

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München

Generierung zytotoxischer T-Zellen gegen das tumorassoziierte
Antigen HER3

Kerstin Schaller

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Generierung zytotoxischer T-Zellen gegen das tumorassoziierte Antigen HER3

Kerstin Schaller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. H. Bernhard

2. Univ.-Prof. Dr. Ch. Peschel

Die Dissertation wurde am 15.06.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.10.2012 angenommen.

Abkürzungsverzeichnis

γ	gamma
μg	10^{-6} Gramm
μl	10^{-6} Liter
A2	Blutgruppe A2
AB	Blutgruppe AB
Abb.	Abbildung
abl	„Abelson murine leukemia oncogene“
a.d.	destilliertes Wasser
Ag	Antigen
Akt	Proteinkinase B
allo	allogen
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APM	Antigenprozessierungsmaschinerie
bcr	„breakpoint cluster region“
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Celsius
CD	Differenzierungscluster („cluster of differentiation“)
cDNA	komplementäre DNA
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
CM	Initialien des T-Zell-Spenders
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
⁵¹ Cr	radioaktives ⁵¹ Chrom
CRA	Chromium release Assay
DC	dendritische Zellen
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Effektorzellen
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECD	extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGFR	„epidermal growth factor receptor“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ELISpot	„enzyme linked immunospot assay“
ErbB	„erythroblastic leukemia viral oncogene homolog“
FACS	„fluorescence-activated Cell-Sorter“
Fc	kristallines Fragment eines Antikörpers
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2	Proleukin (Interleukin-2)
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-7	Interleukin-7
IL-12	Interleukin-12
IL-15	Interleukin-15
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
M	Mol
mAb	monoklonaler Antikörper
MACS	magnetischer Zellsort
MAGE	Melanom-assoziiertes Antigen
Melan A	Melanozyten differenzierendes Antigen
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
min	Minute
ml	10 ⁻³ Liter

mRNA	messenger RNA
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mi-R	mikro-Ribonukleinsäure
Na ₂ ⁵¹ CrO ₄	Natriumchromat
ng	10 ⁻⁹ Gramm
nm	nanometer
NY-ESO	New York esophageal squamous cell carcinoma
OKT3	muriner monoklonaler Antikörper gegen CD3
PBMC	„peripheral blood mononuclear cell“ (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
pg	10 ⁻¹² gramm
PGE2	Prostaglandin E2
PI	Propidiumjodid
PI3-K	Phosphoinositol 3-Kinase
rad	radiation absorbed dose
ras	„rat sarcoma“
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute medium“
RT	Raumtemperatur
T	Targetzellen
TAP	„transporter associated with antigen processing“
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF- α	Humaner Tumornekrosefaktor α
TRP	„Tyrosinase related Protein“
TKI	Tyrosinkinaseinhibitoren
U	Units
V β	variable Region der β -Ketten des TCR
3-D	dreidimensional

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	9
1.1 Zelluläre Tumorummunität.....	9
1.2 Das tumorassoziierte Antigen Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 3 (HER3, ErbB3)	11
1.3 HER3-gerichtete Therapie.....	13
1.4 Adoptiver T-Zell-Transfer im Rahmen unserer Forschung.....	15
2 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material.....	19
3.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen.....	19
3.1.2 Radioaktive Substanzen.....	19
3.1.3 Medien und Supplemente für die Zellkultur.....	20
3.1.4 Peptide	20
3.1.5 Antikörper.....	21
3.1.6 Tetramere.....	21
3.1.7 Zelllinien.....	22
3.1.7.1 Adhärente Zellen	22
3.1.7.2 Suspensionszellen.....	22
3.1.8 Kitsysteme	22
3.1.9 Standardgeräte.....	22
3.1.10 Standardlösungen und –puffer	23
3.2 Methoden	24
3.2.1 Zellkultur	24
3.2.1.1 Allgemeine Zellkultur.....	24
3.2.1.1.1 Kultivierung verschiedener Zelllinien.....	24
3.2.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl.....	25
3.2.1.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	25
3.2.1.2 Spezielle Zellkultur	25

3.2.1.2.1 Isolierung von PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)	25
3.2.1.2.2 Generierung von Monozyten-derivierten DC	26
3.2.1.2.3 Peptidbeladung von Zellen.....	27
3.2.1.2.4 CD8-Isolierung.....	27
3.2.1.2.5 „Priming“ und Restimulation von CD8 ⁺ T-Zellen.....	28
3.2.1.2.6 T-Zellklonierung	28
3.2.1.2.7 Expansion von T-Zellen.....	29
3.2.2 Funktionelle Tests	29
3.2.2.1 ELISpot-Test als Screening Test.....	29
3.2.2.2 ⁵¹ Cr-Freisetzungstest (Chromium release assay, CRA)	30
3.2.2.3 Zytokinsekretionstest mittels Sandwich-ELISA	32
3.2.2.4 Durchflusszytometrische Messungen (FACS-Analyse).....	33
3.2.2.4.1 Färbung auf Oberflächenmarker	34
3.2.2.4.2 MHC:Peptid-Multimerfärbung.....	34
3.2.2.4.2.1 Sortierung im Durchflusszytometer.....	35
3.2.2.4.3 TCR-Vβ-Analyse	35
3.2.2.5 HLA-A2 Transfektion von Zelllinien.....	36
4 Ergebnisse	37
4.1 Expressionsanalysen von HLA-A2 und HER3 von Tumorzelllinien	37
4.2 Stimulierung HER3- spezifischer HLA-A2 ⁻ zytotoxischer T- Lymphozyten mit peptidbeladenen allogenen HLA-A2 ⁺ DC.....	39
4.3 Die alloreaktiven HER3 ⁺ CD8 ⁺ Klone sind A2/HER3 ₃₅₆₋₃₆₄ - Multimer positiv mit einer geringen Kreuzreaktivität zu dem A2/HER2 ₃₆₉₋₃₇₇ - Multimer.....	41
4.4 HER3- reaktive CTL sind funktionell hochavide und weisen eine Kreuzreaktivität mit niedriger Avidität zum HER2 ₃₆₉₋₃₇₇ - Peptid auf	43
4.5 Die HER3- spezifischen T- Zell- Klone erkennen HLA-A2 ⁺ HER3 ⁺ Tumorzelllinien und produzieren IFN-γ	44
4.6 HER3- reaktive CD8 ⁺ Klone lysieren HLA-A2 ⁺ HER3 ⁺ Tumorzelllinien	45
4.7 Die Lyse der HLA-A2 ⁺ HER3 ⁺ Tumorzelllinien ist HLA-A2/HER3- abhängig.....	48
4.8 Erkennung der HER3-positiven/HER2-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 tA2 im IFN-γ-ELISA und im ⁵¹ Cr- Freisetzungstest	50

5 Diskussion.....	52
6 Zusammenfassung.....	58
7 Literaturverzeichnis.....	59

1 Einleitung

Die Therapie von Krebserkrankungen stützt sich momentan auf folgende 3 Säulen: das chirurgische Vorgehen, die Chemotherapie und die Strahlentherapie. Durch diese Behandlungsoptionen werden gute kurative Chancen in niedrigen Tumorstadien erreicht, allerdings ist die Therapie des metastasierten Karzinoms meist eine palliative.

Da das Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung von Krebserkrankungen einnimmt, wurden zusätzlich in den letzten Jahren vermehrt verschiedenste Arten von Immunstrategien etabliert, wie z. B. die Antikörpertherapie (Piccart et al. 2000:1760; Robinson et al. 2008:1), Vakzinierungsstrategien (Bernhard et al. 2002:33; Yannelli et al. 2004:97) oder auch die T-Zell-Therapie (Bernhard et al. 2008:271). Einige dieser Immuntherapien finden auch schon in der Klinik als Therapieschemata Anwendung. Dabei ist vorwiegend die Therapie des adjuvanten und metastasierten Brustkrebs mit einem humanisierten monoklonalen Antikörper (Trastuzumab, Handelsname Herceptin®) gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2 zu nennen (Baselga et al. 2006:4; Cobleigh et al. 1999:2639), der alleine oder in Kombination mit Chemotherapeutika verabreicht werden kann (Baselga et al. 2006:4). Dabei hat sich gezeigt, dass Trastuzumab die zytolytische Aktivität von CD8⁺ T- Zellen gegen HER2- überexprimierende Tumorzellen erhöhen kann (zum Buschenfelde et al. 2002:2245).

Diese Behandlungsform nennt man auch „targeted therapies“, d. h. es werden Therapiestrategien entwickelt, wobei eine Substanz spezifisch auf eine Struktur gerichtet ist, die im Krankheitsprozess eine wichtige Rolle spielt. Im Falle der Immuntherapien sind dies z. B. T-Zellen, die spezifisch auf bestimmte Tumorantigene gerichtet sind. Um zukünftig vermehrt „targeted therapies“ in der Klinik als „vierte Behandlungssäule“ in der Krebsbehandlung zu verwenden, ist es wichtig neue Tumorantigen- gerichtete Therapien zu entwickeln.

1.1 Zelluläre Tumormunität

In vielen tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Abstoßung von transplantierten Tumoren vorwiegend durch die zelluläre Immunantwort geschieht (Rosenberg 2001:383). Die Voraussetzung für Immuntherapien zur zellulären Tumormunität ist somit die Aktivierung von tumorspezifischen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen *in vivo* oder *in vitro*. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zytotoxische CD8⁺ T- Zellen gegen das tumorassoziierte Antigen

HER3 isoliert, die als Ausgangsprodukt für einen T- Zell- Rezeptor- Transfer (TCR) bei HER3-überexprimierenden Tumorpatienten, im Speziellen Brustkrebspatienten, dienen (Meyerhuber et al. 2010:1113).

