C inkubiert. Wenn keine anderen Angaben vom Hersteller vorliegen, wird die enzymatische Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 10 min gestoppt. Zur Kontrolle, ob der Restriktionsverdau erfolgreich verlaufen ist, wird anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die PCR-Produkte und der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo (+), der PCR-BluntII-TOPO-Vektor, MIY-D835Y-GFP und der lentivirale Vektor pWPI bei 37°C mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut.

5.2.1.6 Dephosphorylierung

Wenn nur ein einziges Restriktionsenzym verwendet wird, kann es bei der Ligation vom Insert in den Klonierungsvektor zu einer Rezirkularisierung des Vektors kommen. Bei der Dephosphorylierung wird eine alkalische Phosphatase eingesetzt, die die freien 5'-Phosphatgruppen der linearen DNA abbaut. Die Ligation ist dadurch nur noch zwischen den freien 5'-Phosphat-Enden der Fremd-DNA und den 3'-OH-Enden des Vektors möglich. Die Dephosphorylierung kann direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau im Restriktionsansatz durchgeführt werden.

Da bei der Klonierung von *FLT3-WT*, *FLT3-ITD* und *FLT3-TKD* in den retroviralen Vektor pWPI nur das Enzym *PmeI* verwendet wurde, erfolgte eine Dephosphorylierung des Vektors.

5.2.1.7 DNA-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese macht man sich die Tatsache zunutze, dass Moleküle die eine Nettoladung besitzen, in einem elektrischen Feld wandern. Nukleinsäuren tragen eine negative Nettoladung, also wandern sie nach Anlegen einer Spannung stets in Richtung Anode.

Zur Auftrennung von Nukleinsäure-Strängen nach ihrem Molekulargewicht, werden diese in die Taschen eines Agarosegels aufgetragen. Je höher die Agaroskonzentration ist, desto dichter ist das Maschenwerk des Gels. Nach Anlegen einer Spannung (80 V) laufen längere Nukleinsäurefragmente langsamer als kürzere Fragmente.

Um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen wird 0,01 % Ethidiumbromid in die noch flüssige Agarose gegeben. Ethidiumbromid ist in der Lage in Nukleinsäuren zu interkalieren und es fluoresziert rosafarben bei Anregung mit UV-Licht

Herstellung eines 1 %igen Agarosegels

Zu 40 ml 1 x TAE werden 400 mg Agarose gegeben und die Mischung in einer Mikrowelle aufgekocht. Während des nun folgenden Abkühlens beginnt die Agarose auszupolymerisieren. Sobald die Agarose auf ca. 55°C abgekühlt ist, werden 4 µl Ethidiumbromid zugegeben und die Mischung in einen mit einem Kamm versehenen Gelschlitten gegossen. Blasenbildung sollte dabei vermieden werden. Nach ca. 20 min bei RT ist das Gel vollständig auspolymerisiert.

Durchführung der Gelelektrophorese

Zunächst wird der Gelschlitten in einer Gelkammer plaziert, die 1 x TAE-Puffer enthält. Vor dem Auftragen der zu untersuchenden DNA muss diese nun noch mit Probenpuffer versetzt werden. Dieser hat zum einen die Funktion, anzuzeigen wie weit die DNA im Gel bereits gelaufen ist, denn das dunkelblaue Bromphenolblau bildet die unterste Lauffront, wohingegen das hellblaue Xylencyanol die oberste langsamere Lauffront darstellt, zum anderen erleichtert das Glycerin im Probenpuffer das Beladen des Gels erheblich, da es durch sein Gewicht die

Probe in die Geltasche absinken lässt. Zusätzlich muss in jedem Gel eine Tasche mit einem Marker beladen werden. Mit dessen Hilfe ist man überhaupt erst in der Lage, die Größe bzw. das Molekulargewicht der aufgetragenen Proben zu bestimmen. Anschließend folgt die Gelelektrophorese bei 80 V für ca. 60 min.

5.2.1.8 Isolation und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Nukleinsäuren können nach einer elektrophoretischen Auftrennung aus niedrigschmelzenden Agarosegelen extrahiert werden. Hierzu wird die DNA von Interesse zunächst auf ein 0,8-1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach dem Gellauf werden die Banden von Interesse unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend kann die DNA mit Hilfe des QIAEX[®] Gel Extraction Kits von QIAGEN nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und aus dem Agarosestück isoliert werden. Dabei wird die ausgeschnittene Agarose durch eine zehnmünütige Inkubation bei 50°C verflüssigt und die DNA an die QIAEX II Kieselgelpartikel adsorbiert. Nach zweimaligem Waschen kann die DNA schließlich in 10 mM Tris-Cl (pH 8,5) eluiert werden.

5.2.1.9 Ligation von Nukleinsäuren

Ligasen katalysieren die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 3'-OH- und einer benachbarten unverknüpften 5'-Phosphatgruppe. Um Fremd-DNA in ein Plasmid zu inserieren, müssen beide Moleküle zunächst mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten werden. Dadurch entstehen je nach gewähltem Enzym glatte Enden (blunt ends, z.B. *EcoRV*), 5'-Überhänge (sticky ends, z.B. *EcoRI*) oder 3'-Überhänge (sticky ends, z.B. *SacII*). Diese können von der DNA-Ligase in einer ATP-abhängigen Reaktion kovalent miteinander verknüpft werden.

In der Praxis verwendet man meist die T4-DNA-Ligase aus dem gleichnamigen Bakteriophagen. Diese kann sowohl glatte Enden als auch kohäsive Enden miteinander ligieren. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 16°C oder mit Hilfe des Rapid Ligation Kits von Roche in nur 10 min. Dabei werden Vektor und Insert, beide geschnitten, in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt und mit den weiteren Reaktionskomponenten versetzt. Zudem setzt man neben den präparativen Ligationen zwei Kontrollen an: Eine Religationskontrolle, um festzustellen, ob der Vektor ohne das Insert mit sich selbst ligiert und eine Restriktionskontrolle, um zu überprüfen, ob der Vektor effizient geschnitten wurde. Anschließend kann der Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert werden.

5.2.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in hitzekompetente Bakterien

Unter Transformation versteht man die Aufnahme „nackter“ DNA aus der Umgebung durch kompetente Bakterienzellen. Allerdings nehmen die meisten Bakterien unter normalen Bedingungen DNA nur in begrenztem Umfang auf.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden chemisch kompetente Zellen der Firma Invitrogen, verwendet: *E. coli* DH5 α Zellen bzw. die speziell für Vektoren mit retroviralen Sequenzen geeigneten MAX EFFICIENCY STBL 2 Zellen. Diese weisen eine hohe Transformationseffizienz auf und sind ampicillinsensitiv.

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 1-2 μ l des Ligationsansatzes versetzt und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend setzt man die Bakterien 40 s einem Hitzeschock von 42°C aus, so dass die DNA von den Zellen aufgenommen werden kann. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis werden die Bakterien in 250 μ l S.O.C.-Medium aufgenommen und für 60 min bei 37°C und 350 rpm inkubiert. Danach plattiert man 100 und 150 μ l des Ansatzes auf LB-Selektionsplatten aus und inkubiert die Platten über Nacht bei 37°C.

5.2.1.11 Plasmid-DNA-Amplifikation in einer LB-Flüssigkultur

Um Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien zu analysieren bzw. isolieren muß sie zunächst amplifiziert werden. Hierfür pickt man mit einer autoklavierten Pipettenspitze den entsprechenden Klon von der LB-Agar-Platte und gibt diese in ein mit LB-Medium und einem entsprechenden Antibiotikum gefüllten Röhrchen. Das eingesetzte Volumen hängt dabei von der anschließenden Verwendung der DNA bzw. der benötigten Menge an DNA

ab. Die unverschlossenen Gefäße werden über Nacht auf dem Schüttler (ca. 200 rpm) bei 37°C inkubiert. Prinzipiell sollten die Bakterien nach 12-16 h geerntet werden, da sie sich nach dieser Zeit am Ende ihrer logarithmischen bzw. am Anfang ihrer stationären Wachstumsphase befinden. Längeres Wachstum sollte vermieden werden da die Bakterien nach 16-18 h beginnen zu lysieren und sich die DNA-Ausbeute verringern könnte.

5.2.1.12 Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien

Das Prinzip von DNA-Präparationen beruht auf der Kombination einer alkalischen Lyse und einer Silikamembran, die sehr selektive und reversible Nukleinsäure-Bindungseigenschaften besitzt.

Zunächst werden die Bakterien aus der LB-Flüssigkultur durch zehninütiges zentrifugieren pelletiert. Das Pellet wird in einem RNase-haltigen Resuspensionspuffer resuspendiert. Dieser Abbau der RNA stellt sicher, dass tatsächlich nur Plasmid-DNA an die Silikamembran bindet.

Nun folgt die Lyse der Bakterien mit Hilfe eines NaOH und SDS (Natriumdodecylsulfat) enthaltenden Lysispuffers. Das SDS löst die Phospholipid- und Proteinbestandteile der Zell-membran, während das NaOH Proteine, chromosomale und Plasmid-DNA denaturiert. Dies ist daher auch ein sehr zeitkritischer Schritt, der 5 min nicht überschreiten sollte. Bei einer optimalen Lysisdauer wird die maximale Menge an Plasmid-DNA freigesetzt ohne die Freisetzung chromosomaler DNA und ohne die Plasmid-DNA allzu lange den denaturierenden Bedingungen auszusetzen.

Der Neutralisierungspuffer, der die Lysisreaktion abstoppt, enthält KAc (pH 5,5), was zum einen dazu führt, dass das SDS ausfällt und die denaturierten Proteine, die chromosomale DNA und die weiteren Zelltrümmer in Salz-Detergenz-Komplexen gebunden werden, zum anderen befähigt es die Plasmid-DNA, an die Silikamembran zu binden. Die Plasmid-DNA ist aufgrund der geringeren Größe im Vergleich zur chromosomalen DNA in der Lage, vollständig zu renaturieren und in Lösung zu gehen. Nach Zentrifugation verbleibt sie daher im Überstand. Dieses klare (da frei von Proteinen) Lysat wird auf eine Säule geladen. Die hohen Salzkonzentrationen und pH-Bedingungen des Lysates sorgen nun dafür, dass lediglich Plasmid-DNA an die Silikamembran bindet. Es folgt ein Waschschritt bei dem mit Hilfe eines Waschpuffers Nukleinsäure-bindende Proteine, Salze und RNA-Spuren entfernt werden. Abschließend wird die DNA mit einem geeigneten Volumen an autoklaviertem ddH₂O oder Elutionspuffer eluiert. Gelagert werden kann die in Wasser

gelöste DNA bei -20°C . Zur Isolierung von hochreiner DNA mit Hilfe von Säulen stehen, je nach erwünschter Ausbeute an DNA, verschiedene Kit-Systeme zur Verfügung (5.1.11).

5.2.1.13 Kolonie-PCR

Die Kolonie PCR ermöglicht die schnelle Überprüfung einer Bakterienkolonie auf das gewünschte Plasmid. Anstatt isolierte DNA als Template zu verwenden, dient die Bakterienkolonie in diesem Fall selbst als Ausgangsmaterial. Sie wird mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und für ca. 2 s mit dem PCR-Ansatz inkubiert. Für die Kolonie-PCR werden dieselben Primer verwendet, die zu Beginn der Klonierung die Amplifikation des Inserts ermöglicht haben. Kommt ein Produkt zu Stande, so ist das Insert vorhanden. Da bei dieser Methode nur die Länge des Amplifikats und nicht dessen Qualität von Bedeutung ist, wird die *Taq*-Polymerase verwendet, da diese eine sehr hohe Polymerisationsgeschwindigkeit aufweist. Ansonsten entspricht die PCR den unter 5.2.1.2 genannten Bedingungen.

5.2.1.14 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Die Absorptionsmaxima von Nucleinsäuren bzw. Proteinen in wässriger Lösung liegen bei Wellenlängen von 260 nm bzw. 280 nm. Man kann deshalb durch Absorptionsmessungen in diesen Wellenlängenbereichen Rückschlüsse auf Konzentration und Reinheit einer Nucleinsäurelösung ziehen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von einem Zentimeter ist die optische Dichte gleich eins, wenn doppelsträngige DNA eine Konzentration von 47 $\mu\text{g/ml}$ bzw. einzelsträngige RNA eine Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ aufweist. Das Verhältnis der Extinktionen (Ratio) ist ein Maß für die Reinheit der Nucleinsäuren. Dabei gilt, dass mit zunehmender Größe des Quotienten aus spezifischem Signal (ΔE^{260}) zu unspezifischem Signal (ΔE^{280}) die Reinheit und Hochwertigkeit der Nucleinsäureprobe zunehmen. Ideal sind Werte zwischen 1,7 und 2,0, bei niedrigeren Quotienten liegen Verunreinigungen vor.

Die Konzentrationsbestimmung aller verwendeten Plasmide und aus Zellen isolierten Gesamt-RNA erfolgte nach dieser Methode.

5.2.1.15 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Auch bei der Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen macht man sich die selektiven Bindungseigenschaften einer Silikamembran zur nutze, die überwiegend RNA und nicht DNA bindet. Zusätzlich wird vorher das Zelllysate homogenisiert um die genomische DNA zu scheren. Zur RNA-Isolation stehen ebenfalls Kit-Systeme zur Verfügung (siehe 5.1.11).

5.2.1.16 *in vitro* Transkription (IVT) von mRNA

Bei einer *in vitro* Transkription wird doppelsträngige Plasmid-DNA durch Einsatz einer RNA-Polymerase in RNA umgeschrieben. Die Initiation bzw. Effektivität der Translation dieser mRNA wird entscheidend beeinflusst von der Anwesenheit einer Cap-Struktur aus 7-Methylguanylat am 5'-Ende der mRNA und von einer Folge von Adenosinresten (A), dem sogenannten Poly(A)-Schwanz, am 3'-Ende. Vor der Durchführung der IVT wird das Plasmid mit dem zu transkribierenden Konstrukt am 3'-Ende des Poly(A)-Schwanzes zunächst linearisiert um bei der IVT RNA-Stücke definierter Länge zu erhalten und um auszuschließen, dass die RNA Vektorsequenzen enthält. Besonders wichtig ist, dass die zu transkribierende DNA RNase frei und sauber ist, um eine hohe Ausbeute zu gewährleisten.

Die Synthese der in dieser Arbeit verwendeten mRNAs von FLT3-WT, FLT3-ITD und FLT3-TKD wurde nach der Klonierung der jeweiligen cDNA in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 ZEO (+) von der Firma Curevac (Tübingen) übernommen.

5.2.1.17 Isolierung von humanen TCR-Genen

Die Gesamt-RNA wurde aus Zellen des CTL Klons KW63 mit Hilfe des RNeasy miniKit (*Qiagen*, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die mRNA wurde weiterhin nach dem Protokoll des GeneRacer™ Kit (*Invitrogen*) behandelt.

Dephosphorylierung der RNA:

RNA (1µg)	7 µl
10x CIP Puffer	1 µl
RNase Out (40 U/µl)	1 µl
CIP (10 U/µl)	1 µl
V _{Gesamt}	10 µl

Inkubation für 1 h bei 50°C.

Entfernung der CAP-Struktur:

Mit Hilfe der Tabaksäure-Pyrophosphatase (TAP) wird die CAP-Struktur der mRNA entfernt.

dephosphorylierte RNA (1µg)	7 µl
10x TAP Puffer	1 µl
RNase Out (40 U/µl)	1 µl
TAP (0,5 U/µl)	1 µl
V _{Gesamt}	10 µl

Inkubation für 1 h bei 37°C.

Ligation des RNA Primer an die vorbehandelte mRNA:

An die vorbehandelte RNA wird nun ein RNA Primer ligiert, der in der später gebildeten cDNA als Bindestelle für Primer dienen kann.

dephosphorylierte, decappierte RNA	7 µl
10x Ligase Puffer	1 µl
RNase Out (40 U/µl)	1 µl
T4 RNA Ligase (5 U/µl)	1 µl
V _{Gesamt}	10 µl

Inkubation für 1 h bei 37°C.

Reverse Transkription der mRNA in cDNA:

ligierte RNA	10 µl
GeneRacer TM Oligo-dT Primer	1 µl
dNTP Mix (10mM)	1 µl
5x First Strand Puffer	4 µl
0.1 M DTT	1 µl
RNase Out (40 U/µl)	1 µl
SuperScript TM III RT (200 U/µl)	1 µl
V _{Gesamt}	20 µl

Inkubation für 1 h bei 50°C. Die reverse Transkription wurde für 15 min bei 70°C gestoppt. Anschließend wurde dem Reaktionsmix 1 µl RNase H (2 U/µl) zugegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert.