Da Antigene wie HER3 oder HER2 auch auf normalem Gewebe exprimiert werden (Stern 2003:89), werden hochaffine T- Zellen schon im Thymus deletiert. Dadurch ist es schwierig bei einem autologen T- Zell- Spender antigenspezifische T- Zellen zu isolieren. Dieses Problem kann dadurch umgangen werden, dass man auf T- Zellen eines Spenders mit einem anderen HLA (Humanes Leukozyten-Antigen)- Typ zurückgreift, denn 1-10% der T- Zellen erkennen durch Kreuzreaktivität auch allogene Peptid- HLA- Komplexe (Detours et al. 2000:8479; Suchin et al. 2001:973). In dieser Doktorarbeit wurden allo- restringierte CD8⁺ T- Zellen verwendet, d. h. die T- Zellen wurden mit spenderfremden antigenpräsentierenden Zellen stimuliert.

Bei der Interaktion zwischen T- Zelle und Antigen- präsentierender Zelle (APC) ist die Erkennung des Antigens auf einer antigenpräsentierenden Zelle durch den T- Zell- Rezeptor (TCR)- Komplex auf den T- Zellen die wichtigste Komponente. Da in dieser Doktorarbeit ausschließlich zytotoxische T- Zellen, also CD8⁺ T- Zellen, benutzt wurden, fand die Antigenerkennung über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I auf antigenpräsentierenden Zellen, in diesem Fall dendritische Zellen (DC), statt. Dadurch werden die T- Zellen zum einen durch das Antigen im MHC- I- Komplex und zum anderen durch kostimulatorische Moleküle auf den DCs stimuliert. Diese erste Stimulation einer T- Zelle wird auch „Priming“ genannt, welches natürlicherweise im Lymphknoten stattfindet und im Rahmen dieser Doktorarbeit *in vitro* nachgestellt wurde.

Als antigenpräsentierende Zellen wurden dendritische Zellen benutzt, die aus Blutmonozyten eines HLA-A0201⁺ Spenders generiert wurden und über eine gewisse Zeit zu reifen dendritischen Zellen ausgereift wurden, denn nur diese reifen DCs sind in der Lage T- Zellen zu „primen“ (Melief 2003:2645). Bei der Interaktion zwischen TCR der T- Zelle und MHC- Klasse- I- Komplex der DC werden Teile des Antigens als okta- bis dekamere Peptide über den MHC- Klasse- I Komplex den T- Zellen präsentiert (Godkin et al. 2001:6720). Dabei werden im Falle der Tumorummunologie natürlicherweise die Tumorantigene von der DC aufgenommen, über das Zytosol als Proteine an das Proteasom (multikatalytischer Proteasekomplex) weitergegeben und dort zu Peptiden verarbeitet. Diese Peptide werden ins endoplasmatische Retikulum transportiert, dort an MHC- Klasse- I- Moleküle gebunden und als Peptid- MHC- I- Komplex an die Zelloberfläche gebracht. Dieser Vorgang der Tumorantigenaufnahme und –verarbeitung wird auch endogene Prozessierung genannt.

1.2. Das tumorassoziierte Antigen Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 3 (HER3, ErbB3)

Nach Ribas et al. werden Tumorantigene in sechs Kategorien eingeteilt (2003:2416):

1. In immunologisch privilegierten Regionen der Keimbahn und in verschiedenen Tumoren vorkommende nicht-mutierte Antigene (cancer/germline antigens) wie z.B. NY-ESO, MAGE
2. Expression von Linien-spezifischen Tumorantigenen, d.h. diese Tumorantigene werden von normalen und neoplastischen Zellen des gleichen Gewebes exprimiert wie z.B. aus der Melanozyten-Melanom-Linie Melan A, gp 100, Tyrosinase und Tyrosinase related Protein (TRP)
3. Epitope von in Tumorzellen mutierten Genen oder in Tumorzellen überexprimierten Genen verglichen mit normalen Zellen, wie mutiertes ras, bcr/abl, Her2/neu oder mutiertes bzw. Wildtyp-p53
4. Bildung einmaliger Idiotypen in Myelomen bzw. B-Zell-Lymphomen durch klonale Rearrangements von Immunglobulingenen
5. Aus onkoviralen Prozessen stammende Epitope wie die Proteine E6 und E7 aus dem humanen Papilloma-Virus
6. Nicht-mutierte onkofötale Proteine, welche nur tumorselektiv exprimiert werden, wie das Carcino-Embryonale Antigen (CEA) sowie das Alpha-Fetoprotein

Das tumorassoziierte Antigen HER3, mit dem in dieser Doktorarbeit gearbeitet wurde, fällt in Kategorie 3. HER3 gehört in die Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren Typ I, die aus vier bekannten Rezeptortyrosinkinasen besteht: EGFR („epidermal growth factor receptor“)/HER1 (erbB1), HER2 (erbB2), HER3 (erbB3) und HER4 (erbB4). Diese Wachstumsfaktorrezeptoren sind für die Regulation des Wachstums, der Differenzierung und des Überlebens der epithelialen Brustdrüsenzellen unerlässlich (Holbro et al. 2003:100), außerdem z.B. für die Entwicklung des kardiovaskulären- und Nervensystems essentiell (Erickson et al. 1997:5002-5003). Um Signale über den HER3- Rezeptor in das Zellinnere zu transportieren ist eine Dimerisierung mit anderen Rezeptortyrosinkinasen notwendig, da dem HER3- Rezeptor die Rezeptortyrosinkinase Aktivität fehlt (Kraus et al. 1989:9195). Besonders für intrazelluläre Signalwege wichtig ist hier die Heterodimerisierung zwischen HER3/HER2 (Wiseman et al. 2005:1771). Dabei findet über eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von erbB3 eine Aktivierung des für das Zellüberleben wichtigen PI3-K/Akt-Signalwegs statt (Le et al. 2005:2093; Stern 2008:217).

Nachdem lange nur EGFR und HER2 als Tumorantigene erforscht und für sie Therapiestrategien entwickelt wurden, ist in letzter Zeit HER3 als ein geeigneter Ansatzpunkt für Krebstherapien erkannt worden. Denn eine vermehrte Expression von erbB3 konnte in vielen Tumoren nachgewiesen werden, z. B. zeigte sich in mRNA (messenger Ribonukleinsäure)- und immunhistochemischen Analysen eine Prävalenz der HER3- Expression in Brustkrebs zwischen 17-52% (Hamburger 2008:226). Eine Überexpression des HER3- Rezeptors wurde in 20-30% aller invasiven Mammakarzinome nachgewiesen (Karamouzis et al. 2007:851; Lemoine et al. 1992:1119). Außerdem konnte gezeigt werden, dass hohe Expressionen von HER3 in Mammakarzinomen mit einer verstärkten Tumoraggressivität einhergehen, wie z.B. Metastasenbildung (Lemoine et al. 1992:1120), Tumorgröße und ein höheres Risiko für Rezidive (Travis et al. 1996:232). Doch z. B. auch bei Magen- und Kolonkarzinom- sowie bei Melanompatienten konnte eine positive Korrelation zwischen der HER3- Überexpression und einer schlechten Prognose bzw. einem vermindertem Überleben nachgewiesen werden (Beji et al. 2012:957; Hayashi et al. 2008:7846; Reschke et al. 2008:5189). Außerdem wurde in Studien gezeigt, dass in der Mehrheit der erb2 positiven Brustkrebspatienten auch erbB3 exprimiert wird, wobei die Koexpression von mindestens zwei der Wachstumsfaktorrezeptoren HER3, HER2 und HER1 mit einem noch schlechteren Überleben korrelierte, als wenn nur jeweils ein Wachstumsfaktorrezeptor exprimiert wurde (Wiseman et al. 2005:1776).

Die Wachstumsfaktorrezeptoren existieren an der Oberfläche der Krebszellen als Homo- oder Heterodimere, wobei die Heterodimerbildung besonders bei ErbB3 und ErbB2 die bevorzugte ist, denn HER3 und HER2 sind inkomplette Rezeptoren und erst bei Heterodimerisierung aktiv (Baselga 2009:464; Stern 2000:177). Der Grund dafür ist, dass zum einen HER3 keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität aufweist (Stern 2008:215) und zum anderen HER2 ein Rezeptor ist, der keine Liganden binden kann (Stern 2008:216). Nach Heterodimerisierung ist HER3 außerdem als einziger Wachstumsfaktorrezeptor in der Lage, die Signaltransduktion in das Zellinnere über den PI3-K/Akt Signalweg zu vermitteln, wodurch sich der Begriff der „onkogenen Einheit“ in Brustkrebspatienten durchgesetzt hat (Holbro et al. 2003:8933), was mit einem verminderten Überleben assoziiert ist (Stern 2008:218).

In letzter Zeit wurde festgestellt, dass die Expression von HER3 in Krebszellen eine Rolle bei HER2- gerichteten Therapien spielt. Zum einen konnten hohe Expressionen von HER3 mit einer niedrigen Trastuzumab- Effizienz assoziiert werden (Smith et al. 2004:1193), zum anderen wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, dass durch Behandlung HER2- positiver Tumoren mit Tyrosinkinaseinhibitoren eine Aktivierung und verstärkte Signalgebung von HER3 vorhanden ist

(Sergina et al. 2004:437). Außerdem konnte bei HER2⁺ Brustkrebslinien gezeigt werden, dass eine Ausschaltung des ErbB3- Gens zu einer Wachstumshemmung dieser Zellen führte (Lee-Hoeflich et al. 2008:5878). Auch bei der Behandlung von Brustkrebspatienten mit dem Östrogenrezeptorinhibitor Tamoxifen kann es durch ein Zusammenspiel des HER3/HER2-Heterodimers mit dem Östrogenrezeptor zu einer Tamoxifenresistenz kommen (Jhabvala-Romero et al. 2003:8183; Sassen et al. 2008:10; Stoica et al. 2003:2074), wobei bei Herunterregulation von ErbB3 die Resistenz wieder aufgehoben werden kann (Liu et al. 2007:1878).