Amplifizierung des 5'-Endes der TCR-spezifischen cDNA (5'-RACE-PCR):

Mit der gewonnenen cDNA wurde eine 5'-RACE-PCR durchgeführt. Als genspezifische Primer wurde der Primer C α RACE für die Amplifikation der Alpha-Kette bzw. der Primer C β RACE für die Amplifikation der Beta-Kette verwendet.

PCR Schema

cDNA	2 µl
GeneRacer TM 5' Primer	3 µl
C α RACE bzw. C β RACE	1 µl
dNTP Mix (10mM)	1 µl
10x FastStart PCR Puffer + MgCl ₂	5 µl
FastStart Polymerase (5 U/µl)	1 µl
V _{Gesamt}	50 µl

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholungen</i>
94°C	2 min	1
94°C	30 s	5
72°C	1 min	
94°C	30 s	5
70°C	1 min	
94°C	30 s	20-25
65°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igem Agarosegel/ 1x TAE elektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (*Promega*) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Um genügend DNA für die anschließende Sequenzierung zur Verfügung zu haben, wurde die aufgereinigte DNA in einer zweiten PCR mit "verschachtelten" (nested PCR) Primern erneut amplifiziert.

Nested-PCR Schema:

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
gereinigtes PCR Produkt	2-3 µl
GeneRacer TM 5'-nested Primer	2 µl
CαRACE-2 bzw. CβRACE-2	2 µl
dNTP Mix (10mM)	1,5 µl
10x FastStart PCR Puffer + MgCl ₂	5 µl
FastStart Polymerase (5 U/µl)	1 µl
V _{Gesamt}	50 µl

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholungen</i>
94°C	2 min	1
94°C	30 s	33
65°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1

Wiederum wurden die entsprechenden Banden gelelektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (*Promega*) gereinigt. Die amplifizierte DNA der beiden Ketten wurde mit den Primern C α RACE-2 bzw. C β RACE-2 zur Sequenzanalyse gegeben (*MWG Biotech GmbH*, Ebersberg).

Aus den erhaltenen Sequenzdaten wurden genspezifische Primer für das 5'-Ende der jeweiligen Kette bestimmt (TRAV-KW63).

Amplifikation der Alpha- bzw. Beta-Kette:

cDNA	2 μ l
TRAV-KW63 Primer (10 μ M) oder TRBV-KW63	4 μ l
revTRACeco oder revTRBC2eco	4 μ l
dNTP Mix (10mM)	2 μ l
10x Pwo Puffer + MgCl ₂	5 μ l
100x BSA	0,5 μ l
Pwo Polymerase	1 μ l
V _{Gesamt}	50 μ l

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholungen</i>
93°C	2 min	1
93°C	30 s	33
60°C	40 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 % Agarosegel/ 1x TAE elektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (*Promega*) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Klonierung des TCR in einen retroviralen Vektor:

Die in 1.3 amplifizierten Ketten enthalten eine *Not I*- Schnittstelle am 5'-Ende und eine *Eco RI*-Schnittstelle am 3'-Ende. Die PCR Produkte wurden nach Aufreinigung mit den Restriktionsenzymen *Not I* (*Fermentas*) und *Eco RI* (*Fermentas*) geschnitten und in den ebenfalls mit *Not I* und *Eco RI* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pMP71-PRE

mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (*Roche*) ligiert. Alle Einzelschritte erfolgten nach Herstellerangaben.

5.2.1.18 Murinisierung eines humanen TCR

PCR Schema

<i>PCR</i>	<i>DNA</i>	<i>Fwd Primer</i>	<i>Rev Primer</i>
1	TCR-Alpha	P2A Va fwd	hVa rev
2	murinisierte TCR-alpha-Kette	mCa fwd	rev
3	TCR-Beta	fwd	hVb rev
4	murinisierte TCR-beta-Kette	mCb fwd	P2A rev
5	PCR 1 + PCR 2	P2A Va fwd	rev
6	PCR 3 + PCR 4	fwd	P2A rev
7	PCR 5 + PCR 6	fwd	rev

PCR 1-4

DNA	100 ng
Fwd Primer (10 µM)	3 µl
Rev Primer (10 µM)	3 µl
dNTP Mix (10mM)	3 µl
10x Herkulase Puffer	5 µl
Herkulase Polymerase	1 µl
V _{Gesamt}	50 µl

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholungen</i>
95°C	2 min	1
95°C	30 s	35
65°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	3 min	1

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 % Agarosegel/1x TAE elektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (*Promega*) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

PCR 5-7

In einer ersten Reaktion werden die beiden PCR Produkte aus PCR 1-4 aneinander gebunden (Annealing Reaktion) und anschließend mittels PCR amplifiziert.

DNA	100 ng
dNTP Mix (10mM)	3 μ l
10x Herkulase Puffer	5 μ l
Herkulase Polymerase (5 U/ μ l)	2 μ l
V_{Gesamt}	42 μ l

Inkubation für 5 min bei 100°C und Auskühlen auf Raumtemperatur. Zugabe von folgenden Reagenzien:

Fwd Primer (10 μ M)	3 μ l
Rev Primer (10 μ M)	3 μ l
Herkulase Polymerase (5 U/ μ l)	2 μ l
V_{Gesamt}	50 μ l

<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholungen</i>
95°C	3 min	1
95°C	30 s	35
55-60°C	30 s	
72°C	2 min	
72°C	3 min	1

Gelelektrophoretische Aufreinigung der PCR Produkte, Gelextraktion und Aufreinigung mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (*Promega*).

Die Ligation in den retroviralen Vektor pMP71-PRE erfolgte wie unter 1.4 beschrieben.

5.2.2 Zellkultur

5.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37°C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂ im Brutschrank. Die adhärenenten Zelllinien wurden in DMEM-Medium gehalten.

Bei einer Konfluenz von etwa 90 % erfolgte die Ablösung der Zellen durch enzymatischen Abbau mittels einer Trypsin / EDTA-Lösung. Dazu wurden die Zellen erst mit sterilem 1x PBS gewaschen und dann 5-20 min mit 3-5 ml 1x Trypsin/ EDTA inkubiert. Dabei musste kontrolliert werden, wann die Zellen abgelöst waren, da bei einer zu langen Inkubation die Zellmembran angedaut wird. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt, dann folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1300 rpm. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in gewünschter Zahl in neuen Kulturflaschen ausgesät.

Die Suspensionszellen, EBV-transformierte B-Zellen, T2-Zellen und K562-Zellen, wurden in RPMI-Medium kultiviert. Mit A2 transfizierte wurden durch Zusatz von G418 zum Medium selektiert.

Für eine IFN γ -Vorbehandlung wurden dem Medium der jeweiligen Zelllinien zwei Tage vor dem ^{51}Cr -Freisetzungstest, ELISpot oder ELISA 100 U/ml IFN- γ zugesetzt. Bevor die so behandelten Zellen im Test eingesetzt wurden, wurden sie dreimal gewaschen.

5.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Reichert, New York, USA). Dazu wurden 50 μl einer Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit einer 0,5%igen Trypanblaulösung versetzt und im Mikroskop im von der Zählkammer vorgegebenen Raster gezählt. Da Trypanblau nur tote Zellen und Zelltrümmer anfärbt, können diese von intakten, vitalen Zellen unterschieden werden. Die Zellen in den vier vorgegebenen Quadraten wurden ausgezählt und die Zellkonzentration pro Milliliter wurde ermittelt, indem die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert wurde.

5.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden gezählt und abzentrifugiert. Je nach Zelltyp wurden bis zu 1×10^7 Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden sofort in eine stufenweise abkühlende Einfrierbox gestellt und bei -80°C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Aufgetaut wurden Zellen im 37°C Wasserbad. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und vor der Kultivierung einmal mit frischem Kulturmedium gewaschen.

5.2.2.4 Generierung von immortalisierten B-Zelllinien

Durch Infektion mit Epstein-Barr-Viren wurden humane B-Zellen immortalisiert und damit lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) generiert.

Zur EBV-Transformation wurden 1×10^7 PBMC in 2,5 ml RPMI-Medium im Verhältnis 1:1 mit EBV-Überstand für 2 h im 37°C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 5 ml RPMI-Medium mit 1 µg/ml Cyclosporin A, das die Proliferation von T-Zellen verhindert, dazugegeben und die Suspension in 25 cm²-Flaschen überführt. Es folgte eine dreiwöchige Inkubation im Brutschrank. Nach dieser Zeit können erste LCL-typische Zellaggregate in den Kulturflaschen nachgewiesen werden.

5.2.2.5 Retrovirale Transduktion

Im Verlauf einer retroviralen Infektion wird die einsträngige RNA aus dem Retrovirus durch die retrovirale reverse Transkriptase in komplementäre doppelsträngige DNA umgeschrieben und stabil ins Erbgut der Empfängerzelle integriert. Bei der retroviralen Transduktion macht man sich dieses Prinzip zu Nutze: Zunächst wird das zu transduzierende Gen in einen retroviralen Vektor kloniert, der nun wiederum in eine sogenannte Verpackungszelllinie transfiziert wird, die ein Provirus enthält. Dieser kodiert alle für die Produktion der für die Viruspartikel notwendigen Proteine. Von der Verpackungszelllinie werden nun Viren ins Medium freigesetzt, die über das Oberflächenprotein ihrer Hüllmembran mit geeigneten Rezeptoren auf der Oberfläche der Empfängerzellen interagieren und diese so infizieren können. Eine stabile Integration des übertragenen Gens ist dabei nur in proliferierende Zellen möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Jurkat-Zellen bzw. CD8⁺ T-Zellen mit den gegen Her2 gerichteten T-Zellrezeptoren, die aus den CTL-Klonen KU-1 bzw. KW63 isoliert worden waren, infiziert. Beide TCRs lagen jeweils in dem retroviralen Vektor pMP71 vor.

Zunächst erfolgte die Transfektion der Plasmide in eine Verpackungszelllinie. Anschließend wurden die Zielzellen mit den entstandenen Viren infiziert.

5.2.2.5.1 Transfektion von adhärenen Verpackungszellen zur Virusgewinnung

Zur Virusgewinnung wurde die humane embryonale Nierenzelllinie 293T als Verpackungszelllinie verwendet. Diese wurde mit dem Adenovirus E1a transformiert und trägt ein temperatursensitives T-Antigen, das mit Neomycin koselektiert wird. Durch das Einfügen eines Hüllprotein- sowie eines Gag-Pol-Konstrukts entstand die Verpackungszelllinie. Als Transfektionsreagenz wurde LipofectaminTM 2000 Transfektionsreagenz (Invitrogen, Mannheim), ein auf kationischen Liposomen basierendes, Multikomponenten-Transfektionsreagenz, eingesetzt, das mit der DNA Komplexe bildet und diese in die Zelle transportiert.

Zur Vorbereitung auf die Transfektion wurden jeweils etwa 7×10^5 HEK293T-Zellen in 2 ml DMEM über Nacht in Transfektionsplatten ausgesät. Zur Transfektion wurde für jeweils zwei Ansätze ein Gemisch aus 1190 μ l serumfreiem DMEM, 10 μ l Lipofectamin und 6 μ g DNA angesetzt und 20 min bei RT inkubiert. Das Medium auf den HEK293T-Zellen wurde durch 3 ml serumfreies DMEM ersetzt, dann folgte die Zugabe des Transfektionsgemisches. Nach 5-8 h im Brutschrank wurden FCS und Penicillin/Streptomycin zugegeben. Nach 48 h erfolgte die Transduktion, wobei wegen der amphotropen Viren unter S2-Bedingungen gearbeitet wurde.

5.2.2.5.2 Transduktion mit retroviralem Überstand

Die zu transduzierenden CD8⁺-T-Zellen wurden bereits zwei Tage vor der Transduktion in nicht Gewebekultur behandelte Kulturplatten, die mit den in 1xPBS gelösten Antikörpern α -CD3 und α -CD28 inkubiert worden waren, ausgesät. Zur Transduktion wurde der gesammelte Medienüberstand durch einen 0,45 μ m Filter filtriert, um eventuell vorhandene Zellen zu entfernen. Anschließend wurden jeweils 10^6 CD8⁺-T-Zellen mit 1ml des Virusüberstandes versetzt und in den beschichteten Platten 90 min bei 32°C und 2000 rpm zentrifugiert. Nach der Zugabe von Protaminsulfat und Interleukin-2 und -15 wurden die transduzierten Zellen hochgezogen, wobei bis zur 6. Passage noch unter S2-Bedingungen gearbeitet wurde.

Nach etwa zwei Wochen konnten die transduzierten CD8⁺ T-Zellen mittels FACS auf den im retroviralen Vektor enthaltenen TCR geprüft und weiteren Tests unterzogen werden.

5.2.2.6 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Mononukleären Zellen aus peripherem Blut wurden mittels einer Zwei-Phasen-Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque von den dichteren Granulozyten, Erythrozyten und toten Zellen getrennt.

15 ml heparinisiertes Spenderblut wurden hierfür 1:1 mit 1x PBS verdünnt und mit 15 ml Ficoll unterschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 887 x g (15 min, RT), die ungebremst auslief. Die Monozyten befinden sich mit den Lymphozyten in einem Interphasering zwischen den sedimentierten dichteren Zellen und einem Gemisch aus Plasma und PBS. Dieser sogenannte „*buffy coat*“ wurde vorsichtig abgenommen und anschließend mit 1x PBS gewaschen. Zum Entfernen eventuell noch vorhandener Erythrozyten folgte eine zehnminütige Inkubation in 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer. Dann werden die Zellen noch einmal in 1x PBS gewaschen.

5.2.2.7 Differenzierung und Ausreifung von DCs aus Monozyten

Durch ihre Eigenschaft, an eine Plastikoberfläche zu adhären, können Monozyten aus einer PBMC-Präparation von den übrigen mononukleären Zellen getrennt werden¹⁶⁶. Die Differenzierung der Monozyten in unreife dendritische Zellen erfolgt durch Kultivierung mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF. Durch Zugabe weiterer, proinflammatorischer Zytokine reifen die DC aus. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete „Ausreifungscocktail“ wurde von Jonuleit *et al.* entwickelt¹⁶⁷.

PBMC wurden in einer Zelldichte von 1×10^7 /Loch in jeweils 3ml RPMI-Medium in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurden die nicht-adhären Zellen zweimal mit Medium abgespült und zur späteren Gewinnung von CD8⁺-T-Zellen eingefroren. Auf die adhären Zellen wurde wieder RPMI-Medium gegeben. Es folgte eine mindestens zweistündige Inkubation. Nach nochmaligem Abspülen wurde X-VIVO, ein spezielles Lymphozyten-Medium, mit den Zytokinen GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (1000 U/ml) hinzugefügt. In der nun folgenden, einwöchigen Differenzierungsphase wurden die Zellen alle zwei Tage mit 1 ml X-VIVO-Medium plus 1600 U GM-CSF und 1000 U IL-4 gefüttert. Die Differenzierung der Monozyten in unreife DC wurde durch FACS-Messungen auf die typischen Oberflächenmarker und die Abwesenheit des Monozytenmarkers CD14 bestimmt und war auch morphologisch durch ein Lösen von der Plastikoberfläche und ein sich veränderndes Erscheinungsbild mit dendritischen Ausläufern erkennbar. Am 7. Tag wurden die unreifen DC geerntet und in einer Zelldichte von 5×10^5 /Loch mit 4 ml X-VIVO-Medium mit 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 in neue 6-Loch-Platten ausgesät zusammen mit den Reifungszytokine IL-1 β

(10ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-6 (1000 U/ml) und PGE-2 (1 μ g/ml). Nach 2 Tagen Inkubation ist die Ausreifung erfolgt, wie die Expression von Oberflächenmolekülen wie CD80, CD86, HLA-DR und besonders CD83 zeigt.

5.2.2.8 Exogene Peptidbeladung von Zellen

Die MHC Klasse I Komplexe verschiedener Zellen wurden zur Antigenpräsentation mit synthetisch hergestellten Peptiden beladen, indem sie 4 h in 250 μ l AIM V plus 5 μ l β 2-Microglobulin sowie 50 μ l Peptid (2 mg/ml) bei 37°C inkubiert wurden. Dabei wurden die Zellen alle 20 min aufgeschüttelt. Anschließend wurden die DC sofort 3 x gewaschen, um ungebundenes Peptid zu entfernen.

5.2.2.9 Gentransfer in DC mittels mRNA-Elektroporation

Der Transfer von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) in Zellen mittels der Methode der Elektroporation beruht darauf, dass in der Zytoplasmamembran nach einem extrem kurzen Stromstoß Poren erzeugt werden, durch die die Nukleinsäuren durch Diffusion und elektrophoretisch in die Zellen gelangen.¹⁶⁸

Zur Elektroporation werden DCs 24 h nach Beginn der Ausreifung abgeerntet, in PBS gewaschen und nach Zählung pro 5×10^6 in 200 μ l Opti-Mem aufgenommen. Nach Transfer in eine 4 mm Elektroporations-Küvette werden 25 μ g mRNA zugegeben. Die Elektroporation erfolgte nach dem Square Wave Protokoll bei 500 V für 0,5 ms. Unmittelbar anschließend wurden die Zellen in X-VIVO-Medium mit 10 % AB-Serum, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 800 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4 und Reifungszytokinen aufgenommen und zu 1×10^6 Zellen/Loch in einer 6-Loch-Platte verteilt.

Für Zeitkinetiken wurden elektroporierte DC nach unterschiedlich langen Zeiträumen mittels RT-PCR, durchflußzytometrischen Analysen und ⁵¹Cr-Freisetzungstests getestet. Nach diesen Tests wurde der ideale Zeitpunkt für ein T-Zellpriming auf etwa 24 h nach der Elektroporation festgelegt.

5.2.2.10 Isolierung von CD8⁺ T-Zellen

Unmittelbar vor dem Priming von CD8⁺ T-Zellen werden diese aus PBMC durch magnetische Selektion über eine MACS-Säule (Miltenyi) isoliert. Die PBMC wurden

hierfür zunächst gezählt und in MACS-Puffer 10 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pipette komplett entfernt und 40 µl MACS-Puffer und 10 µl Biotin-Antibody Cocktail pro 10^7 Zellen zugegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin Micro Beads pro 10^7 Zellen addiert. Es folgte eine fünfzehnminütige Inkubation auf Eis. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 20 ml MACS-Puffer aufgefüllt und 10 min bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder komplett entfernt und das Pellet dann in 500 µl MACS-Puffer/ 10^8 Zellen aufgenommen. Ein Auffangröhrchen und eine gekühlte MACS-Säule wurden in die MACS-Apparatur eingespannt und die Säule mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Je 500 µl Zellsuspension wurden pro Säule aufgegeben und dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Die ausgewaschenen $CD8^+$ -Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert und in der entsprechenden Menge AIM V-Medium für das Priming aufgenommen.

5.2.2.11 Priming und Restimulation von $CD8^+$ T-Zellen

Die MACS-isolierten $CD8^+$ T-Zellen wurden zu 1×10^5 Zellen pro Loch in 100 µl AIM V-T-Zellmedium aufgenommen und nach Zugabe von 10 ng/ml IL-12 und 1000 U/ml IL-6 in die Löcher einer 96-Loch-Rundbodenplatte ausgesät. In ebenfalls 100µl Volumen Kulturmedium und den Zytokinen werden 5×10^3 Peptid-beladene oder mit mRNA transfizierte DC zu-gegeben. Zur Restimulation nach einer Woche werden 5 ng/ml IL-7 sowie 100 U/ml IL-2 an Stelle der beim Priming eingesetzten Zytokine und die gleiche Menge an DC verwendet.

Sieben Tage nach der zweiten Stimulation wurden die im Ergebnisteil dargestellten Spezifitätsanalysen durchgeführt.

5.2.2.12 Klonierung von T-Zellen

T-Zellpopulationen die in den Spezifitätsanalysen ein positives Reaktivitätsmuster zeigten wurden kloniert, um monoklonale T-Zellpopulationen mit definierter Spezifität zu erhalten. Klonierungen wurden nach dem Prinzip der „*limiting dilution*“ (limitierende Verdünnung) durchgeführt, das darauf beruht das die zu klonierenden Zellen in so großen Volumina an T-Zellmedium aufgenommen werden, dass theoretisch nur noch eine statistische Zell-konzentration von z.B. 1 Zelle pro 200 µl bzw. Loch vorliegt. Es wurden Verdünnungen mit 1, 3, 5 oder 10 Zellen pro Loch eingesetzt. Als sogenannte Feeder-Zellen wurden zusätzlich 5×10^4 allogene, mit 3000 rad bestrahlte PBMC und 1×10^5 mit 10000 rad bestrahlte LCL in jedes Loch pipettiert. Dem Medium wurden 30 ng/ml des

Antikörpers OKT-3 zugegeben, der von den Fc-Rezeptoren der PBMC gebunden wird. Das gebundene OKT-3 ist in der Lage eine unspezifische Proliferation der T-Zellen auszulösen, indem es den mit dem T-Zellrezeptor assoziierten CD3-Komplex aktiviert. Die Proliferation wird weiterhin durch die von den LCL produzierten Zytokine unterstützt. Zusätzlich zu den Feeder-Zellen wurden 50 U/ml IL-2 und 2 ng/ml IL-15 zugegeben. Am 7. Tag erfolgte die erneute Zugabe dieser Zytokine in 100 µl T-Zellmedium nach Abnahme von 100 µl Medium. Die Proliferation potentieller Klone konnte ab dem 11. Tag mikroskopisch überprüft werden. Ab Tag 14 folgte ein Klon-Screening mittels ^{51}Cr -Freisetzungstest oder IFN- γ -ELISpot.

5.2.2.13 Expansion positiv getesteter T-Zellklone

Zur Expansion positiv getesteter Klone wurden jeweils ca. 1×10^5 Zellen des Klons mit $2,5 \times 10^7$ bestrahlten allogenen PBMC und 5×10^6 bestrahlten LCL in 25 ml T-Zellmedium plus 30 ng/ml OKT3 in 50 ml Zellkulturflaschen gegeben. An den Tagen 1, 3, 5, 8 und 11 wurden jeweils 50 U/ml IL-2, 2 ng/ml IL-15 und falls nötig frisches T-Zellmedium zugegeben.

5.2.3 T-Zellspezifitätstests und Analysen

5.2.3.1 ^{51}Cr -Freisetzungstest (Chromium release assay, CRA)

Zur Bestimmung der spezifischen zytotoxischen Aktivität der CD8⁺ T-Zellen diente der ^{51}Cr -Freisetzungstest¹⁶⁹. Dieser Test beruht darauf, dass Zellen die mit radioaktiv markiertem Natriumchromat ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) enthaltendem Medium inkubiert werden, dieses Natriumchromat aktiv aufnehmen. Werden diese Zielzellen nun mit zytotoxischen T-Zellen koinkubiert, welche von den HLA-Molekülen der Zellen präsentiertes Peptid erkennen, kommt es zur Lyse der erkannten Zielzellen und damit zur Freisetzung des Natriumchromat. Die vom ^{51}Cr emittierte γ -Strahlung kann nun in einem γ -Strahlungsmessgerät gemessen und daraus die Lyse bestimmt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ^{51}Cr -Freisetzungstests zur Spezifitätsanalyse der jeweiligen T-Zellklone und zur Bestimmung ihrer Affinität durchgeführt.

5×10^5 der jeweiligen Zielzellen wurden in RPMI gewaschen und trocken dekantiert. Das Pellet wurde in 100 µl warmem FCS resuspendiert, dann wurden 100 µCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ hinzugefügt und das Ganze 90 min bei 37°C inkubiert. Alle 20 min wurde die

Zellsuspension vorsichtig aufgeschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Zielzellen zweimal gewaschen, 1 h mit einem relevanten bzw. irrelevanten Peptid und β_2 -Mikroglobulin bei RT inkubiert und dann noch einmal gewaschen. Für die Peptidtitration zur Bestimmung der Affinität der Klone, wurden die Zielzellen mit verschiedenen Mengen an Peptid gepulst, sonst waren es 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Während der Inkubation der Zielzellen wurden je 50 μl der zu testenden Klone bzw. $1,35 \times 10^5$ expandierte CTL-Klone in 150 μl T-Zell-Medium in eine 96-Loch-V-Bodenplatte pipettiert. Im Fall der expandierten CTL-Klone wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei die Zellen in 5 Schritten jeweils 1:3 verdünnt wurden. Die CTL befanden sich jeweils in 100 μl Medium. Zur Feststellung der spontanen Freisetzung von ^{51}Cr wurden pro Zelllinie 6 Löcher als Mediumkontrollen mit 100 μl Medium vorbereitet. Zur Kontrolle der maximalen Lysierbarkeit wurden 100 μl eines Detergenz (1 % NP40) pipettiert, das zum Platzen aller Zielzellen und damit zur Freisetzung des gesamten aufgenommenen ^{51}Cr führen sollte. Pro Loch wurden nun 1×10^3 Zielzellen in 100 μl Medium eingesetzt. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurden je 30 μl Überstand pro Loch abgenommen und in 96-Luma-Platten pipettiert. Die freigesetzte Aktivität wurde dann im γ -Counter gemessen.

Die Formel für die spezifische Lyse lautet folgendermaßen:

$$\frac{(\text{Probenlyse} - \text{Lyse der Mediumkontrolle})}{(\text{Maximallyse} - \text{Lyse der Mediumkontrolle})} \times 100$$

Der mit 100 multiplizierte Quotient der Maximallyse und der Lyse der Mediumkontrolle ist die Spontanlyse der jeweiligen Zelllinie in Prozent. Bei Spontanlysen von über 20 % wurde das Ergebnis des ^{51}Cr -Freisetzungstests als fragwürdig angesehen.

5.2.3.2 „hot-cold-target“-Assay

Zur Bestätigung der Antigen-spezifität wurden CTL-Klone vor einem ^{51}Cr -Freisetzungstest mit unmarkierten Zielzellen inkubiert. Dazu wurden unmarkierte T2-Zellen („cold target“) mit dem relevanten bzw. einem irrelevanten Peptid beladen und im Verhältnis von 40:1 für 30 min bei 37°C mit den fraglichen Effektorzellen inkubiert. Anschließend wurde mit den CTL ein ^{51}Cr -Freisetzungstest mit radioaktiv markierten Zielzellen („hot target“) durchgeführt. Waren die Klone nicht in der Lage diese Zielzellen zu lysieren, war dies ein Hinweis darauf, dass sich während der Inkubation mit den unmarkierten Zielzellen ihre Aktivität erschöpft hatte. War dies lediglich nach Inkubation mit T2-Zellen der Fall, die

mit dem relevanten Peptid gepulst waren, wurde dies als Zeichen für die Spezifität des jeweiligen Klons gewertet.

5.2.3.3 ELISpot-Zytokinsekretionstest

Bei Zytokinsekretionstests wird die Spezifität von T-Zellen nicht wie oben durch Bestimmung der spezifischen lytischen Aktivität untersucht, sondern durch Analyse ihrer spezifischen Zytokinsekretion bei Kontakt mit verschiedenen Zielzellen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten ELISpot-Verfahren wurden $CD8^+$ T-Zellen spezifisch auf die Produktion von $IFN-\gamma$ bzw. Granzym B (GrzB) hin untersucht. Die Besonderheit des ELISpot ist, z.B. im Vergleich zu einem klassischen ELISA, dass Effektor- und Zielzellen direkt in, mit Primärantikörper beschichteten, 96-Loch Nitrozellulose-Mikrotiterplatten koinkubiert werden. Jede einzelne Zytokin-sezernierende Zelle kann so nach dem Test als Punkt („Spot“) sichtbar gemacht werden, wodurch sich spezifische T-Zellen mit außerordentlich großer Sensitivität nachweisen lassen.

In die Löcher der benötigten Nitrozellulose-Mikrotiterplatten wurden je 50 μ l 1x PBS mit 10 μ g/ml (bei $IFN-\gamma$) bzw. 15 μ g/ml (bei GrzB) Primärantikörper pipettiert und die so behandelten Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten viermal mit 1 x PBS gewaschen um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Es folgte die Zugabe von 150 μ l RPMI-Medium mit 10 % AB-Serum um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach 1 h bei 37°C wurden die T-Zellen in 100 μ l T-Zellmedium pro Loch ausgesät (ca. 1×10^3 Zellen pro Loch) und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 2×10^4 Zielzellen pro Loch in 100 μ l T-Zellmedium addiert und die Platten für 24 (bei $IFN-\gamma$) bzw. 48 (bei GrzB) h bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Platten sechsmal in 1 x PBS + 0,05 % Tween gewaschen und danach auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Dann wurden 2 μ g/ml eines Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpers in 100 μ l PBS + 0,5 % BSA in jedes Loch pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden die Platten wiederum sechsmal mit 1 x PBS + 0,05 % Tween gewaschen. Auf die Platten wurden dann je 100 μ l PBS + 0,5 % FCS + 1 % Streptavidin-Peroxidase gegeben. Durch die Bindung von Streptavidin an das Biotin des $IFN-\gamma$ Sekundärantikörpers erhält dieser eine Peroxidase-Funktion (ALP). Nach einstündiger Inkubation bei RT im Dunkeln wurden die Platten je dreimal mit 0,05 % Tween/1x PBS

und 1x PBS gewaschen. Das Waschen mit PBS ist nötig, da Tween die Peroxidase-Reaktion stören würde. Durch Zugabe von je 100 µl H₂O₂-aktivierter AEC-Lösung erfolgt eine Farbreaktion, die nach 4 min 30 s durch gründliches Spülen unter fließendem Wasser gestoppt wird. Nach dem Trocknen können die Spots mit dem ELISpot-Mikroskop und der zugehörigen Software ausgezählt und ausgewertet werden.

5.2.3.4 Sandwich-ELISA

Beim ELISA wird im Gegensatz zum ELISpot die Zytokinsekretion aus dem Überstand von vorher inkubierten Effektor- und Zielzellen gemessen. Es wurden IFN- γ -ELISA durchgeführt, um die Spezifität expandierter Klone zu bestimmen.

1 x 10⁴ Zielzellen wurden für 24 h bei 37°C mit 2 x 10⁴ CTL in 200 µl T-Zellmedium in 96-Loch-Rundbodenplatten koinkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden 100-150 µl Überstand/Loch abpipettiert und entweder sofort im ELISA eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

Die Löcher der für den ELISA verwendeten 96-Loch-MaxiSorp-Platten wurden zunächst mit dem 1. Antikörper beschichtet. Dazu wurden aus einem Mix aus 11,95 ml Coating-Buffer und 48 µl Capture Antibody pro Platte 100 µl in jedes Loch pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten dekantiert und dreimal mit Waschpuffer (1 x PBS + 0,05 % Tween) gewaschen. Anschließend wurden die Platten auf saugfähigem Papier ausgeklopft, mit je 200 µl Assay Diluent/Loch gefüllt und 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Diese Inkubation diente der Blockierung unspezifischer Bindungen. Inzwischen wurden von den Zytokinstandards je sechs Verdünnungsschritte angesetzt, die bei IFN γ von 1200 pg/ml und bei TNF- α von 500 pg/ml ausgingen. Dann wurden in die wieder dreimal gewaschenen Platten entweder 100 µl Assay Diluent als Blindwert, 100 µl Zytokinstandard oder 100 µl Kulturüberstand pro Loch pipettiert. Es folgten eine zweistündige Inkubation bei RT und fünfmaliges Waschen. Dann wurden 100 µl aus einer Mischung aus 11,95 ml Assay Diluent, 48 µl Detektionsantikörper und 48 µl Avidin-HRP in jedes Loch gegeben. Nach 1 h bei RT wurden die Platten siebenmal gewaschen. Zur Färbung wurden pro Loch 100 µl Substratlösung, die aus einer 1:1 Mischung aus den Reagenzien A und B bestand, eingesetzt. Nach einer etwa zehnminütigen Inkubation im Dunkeln ohne Deckel, wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 N H₂SO₄ gestoppt. Im ELISA-Reader wurden die Intensitäten der Färbungen bei 450 nm und 570 nm gemessen und die jeweiligen Zytokinkonzentrationen bestimmt.

5.2.3.5 Durchflusszytometrische Zellanalysen („FACS-Analyse“)

Die FACS („*fluorescence-activated cell sorting*“)-Analyse bzw. Durchflusszytometrie dient der Analyse von Einzelzellen auf Grund ihrer Fluoreszenzeigenschaften bzw. ihrer Eigenschaft, Licht auf bestimmte Art zu streuen. Dabei wird eine Zellsuspension mit immungefärbten Zellen über eine Stahlkapillare durch Unterdruck in eine Meßküvette geleitet. Diese sog. hydrodynamische Fokussierung stellt sicher, dass die Zellen einen analysierenden Argon- Laserstrahl nacheinander bzw. einzeln passieren. Das hier abgestrahlte oder gestreute Licht wird von Detektoren empfangen, so dass die Größe, Granularität und Fluoreszenz der Zellen quantifiziert und analysiert werden kann. Auf diese Weise können innerhalb kürzester Zeit Tausende von Zellen einer Zellpopulation auf die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle untersucht werden.