Die Immunogenität von HER2 bei HER2- überexprimierenden Brustkrebspatienten durch Bildung von Antikörpern und T- Zellen konnte gezeigt werden (Disis et al. 1994:16) und für verschiedene T- Zell- Epitope, wie das HLA-A0201-restringierte Nonamer von HER2₃₆₉₋₃₇₇ (KIFGSLAFL) wurde nachgewiesen, dass sie von verschiedenen zytotoxischen T- Zellen erkannt wurden (Fisk et al. 1995:2111). HER2₃₆₉₋₃₇₇ wurde daraufhin in vielen Studien untersucht und zur Peptid- und auf DCs basierenden Immunisierung bzw. zum adoptiven T- Zell- Transfer von Patienten mit HER2- überexprimierenden Tumoren eingesetzt (Bernhard et al. 2008:271; Disis et al. 1999:1291; Zaks et al. 1998:4902). Im Rahmen unserer Forschungsarbeiten bei der Isolierung HER2₃₆₉₋₃₇₇- reaktiver T- Zellen wurde eine Kreuzreaktivität u. a. zu einem HER3- Nonamer mit der Sequenz HER3₃₅₆₋₃₆₄ (KILGNLDFL) festgestellt, welches das korrespondierende HLA-A0201- restringierte Peptid zu dem HER2₃₆₉₋₃₇₇- Peptid darstellt und als erstes von unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurde (Conrad et al. 2008:8142). Mit diesem HLA-A2- restringierten HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid, welches in verschiedenen Konzentrationen exogen auf ausgereifte DCs geladen worden war, wurden HLA-A2⁻ CD8⁺ T- Zellen zweimalig stimuliert und auf ihre Funktionalität hin überprüft (s. Material – und Methoden, Ergebnisse).

1.3 HER3- gerichtete Therapie

Eine neuere immunologische Therapiestrategie gegen HER- exprimierende Tumoren ist die Gabe von kleinmolekularen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) wie z. B. Lapatinib gegen HER2- überexprimierende Brustkrebstumoren (Mc Arthur 2009:264) oder Erlotinib gegen EGFR- überexprimierendes nicht- kleinzelliges Lungenkarzinom oder Pankreaskarzinom (Katzel et al. 2009:14; Philip 2008:S17). Doch HER3 weist keine intrinsische Kinaseaktivität auf, wodurch diese Tyrosinkinaseinhibitoren bei der HER3-gerichteten Therapie unwirksam sind (Hsieh et al.

2007:455). Außerdem wurde herausgefunden, dass diese Agenzien in der klinischen Anwendung nur limitierte anti- Tumor Antworten zeigen konnten (Philip 2008:S17), da die Hemmung des PI3-K/Akt Signalwegs fehlschlägt und es dadurch zu einer TKI Resistenz kommt (Bianco et al. 2003:2812; She et al. 2003:4345). Interessanterweise konnte man durch die TKI- Behandlungen kompensatorische Veränderungen an den Tumorzellen nachweisen, wie die zunehmende HER3- Expression auf der Zelloberflächenmembran und die verstärkte Transphosphorylierung von HER3 (Hamburger 2008:227; Sergina et al. 2007:438), was immuntherapeutische Strategien wieder interessanter macht. Denn es konnte gezeigt werden, dass HER2 nach HER2- gerichteten Therapien herunterreguliert oder mutiert sein kann, was zu einem ansteigenden Wachstum HER3- positiver Tumorzellen führen könnte (Czerniecki et al. 2007:1850; Knutson et al. 2004:1150-51; Singh et al. 2007:1887).

Zusätzlich dazu wurden mikro- RNAs nachgewiesen, welche hochkonservierte kleine nichtkodierende RNAs darstellen (Iorio et al. 2009:2195), die auf posttranskriptionaler Ebene die Genexpression in der Biologie von Karzinomen regulieren. Im Jahr 2005 fand man mikro- RNAs (z.B. miR-125a, miR-125b und miR-205), die beim Mammakarzinom als Suppressorgene fungieren (Iorio et al. 2005:7068) und eine Suppression von ErbB3 auf transkriptionaler und translationaler Ebene in HER3⁺ Brustkrebszelllinien hervorrufen (Scott et al. 2007:1484). Dadurch wird die Proliferation der Brustkrebszelllinien gehemmt und die Sensitivität für Tyrosinkinasehemmer wie Lapatinib wieder erhöht (Iorio et al. 2009:2198).

Andere Therapiestrategien sind z. B. zum einen die Entwicklung eines RNA-Aptamers (= kurze einzelsträngige DNA- oder RNA- Oligonukleotide, die ein spezifisches Molekül über ihre 3D- Struktur binden können), das in Brustkrebszelllinien die extrazelluläre Domäne von HER3 (HER3- ECD) spezifisch binden kann und dadurch das Zellwachstum verringert (Chen et al. 2003:9231). Zum anderen konnte eine Hemmung der ErbB3 Genexpression in HER3⁺ Zelllinien beobachtet werden wenn diese mit künstlich hergestellten DNA- bindenden Zink Transkriptionsfaktoren retroviral infiziert wurden (Lund et al. 2005:9084). Dadurch konnte die Proliferation und die Signalgebung in den Zelllinien inhibiert werden.

Als immuntherapeutische Konzepte wurden zum einen Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von HER3 (HER3-ECD) hergestellt, womit man bei *in vitro*-Testungen zeigen konnte, dass HER3-überexprimierende Brustkrebs- bzw. Kolonkarzinomzelllinien nach Behandlung mit dem HER3-ECD-Antikörper in ihrer Proliferation und Invasionsfähigkeit gehemmt wurden (Beji et al. 2012:966; van der Horst et al. 2005:521). Zusätzlich konnte nach Behandlung mit dem HER3-ECD-Antikörper eine Einleitung der Apoptose bei Kolonkarzinomzelllinien beobachtet

werden (Beji et al. 2012:961). Zum anderen wurde ein bispezifischer Antikörper entwickelt, der HER3 und HER2 zusammen als Heterodimer bindet und dadurch die intrinsische Aktivität in Krebszellen hemmt (Robinson et al. 2008:1).

Aufgrund der Tatsachen, dass HER3 bei der Krebsentstehung und Aufrechterhaltung bzw. beim Fortschreiten einer Krebserkrankung eine wichtige Rolle spielt, ist es sinnvoll, HER3 als Tumorantigen und Zielstruktur mit in die Krebstherapie HER3- überexprimierender Tumoren aufzunehmen. Dadurch, dass bislang in der Klinik noch kein immuntherapeutisches Konzept existiert, welches HER3 alleine als Zielstruktur beinhaltet, wurden im Rahmen dieser Forschungsarbeit HER3₃₅₆₋₃₆₄- reaktive T- Zell- Klone isoliert, die als Basis für einen T- Zell- Rezeptor- Transfer bei HER3- überexprimierenden Brustkrebspatienten dienen.

1.4 Adoptiver T- Zell- Transfer im Rahmen unserer Forschung

Im Rahmen der zellulären Immuntherapien gibt es zwei Arten der T- Zell- Stimulation, zum einen die *in vivo*- Stimulierung von tumorspezifischen T- Zellen durch Injektion antigenbeladener APCs oder immunodominanter Peptide (Panelli et al. 2000:487; Phan et al. 2003:349) oder die *in vitro*- Stimulation und –Expansion tumorspezifischer T- Zellen mit Ziel eines adoptiven T- Zell- Transfers (Bernhard et al. 2008:271; Rosenberg et al. 2009:233).

Im Rahmen unserer Forschungsmodelle haben wir den Focus auf den adoptiven T- Zell- Transfer gelegt. Wie in Abb. 1 gezeigt, werden tumorreaktive zytotoxische CD8⁺ T- Zellen aus dem Blut eines Tumorpatienten isoliert, *in vitro* mit ausgereiften antigenbeladenen DCs einige Male stimuliert, kloniert und expandiert und nach gründlicher Prüfung in Funktionstests dem Patienten wieder zurückgegeben. Das Ziel dabei ist, dass die reinfundierten aktivierten, zytotoxischen T- Zellen *in vivo* das prozessierte Tumorantigen in Kontext mit HLAs auf der Oberfläche von Tumorzellen erkennen und daraufhin die Tumorzellen töten.