Zur FACS-Analyse werden Oberflächenantigene entweder direkt mit an entsprechende Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (direkte Immunfluoreszenz) oder ein erster wird von einem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper gebunden (indirekte Immunfluoreszenz). Bei Verwendung von in verschiedenen Wellenlängen fluoreszierenden Farbstoffen können deshalb je nach Zytometer mehrere verschiedene Oberflächenmarker parallel analysiert werden. Die von den Detektoren erfasste Fluoreszenzintensität der analysierten Zelle korreliert mit der Menge des gebundenen Fluorochroms, daher sind auch Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des zu untersuchenden Antigens möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden direkte und indirekte FACS-Messungen auf verschiedene Oberflächenantigene sowie Multimerfärbungen zur Bestimmung der Spezifität von CD8⁺ T-Zellen durchgeführt.

5.2.3.5.1 Färbung auf Oberflächenmarker

Für die direkte und indirekte FACS-Messung wurden die zu messenden Zellen geerntet, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 5 min. bei 1450 rpm bei 4°C), gezählt und in einer entsprechenden Menge FACS-Puffer aufgenommen. Von jeder Zelllinie wurden je 100 µl Zellsuspension für eine IgG-Kontrolle zur Ermittlung der Autofluoreszenz der Zellen und ein oder mehrere Ansätze für die jeweiligen Antikörper in FACS-Röhrchen überführt. Auf diese 100 µl kamen je 2,5-10 µl des primären bzw. gleich Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen. Die direkt markierten Zelllinien konnten nun

gemessen werden, die Anderen wurden mit 1,5 µl des sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers für weitere 20 min bei 4°C inkubiert und anschließend noch einmal gewaschen. Konnten die gefärbten Zellen nicht sofort gemessen werden, wurden sie in FACS-Puffer plus 1 % Paraformaldehyd fixiert. Sie konnten dann mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

5.2.3.5.2 Durchflusszytometrischer Nachweis von MHC/Peptid Multimerkomplexen

Erst seit wenigen Jahren ist es möglich antigenspezifische T-Zellen auf Grund ihrer Rezeptorspezifität zu identifizieren. Die Affinität zwischen T-Zellrezeptor und MHC/Peptid-Komplex ist nämlich zu gering für eine Markierung von T-Zellen mit ihren spezifischen MHC:Peptid-Komplexen. Dieses Problem wurde durch die Entwicklung multimerer MHC:Peptid-Komplexe zur Erhöhung der Avidität der Wechselwirkung gelöst¹⁷⁰. Die Multimere werden durch die Bindung rekombinanter biotinylierter MHC-Moleküle an ein fluoreszenzmarkiertes Streptavidin, das ein Tetramer mit vier Bindungsstellen für Biotin ist, hergestellt. Eine Weiterentwicklung sind die sogenannten Streptamere, die nach der Messung im Durchflusszytometer durch Zugabe von Biotin monomerisiert werden und so wieder von T-Zellen ablösbar sind, was eine Überstimulation der T-Zellen verhindern soll¹⁷¹.

Zur Tetramerfärbung wurden je 5×10^5 zuvor mit FACS-Puffer gewaschene T-Zellen mit dem relevanten bzw. einem irrelevanten PE-markierten MHC/Peptid-Tetramer im Verhältnis 1:40 in 50 µl FACS-Puffer 45 min in einer 96-Loch-Rundbodenplatte auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde anti-CD8-FITC im Verhältnis 1:100 zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis, wurden die Zellen dreimal in FACS-Puffer gewaschen und dann in 500 µl FACS-Puffer plus 2 µg/ml Propidiumjodid resuspendiert. Die Färbung mit dem rotfluoreszierenden Propidiumjodid dient der Markierung toter Zellen, da es durch deren defekte Zellmembranen eindringen und sich in die DNA der Zellkerne einlagern kann.

5.2.4 Proteinbiologische Methoden

5.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Die als Trennmedium verwendete Gelmatrix

besteht aus einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, Bisacrylamid dient dazu, diese Polymere zu vernetzen. Als Radikalbildner wird APS (Ammoniumperoxodisulfat), als Katalysator TEMED (N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin) eingesetzt. Die Proteinauftrennung findet unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Mercaptoethanol statt. Durch die Bindung von SDS an die hydrophoben Regionen des Proteinmoleküls bilden sich SDS-Proteinkomplexe mit gleichmäßig verteilter negativer Ladung. Da diese die Eigenladung der Proteine überdeckt, steht die Ladung der SDS-Proteinkomplexe in direkter Beziehung zur jeweiligen Proteingröße. Durch die Zugabe von reduzierenden Substanzen wie Thiolverbindungen oder Dithioereitol (DTT) können alle Disulfid-Brücken-Bindungen im Protein gespalten werden. Somit werden Proteine unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Konformation der Größe nach im Spannungsfeld von der Kathode zur Anode hin aufgetrennt. Der Trennbereich eines Polyacrylamidgels wird durch dessen Porengröße bestimmt. Diese kann durch das Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid eingestellt werden. Für die Auftrennung kleinerer Proteine eignen sich niedrigprozentige Gele, für die Auftrennung größerer Proteine höherprozentige. Gradientengele erlauben einen breiteren Trennbereich, so dass große Proteine besser aufgetrennt werden können. Bei den im folgenden beschriebenen Experimenten kam die diskontinuierliche Elektrophorese zur Anwendung, bei der zunächst alle Proteine in einem großporigen Sammelgel auf einer Höhe fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen bzw. kleinporigen Trenngel aufgetrennt werden.

Gelzusammensetzung eines 10 % Acrylamid-Gels:

	Sammelgel	Trenngel
1,5 M Tris, pH 8.8; 0,4 % SDS	-	3 ml
1,5 M Tris, pH 6.8; 0,4 % SDS	1 ml	-
AA/ Bis-AA (30:0.8)	500 µl	4 ml
ddH ₂ O	2,5 ml	5 ml
40 % APS	8 µl	20 µl
TEMED	8 µl	20 µl

5.2.4.2 Übertragung von Proteinen auf eine Membran mit Hilfe des Western Blot/Immunblot Verfahrens

Anschließend wird die Färbelösung abgekippt und kann bis zu fünf Mal wieder verwendet werden.

5.2.4.4 Detektion von Proteinen mit Hilfe der Immunfärbung

Mit Hilfe der Immunfärbung können auf Membranen fixierte Proteine identifiziert und analysiert werden. Zunächst werden unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in 3%iger Magermilch-Blocking-Lösung in PBST (Phosphat-gepufferte Salzlösung) abgesättigt. Anschließend wird die Membran über Nacht bei 4°C mit einem spezifischen Primärantikörper, der in 3 %iger Blocking Lösung verdünnt ist, inkubiert. Die Antikörperlösung wird durch Zugabe von NaN_3 zu einer Endkonzentration von 0,02 % haltbar gemacht und ist so bis zu fünf Mal wieder verwendbar. Am nächsten Tag werden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen in PBST für jeweils 15 min entfernt. Anschließend wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in 3%iger Magermilchlösung inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen für jeweils 15 min mit PBST werden die Proteinbanden mittels der ECL-Reaktion visualisiert. Hierfür wird die Membran für 1 min in einer Mischung gleicher Volumina der Detektionslösungen Peroxidverbindung und Luminol/Enhancer geschwenkt. Der Peroxidase markierte Sekundärantikörper katalysiert die Oxidation von Luminol und löst so eine Chemilumineszenz aus. Das fluoreszierende Produkt emittiert Licht einer Wellenlänge von 428 nm. Dieses wird durch Auflegen eines Röntgenfilms nachgewiesen. Die Intensität der entstehenden Proteinbanden ist proportional zur Menge des detektierten Proteins und kann quantifiziert werden. Die Spezifität der Immunfärbung ist abhängig von der Spezifität der Antikörper sowie deren Verdünnung.

PBST:	1 x PBS-0,05 % Tween-20
3 % Magermilch-Blocking Lösung:	3 % Magermilchpulver in 1 x PBS-0,05 % Tween-20

5.2.4.5 Befreiung membrangebundener Proteine von Antikörpern

Um membrangebundene Proteine mit verschiedenen Antikörpern nachweisen zu können, müssen die zuerst gebundenen Antikörper wieder entfernt werden. Dazu inkubiert man den Blot für 30 min bei RT in Puffer S und anschließend für 30 min bei 37°C. Nach dem

6 Literatur

1. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341:1051-1062.
2. Schoch C, Kern W, Krawitz P, et al. Dependence of age-specific incidence of acute myeloid leukemia on karyotype. *Blood.* 2001;98:3500.
3. Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001:62-86.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976;33:451-458.
5. Mrozek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol.* 1997;24:17-31.
6. Mrozek K, Heinonen K, Lawrence D, et al. Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9; 11)(p22; q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia group B study. *Blood.* 1997;90:4532-4538.
7. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Mod Pathol.* 2000;13:193-207.
8. Schoch C, Haferlach T. Cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep.* 2002;4:390-397.
9. Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood.* 2002;99:310-318.
10. Schessl C, Rawat VP, Cusan M, et al. The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest.* 2005;115:2159-2168.
11. Grisolano JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG, Ley TJ. Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood.* 1997;89:376-387.
12. He C, Alexander JJ, Lim A, Quigg RJ. Production of the rat complement regulator, Crry, as an active soluble protein in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys.* 1997;341:347-352.
13. Dash A, Gilliland DG. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001;14:49-64.
14. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002;100:1532-1542.
15. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 1990;61:203-212.
16. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* 2000;19:5548-5557.
17. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001;411:355-365.
18. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* 1988;241:42-52.
19. Shewchuk LM, Hassell AM, Ellis B, et al. Structure of the Tie2 RTK domain: self-inhibition by the nucleotide binding loop, activation loop, and C-terminal tail. *Structure.* 2000;8:1105-1113.

20. Gupta R, Knight CL, Bain BJ. Receptor tyrosine kinase mutations in myeloid neoplasms. *Br J Haematol.* 2002;117:489-508.
21. Robertson SC, Tynan J, Donoghue DJ. RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet.* 2000;16:368.
22. Reilly JT. FLT3 and its role in the pathogenesis of acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma.* 2003;44:1-7.
23. Huse M, Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.* 2002;109:275-282.
24. Spiekermann K, Hiddemann W, Schnittger S. [Mutations of the gene coding for the receptor tyrosine kinase FLT3 in acute myeloid leukemia. Significance as the disease-specific molecular marker for diagnosis, prognosis and innovative therapy approaches]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2005;130:1020-1025.
25. Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell.* 1995;80:213-223.
26. Lemmon MA, Schlessinger J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci.* 1994;19:459-463.
27. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000;103:211-225.
28. Polo S, Pece S, Di Fiore PP. Endocytosis and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16:156-161.
29. Turner AM, Lin NL, Issarachai S, Lyman SD, Broudy VC. FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood.* 1996;88:3383-3390.
30. Mayer BJ, Baltimore D. Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol.* 1993;3:8-13.
31. Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature.* 1995;373:573-580.
32. Kavanaugh WM, Turck CW, Williams LT. PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science.* 1995;268:1177-1179.
33. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell.* 1993;72:767-778.
34. Margolis B, Borg JP, Straight S, Meyer D. The function of PTB domain proteins. *Kidney Int.* 1999;56:1230-1237.
35. Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell.* 1995;80:237-248.
36. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell.* 1991;65:1143-1152.
37. Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O, Birnbaum D. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene.* 1991;6:1641-1650.
38. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood.* 1993;82:1110-1119.
39. Small D, Levenstein M, Kim E, et al. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:459-463.
40. Gilliland DG, Griffin JD. Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol.* 2002;9:274-281.
41. Lyman SD, James L, Vanden Bos T, et al. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell.* 1993;75:1157-1167.

42. Maroc N, Rottapel R, Rosnet O, et al. Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1993;8:909-918.
43. Spiekermann K, Hiddemann W. [Molecular target structures in oncology]. *Internist (Berl)*. 2005;46:847-848, 850-844, 856-860.
44. Agnes F, Shamoon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene*. 1994;145:283-288.
45. Rosnet O, Buhning HJ, deLapeyriere O, et al. Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Acta Haematol*. 1996;95:218-223.
46. Griffith J, Black J, Faerman C, et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*. 2004;13:169-178.
47. Reilly JT. Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *Br J Haematol*. 2002;116:744-757.
48. Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, et al. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood*. 1996;87:1089-1096.
49. Ray RJ, Paige CJ, Furlonger C, Lyman SD, Rottapel R. Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7. *Eur J Immunol*. 1996;26:1504-1510.
50. Veiby OP, Jacobsen FW, Cui L, Lyman SD, Jacobsen SE. The flt3 ligand promotes the survival of primitive hemopoietic progenitor cells with myeloid as well as B lymphoid potential. Suppression of apoptosis and counteraction by TNF-alpha and TGF-beta. *J Immunol*. 1996;157:2953-2960.
51. Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, et al. Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood*. 1995;86:1661-1670.
52. Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM. Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood*. 1996;87:3563-3570.
53. Rusten LS, Lyman SD, Veiby OP, Jacobsen SE. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood*. 1996;87:1317-1325.
54. Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:650-665.
55. Meierhoff G, Dehmel U, Gruss HJ, et al. Expression of FLT3 receptor and FLT3-ligand in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia*. 1995;9:1368-1372.
56. Zheng R, Klang K, Gorin NC, Small D. Lack of KIT or FMS internal tandem duplications but co-expression with ligands in AML. *Leuk Res*. 2004;28:121-126.
57. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10:1911-1918.
58. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*. 2002;100:59-66.
59. Horiike S, Yokota S, Nakao M, et al. Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia*. 1997;11:1442-1446.

60. Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*. 1998;12:1333-1337.
61. Vempati S, Reindl C, Kaza SK, et al. Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential. *Blood*. 2007;110:686-694.
62. Fenaux P. Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol*. 2001;73:429-437.
63. Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*. 1997;11:1605-1609.
64. Xu F, Taki T, Yang HW, et al. Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Br J Haematol*. 1999;105:155-162.
65. Xu F, Taki T, Eguchi M, et al. Tandem duplication of the FLT3 gene is infrequent in infant acute leukemia. Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia*. 2000;14:945-947.
66. Brown P, Small D. FLT3 inhibitors: a paradigm for the development of targeted therapeutics for paediatric cancer. *Eur J Cancer*. 2004;40:707-721, discussion 722-704.
67. Ishii E, Zaitzu M, Ihara K, Hara T, Miyazaki S. High expression but no internal tandem duplication of FLT3 in normal hematopoietic cells. *Pediatr Hematol Oncol*. 1999;16:437-441.
68. Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*. 2002;21:2555-2563.
69. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. *Br J Haematol*. 2001;113:1076-1077.
70. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*. 2000;19:624-631.
71. Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood*. 2000;96:3907-3914.
72. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001;97:2434-2439.
73. Tse KF, Mukherjee G, Small D. Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia*. 2000;14:1766-1776.
74. Spiekermann K, Pau M, Schwab R, Schmieja K, Franzrahe S, Hiddemann W. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol*. 2002;30:262-271.
75. Spiekermann K, Bagrintseva K, Schwab R, Schmieja K, Hiddemann W. Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2140-2150.

76. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999;93:3074-3080.
77. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol*. 2000;111:190-195.
78. Rombouts WJ, Blokland I, Lowenberg B, Ploemacher RE. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. *Leukemia*. 2000;14:675-683.
79. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001;98:1752-1759.
80. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97:89-94.
81. Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99:4326-4335.
82. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res*. 2001;61:7233-7239.
83. Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J. FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*. 2005;105:4792-4799.
84. Lee BH, Williams IR, Anastasiadou E, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations induce myeloproliferative or lymphoid disease in a transgenic mouse model. *Oncogene*. 2005;24:7882-7892.
85. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, et al. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8283-8288.
86. Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002;100:3423-3425.
87. Jiang J, Paez JG, Lee JC, et al. Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. *Blood*. 2004;104:1855-1858.
88. Griffin JD. Point mutations in the FLT3 gene in AML. *Blood*. 2001;97:2193A-2193.
89. Fenski R, Flesch K, Serve S, et al. Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *Br J Haematol*. 2000;108:322-330.
90. Spiekermann K, Biethahn S, Wilde S, Hiddemann W, Alves F. Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia. *Eur J Haematol*. 2001;67:63-71.
91. Moreno I, Martin G, Bolufer P, et al. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2003;88:19-24.