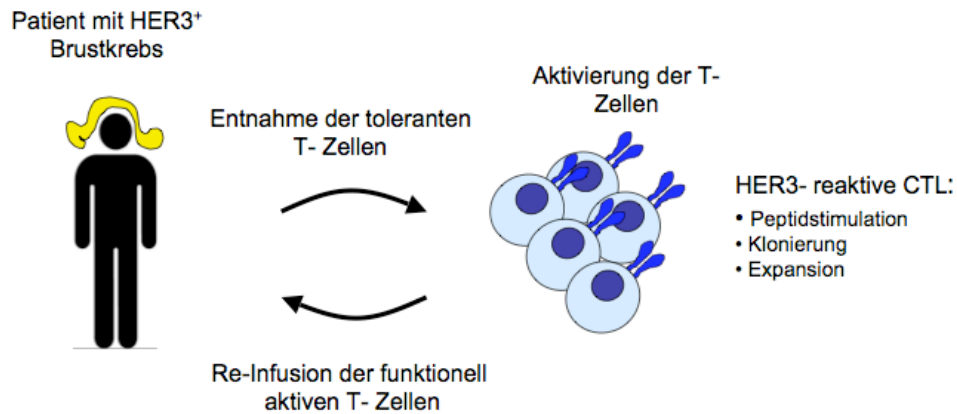


Abb. 1 Adoptiver Transfer von HER3- spezifischen T- Zellen (Bernhard et al., *Cancer Immunology Immunotherapy* 2008)

In jüngsten Studien hat sich nun gezeigt, dass der adoptive Transfer von autologen T-Zellen, die mit einem T- Zellrezeptor gegen ein ausgewähltes tumorassoziertes Antigen transduziert wurden, eine viel versprechende Alternative zum adoptiven Transfer autologer T-Zell-Klone darstellt (Meyerhuber et al. 2010:1118; Schumacher 2002:518). Auch unsere Forschungsgruppe hat im Rahmen ihrer Arbeit mit HER2₃₆₉₋₃₇₇- spezifischen T- Zellen festgestellt, dass die Isolierung antigenspezifischer zytotoxischer T- Zell-Klone pro Patient sehr zeitaufwändig (Conrad et al. 2008:8143) und mit einer geringen Reproduzierbarkeit behaftet ist. Außerdem wurden oft niedrigavide T- Zellen generiert, die eine schwache Tumorerkennung und eine geringe Überlebenszeit *in vivo* aufwiesen (Bernhard et al. 2008:276). Wie in Abb. 2 gezeigt, werden zytotoxische antigenspezifische T- Zellen, in diesem Fall HER3₃₅₆₋₃₆₄- reaktive T- Zellen eines Spenders, isoliert, die eine hohe Avidität zu dem Antigen und gute Tumorerkennung und – lyse aufweisen (s. Ergebnisse). Daraufhin wird der T- Zell- Rezeptor dieser hochaviden T- Zellen isoliert und in einen retroviralen Vektor kloniert (Engels et al. 2003:1155; Meyerhuber et al. 2010:1114; Sommermeyer et al. 2006:3057-3058), so dass ein retroviraler T- Zell- Rezeptor Gen- Transfer in primäre T- Lymphozyten der Tumorpatienten möglich wird. Abschließend

werden die konstruierten T- Zellen des Patienten einer funktionellen Prüfung unterzogen und im Rahmen eines adoptiven Transfers dem Tumorpatienten zurückgegeben.

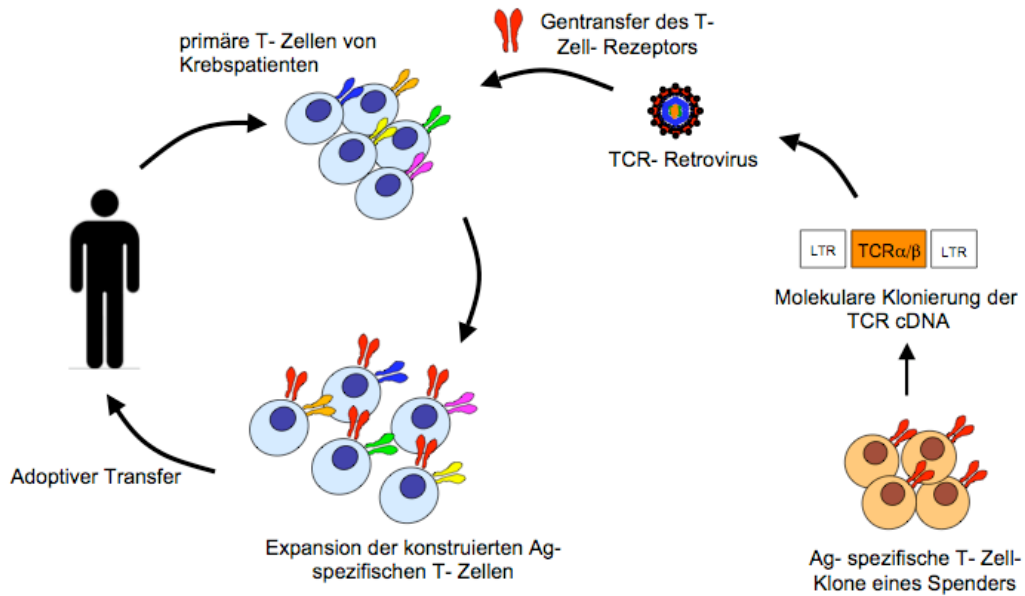


Abb. 2 Schema des adoptiven T- Zell- Rezeptor- Transfers

2 Ziele der vorliegenden Arbeit

Der Typ 1 Wachstumsfaktorrezeptor HER3 wird in verschiedensten Tumorarten überexprimiert, v. a. konnten Expressionen von ErbB3 in bis zu 52% der Mammakarzinome nachgewiesen werden, was mit einer schlechten Prognose der Patienten einhergeht (Hamburger 2008:226; Witton et al. 2003:292). Dadurch ist HER3 ein geeignetes tumorassoziiertes Antigen für neue Therapiestrategien. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Generierung HER3₃₅₆₋₃₆₄-spezifischer tumorlytischer CD8⁺ T- Zell- Klone. Diese T- Zell- Klone sollen dabei als T- Zell- Rezeptor- Reservoir dienen, wobei die TCR in primäre T- Zellen von HER3-überexprimierenden Brustkrebspatienten in fortgeschrittenen Stadien mittels Gentransfer gebracht werden. Innerhalb einer klinischen Studie sollen diese HER3- TCR⁺ CD8⁺ T- Zellen dem Patienten im Rahmen eines T- Zell- Rezeptor- Transfers reinfundiert werden.

Die Grundvoraussetzung zur Generierung von T- Zell- Klonen war die Stimulation der HLA-A2⁺ CD8⁺ T- Zellen mit ausgereiften, funktionstüchtigen HLA-A2⁺ dendritischen Zellen, die mit dem neu von unserer Arbeitsgruppe definierten HLA-A2- restringierten HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid beladen worden waren.

Zur funktionellen Charakterisierung der HER3- reaktiven T- Zell- Klone im Hinblick auf Ihre tumorlytische Aktivität wurden verschiedene Zelllinien verwendet: Zwei HLA-A2⁺ HER3-überexprimierende Mammakarzinomzelllinien und drei HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanomzelllinien.

Momentan werden die HER3₃₅₆₋₃₆₄- spezifischen T- Zell- Rezeptoren isoliert und kloniert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen

2-Amino-9-Ethylcarbazol-(AEC-)Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Assay diluent	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Aqua ad iniectabilia, steril	Braun, Melsungen
Aqua Spüllösung	Delta Select, Pfullingen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Deisenhofen
Ficoll	Biochrom GmbH, Berlin
Heparin, Liquemin®	Roche, Grenzach-Whylen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumacetat	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumcarbonat	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
Natriumhydrogencarbonat	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Schwefelsäure	Fluka-Chemie, Deisenhofen
TMB Substrate Reagent Set	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.2 Radioaktive Substanzen

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

3.1.3 Medien und Supplemente für die Zellkultur

AB-Serum	Valley Biomedical, Winchester, VA, USA
AIM V	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Humanes β 2-Mikroglobulin	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Cyclosporin A, Sandimmun®	Novartis, Nürnberg
DMEM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
G 418	PAA, Pasching, Österreich
Rekombinanter humaner Granulozyten- Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	Cell Genix, Freiburg
Interferon- γ	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
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
Penicillin/ Streptomycin Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Minprostin 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

3.1.4 Peptide

HER1 ₃₆₄₋₃₇₂ SISGDLHIL	Biosyntan, Berlin
HER2 ₃₆₉₋₃₇₇ KIFGSLAFL	"

HER3 ₃₅₆₋₃₆₄ KILGNLDFL	"
HER4 ₃₆₁₋₃₆₉ KINGNLIFL	"
HIVpol ₄₇₆₋₄₈₄ ILKEPVHGV	"

3.1.5 Antikörper

Anti-human CD3 (=Orthoclone OKT3)	Janssen-Cilag-GmbH, Neuss
Anti-human CD8, FITC-konjugiert	Caltag Laboratories, Bangkok, Thailand
Anti-human c-Erb B2/c-Neu (Ab 5), unkonjugiert	Calbiochem, Merck Biosciences, Darmstadt
Anti-human c-erbB-2/HER-2/neu	"
Ab-20 (L87 + 2ERB19) unkonjugiert	"
Anti-human c-Erb B3 (Ab-4), unkonjugiert	"
Anti-human c-Erb B4 (Ab-1), unkonjugiert	"
Anti-human IgG, unkonjugiert	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-human IgG _{2b} , FITC-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Anti-HLA-A2, FITC-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Anti-human Interferon- γ , mAb 1-D1K	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Antihuman Interferon- γ , mAb 7-B6-1-Biotin	Mabtech Nacka Strand, Schweden
Anti-mouse Fab, FITC-konjugiert	Zymed, San Francisco, USA
F(ab)2 Fragment Anti-mouse IgG (H+L), PE-konjugiert	Immunotech, Marseille, Frankreich

3.1.6 Tetramere

HER2 ₃₆₉₋₃₇₇ -Tetramer	Klinikum rechts der Isar, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, AG Dirk Busch, München
HER3 ₃₅₆₋₃₆₄ -Tetramer	"
HER4 ₃₆₁₋₃₆₉ -Tetramer	"
MelanA ₂₆₋₃₅ -A27L-Tetramer	"

3.1.7 Zelllinien

3.1.7.1 Adhärente Zellen

MCF7	HLA-A2 ⁺ HER3-positive Mammakarzinomzelllinie
KS 24.22	HLA-A2 ⁺ HER3-positive Mammakarzinomzelllinie
MDA-MB-468	HLA-A2 ⁻ HER3-positive Mammakarzinomzelllinie
SK-MEL-29	HLA-A2 ⁺ HER3-positive Melanomzelllinie
SK-MEL-37	HLA-A2 ⁺ HER3-positive Melanomzelllinie
NW-MEL-38	HLA-A2 ⁺ HER3-positive Melanomzelllinie
MUC-MEL-1	HLA-A2 ⁻ HER3-positive Melanomzelllinie