92. Frohling S, Schlenk RF, Breitruck J, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*. 2002;100:4372-4380.
93. Smith BD, Levis M, Beran M, et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103:3669-3676.
94. Kelly LM, Yu JC, Boulton CL, et al. CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell*. 2002;1:421-432.
95. O'Farrell AM, Foran JM, Fiedler W, et al. An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5465-5476.
96. Yee KW, O'Farrell AM, Smolich BD, et al. SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood*. 2002;100:2941-2949.
97. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell*. 2002;1:433-443.
98. Cools J, Mentens N, Furet P, et al. Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia. *Cancer Res*. 2004;64:6385-6389.
99. Fiedler W, Serve H, Dohner H, et al. A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood*. 2005;105:986-993.
100. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105:54-60.
101. Tallmann MS. Curative therapeutic approaches to APL. *Ann Hematol*. 2004;83 Suppl 1:S81-82.
102. Levis M, Pham R, Smith BD, Small D. In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood*. 2004;104:1145-1150.
103. Graf C, Heidel F, Tenzer S, et al. A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells. *Blood*. 2007;109:2985-2988.
104. Schmidt-Arras DE, Bohmer A, Markova B, Choudhary C, Serve H, Bohmer FD. Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*. 2005;25:3690-3703.
105. Scheich F, Duyster J, Peschel C, Bernhard H. The immunogenicity of Bcr-Abl expressing dendritic cells is dependent on the Bcr-Abl kinase activity and dominated by Bcr-Abl regulated antigens. *Blood*. 2007;110:2556-2560.
106. Greiner J, Bullinger L, Guinn BA, Dohner H, Schmitt M. Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14:7161-7166.
107. Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*. 1997;6:199-208.

108. Kessler JH, Beekman NJ, Bres-Vloemans SA, 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.* 2001;193:73-88.
109. Greiner J, Schmitt M, Li L, et al. Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood.* 2006;108:4109-4117.
110. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, et al. mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int J Cancer.* 2004;108:704-711.
111. Bergmann L, Miething C, Maurer U, et al. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood.* 1997;90:1217-1225.
112. 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.* 2000;95:286-293.
113. Maurer U, Weidmann E, Karakas T, Hoelzer D, Bergmann L. Wilms tumor gene (wt1) mRNA is equally expressed in blast cells from acute myeloid leukemia and normal CD34+ progenitors. *Blood.* 1997;90:4230-4232.
114. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:13885-13890.
115. Dengler R, Munstermann U, al-Batran S, et al. Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells. *Br J Haematol.* 1995;89:250-257.
116. Rao NV, Wehner NG, Marshall BC, Gray WR, Gray BH, Hoidal JR. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *J Biol Chem.* 1991;266:9540-9548.
117. Rao NV, Wehner NG, Marshall BC, et al. Proteinase-3 (PR-3): a polymorphonuclear leukocyte serine proteinase. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;624:60-68.
118. Witko-Sarsat V, Canteloup S, Durant S, et al. Cleavage of p21waf1 by proteinase-3, a myeloid-specific serine protease, potentiates cell proliferation. *J Biol Chem.* 2002;277:47338-47347.
119. Pederzoli M, Kantari C, Gausson V, Moriceau S, Witko-Sarsat V. Proteinase-3 induces procaspase-3 activation in the absence of apoptosis: potential role of this compartmentalized activation of membrane-associated procaspase-3 in neutrophils. *J Immunol.* 2005;174:6381-6390.
120. Bories D, Raynal MC, Solomon DH, Darzynkiewicz Z, Cayre YE. Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cell.* 1989;59:959-968.
121. Goldschmeding R, van der Schoot CE, ten Bokkel Huinink D, et al. Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J Clin Invest.* 1989;84:1577-1587.
122. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Champlin RE, Davis MM. A PR1-human leukocyte antigen-A2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic T lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 1999;59:2675-2681.

123. Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6:726-733.
124. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, et al. Receptor for hyaluronan acid-mediated motility (RHAMM) is a new immunogenic leukemia-associated antigen in acute and chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2002;30:1029-1035.
125. Greiner J, Li L, Ringhoffer M, et al. Identification and characterization of epitopes of the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM/CD168) recognized by CD8+ T cells of HLA-A2-positive patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005;106:938-945.
126. Adida C, Haioun C, Gaulard P, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2000;96:1921-1925.
127. Wagner M, Schmelz K, Wuchter C, Ludwig WD, Dorken B, Tamm I. In vivo expression of survivin and its splice variant survivin-2B: impact on clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 2006;119:1291-1297.
128. Schmidt SM, Schag K, Muller MR, et al. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood.* 2003;102:571-576.
129. Zeis M, Siegel S, Wagner A, et al. Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170:5391-5397.
130. Krug LM, Dao T, Brown AB, et al. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother;*59:1467-1479.
131. Sun L, Tran N, Tang F, et al. Synthesis and biological evaluations of 3-substituted indolin-2-ones: a novel class of tyrosine kinase inhibitors that exhibit selectivity toward particular receptor tyrosine kinases. *J Med Chem.* 1998;41:2588-2603.
132. Spiekermann K, Dirschinger RJ, Schwab R, et al. The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood.* 2003;101:1494-1504.
133. Levis M, Small D. FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia.* 2003;17:1738-1752.
134. Lyman SD. Biology of flt3 ligand and receptor. *Int J Hematol.* 1995;62:63-73.
135. Schmitt M, Schmitt A, Rojewski MT, et al. RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses. *Blood.* 2008;111:1357-1365.
136. Conrad H, Gebhard K, Kronig H, et al. CTLs directed against HER2 specifically cross-react with HER3 and HER4. *J Immunol.* 2008;180:8135-8145.
137. Rezvani K, Yong AS, Mielke S, et al. Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood.* 2008;111:236-242.
138. Carter BZ, Milella M, Altieri DC, Andreeff M. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood.* 2001;97:2784-2790.
139. Greiner J, Dohner H, Schmitt M. Cancer vaccines for patients with acute myeloid leukemia--definition of leukemia-associated antigens and current clinical protocols targeting these antigens. *Haematologica.* 2006;91:1653-1661.
140. Schuster FR, Buhmann R, Reuther S, et al. Improved effector function of leukemia-specific T-lymphocyte clones trained with AML-derived dendritic cells. *Cancer Genomics Proteomics.* 2008;5:275-286.

141. Kufner S, Fleischer RP, Kroell T, et al. Serum-free generation and quantification of functionally active Leukemia-derived DC is possible from malignant blasts in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54:953-970.
142. Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO, Reiser J. High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J Virol.* 1998;72:8873-8883.
143. Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Brady RO, Karlsson S, Schubert M. Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:15266-15271.
144. Kofron MD, Laurencin CT. Bone tissue engineering by gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58:555-576.
145. Trono D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther.* 2000;7:20-23.
146. Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:237-246.
147. Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, Rosenberg SA, Morgan RA. 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.* 2006;66:8878-8886.
148. Sommermeyer D, Uckert W. minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells. *J Immunol;*184:6223-6231.
149. Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, et al. Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette. *J Mol Med.* 2008;86:573-583.
150. Gordon-Thomson C, Jones J, Mason RS, Moore GP. ErbB receptors mediate both migratory and proliferative activities in human melanocytes and melanoma cells. *Melanoma Res.* 2005;15:21-28.
151. Birg F, Courcou M, Rosnet O, et al. Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood.* 1992;80:2584-2593.
152. Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:178-184.
153. Tong FK, Chow S, Hedley D. Pharmacodynamic monitoring of BAY 43-9006 (Sorafenib) in phase I clinical trials involving solid tumor and AML/MDS patients, using flow cytometry to monitor activation of the ERK pathway in peripheral blood cells. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70:107-114.
154. Stopeck A, Sheldon M, Vahedian M, Cropp G, Gosalia R, Hannah A. Results of a Phase I dose-escalating study of the antiangiogenic agent, SU5416, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res.* 2002;8:2798-2805.
155. Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, et al. SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2003;102:795-801.
156. Knapper S, Burnett AK, Littlewood T, et al. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood.* 2006;108:3262-3270.
157. Schmitt M, Casalegno-Garduno R, Xu X, Schmitt A. Peptide vaccines for patients with acute myeloid leukemia. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8:1415-1425.

158. Porter DL, Collins RH, Jr., Hardy C, et al. Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions. *Blood*. 2000;95:1214-1221.
159. Pollard JA, Alonzo TA, Gerbing RB, et al. FLT3 internal tandem duplication in CD34+/CD33- precursors predicts poor outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;108:2764-2769.
160. Rosenfeld C, Cheever MA, Gaiger A. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia*. 2003;17:1301-1312.
161. Heslop HE, Stevenson FK, Molldrem JJ. Immunotherapy of hematologic malignancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:331-349.
162. Haurum JS, Hoier IB, Arsequell G, et al. Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules in vivo. *J Exp Med*. 1999;190:145-150.
163. Zaks TZ, Rosenberg SA. Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors. *Cancer Res*. 1998;58:4902-4908.
164. Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique*. 1990;48:579-582.
165. Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*. 1989;342:224-225.
166. Zhou Z, Huang R, Danon M, Mayer L, Cunningham-Rundles C. IL-10 production in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;86:298-304.
167. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*. 1997;27:3135-3142.
168. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal*. 1982;1:841-845.
169. Brunner KT, Mauer J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*. 1968;14:181-196.
170. Altmann KH, Fabbro D, Dean NM, et al. Second-generation antisense oligonucleotides: structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochem Soc Trans*. 1996;24:630-637.
171. Knabel M, Franz TJ, Schiemann M, et al. Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. *Nat Med*. 2002;8:631-637.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Helga Bernhard für das interessante Projekt, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die Unterstützung bei der Verfassung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jerzy Adamski danke ich sehr für die Übernahme der Erstgutachtung meiner Dissertation.

Frau Prof. Dr. Angelika Schnieke danke ich für die Übernahme dieser Dissertation an die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München.

Herrn Prof. Dr. Hans-Rudolf Fries danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. Christian Peschel danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation im hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München anzufertigen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Heinke Conrad, Frau Dr. Melanie Kimm, Herrn Dr. Julien Daniel, Frau Barbara Kast, Frau Kathrin Hofer, Frau Julia Müller, Frau Stephanie Mayer, Frau Maria Rosa Salvador, Frau Kerstin Gebhard und Herrn Dr. Holger Krönig für die tatkräftige Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Duyster und Ruland danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft bei sämtlichen Fragestellungen.

Ebenso gilt mein Dank allen Menschen, die mir persönlich immer zur Seite standen:

Meinen Eltern, die mir soviel ermöglicht haben und ohne deren einzigartige Unterstützung mein Studium und diese Dissertation nicht möglich gewesen wären.

Meiner lieben Schwester Anita und meinen Freunden Stefanie Fülöp, Johannes Försch und Kathrin Köppl, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Abschließend allen, die namentlich zu erwähnen zu weit führen würde.

Appendix

Publikation im Fachmagazin *Blood Cancer Journal*:

ORIGINAL ARTICLE

FLT3-regulated antigens as targets for leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes

B Brackertz^{1,7}, H Conrad^{1,7}, J Daniel¹, B Kast^{1,2}, H Krönig¹, DH Busch^{2,3}, J Adamski^{4,5}, C Peschel¹ and H Bernhard^{1,2,6}

¹Department of Hematology/Oncology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany; ²Clinical Cooperation Group 'Antigen-Specific Immunotherapy' Helmholtzzentrum München, German Research Center for Environmental Health, Munich, Germany; ³Institute of Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, Technische Universität München, Munich, Germany; ⁴Institute of Experimental Genetics, Genome Analysis Center, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Neuherberg, Germany; ⁵Institute of Experimental Genetics, Life and Food Science Center Weihenstephan, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany and ⁶Department of Hematology/Oncology, Klinikum Darmstadt GmbH, Darmstadt, Germany

The FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) is highly expressed in acute myeloid leukemia (AML). Internal tandem duplications (ITD) of the juxtamembrane domain lead to the constitutive activation of the FLT3 kinase inducing the activation of multiple genes, which may result in the expression of leukemia-associated antigens (LAAs). We analyzed the regulation of LAA in FLT3-wild-type (WT)- and FLT3-ITD⁺ myeloid cells to identify potential targets for antigen-specific immunotherapy for AML patients. Antigens, such as PR-3, RHAMM, Survivin, WT-1 and PRAME, were upregulated by constitutively active FLT3-ITD as well as FLT3-WT activated by FLT3 ligand (FL). Cytotoxic T-cell (CTL) clones against PR-3, RHAMM, Survivin and an AML-directed CTL clone recognized AML cell lines and primary AML blasts expressing FLT3-ITD, as well as FLT3-WT⁺ myeloid dendritic cells in the presence of FL. Downregulation of FLT3 led to the abolishment of CTL recognition. Comparing our findings concerning LAA upregulation by the FLT3 kinase with those already made for the Bcr-Abl kinase, we found analogies in the LAA expression pattern. Antigens upregulated by both FLT3 and Bcr-Abl may be promising targets for the development of immunotherapeutical approaches against myeloid leukemia of different origin.

Blood Cancer Journal (2011) 1, e11; doi:10.1038/bcj.2011.12; published online 18 March 2011

Keywords: acute myeloid leukemia; FLT3 kinase; leukemia-associated antigens; T-cell clones; immunotherapy

Introduction

The FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) receptor tyrosine kinase is highly expressed by malignant cells in most cases of acute myeloid leukemia (AML) and acute B-lineage leukemia (ALL).^{1,2} In addition, FLT3 mutations belong to the most frequent somatic alterations in AML and occur in approximately 30% of AML patients.³ The most common forms of mutant FLT3 are internal tandem duplications (ITDs) in the juxtamembrane domain. This duplication shows strong variations in length of 3 to more than 400 bp between different patients.^{4,5} The FLT3-ITD leads to the constitutive activation by ligand-independent phosphorylation of the receptor.³ It has been shown in clinical studies that AML patients harboring FLT3-ITD mutations have a poor prognosis.^{6,7}

Several small-molecule inhibitors of FLT3 have been developed and are currently in different stages of clinical development, including Sorafenib and SU5416.^{8–10} Although treatment with

FLT3 inhibitors results in clinical responses in relapsed AML with activating FLT3 mutations, the reduction in peripheral blood and bone marrow blasts is only transient.^{10–16} Combination therapies of FLT3 inhibitors and conventional chemotherapy are currently being studied.¹⁷ However, the insensitivity of quiescent leukemic stem cells towards kinase inhibitors may lead to the selective outgrowth of these cells and finally to disease relapse even after years of continuous treatment.

T lymphocytes have the potential to eliminate the AML stem cell. Proof of principle has been shown in an exceptional clinical situation where donor lymphocyte infusions can induce complete cytogenetic remissions of AML relapsed after allogeneic stem cell transplantation.¹⁸ The donor's T lymphocytes include allo-restricted T cells, which may ideally combine antigen specificity, high avidity and a superior leukemia-lytic function. However, most of the allo-restricted T cells display broad peptide specificity or even a peptide-independent human leukocyte antigen (HLA)-dominant binding, both characteristics leading to a wide reactivity and potentially to graft-versus-host disease. Besides, the risk of graft-versus-host disease rises if target antigens are widely expressed in the body. Therefore, the current immunotherapeutic concepts focus on targeting those antigens that are preferentially or even exclusively expressed by AML blasts, including the AML stem cell.

Graf *et al.*¹⁹ successfully generated cytotoxic T cells (CTLs) highly specific for an HLA-A*0101 (HLA-A1)-restricted epitope derived from the FLT3-ITD of one AML patient showing that the FLT3-ITD is a potential target antigen for immunotherapeutic approaches. However, the variations in the length of the ITD imply the problem of having to find an individual antigenic epitope for each individual patient.⁴ An alternative approach to circumvent this problem may lie in the observation that the likewise constitutively active tyrosine kinase Bcr-Abl expressed in Philadelphia⁺ chronic myeloid leukemia (CML) upregulates immunogenic leukemia-associated antigens (LAA).²⁰ Some of the Bcr-Abl-regulated LAA, such as PR-3 and Wilms tumor protein (WT)-1, are also expressed in AML. Moreover, for PR-3 and WT-1, it has been shown that they spontaneously activate T cells in AML patients, indicating the immunogenicity of these antigens.²¹ On the basis of these findings, we asked the question as to whether LAA are also regulated by FLT3-WT and/or FLT3-ITD in AML.

In this study, we show that a panel of LAA, such as PR-3, Survivin and RHAMM, is upregulated by constitutively active FLT3-ITD. Moreover, the activation of non-mutated FLT3 upon stimulation with FLT3 ligand (FL) leads to the upregulation of the same LAA. *Vice versa*, treatment of FLT3-WT⁺ leukemia cells with FLT3-small interfering RNA (siRNA) leads to the down-

Correspondence: Professor Dr H Bernhard, Department of Hematology/Oncology, Klinikum Darmstadt, Grafenstraße 9, 64293 Darmstadt, Germany.

E-mail: helga.bernhard@klinikum-darmstadt.de

⁷These authors contributed equally to this work.

Received 7 December 2010; revised 27 January 2011; accepted 11 February 2011

regulation of the LAA even in the presence of FL. LAA downregulation was also observed after treatment of FLT3-ITD⁺ leukemia cells with the FLT3 inhibitor Sugen SU5416. To prove the functional relevance of FLT3-regulated LAA as immunological targets, we used LAA-reactive CTL clones as effector cells. Indeed, CTL clones specific for PR-3, Survivin and RHAMM recognized various myeloid target cells harboring the activated FLT3 kinase. The strong dependence of CTL killing on the FLT3 activation status indicates the relevance of FLT3-regulated LAA as promising targets for T-cell-based immunotherapy.

Materials and methods

Cell culture

The human leukemia cell lines RS4;11 and MV4;11 (obtained from the DSMZ, Braunschweig, Germany) carry the chromosomal translocation t(4;11)(q21;q23), but express different MLL-AF4 variants owing to different break points. Further leukemic cell lines used in this study were the cell lines K562 and K562 transfected with HLA-A*0201 (HLA-A2) (generous gift from Th Wölfel, Klinikum der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, Germany) and BV-173 (DSMZ). The TAP-defective HLA-A2⁺ T2 cell line was provided by P Cresswell (Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA). The B lymphoblastoid cell lines (LCLs) were generated by EBV transformation of peripheral blood B cells from healthy donors.

MV4;11, K562A2, BV-173 and T2 cells were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RS4;11 cells were maintained in α -minimum essential medium. All media were supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM glutamine and 10% fetal calf serum.

The expression of HLA-A2 was confirmed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analyses with a fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-HLA-A2 monoclonal antibody (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). For interferon (IFN)- γ treatment, the medium was supplemented with 100 U/ml IFN- γ 48 h before the functional assays.

Generation of CTL clones

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were derived from healthy donors and AML patients. Isolation of CD8⁺ T cells occurred via magnetic-activated cell sorting (Miltenyl Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) after indirect antibody staining. The isolated HLA-A2⁻ CD8⁺ T cells were repetitively stimulated with allogenic HLA-A2⁺ dendritic cells (DCs) loaded with 10 μ g of the HLA-A2-restricted peptide epitope PR-3_{169–177} (VLQELNVTV), RHAMM_{165–173} (ILSLELMKL) or Survivin_{95–104} (ELTLGEFLKL). CD8⁺ T cells and peptide-pulsed DCs were co-cultured in 200 μ l AIM-V medium in a stimulator to a response ratio of 1: 20 in 96-well round-bottom plates with 5% human AB-Serum (Milan Analytica, LaRoche, Switzerland), 1000 U/ml interleukin (IL)-6 and 10 ng/ml IL-12. Restimulation was set up in the presence of 5 ng/ml IL-7 and 100 U/ml IL-2. After two stimulations, the proliferating T cells were stained with HLA-A2/PR-3_{169–177}, HLA-A2/RHAMM_{165–173} and HLA-A2/Survivin_{95–104} multimers, respectively, and the specific T cells were FACS sorted with a MoFlo cell sorter (Cytomation, Fort Collins, CO, USA)²² and cloned by limiting dilution in five 96-well plates. The expansion of the T-cell clones occurred in the presence of anti-CD3, IL-15, IL-2 and irradiated LCL and PBMC as feeder cells.

IFN- γ ELISpot assay

The production of IFN- γ was determined in an ELISpot assay. ELISpot membrane plates (Millipore, Bedford, MA, USA) were

coated overnight with an IFN- γ -specific antibody (Mabtech AB, Stockholm, Sweden). Target cells (2×10^4 cells per well) and CTL (5×10^3 cells per well) were washed twice in RPMI medium (Invitrogen) before seeding them onto the ELISpot plates. After 24 h incubation at 37 °C, the spots were assessed using antibodies against IFN- γ , and then stained with AEC (3-amino-9-ethylcarbazole; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) staining solution. The number of spots was counted by using an automated ELISpot reader system (KS ELISpot, Carl Zeiss, Jena, Germany).

Enzyme-linked immunosorbent assay

To detect the IFN- γ production of the CTL clones, 2×10^4 T cells per well were co-cultured with 1×10^4 target cells in 96-well round-bottom plates at 37 °C. After 24 h, supernatants were collected and IFN- γ production was determined using a commercially available IFN- γ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BD BioSciences International, San Jose, CA, USA).

Cytotoxicity assay

Cytolytic activity was analyzed in a standard 4 h chromium release assay as described.²³ In short, the tumor cell lines (5×10^5 cells in 100 μ l of fetal calf serum) were incubated with 100 μ Ci of ⁵¹Cr for 1.5 h at 37 °C, washed and used as target cells. Peptide-loaded T2 cells were first labeled with ⁵¹Cr for 1.5 h at 37 °C and then loaded with the respective peptide (10 μ g/ml) for an additional hour at room temperature. As negative controls (ctrls), ⁵¹Cr-labeled T2 cells were loaded with the HLA-A2-restricted peptide HIVpol_{476–484} (ILKEPVHGV). The ⁵¹Cr-labeled targets were cultured with the T cells in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum at 200 μ l per well in V-bottom, 96-well tissue culture plates (Greiner, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). For evaluating the efficacy of CTL-mediated lysis, the T cells were serially diluted and then co-cultured with a fixed amount of target cells, resulting in graded E:T ratios. For testing functional T-cell receptor (TCR) avidity, the T cells were plated at a fixed E:T ratio of 30:1 while the peptide concentration was titrated.

After 4 h of co-culturing the effector and target cells at 37 °C, 100 μ l of supernatant were collected and radioactivity was measured in a γ -counter. The killing was calculated as the percentage of specific ⁵¹Cr release using the equation percentage of specific lysis = ((sample release – medium release) / (maximal release – medium release)).

siRNA treatment

The siRNA SMARTpool containing four pooled siRNA duplexes directed against FLT3 (catalog no. M-003137-02-0005) and a nonspecific siRNA (catalog no. D-001206-13-20) were purchased from Thermo Science and Perbio (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), respectively.

The transfection of siRNA was performed using the Nucleofactor system (Amaxa, Cologne, Germany) according to the manufacturer's instructions. The knockdown of the specified protein was determined by FACS analyses.

RNA isolation and reverse transcription–polymerase chain reaction

Total RNA was isolated using the RNeasy mini kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA was reverse transcribed using Moloney murine leukemia

virus reverse transcription with oligo(dT) (Invitrogen). The following primers were used: β -actin (sense: 5'-GGGACCTGAC TGACTACCTCAT-3'; antisense: 5'-ATAGTCCGCTAGAAGCA TTTG-3'); PRAME (sense: 5'-CTGTACTCATTTCAGAGCCA GA-3'; antisense: 5'-TATTGAGAGGGTTTCCAAGGGGTT-3'); PR-3 (sense: 5'-CGGCCACATAACATTTGCAC-3'; antisense: 5'-TGGCACATCCCCAGATCAC-3'); RHAMM (sense: 5'-CAGGT CACCCAAAGGAGTCTC-3'; antisense: 5'-CAAGCTCATCCAGT GTTTGC-3'); Survivin (sense: 5'-ACCACCGCATCTCTACATT C-3'; antisense: 5'-GCTCTTCTCTGTCCAGTTTC-3'); and WT-1 (sense: 5'-TAACCACACAACGCCCATC-3'; antisense: 5'-AAAAC CTTCGTTACAGTCC-3'). The polymerase chain reaction (PCR) products were electrophoresed on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

Flow cytometry

Flow cytometry was performed using HLA-A2/PR-3₁₆₉₋₁₇₇, HLA-A2/RHAMM₁₆₅₋₁₇₃ and HLA-A2/Survivin₉₅₋₁₀₄ multi-mers, and anti-human CD8 monoclonal antibody, fluorescein isothiocyanate conjugated (Immunotech, Marseille, France). Fluorescence analyses were performed with the Coulter Epics XL flow cytometer (Coulter Electronics, GmbH, Krefeld, Germany) and documented with the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

RESULTS

The LAA PR-3, RHAMM, Survivin, WT-1 and PRAME are upregulated by the FLT3 receptor tyrosine kinase

First we analyzed whether the FLT3 kinase has an influence on the expression of the LAA PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin that are known to be expressed in AML.²⁴⁻²⁹ As examples for the FL-dependent FLT3-WT and the constitutively active FLT3-ITD variant, we used the two different human acute leukemia cell lines RS4;11 and MV4;11, which endogenously express the FLT3-WT and FLT3-ITD, respectively.

In RS4;11 leukemia cells, the administration of FL increased the expression levels of the LAA PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin from low/intermediate levels before FL treatment to high levels after incubation with FL (Figure 1a). This experimental finding indicates the dependency of these LAA on the activity of the FLT3 kinase. To further examine this finding, we made an approach using the RS4;11 leukemia cells transfected

with siRNA against FLT3 and analyzed the expression of the LAA PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin in the presence of FL. Following treatment with FLT3-siRNA, the RS4;11 cells showed a marked downregulation of these LAA even in the presence of FL. The transfection of RS4;11 cells with the irrelevant ctrl-siRNA in the presence of FL did not result in any downregulation of LAA expression compared with that after exclusive treatment with FL (Figure 1b).

In MV4;11 leukemia cells, in which the FLT3 kinase is constitutively active, we detected a permanently high expression of the different LAA (Figure 1c). Culturing these cells with SU5416, a known inhibitor of the FLT3-ITD activity, reduced the expression of Survivin, an antigenic protein that has already been known to be upregulated by the FLT3 kinase activity.^{30,31} In addition, we documented decreasing levels of the expression of PRAME, WT-1, RHAMM and PR-3 after an incubation of 48–72 h. On the basis of these findings, we conclude that active FLT3 kinase upregulates the expression of the LAA PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin.

The correlation between the activity of the FLT3 kinase and the expression of different LAA underlines the significance of these antigens for the development of immunotherapeutic approaches against myeloid leukemia.

CTL clones against the LAA PR-3, RHAMM and Survivin recognize and lyse leukemia cell lines and primary AML blasts

On the basis of our findings that FLT3-expressing cell lines are able to upregulate the LAA PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin, our aim was the generation of CTL clones directed against HLA-A2-restricted epitopes of these LAA. For this purpose, CD8⁺ T lymphocytes from healthy donors were stimulated with allogeneic DCs loaded with the peptides PR-3₁₆₉₋₁₇₇, Survivin₉₅₋₁₀₄, WT-1₁₂₆₋₁₃₄, PRAME₃₀₀₋₃₀₉ or RHAMM₁₆₅₋₁₇₃. Following repetitive stimulations, the amount of PR-3₁₆₉₋₁₇₇, Survivin₉₅₋₁₀₄- and RHAMM₁₆₅₋₁₇₃-specific T cells could be increased to numbers that permitted the visualization, sorting with HLA-A2/peptide multimers and cloning by limiting dilution. Sixty-two CTL clones grew in the approach stimulated with PR-3₁₆₉₋₁₇₇ from which after further testing two proved to be tumour reactive. In the case of Survivin₉₅₋₁₀₄, one of 25 CTL clones tested was able to lyse Survivin-expressing tumor cells. For RHAMM₁₆₅₋₁₇₃, we got three tumor-reactive out of 48 potential clones. Figure 2a

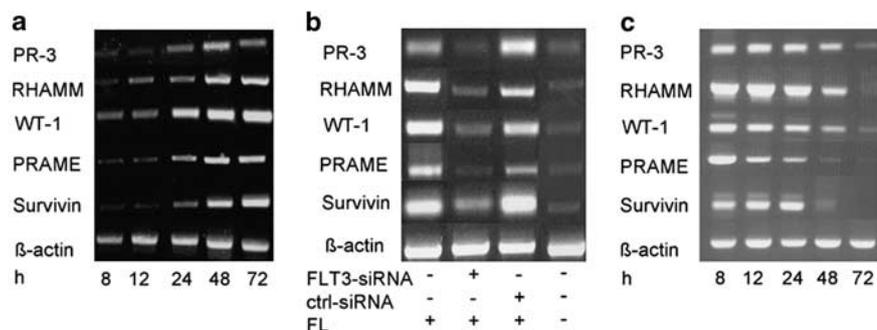


Figure 1 Influence of the FLT3 kinase on the expression of the LAA PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin. (a) RS4;11 (FLT3-WT⁺) cells were treated with FL for a time period of 72 h and the expression of the LAA PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin was documented via RT-PCR at 8, 12, 24, 48 and 72 h after treatment. (b) RS4;11 (FLT3-WT⁺) cells were treated with FL, FLT3-siRNA and/or ctrl-siRNA for 72 h, and the expression of the LAA PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin was analyzed by RT-PCR. (Lanes 1–4 show the expression of the different tumor antigens PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin in RS4;11 cells treated with FL (lane 1), in RS4;11 cells treated with FLT3-siRNA (lane 2), in RS4;11 cells treated with ctrl-siRNA (lane 3) and in RS4;11 cells without FL (lane 4).) (c) MV4;11 (FLT3-ITD⁺) cells were treated with the FLT3 kinase inhibitor SU5416 for 72 h, and the expression of the LAA PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin was documented via RT-PCR at different time points after treatment. The three figures are composed of different gels.

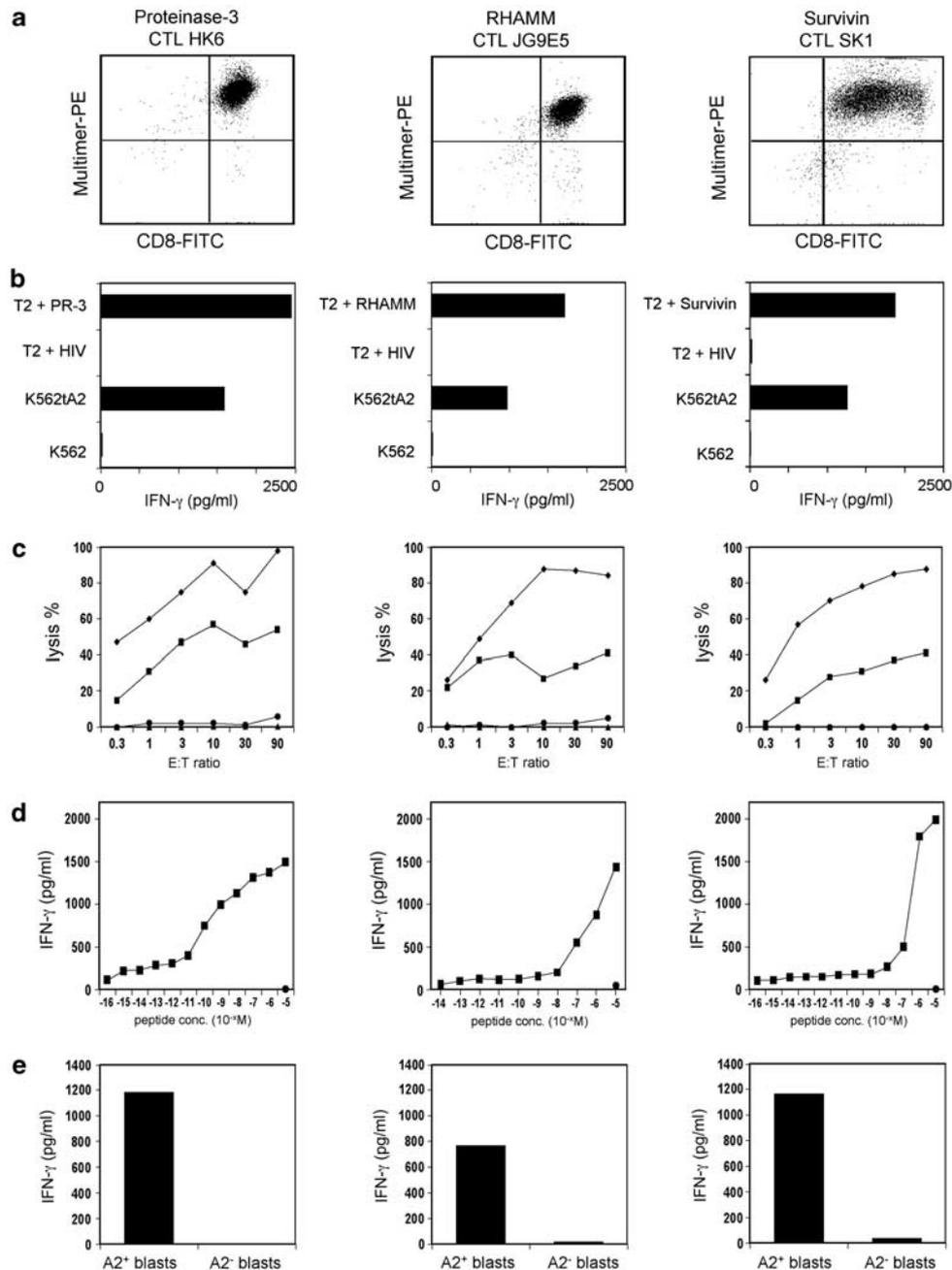


Figure 2 CTL clones against PR-3, RHAMM, and Survivin, respectively, recognize the corresponding peptide epitopes. (a) FACS staining of the different CTL clones with the respective multimers. (b) The different CTL clones were co-cultivated with T2 cells loaded with PR-3_{169–177}, RHAMM_{165–173}, Survivin_{95–104} or HIV_{pol476–484}, K562tA2, K562 or MCF7. The IFN- γ concentration of the supernatant was determined by ELISA. (c) Differential lytic activity of HLA-A2-restricted PR-3_{169–177}, RHAMM_{165–173} or Survivin_{95–104}-directed CTL clones against T2 cells loaded with the respective peptide (◆) and HLA-A2⁺ K562tA2 cells (■). T2 cells loaded with the irrelevant peptide HIV_{pol476–484} (▲) and K562 cells (●) were used as negative ctrl. (d) Functional avidity of CTL clones was determined by the recognition of T2 cells pulsed with graded amounts of peptides. (e) The different CTL clones were co-cultivated with FLT3-ITD⁺ blasts of an HLA-A2⁺ AML patient or with blasts of an HLA-A2⁻ AML patient. The IFN- γ concentration of the supernatant was determined by ELISA.

exemplifies FACS staining of, in each case, one representative CTL clone with the respective multimer.