3.1.7.2 Suspensionszellen

InRi-LCL	EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinie
Sven-LCL	EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinie
SuHi-LCL	EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinie
T2	HLA-A2-positive, TB lymphoblastoide Hybridzelllinie, TAP-defizient

3.1.8 Kitsysteme

BD OptEIA™ Human IFN- γ ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD8 ⁺ T Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Streptavidin-HRP-PQ	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
IOTest® Beta Mark TCR V β Repertoire Kit	Immunotech, Marseille, Frankreich

3.1.9 Standardgeräte

Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
Caesium 137-Strahlenquelle (33300 GBq)	Buchler, Braunschweig
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Wipperfürth

Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen
Durchflusszytometer (EPICS®XL)	Beckman-Coulter, Krefeld
Elisa Reader sunrise	TECAN, Crailsheim
ELISpot-Kamera, DX 950P	Sony, Japan
ELISpot-Mikroskop, Axioplan 2	Zeiss, Hallbergmoos
KS ELISpot, Version 4.1.103	Zeiss, Hallbergmoos
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
MACS Preparation Column	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
pH-Meter Φ32	Beckman, Fullerton, USA
Sterile Werkbank HERA safe	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

3.1.10 Standardlösungen und -puffer

Coating-Puffer (ELISA):	8,4 g Natriumhydrogencarbonat 3,56 g Natriumcarbonat ad 1 l A.d.
Erythrozyten-Lyse-Puffer:	8,3 g Ammoniumchlorid 1,0 g Kaliumcarbonat 37 mg EDTA
FACS-Puffer:	1% BSA in PBS

MACS-Puffer:	1 x PBS (pH 7,2) 0,5% BSA 2 mM EDTA
Stopp-Lösung (ELISA):	2 N Schwefelsäure

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Allgemeine Zellkultur

3.2.1.1.1 Kultivierung verschiedener Zelllinien

DMEM Medium: DMEM, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 10% FCS

RPMI-Medium: RPMI, 1% (v/v) Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 10% FCS

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank.

Die adhärenenten Zelllinien wurden in DMEM-Medium gehalten. Bei einer Konfluenz von ungefähr 90% erfolgte die Ablösung der Zellen durch enzymatischen Abbau mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung. Dazu wurden die Zellen erst mit sterilem, auf Raumtemperatur gebrachtem 1x PBS gewaschen und dann 5-20 min mit 3-5 ml 1x Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Zelllinien bei Ablösung sofort weiter verarbeitet wurden, denn bei einer zu langen Inkubation wird die Zellmembran zusätzlich mit angedaut und somit die Zelle zerstört. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt, dann folgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 340 x g. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in gewünschter Zahl und Verdünnung in neuen Kulturflaschen ausgesät.

Die Suspensionszellen - EBV-transformierte B-Zellen und T2 Zellen - wurden in RPMI-Medium kultiviert.

Bei IFN- γ -Vorbehandlung wurden dem Medium der jeweiligen Zelllinien zwei Tage vor den spezifischen funktionellen Tests 100U/ml IFN- γ zugesetzt. Vor Benutzung der behandelten Zellen in einem funktionellen Test wurden diese 3x gewaschen.

3.2.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Reichert, New York, USA). Dazu wurden 50 μ l 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 dunkelblau anfärbt, können diese von intakten, vitalen nicht gefärbten Zellen unterschieden werden. Die Zellen in den vier vorgegebenen Quadraten wurden ausgezählt und dadurch konnte die Zellkonzentration pro Milliliter ermittelt werden, indem die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert wurde.

3.2.1.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfriermedium: 90% Humanalbumin, 10% DMSO

Die einzufrierenden Zellen wurden gezählt und abzentrifugiert, danach wurden je nach Zelltyp 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, bei -80°C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Aufgetaut wurden Zellen entweder im 37°C Wasserbad oder in der Hand, danach wurden sie in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.2.1.2 Spezielle Zellkultur

3.2.1.2.1 Isolierung von PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)

Erythrozyten-Lyse-Puffer: 8,3 g Ammoniumchlorid, 1,0 g Kaliumcarbonat, 37 mg EDTA

PBMC aus peripherem Blut wurden mittels einer Zwei-Phasen-Dichtegradientenzentrifugation durch Ficoll® von den dichteren Granulozyten, Erythrozytenkomplexen und toten Zellen getrennt. Dazu wurden jeweils 15 ml heparinisieretes Spenderblut in einem 50 ml Röhrchen 1:2 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 befanden sich mit den Lymphozyten in einem Interphasering zwischen den sedimentierten dichteren Zellen sowie Ficoll® und einem Gemisch aus Plasma und PBS. Sie wurden vorsichtig abpipettiert, anschließend zweimal mit 1x PBS gewaschen (Zentrifugationen: 515 x g, 15 min; 340 x g, 10 min) und danach in einem 50 ml Röhrchen gepoolt. Zum Entfernen eventuell noch vorhandener Erythrozyten wurde eine fünf- bis zehnminütige Inkubation in 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer durchgeführt. Dann wurden die Zellen noch einmal in 1x PBS aufgenommen und 5 min bei 340 x g zentrifugiert.

3.2.1.2.2 Generierung von Monozyten-derivierten DC

Monozyten-RPMI-Medium: RPMI, 1% (v/v) Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1% AB-Serum

X-VIVO-Medium: X-VIVO 15, 1% (v/v) Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1% AB-Serum

Dadurch, dass Monozyten die Eigenschaft besitzen an eine Plastikoberfläche zu adhären, können sie aus einer PBMC-Präparation von den übrigen mononukleären Zellen getrennt werden (Zhou et al. 1995:3822) und in dendritische Zellen differenziert werden. Die Differenzierung der Monozyten in unreife dendritische Zellen erfolgt mittels Zugabe von IL-4 und GM-CSF zum Medium für 6 Tage. Durch Zugabe weiterer, proinflammatorischer Zytokine an Tag 7 reifen die DCs aus. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete „Ausreifungscocktail“ wurde von Jonuleit (1997:3135) entwickelt.

PBMC wurden in einer Zelldichte von 1×10^7 /Loch in jeweils 3 ml Monozyten-RPMI-Medium in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurden die nicht-adhären Zellen zweimal mit Medium abgespült und verworfen. Die adhären Zellen wurden erneut in 3 ml Monozyten-RPMI-Medium für mindestens 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach abschließendem Abspülen wurde X-VIVO, ein spezielles Lymphozyten-Medium, inklusive der Zytokine GM-CSF (800U/ml) und IL-4 (1000U/ml) hinzugefügt. In der nun folgenden,

einwöchigen Differenzierungsphase wurden den Zellen alle zwei Tage 1 ml X-VIVO-Medium plus 1600U GM-CSF und 1000U IL-4 zugefügt. Die Differenzierung der Monozyten in unreife DC war zum einen makroskopisch durch Lösung von der Plastikoberfläche erkennbar und zum anderen mikroskopisch durch ein verändertes Erscheinungsbild im Sinne von dendritischen Ausläufern. An Tag 7 wurden die unreifen DC geerntet, gepoolt und gezählt und anschließend in einer Zelldichte von 5×10^5 /Loch mit 4 ml X-VIVO-Medium inklusive 800U/ml GM-CSF und 500U/ml IL-4 in neue 6-Loch-Platten ausgesät. Etwa 4 h später wurden die Reifungszytokine IL-1 β (10ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-6 (1000U/ml) und PGE-2 (1 μ g/ml) addiert. Nach 2 Tagen ist die Ausreifung erfolgt, wie die Expression von Oberflächenmolekülen wie CD80, CD86, HLA-DR und besonders CD83 zeigt.

3.2.1.2.3 Peptidbeladung von Zellen

Zur Peptidbeladung von DCs wurden nur ausgereifte eingesetzt, die dadurch für das „Priming“ von T-Zellen zuständig sind. Die Beladung von DCs erfolgte dadurch, dass sie 2 h bei RT in 1 ml RPMI plus Peptid und je 10 μ g β 2-Mikroglobulin inkubiert wurden, beim „Priming“ mit 1 μ g HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid, bei der Restimulation mit 500ng. Dazwischen wurden die Zellen alle 20 min aufgeschüttelt und danach 3x mit Medium gewaschen.

Peptidbeladene T2-Zellen dienen als Target Zellen für verschiedene funktionelle Tests. Hierbei wurden sie 1 h bei RT in 1 ml RPMI plus 10 μ g Peptid und 10 μ g β 2-Mikroglobulin inkubiert und anschließend 3x mit Medium gewaschen.

3.2.1.2.4 CD8-Isolierung

MACS-Puffer: 45 ml 1 x PBS + 5 ml 5% BSA → - 0,5 ml + 0,5 ml 200mM EDTA

Vor dem „Priming“ werden CD8⁺ T-Zellen aus PBMC über eine MACS-Säule (Miltenyi) „untouched“ isoliert. Das bedeutet, dass alle CD8-negativen Zellen durch magnetisch beladene monoklonale Antikörper depletiert werden.

Die PBMC wurden gezählt und in MACS-Puffer 10 min bei 340 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pipette komplett entfernt und 40 μ l MACS-Puffer und 10 μ l Biotin-Antibody Cocktail pro 10^7 Zellen zugegeben. Danach wurden die Zellen gut gemischt 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 30 μ l MACS-Puffer und 20 μ l 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 $340 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder komplett entfernt und das Pellet dann in $500 \mu\text{l}$ 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 $500 \mu\text{l}$ Zellsuspension wurden pro Säule draufgegeben 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.

3.2.1.2.5 „Priming“ und Restimulation von CD8^+ T-Zellen

AIM V-T-Zellmedium: AIM V, 5 % humanes AB-Serum, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1% (v/v) Glutamin

Für die Stimulation von T-Zellen wurden 96-Loch-Rundbodenplatten verwendet, da diese durch ihre geringe Fläche zum einen eine optimale Interaktion zwischen DC und T-Zelle ermöglichen. Zum anderen können relativ wenige T-Zellen eingesetzt werden, so dass die Gefahr der Überwucherung spezifischer durch unspezifische T-Zellen verringert ist.

Pro Loch wurden 1×10^5 frisch über die MACS-Säule isolierte CD8^+ T-Zellen in $100 \mu\text{l}$ AIM V-T-Zellmedium inklusive 10ng/ml IL-12 und 1000U/ml IL-6 eingesetzt. Anschließend wurden 5×10^3 HER3₃₅₆₋₃₆₄ peptidbeladene allogene DC im gleichen Volumen AIM V-T-Zellmedium inklusive Zytokine addiert. IL-12 wird von reifen DC sezerniert und ist u.a. für das „Priming“ von CD8^+ T-Zellen wichtig. Außerdem wird IL-6 von T-Zellen produziert und u.a. für die T-Zell Proliferation und Differenzierung benötigt.

Eine Woche später wurden die CD8^+ T-Zellen mit 500ng/ml HER3₃₅₆₋₃₆₄ peptidbeladenen allogenen HLA-A2⁺ DC restimuliert, die in $100 \mu\text{l}$ AIM V-T-Zellmedium inklusive 5ng/ml IL-7 und 100U/ml IL-2 zugeführt wurden. IL-7 wird zur Apoptoseinhibition von speziell frühen T-Zell Populationen eingesetzt, während IL-2 für die Proliferation von T-Zellen zuständig ist. Spezifitätsanalysen wurden jeweils sieben Tage nach einer Restimulation durchgeführt.

3.2.1.2.6 T-Zellklonierung

T-Zellmedium: RPMI, 10% AB-Serum, 1% (v/v) Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

Klonierungen wurden mit in Spezifitätsanalysen positiv getesteten T-Zellen in 96-Lochplatten durchgeführt. Das den Klonierungen zu Grunde liegende Prinzip ist das Prinzip der limitierenden Verdünnung. Dabei werden die zu klonierenden Zellen in so großen Volumina an T-Zellmedium aufgenommen, dass nur noch eine statistische Wahrscheinlichkeit von z.B. 1 Zelle pro Loch besteht. Es wurde eine Verdünnung mit 3 Zellen pro Loch eingesetzt. Zusätzlich fügt man 5×10^4 allogene, mit 3000 rad bestrahlte PBMC und 1×10^5 allogene mit 10000 rad bestrahlte LCL als sogenannte Feeder-Zellen in jedes Loch hinzu. Dem Medium wurden 30ng/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 der T-Zellen wird weiterhin durch von den LCL produzierten Zytokine unterstützt. Desweiteren wurden noch 50U/ml IL-2 und 2ng/ml IL-15 zugegeben. Am 7. Tag erfolgte wieder eine Zugabe dieser Zytokine in 100 µl T-Zellmedium nach Abnahme von 100 µl Medium. Die Proliferation potentieller Klone konnte ab dem 12. Tag mikroskopisch überprüft werden. An Tag 14 folgte ein T-Zell-Klon-Screening mittels IFN- γ -ELISpot.

3.2.1.2.7 Expansion von T-Zellen

T-Zellmedium: RPMI, 10% AB-Serum, 1% (v/v) Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

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

3.2.2 Funktionelle Tests

3.2.2.1 ELISpot-Test als Screening Test

T-Zellmedium: RPMI, 10% AB-Serum, 1% (v/v) Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

Zum Screening von Mikroklulturen aus den Löchern der verwendeten 96-Loch-Platten nach der Klonierung wurden ELISpot-Tests zum Nachweis des Zytokins IFN- γ durchgeführt. Die Besonderheit des ELISpots ist, dass Effektor- und Targetzellen direkt in mit einem Fängerantikörper für IFN- γ beschichteten Nitrozellulose-Mikrotiterplatten koinkubiert werden, so dass nach dem Test Zytokin-sezernierende Zellen als Punkte (Spots) sichtbar sind.

In die Löcher der benötigten Nitrozellulose-Mikrotiterplatten wurden je 50 μ l 1x PBS mit 10 μ g/ml anti-IFN- γ 1-D1K-Antikörper pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung dekantiert und die Platten viermal für 15 min mit 1x PBS inkubiert, damit ungebundener Antikörper entfernt werden konnte. Als nächstes wurden je 150 μ l T-Zellmedium zugegeben, um durch das enthaltene Serum unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach 1 h bei 37°C wurde das Medium dekantiert und die 3x gewaschenen T-Zellen aus einem Klonierungsloch in 50 μ l T-Zellmedium pro Loch ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurden je 2 x 10⁴ Targetzellen pro Loch in 50 μ l T-Zellmedium addiert. Anschließend wurden die Platten 20 h im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Platten sechsmal in 1x PBS plus 0,05% Tween gewaschen, wobei sie jeweils 3 min inkubiert wurden. Nach der letzten Inkubation wurden die Platten auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Dann wurden 2 μ g/ml 7-B6-Biotin-Antikörper in 100 μ l 0,5% BSA/1x PBS in jedes Loch pipettiert. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C, anschließend wurden die Platten wieder sechsmal mit 1x PBS plus 0,05% Tween gewaschen. Auf die Platten wurden danach je Loch 100 μ l 0,5% FCS/1x PBS mit 1:100 Streptavidin/Peroxidase gegeben. Durch die Bindung des Streptavidin an das Biotin des Sekundärantikörpers erhält dieser eine Peroxidase-Funktion. Nach 1-2 h Inkubation bei RT wurden die Platten je dreimal mit 0,05% Tween/1x PBS und 1x PBS gewaschen. Das anschließende Waschen mit PBS ist nötig, da Tween die Peroxidase-Reaktion stören würde. Durch Zugabe von je 100 μ l pro Loch Wasserstoffperoxid-aktivierter AEC-Lösung erfolgte eine Farbreaktion, die nach 4 min 30 s durch gründliches Spülen unter fließendem Wasser gestoppt wurde. Nach dem Trocknen können die Spots mit dem ELISpot-Mikroskop und der zugehörigen Software ausgezählt und ausgewertet werden.

3.2.2.2 ⁵¹Cr-Freisetzungstest (Chromium release assay, CRA)

Zur Bestimmung der spezifischen zytolytischen Aktivität der CD8⁺ T-Zellen diente der ⁵¹Cr-Freisetzungstest (Brunner et al. 1968:182). Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass in

$\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ enthaltendem Medium inkubierte Zellen das Natriumchromat aktiv aufnehmen. Werden die Zellen nun mit zytolytischen T-Zellen inkubiert, welche von den HLA-Molekülen der Zellen präsentiertes Peptid erkennen, kommt es zur Lyse der erkannten Zellen und damit zur Freisetzung von $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$. Die vom ^{51}Cr emittierte γ -Strahlung kann nun in einem γ -Counter 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 Targetzellen 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 60-90 min bei 37°C inkubiert. Alle 20 min wurde die Zellsuspension vorsichtig aufgeschüttelt und nach der Inkubation zweimal gewaschen. T2 Zellen wurden anschließend 1 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ eines relevanten bzw. irrelevanten Peptid und β_2 -Mikroglobulin bei RT inkubiert und danach noch einmal gewaschen. Für die Peptidtitration zur Bestimmung der Affinität der Klone wurden die T2 Zellen mit verschiedenen Mengen an Peptid gepulst. Während der Inkubation der Targetzellen wurden je $1,35 \times 10^5$ expandierte CTL-Klone in eine 96-Loch-V-Bodenplatte pipettiert. Danach wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei die Zellen in 5 Schritten jeweils 1:3 verdünnt wurden auf ein Endvolumen von 100 μl Medium. Zur Feststellung der spontanen Freisetzung von ^{51}Cr wurden pro Target 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 Targetzellen und damit zur Freisetzung des gesamten aufgenommenen ^{51}Cr führen sollte. Pro Loch wurden nun 1×10^3 Targetzellen in 100 μl Medium eingesetzt.

Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurden je 30 μl Überstand pro Loch abgenommen und auf eine spezielle Lumineszenzplatte pipettiert. Die freigesetzte ^{51}Cr Aktivität wurde dann im γ -Counter gemessen.

Die Berechnung für die spezifische Lyse lautet folgendermaßen:

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

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.

Zur Bestätigung der Peptidspezifität wurden CTL-Klone vor einem ^{51}Cr -Freisetzungstest mit unmarkierten Zielzellen inkubiert. Dazu wurden T2 Zellen mit dem relevanten bzw. einem irrelevanten Peptid gepulst und im Verhältnis 20:1 für 30 min bei 37°C mit den fraglichen

Effektorzellen inkubiert. Anschließend wurde mit den CTL ein ^{51}Cr -Freisetzungstest mit radioaktiv markierten Zielzellen durchgeführt. Waren die Klone nicht in der Lage die Zielzellen zu lysieren, war dies ein Hinweis darauf, dass sich während der Inkubation mit den unmarkierten Zielzellen ihre Aktivität erschöpft hatte. Wurde dies nur nach Inkubation mit T2 Zellen beobachtet, die mit dem relevanten Peptid gepulst waren, wurde dies als Zeichen für die Spezifität des jeweiligen Klons gewertet.

Bei dem sogenannten „hot/cold target inhibition“ Test wurden die T- Zell- Klone für 30 Minuten mit den HLA-A2- positiven und zuvor mit relevantem bzw. irrelevantem Peptid beladenen T2 Zellen präinkubiert. Dadurch wurde erwartet, dass die T- Zell-Klone in der Inkubationszeit die T2 Zellen mit dem relevanten Peptid, jedoch nicht die T2 Zellen mit dem irrelevanten Peptid erkannten. Danach wurden zusätzlich ^{51}Cr - markierte HLA-A2⁺ HER3⁺ Zelllinien mit in die Kultur gegeben, für 4 Stunden inkubiert und danach wurde die ^{51}Cr - Abgabe in den Überstand gemessen.