The peptide specificity of the respective clones was confirmed in an IFN- γ ELISA, in which T2 cells loaded with PR-3_{169–177}, Survivin_{95–104}, RHAMM_{165–173} or the irrelevant peptide HIV_{pol476–484} were used as target cells. As shown in Figure 2b, the different CTL clones secreted high amounts of IFN- γ after incubation with the respective relevant, but not with the irrelevant peptide. In the same test, we analyzed whether the

different CTL clones were able to recognize endogenously processed PR-3_{169–177}, Survivin_{95–104} and RHAMM_{165–173}, respectively. Therefore, the HLA-A2⁺ K562tA2 leukemia cells known to express PR-3, Survivin and RHAMM were used as target cells. The reactivity pattern of the different clones is shown in Figure 2b. The different CTL clones were able to recognize K562tA2 cells, whereas there was no recognition of K562 cells used as negative ctrl. The lytic activity was determined in a ⁵¹Cr release assay. Lysis of T2 cells loaded

with the relevant peptide PR-3_{169–177} by CTL clone HK6 was between 45 and 100% at increasing E:T ratios, whereas there was no recognition of T2 cells pulsed with the irrelevant peptide HIVpol_{476–484}. The leukemic cell line K562tA2 was lysed with a maximum of about 55% at an E:T ratio of 10:1 (Figure 2c, left). The RHAMM-specific CTL clone JG9E5 showed about 100% lysis of RHAMM_{165–173}-loaded T2 cells at higher E:T ratios and up to 40% lysis of K562tA2 cells (Figure 2c, middle). The lysis of T2 cells loaded with Survivin_{95–104} by CTL clone SK1 was between 25 and 90% at increasing E:T ratios. K562tA2 cells were lysed with a maximum of about 40% (Figure 2c, right).

Furthermore, the functional avidities of the CTL clones toward the peptides PR-3_{169–177}, Survivin_{95–104} and RHAMM_{165–173} were assessed by the recognition of serially diluted amounts of the respective peptides (10^{-5} – 10^{-16} M) loaded onto T2 cells in an IFN- γ ELISA. The PR-3-specific CTL clone displayed a rather high avidity toward the PR-3_{169–177} peptide with a half-maximum IFN- γ secretion of 10^{-10} (Figure 2d, left). The RHAMM- and the Survivin-reactive CTL clones have a relatively low avidity with a half-maximum IFN- γ secretion of about 10^{-7} – 10^{-6} (Figure 2d, middle, right).

On the basis of our findings that FLT3-expressing cell lines upregulate the LAA PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin, we were led to question whether our CTL clones reactive against PR-3, Survivin and RHAMM were able to recognize leukemic blasts. Hence, we co-cultivated the three CTL clones with primary blasts of an HLA-A2⁺ patient with FLT3-ITD⁺ AML. Blasts of an HLA-A2⁻ AML patient served as negative ctrl. As shown in Figure 2e, the CTL clones performed high IFN- γ secretion only in the presence of HLA-A2⁺, FLT3-ITD⁺ blasts, but not in the presence of HLA-A2⁻ blasts.

Leukemia-reactive CTL clones are generated by stimulation with blast-derived DC

On the basis of our findings, we were led to question whether FLT3-ITD⁺ leukemic blast-derived DCs (DC_{AML}) were capable of inducing a primary CTL response. In this approach, we

stimulated HLA-A2⁻ CD8⁺ T lymphocytes from a healthy donor with allogeneic DC_{AML} of a 71-year-old HLA-A2⁺ female patient with FLT3-ITD⁺ AML. The expression of the LAA PR-3, Survivin, WT-1, PRAME and RHAMM by these DC_{AML} has been documented by RT-PCR (Supplementary Figure 1A). The dependency of this expression on the FLT3 kinase activity could be shown indirectly by the downregulation of IFN- γ secretion by the respective clones following treatment of DC_{AML} with SU5416, a known inhibitor of the FLT3 kinase activity (Supplementary Figure 1B). After two stimulations, we did an IFN- γ ELISpot assay with T2 cells pulsed with the AML-associated peptides PR-3_{169–177}, Survivin_{95–104}, WT-1_{126–134}, PRAME_{300–309} or RHAMM_{165–173}, HIVpol_{476–484}, as well as with K562tA2 and K562 to test the specificity of the different T-cell populations in the 96-well plates. There were no T cells specific for one of the peptides tested, so we cloned T cells recognizing K562tA2, but not K562 (data not shown). The reactivity pattern of three of the resulting CTL clones (CTL_{AML}) is shown in Figure 3. The three CTL_{AML} clones showed high reactivity against the HLA-A2⁺ leukemia cell lines K562tA2 and BV173, but no recognition of K562 (Figure 3a) in an IFN- γ ELISpot. Furthermore, we wanted to know whether the recognition of the CTL_{AML} clones is specifically restricted to HLA-A2⁺ leukemic blasts and not to PBMC of a healthy donor. As depicted in Figure 3b, there was only low or no reactivity against HLA-A2⁺ PBMC and HLA-A2⁻ blasts. In contrast, there was a marked IFN- γ secretion when co-cultivated with HLA-A2⁺ leukemic blasts (Figure 3b).

DCs transfected with FLT3-ITD are recognized by CTL clones against PR-3, RHAMM and Survivin, as well as by CTL_{AML} clones

We wanted to know whether downregulation of the FLT3 kinase is also leading to a lower recognition of FLT3⁺ cells by our isolated CTL clones. As we do not have any FLT3⁺ cell lines, we used HLA-A2⁺ DCs from a healthy donor. For testing the FLT3-WT and the constitutively active mutant variant FLT3-ITD, the

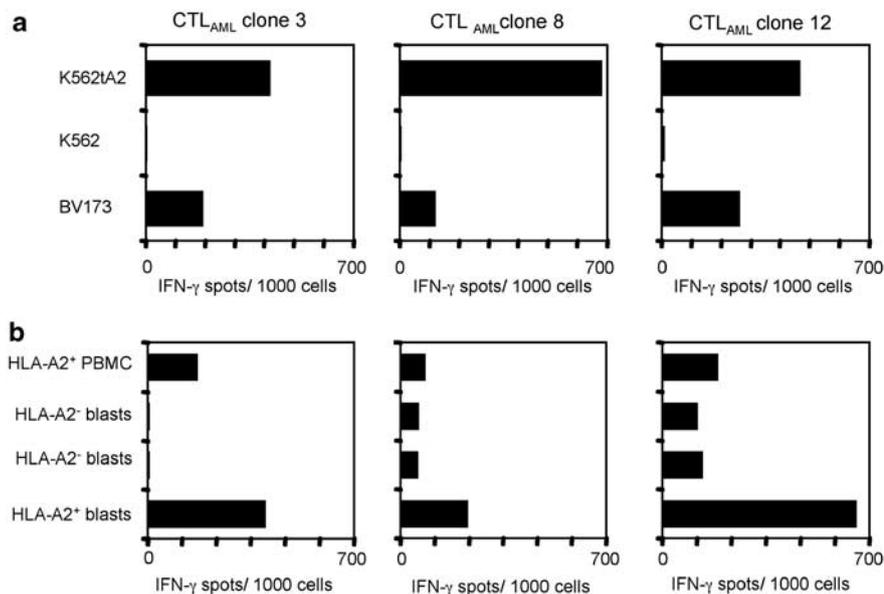


Figure 3 CTL clones stimulated with HLA-A2⁺ ITD⁺ DC_{AML} recognize leukemia cell lines and blasts. CD8⁺ T cells from a healthy HLA-A2⁻ donor were primed with allogeneic HLA-A2⁺ DC_{AML} and specific T cells were cloned. (a) In an IFN- γ ELISpot, the three CTL_{AML} clones were co-incubated with K562tA2, K562 and HLA-A2⁺ BV173 cells, and the resulting spots were counted. (b) An IFN- γ ELISpot was performed using allogeneic HLA-A2⁻ PBMC and blasts, as well as HLA-A2⁺ blasts as targets and the three CTL_{AML} clones as effector cells.

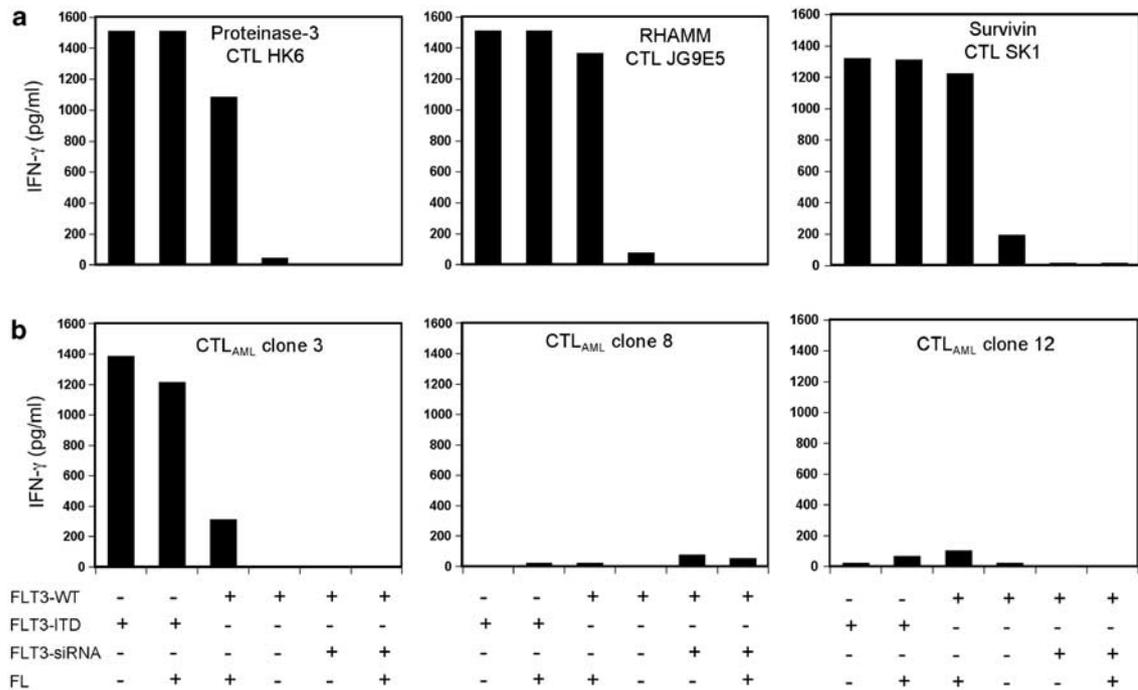


Figure 4 Reactivity of CTL clones directed against PR-3, RHAMM and Survivin, as well as CTL_{AML} clones towards DCs nucleofected with FLT3-WT plus and minus FLT3-siRNA or FLT3-ITD. All approaches were carried out with and without the addition of FL. (a, b) HLA-A2⁺ DCs from a healthy donor were nucleofected with FLT3-WT-mRNA or FLT3-ITD-mRNA and co-cultivated with the different CTL clones with and without the addition of FL. Furthermore, the FLT3-WT⁺ DCs were additionally transfected with FLT3-siRNA. The supernatants were tested in an IFN- γ ELISA. (a, b) show the results of the ELISA with the CTL clones directed against PR-3, RHAMM and Survivin, as well as with the CTL_{AML} clone nos 3, 8 and 12.

DCs were nucleofected with FLT3-WT- or FLT3-ITD-mRNA. To analyze if FLT3 was active in DCs transfected with FLT3-WT, we compared recognition of DCs either treated or not treated with FL by the CTL clones directed against PR-3, RHAMM, Survivin and the CTL_{AML} clones. As depicted in Figure 4, there was no or only little IFN- γ secretion of the different CTL clones in the presence of untreated FLT3-WT DCs. The CTL clones directed against PR-3, RHAMM and Survivin showed high reactivity against DCs treated with FL (Figure 4a). In contrast, only one of the CTL_{AML} clones (clone no. 3) secreted some IFN- γ when incubated with DCs treated with FL (Figure 4b). The three peptide-specific clones and the CTL_{AML} clone no. 3 displayed high FL-independent recognition of ITD⁺ DCs. To see the effect of downregulation of FLT3-WT, we used the FLT3-siRNA that we already used in RS4;11 cells (Figure 1b). Following treatment of the DCs with FLT3-siRNA, no recognition could be observed by any of the clones independently of FL. With these experimental settings, we were able to further confirm our hypothesis that the expression of the LAA PR-3, RHAMM and Survivin is regulated by active FLT3.

In contrast to CTL_{AML} clone no. 3, which also seems to have an FLT3-dependent recognition, the CTL_{AML} clone nos 8 and 12 did not show any reactivity against DCs nucleofected with FLT3-WT or FLT3-ITD.

CTL clones against PR-3, RHAMM and Survivin recognize DCs transfected with Bcr-Abl-WT, but not DCs transfected with Bcr-Abl-KD

Our findings concerning the upregulation of different LAA by the active FLT3 kinase are in accordance with the observations about the immunogenicity of the Bcr-Abl kinase made by our

group.²⁰ It has been shown that the tyrosine kinase activity of Bcr-Abl leads to enhanced expression of some CML-associated antigens, for example, PR-3. In the meantime, we could also detect an upregulation of RHAMM and Survivin in Bcr-Abl⁺ cells. As we now have T-cell clones against these LAA, which recognize cells expressing FLT3, we wanted to know whether these clones are also reactive against Bcr-Abl-WT⁺ cells. For comparison of the active and inactive form of Bcr-Abl, we transfected DCs with Bcr-Abl-WT-mRNA or a kinase-deficient Bcr-Abl-mRNA (KD) as described before.²⁰

The reactivity of the different peptide-specific T-cell clones and the CTL_{AML} clones against the transfected DCs were documented by analyzing their IFN- γ release (Figure 5). The pattern of T-cell-derived IFN- γ release shows a high reactivity of the different peptide specific CTL clones and the CTL_{AML} clone no. 3 against Bcr-Abl-WT⁺ DC, but not against Bcr-Abl-KD⁺ DCs. Interestingly, this was also true for the two other CTL_{AML} clones that did not recognize FLT3-WT-transfected DCs (Figures 4b and 5).