3.2.2.3 Zytokinsekretionstest mittels Sandwich-ELISA

T-Zellmedium: RPMI, 10% AB-Serum, 1% (v/v) Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

Coating-Buffer: 8,4 g Natriumhydrogencarbonat, 3,56 g Natriumcarbonat ad 1 l A.d.

Waschpuffer: 0,05% Tween/1x PBS

Stopplösung (2N Schwefelsäure): 5,3 ml Schwefelsäure ad 50 ml A.d.

Die Spezifität von CD8⁺ T-Zellen kann man nicht nur durch Bestimmung der spezifischen Lyse von Targetzellen, sondern auch durch Messen ihrer Zytokinsekretion bei Kontakt mit Targetzellen feststellen. Beim Enzyme-linked Absorbant Assay (ELISA) wird im Gegensatz zum ELISpot die Zytokinsekretion aus dem Überstand von vorher koinkubierten Effektor- und Zielzellen gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bestimmung der IFN- γ - Sekretion bei expandierten T-Zell-Klonen im ELISA durchgeführt. Beim ELISA wird zuerst eine polymere Matrix mit spezifischen Antikörpern beschichtet, dann die Probe dazugegeben, so dass das darin enthaltene Antigen daran binden kann. Nach mehreren Waschschritten wird ein zweiter an ein Enzym gekoppelter Antikörper addiert. Das Enzym kann nun ein zugegebenes Substrat in ein farbiges oder fluoreszierendes Produkt umwandeln, so dass indirekt die Menge des in der Probe vorhandenen Antigens bestimmt werden kann.

1×10^4 Zielzellen, entweder endogen HER3 prozessierende oder mit relevantem bzw. irrelevantem Peptid beladene Zelllinien, wurden für 24 h bei 37°C mit 2×10^4 CTL in 200 µl T-Zellmedium in 96-Loch-Rundbodenplatten koinkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden 120 µl Überstand pro 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 Primärantikörper 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 gewaschen. Anschließend wurden die Platten auf saugfähigem Papier ausgeklopft, mit je 200 µl Assay Diluent/Loch gefüllt und 1 h bei RT inkubiert. Diese Inkubation diente der Blockierung unspezifischer Bindungen. Inzwischen wurden von den IFN- γ Standards je sechs Verdünnungsschritte angesetzt, die von 1200pg/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 im Dunkeln und fünfmaliges Waschen. Anschließend 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 im Dunkeln wurden die Platten siebenmal gewaschen. Zur Färbung wurden pro Loch 100 µl Substratlösung, die aus einer 1:2 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 Schwefelsäure gestoppt. Im ELISA-Reader wurden die Intensitäten der Färbungen bei 450 nm und 570 nm gemessen und die jeweiligen Zytokinkonzentrationen bestimmt.

3.2.2.4 Durchflusszytometrische Messungen (FACS-Analyse)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können innerhalb kurzer Zeit Tausende von Zellen einer Zellpopulation auf ihre Expression bestimmter Oberflächenmoleküle untersucht werden. Dazu werden diese Oberflächenantigene entweder direkt mit an entsprechende Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (direkte Immunfluoreszenz) oder ein erster Antikörper wird von einem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper gebunden (indirekte Immunfluoreszenz). Die Fluorochrome werden im Durchflusszytometer durch einen Argon-Laser angeregt und emittieren Licht spezifischer Wellenlänge. Bei Verwendung in verschiedenen Wellenlängen

fluoreszierender Farbstoffe können deshalb je nach Zytometer mehrere verschiedene Oberflächenmarker analysiert werden. Die Zellen fließen zur Messung einzeln in einem Trägerstrom durch ein Rohr, wobei das emittierte Licht von einem Detektor erfasst wird. Da die Fluoreszenzintensität mit der Menge des Fluorochroms korreliert, kann man auch Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des zu untersuchenden Antigens ziehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden direkte und indirekte FACS („fluorescence-activated cell sorter“) -Messungen auf verschiedene Oberflächenantigene sowie Multimerfärbungen zur Bestimmung der Spezifität von CTL durchgeführt.

3.2.2.4.1 Färbung auf Oberflächenmarker

FACS-Puffer: 1x PBS, 1% BSA, pH 7,4

Für die direkte und indirekte FACS-Messung wurden die zu messenden Zellen geerntet, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 5 min bei 423 x g 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 indirekt markierten Zellen wurden mit 1,5 µl des sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers für weitere 20 min bei 4°C inkubiert und anschließend noch einmal gewaschen. Die Differenz der mittleren Fluoreszenzen (Δ MFI) wurde aus der mittleren Fluoreszenz der jeweiligen Isotypkontrolle und des relevanten Antikörpers errechnet.

3.2.2.4.2 MHC:Peptid-Multimerfärbung

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 gelöst (Altman et al.

1996:94). Die Multimere werden durch die Bindung rekombinanter biotinylierter MHC-Moleküle an ein fluoreszenzmarkiertes Streptavidin, das ein Tetramer mit vier Bindungsstellen für Biotin ist, hergestellt.

Zur Tetramerfärbung wurden je 5×10^5 zuvor mit FACS-Puffer gewaschene T-Zellen mit dem relevanten bzw. einem irrelevanten Phycoerythrin(PE)-markierten MHC:Peptid-Tetramer im Verhältnis 1:40 in 50 μ l FACS-Puffer 60 min in einer 96-Loch-Rundbodenplatte auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde anti-CD8-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) im Verhältnis 1:100 zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis, wurden die Zellen dreimal in FACS-Puffer gewaschen, dann in 500 μ l FACS-Puffer plus 2 μ g/ml Propidiumjodid (PI) resuspendiert und am Durchflusszytometer gemessen. Die Färbung mit dem rotfluoreszierenden Propidiumjodid dient der Markierung toter Zellen, da es durch deren defekte Zellmembranen eindringen und sich in die DNS der Zellkerne einlagern kann.

3.2.2.4.2.1 Sortierung im Durchflusszytometer

Die Färbung mit MHC:Peptid-Multimeren kann auch zur Sortierung spezifischer T-Zellen im Durchflusszytometer verwendet werden. Diese Färbung wird in diesem Fall unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Für die Kompensation wurden jeweils 1×10^5 T-Zellen in 100 μ l FACS-Puffer mit anti-CD8-FITC oder dem PE-markierten MHC:Peptid-Multimer gefärbt bzw. ungefärbt belassen. Der Rest der Zellen wurde in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen und mit 10 μ l Multimer und 5 μ l anti-CD8-FITC gefärbt. Zur Sortierung wurden die Kontrollzellen in 200 μ l, die zu sortierenden Zellen in 1000 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Nach der Sortierung wurden die spezifischen T-Zellen in T-Zellmedium aufgenommen und kloniert. Überzählige Zellen wurden expandiert.

3.2.2.4.3 TCR-V β -Analyse

Eine Möglichkeit, eine poly- oder oligoklonale von einer monoklonalen T-Zellproliferation zu unterscheiden, ist die Analyse der variablen Region ihrer β -Ketten (V β) mittels monoklonaler Antikörper im Durchflusszytometer. Es gibt 65 V β -Segmente im β -Genlocus (Rowen et al. 1996:1755), von denen jeweils nur ein einziges zufällig während der T-Zellontogenese „ausgewählt“ wird. Die Bestimmung des V β -Motivs ist also eine sehr geeignete Methode zur

Untersuchung des Klonalitätsgrades, welche bei den klonierten Zellen in dieser Arbeit angewendet wurde.

Zur Analyse wurde das IOTest[®] Beta Mark TCR V β Repertoire Kit verwendet. Das Kit deckt 24 verschiedene Spezifitäten des normalen humanen T-Zellrepertoires ab. Für die zu testenden T-Zellen werden jeweils 9 Röhrchen vorbereitet. In das Kontrollröhrchen wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen pipettiert, mit FACS-Puffer gewaschen und 10 μ l anti-CD3-PC5 in 100 μ l FACS-Puffer addiert. In die Teströhrchen wurde die gleiche Anzahl an Zellen pipettiert und mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 10 μ l anti-CD3-PC5 und 20 μ l der entsprechenden Reagenzien pro Röhrchen zu 100 μ l FACS-Puffer addiert, die drei entweder mit FITC, PE oder FITC/PE markierte Antikörper enthalten. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal gewaschen, in Propidiumjodid aufgenommen und gefacst.

3.2.2.5 HLA-A2 Transfektion von Zelllinien

1. Einen Tag vor Transfektion der adhärennten Zelllinie (in diesem Fall MDA-MB-468) wurde die zu transfizierende Zelllinie mit einer Zellzahl von $0,5-2 \times 10^5$ Zellen in einer 24-well-Platte in 500 μ l Medium ohne antibiotischen Zusatz ausgesät. Dadurch soll gewährleistet sein, dass am Tag der Transfektion ca. 90-95% der Fläche pro well mit Zellen bedeckt sind.

2. Am Tag der Transfektion wurde pro well folgende Suspension hergestellt:

a. DNA (in μ g) wird in einer Ratio von 1:2 bis 1:3 zum Lipofectamine[®] 2000 Transfektionsreagenz mit 50 μ L Opti-MEM[®] I Medium ohne Serum verdünnt und danach vorsichtig gemischt.

b. Lipofectamine[®] 2000 Transfektionsreagenz vorsichtig mit 50 μ L Opti-MEM[®] I Medium ohne Serum zusammen pipettieren und für 5 min bei RT inkubieren.

c. Anschließend wird die DNA aus a. mit dem verdünnten Lipofectamine[®] 2000 Transfektionsreagenz aus b. zusammen gegeben (Gesamtvolumen = 100 μ L), vorsichtig gemischt und für 20 min bei RT inkubiert.