DISCUSSION

Cytotoxic T lymphocytes have the potential to eliminate malignant stem cells, even if they are quiescent. Immunotherapeutic approaches are being developed based on antigen-specific T lymphocytes, such as antigen vaccination or adoptive T-cell transfer. As FLT3-ITD is partially expressed by CD34⁺/CD33⁻ AML progenitors, sequences from FLT3-ITD itself may serve as ideal leukemia-specific epitopes for leukemia-specific T lymphocytes.³² Indeed, from one patient with FLT3-ITD⁺, AML leukemia-specific CTL clones have been isolated that recognize

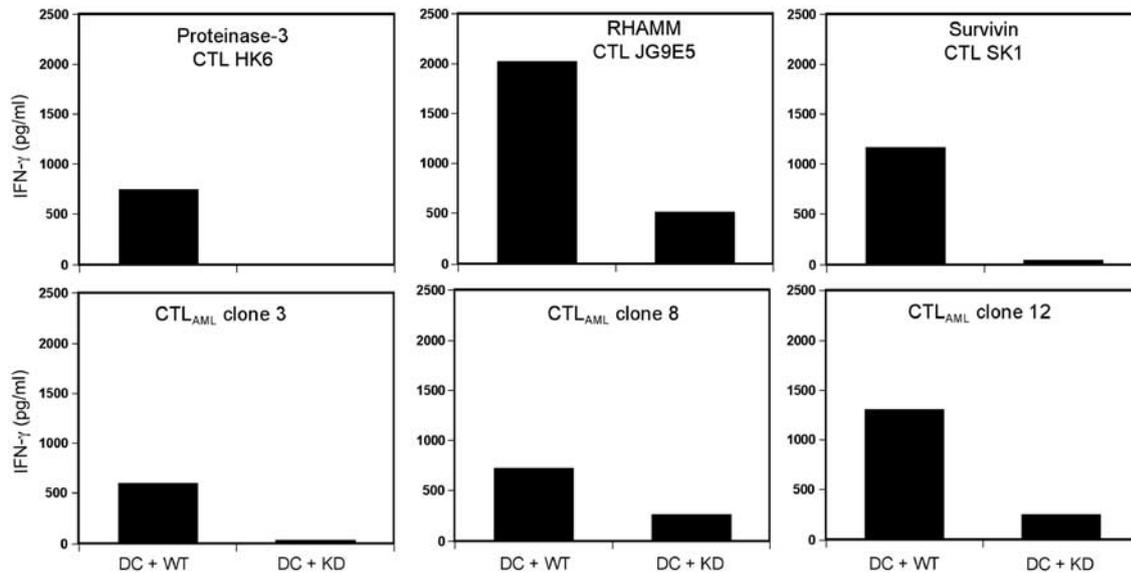


Figure 5 Reactivity of CTL clones directed against PR-3, RHAMM and Survivin, as well as CTL_{AML} clones towards DCs nucleofected with Bcr-Abl-WT or Bcr-Abl-KD. The CTL clones were co-incubated with the respective DCs and an IFN-γ ELISA was performed using the resulting supernatant.

an HLA-A1-restricted peptide sequence derived from the FLT3-ITD sequence.¹⁹ However, the strong variation in length of ITD duplications between AML patients implies the problem to find T-cell epitopes for every single patient to design an individual immunotherapy. In AML, several shared antigens have been identified, which can potentially serve as targets for cytotoxic T lymphocytes, such as PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin.^{24–29} Until now, the expression pattern of these AML-associated antigens and their relevance for the CTL-mediated elimination of AML stem cells is not entirely understood. As the FLT3-ITD is active in early progenitor AML cells, we asked the question as to whether some of the shared antigens are dependent on the activated form of the mutant FLT3 kinase.

In this study, we analyzed the expression of PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin in an FLT3-WT⁺ leukemia cell line with and without the addition of FL. There was a weak basic expression of the five LAA analyzed. The addition of FL, however, resulted in a stronger LAA expression being the first hint for an existent association between FLT3 activity and LAA regulation. This could be confirmed by the downregulation of FLT3 activity, with FLT3-siRNA subsequently lowering the expression of the LAA analyzed. To test the influence of a constitutively active mutant variant of FLT3, we analyzed the LAA expression in an FLT3-ITD⁺ leukemia cell line. These cells showed a high level of LAA corresponding to that of the FLT3-WT⁺ leukemia cell line treated with FL. The inhibition of the constitutively active FLT3-ITD by SU5614, a known inhibitor of the FLT3-ITD activity,³⁰ showed an effect analogous to that achieved after treatment of FLT3-WT⁺ cells with FLT3-siRNA. These data document for the first time that the expression of PR-3, RHAMM, WT-1, PRAME and Survivin is upregulated upon activation of the FLT3 kinase.

We next asked the question as to whether the upregulation of LAA by the activation status of FLT3 influenced the T-cell-mediated lysis of leukemia cells. First, we established a panel of allo-HLA-A2-restricted CTL clones specific for PR-3, RHAMM and Survivin. To effectively stimulate and select T cells against these self-antigens, we took advantage of an HLA mismatch between DCs and T cells by using DCs from an HLA-A2⁺ donor as stimulator cells and T cells from an HLA-A2⁻ donor as

responder cells.^{33,34} For further experiments, we expanded those CTL clones that displayed a fine specificity against the respective peptides as shown by IFN-γ release and lytic activity. The selected CTL clones HK5, JG9ES and SK1 recognized the K562tA2 leukemic cell line expressing PR-3, RHAMM and Survivin. As assumed, FLT3-ITD⁺ AML blasts were also recognized by these CTL in an HLA-A2-restricted manner. To answer the important question as to whether T-cell recognition of myeloid cells is dependent on the FLT3-modulated expression level of their antigens, we used myeloid DCs as target cells. The herein generated monocyte-derived DCs transfected with FLT-WT were not recognized by the antigen-specific CTL clones HK5, JG9ES and SK1. FMS-like tyrosine kinase 3-WT⁺ DCs were recognized upon FL stimulation, indicating that the activation of the FLT3 kinase raised the expression level of PR-3, RHAMM and Survivin above a certain threshold, which further enabled the T cells to recognize their targets. Similarly, CTL recognition could be induced when FLT3-WT⁺ DCs were transfected with the constitutively active FLT3-ITD. The correlation between FLT3 activity and the upregulation of CTL-defined LAA points to the significance of these antigens for the physiological as well as the therapeutic relevance of immune responses against acute leukemias.³⁵ Exemplarily, the expression of RHAMM and PRAME have been shown to be associated with a favorable clinical outcome in AML patients and to induce T-cell responses.²⁹ Peptide vaccination trials performed with RHAMM, PR-3 and WT-1 peptides resulted in measurable immunological and clinical responses in patients with different hematological diseases.^{29,36–40}

As a second approach to prove the immunological relevance of FLT3-regulated antigens for targeting AML cells, we generated DCs from AML blasts known to be able to stimulate leukemia-reactive autologous T lymphocytes.^{41,42} Following stimulation of allogeneic HLA-A2⁻ CD8⁺ T cells with HLA-A2⁺ DC_{AML}, we isolated three different leukemia-reactive CTL clones. All of the three established CTL_{AML} clones recognized FLT3-ITD⁺ AML blasts in an HLA-A2-restricted manner. None of the HLA-A2-restricted epitopes of the known LAA PR-3, RHAMM, Survivin, PRAME and WT-1 was recognized by the CTL_{AML} clones. Of note, one of the three CTL_{AML} clones (CTL no. 3)

secreted IFN- γ when stimulated with DCs harboring the active form of the FLT3 kinase, such as FLT3-ITD-transfected DCs or FL-stimulated FLT3-WT⁺ DCs. This indicates that FLT3-regulated antigens are able to stimulate primary T-cell responses towards myeloid leukemia cells.

On the basis of our previous findings that the expression level of some LAA, such as PR-3 and PRAME, is not only induced by activated FLT3, but also by the constitutively active Bcr-Abl kinase,²⁰ we next analyzed the recognition pattern of the herein described AML-reactive CTL clones in response to monocyte-derived DCs transfected with Bcr-Abl-WT or Bcr-Abl-KD. We first analyzed the IFN- γ secretion by the PR-3-specific CTL clone HK6 in response to HLA-A2-matched Bcr-Abl-WT⁺ DCs versus Bcr-Abl-KD⁺ DCs. As postulated, the PR-3-specific CTL clone released IFN- γ in the presence of Bcr-Abl-WT⁺ DC, but not in the presence of Bcr-Abl-KD⁺ DCs. Similarly, the RHAMM- and Survivin-specific CTL clones both released high amounts of IFN- γ only in the presence of Bcr-Abl-WT⁺ DCs. Interestingly, all three CTL_{AML} clones with yet undefined antigen specificity reacted strongly with Bcr-Abl-WT⁺ DCs and only to a low extent with Bcr-Abl-KD⁺ DCs. Therefore, CTL clone nos 8 and 12 seem to recognize a LAA, which is regulated by the Bcr-Abl, but not by the FLT3 kinase. In contrast, the antigen recognized by CTL clone no. 3 is regulated by both the FLT3 and the Bcr-Abl kinase. In summary, there are common as well as differential antigen patterns induced on the activation of the Bcr-Abl and FLT3 kinases. Our findings raise the question as to whether the same and/or other LAAs are upregulated by additional tyrosine kinases, for example, the NPM/Alk kinase.

In conclusion, antigens upregulated by kinases activated in leukemia cells may be promising targets for the development of T-cell-based immunotherapies against myeloid leukemia of different origins. As the broad clinical application of adoptive T-cell transfer is limited owing to the laborious procedure of T-cell isolation and characterization, we will pursue an alternative methodology whereby primary human T-cell populations are transduced with the LAA-reactive TCR of interest. The herein presented CTL clones against FLT3- and Bcr-Abl-regulated antigens, respectively, for example, PR-3 and RHAMM, may serve as a source for leukemia-reactive TCR. The TCR gene transfer is a convenient method to produce antigen-specific T cells, further allowing that an individualized therapy will be available for a mass of patients with FLT3⁺ or Bcr-Abl⁺ myeloid leukemias.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Kathrin Hofer and Julia Müller for excellent technical assistance. This study was supported by grants from the José Carreras Leukemia Foundation (DJCLS R 07/34f to HB), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB-456 to HB and DHB; DFG BE 1579/4-1 to HB) and from the Helmholtz Alliance 'Immunotherapy of Cancer' (to HB and DHB). BB and HC designed and performed research, collected and analyzed data and wrote the paper; JD and BK performed research; HK revised the paper; DHB provided vital tools; JA and CP supervised research; and HB designed and supervised research, reviewed data and wrote the paper.

References

- Birg F, Courcoul M, Rosnet O, Bardin F, Pebusque MJ, Marchetto S *et al.* Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages. *Blood* 1992; **80**: 2584–2593.
- Carow CE, Levenstein M, Kaufmann SH, Chen J, Amin S, Rockwell P *et al.* Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* 1996; **87**: 1089–1096.
- Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2006; **1**: 178–184.
- Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C *et al.* Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; **100**: 59–66.
- Seedhouse CH, Pallis M, Grundy M, Shang S, Russell NH. FLT3-ITD expression levels and their effect on STAT5 in AML with and without NPM mutations. *Br J Haematol* 2009; **147**: 653–661.
- Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 1997; **11**: 1605–1609.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Koda Y, Miyawaki S *et al.* Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; **97**: 2434–2439.
- Tong FK, Chow S, Hedley D. Pharmacodynamic monitoring of BAY 43-9006 (Sorafenib) in phase I clinical trials involving solid tumor and AML/MDS patients, using flow cytometry to monitor activation of the ERK pathway in peripheral blood cells. *Cytometry B* 2006; **70**: 107–114.
- Stopeck A, Sheldon M, Vahedian M, Cropp G, Gosalia R, Hannah A. Results of a phase I dose-escalating study of the antiangiogenic agent, SU5416, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 2798–2805.
- Fiedler W, Serve H, Dohner H, Schwittay M, Ottmann OG, O'Farrell AM *et al.* A phase I study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood* 2005; **105**: 986–993.
- O'Farrell AM, Foran JM, Fiedler W, Serve H, Paquette RL, Cooper MA *et al.* An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 5465–5476.
- Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Cooper MA, Hannah AL *et al.* SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Blood* 2003; **102**: 795–801.
- Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K *et al.* Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; **103**: 3669–3676.
- Knapper S, Burnett AK, Littlewood T, Kell WJ, Agrawal S, Chopra R *et al.* A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood* 2006; **108**: 3262–3270.
- Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD *et al.* Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* 2005; **105**: 54–60.
- DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, Nimer SD, Paquette RL, Klisovic RB *et al.* Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood* 2006; **108**: 3674–3681.
- Levis M, Pham R, Smith BD, Small D. *In vitro* studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood* 2004; **104**: 1145–1150.

- 18 Porter DL, Collins Jr RH, Hardy C, Kernan NA, Drobyski WR, Giralt S *et al.* Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions. *Blood* 2000; **95**: 1214–1221.
- 19 Graf C, Heidel F, Tenzer S, Radsak MP, Solem FK, Britten CM *et al.* A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells. *Blood* 2007; **109**: 2985–2988.
- 20 Scheich F, Duyster J, Peschel C, Bernhard H. The immunogenicity of Bcr-Abl expressing dendritic cells is dependent on the Bcr-Abl kinase activity and dominated by Bcr-Abl regulated antigens. *Blood* 2007; **110**: 2556–2560.
- 21 Scheibenbogen C, Letsch A, Thiel E, Schmittel A, Mailaender V, Baerwolf S *et al.* CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; **100**: 2132–2137.
- 22 Neudorfer J, Schmidt B, Huster KM, Anderl F, Schiemann M, Holzapfel G *et al.* Reversible HLA multimers (Streptamers) for the isolation of human cytotoxic T lymphocytes functionally active against tumor- and virus-derived antigens. *J Immunol Methods* 2007; **320**: 119–131.
- 23 Meyer zum Buschenfelde C, Nicklisch N, Rose-John S, Peschel C, Bernhard H. Generation of tumor-reactive CTL against the tumor-associated antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells derived from CD34+ hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 2000; **165**: 4133–4140.
- 24 Dengler R, Munstermann U, al-Batran S, Hausner I, Faderl S, Nerl C *et al.* Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells. *Br J Haematol* 1995; **89**: 250–257.
- 25 Miwa H, Beran M, Saunders GF. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia* 1992; **6**: 405–409.
- 26 Miyagi T, Ahuja H, Kubota T, Kubonishi I, Koeffler HP, Miyoshi I. Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells. *Leukemia* 1993; **7**: 970–977.
- 27 Rosenfeld C, Cheever MA, Gaiger A. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia* 2003; **17**: 1301–1312.
- 28 Carter BZ, Milella M, Altieri DC, Andreeff M. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood* 2001; **97**: 2784–2790.
- 29 Greiner J, Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Bosch K, Schmitt A *et al.* Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood* 2006; **108**: 4109–4117.
- 30 Yee KW, O'Farrell AM, Smolich BD, Cherrington JM, McMahon G, Wait CL *et al.* SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood* 2002; **100**: 2941–2949.
- 31 Fukuda S, Singh P, Moh A, Abe M, Conway EM, Boswell HS *et al.* Survivin mediates aberrant hematopoietic progenitor cell proliferation and acute leukemia in mice induced by internal tandem duplication of FLT3. *Blood* 2009; **114**: 394–403.
- 32 Pollard JA, Alonzo TA, Gerbing RB, Woods WG, Lange BJ, Sweetser DA *et al.* FLT3 internal tandem duplication in CD34+/CD33– precursors predicts poor outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; **108**: 2764–2769.
- 33 Conrad H, Gebhard K, Kronig H, Neudorfer J, Busch DH, Peschel C *et al.* CTLs directed against HER2 specifically cross-react with HER3 and HER4. *J Immunol* 2008; **180**: 8135–8145.
- 34 Kronig H, Hofer K, Conrad H, Guillaume P, Muller J, Schiemann M *et al.* Allorestricted T lymphocytes with a high avidity T-cell receptor towards NY-ESO-1 have potent anti-tumor activity. *Int J Cancer* 2009; **125**: 649–655.
- 35 Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Li L, Schmitt A, Shiku H *et al.* mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int J Cancer* 2004; **108**: 704–711.
- 36 Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H *et al.* Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 13885–13890.
- 37 Heslop HE, Stevenson FK, Molldrem JJ. Immunotherapy of hematologic malignancy. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2003; **1**: 331–349.
- 38 Rezvani K, Yong AS, Mielke S, Savani BN, Musse L, Superata J *et al.* Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood* 2008; **111**: 236–242.
- 39 Schmitt M, Schmitt A, Rojewski MT, Chen J, Giannopoulos K, Fei F *et al.* RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses. *Blood* 2008; **111**: 1357–1365.
- 40 Greiner J, Dohner H, Schmitt M. Cancer vaccines for patients with acute myeloid leukemia—definition of leukemia-associated antigens and current clinical protocols targeting these antigens. *Haematologica* 2006; **91**: 1653–1661.
- 41 Choudhury BA, Liang JC, Thomas EK, Flores-Romo L, Xie QS, Agusala K *et al.* Dendritic cells derived *in vitro* from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood* 1999; **93**: 780–786.
- 42 Kremser A, Dressig J, Grabrucker C, Liepert A, Kroell T, Scholl N *et al.* Dendritic cells (DCs) can be successfully generated from leukemic blasts in individual patients with AML or MDS: an evaluation of different methods. *J Immunother* 2010; **33**: 185–199.



This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on Blood Cancer Journal website (<http://www.nature.com/bcj>)