Achtung: Der entstandene Komplex ist nun für 6 Stunden bei RT stabil.

3. Die 100 μ L des entstandenen Komplexes werden pro well in der 24-well-Platte zu den Zellen dazugegeben und durch vorsichtiges Vor- und Zurückbewegen der Platte miteinander vermischt.

4. Anschließend Inkubation der Zellen bei 37°C im Brutschrank für 18–48 Stunden. Das Medium sollte nach 4–6 Stunden erneuert werden.

Zum Nachweis der HLA-A2-Expression wurde eine FACS-Analyse durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsanalysen von HLA-A2 und HER3 von Tumorzelllinien

Zur funktionellen Testung der HER3₃₅₆₋₃₆₄-reaktiven T-Zell-Klone benötigt man Zelllinien, die das HER3-Protein überexprimieren. Das heißt, diese Zellen amplifizieren und translatieren vermehrt das HER3-Gen, woraufhin das HER3-Protein vermehrt prozessiert und (als Nonamere) über MHC-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert wird. Da dieser Mechanismus typischerweise in Krebszellen (speziell Mammakarzinomzellen) vorhanden ist, wurden Krebszelllinien als Zielzellen für die HER3₃₅₆₋₃₆₄-spezifischen T-Zellen verwendet. Zum Nachweis der HER3-Überexpression und der HLA-A2-Expression in den Krebszelllinien wurde eine durchflusszytometrische FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit einem spezifischen, fluoreszenzmarkierten, monoklonalen Antikörper gegen HER3 oder HLA-A2 in einem Zellzähler einzeln auf ihre HER3-/HLA-A2-Expression auf der Zelloberfläche gemessen (Abb. 3, 4). Als Zielzellen wurden folgende HER3-positive Krebszelllinien benutzt:

- KS 24.22 (HLA-A2⁺ HER3⁺ Mammakarzinomzelllinie)
- MCF7 (HLA-A2⁺ HER3⁺ Mammakarzinomzelllinie)
- SK-MEL-29 (HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanomzelllinie)
- SK-MEL-37 (HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanomzelllinie)
- NW-MEL-38 (HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanomzelllinie).

Als Negativkontrolle zu den HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanomzelllinien wurde die HLA-A2⁻ HER3⁺ Melanomzelllinie MUC-MEL-1 in den Tests mitgeführt, zu den HLA-A2⁺ HER3⁺ Mammakarzinomzelllinien wurde die HLA-A2⁻ HER3⁺ Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 als Negativkontrolle benutzt (Abb. 3, 4). In Tabelle 1 sind die Δ MFI Daten der Zelllinien auf ihre HER3- und HLA-A2-Expression zusammengestellt, welche die Intensität der Fluoreszenz angibt, die bei der jeweiligen Zelllinie im Mittel gemessen wird (Tab. 1).

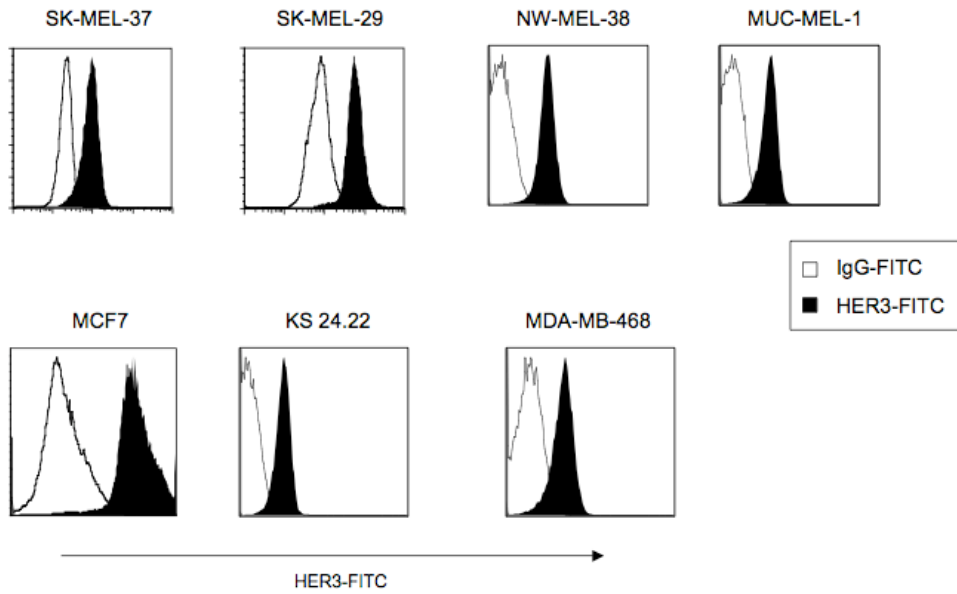


Abb. 3 HER3- Expression verschiedener Zelllinien FACS- Analysen von den HER3 positiven Melanomzelllinien SK-MEL-37, SK-MEL-29, NW-MEL-38 und MUC-MEL-1 und den Mammakarzinomzelllinien MCF7, KS 24.22 und MDA-MB-468

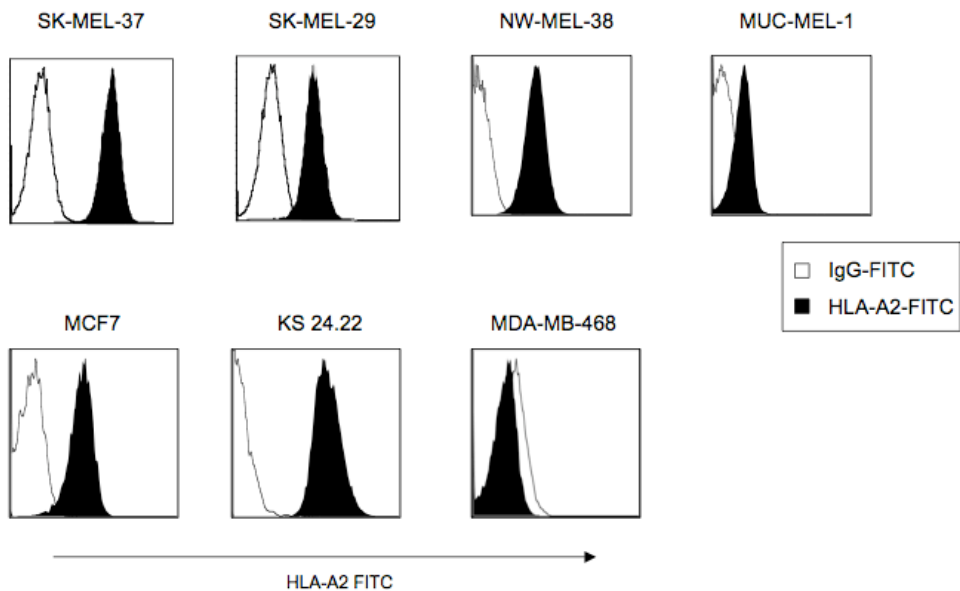


Abb. 4 HLA-A2-Expression verschiedener Zelllinien FACS-Analysen von den HLA-A2 positiven Melanomzelllinien SK-MEL-37, SK-MEL-29 und NW-MEL-38 und den Mammakarzinomzelllinien MCF7 und KS 24.22. Die beiden Zelllinien MUC-MEL-1 und MDA-MB-468 sind HLA-A2 negativ und wurden als Negativkontrollen verwendet.

Tab. 1 HLA-A2- und HER3₃₅₆₋₃₆₄-Expressionen verschiedener Zelllinien

	Expression (Δ MFI)	
	HER3	HLA-A2
A2 ⁺ HER2 ⁺ HER3 ⁺ MCF7	294	342
A2 ⁺ HER2 ⁺ HER3 ⁺ KS 24.22	244	489
A2 ⁺ HER3 ⁺ MDA-MB-468	243	0
A2 ⁺ HER3 ⁺ NW-MEL-38	373	407
A2 ⁺ HER2 ⁺ HER3 ⁺ SK-MEL-29	229	498
A2 ⁺ HER2 ⁺ HER3 ⁺ SK-MEL-37	298	635
A2 ⁺ HER3 ⁺ MUC-MEL-1	311	191

4.2 Stimulierung HER3- spezifischer HLA-A2⁻ zytotoxischer T- Lymphozyten mit peptidbeladenen allogenen HLA-A2⁺ DC

Bei HLA-A2 positiven Spendern werden hochaffine A2-restringierte T-Zellen gegen HER3 schon im Thymus deletiert, da HER3 auch auf normalem Gewebe exprimiert wird. Um dieses Problem zu umgehen, wurden T-Zellen eines HLA-A2 negativen Spenders zur Stimulierung benutzt. Allerdings ist die natürliche T- Zell- Frequenz im Blut oft zu gering um sie zu isolieren, weshalb T-Zellen *in vitro* mit antigenpräsentierenden Zellen stimuliert werden, um deren Frequenz zu erhöhen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgte die zweimalige Stimulation HLA-A2⁻ CD8⁺ T- Zellen mit HLA-A2⁺ DC, die zuvor mit verschiedenen Konzentrationen an HER3₃₅₆₋₃₆₄ – Peptid beladen worden waren. Wichtig dabei ist, dass die übrigen HLA- Allele zwischen T- Zell und DC- Spender ziemlich übereinstimmen, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Eine Woche nach der Restimulation wurden die Zellen vermischt und mit dem HLA-A0201/HER3₃₅₆₋₃₆₄- Multimer gefärbt. In der Kultur ließen sich 0,06% HER3⁺ CD8⁺ spezifische T- Zellen anfärben, die anschließend sortiert wurden (Abb. 5a). Nach der Sortierung wurden die CTL (zytotoxische T-Zellen) in einer Verdünnungsreihe kloniert und 14 Tage später konnten 83

potentielle T- Zell- Klone zur Identifizierung in einem IFN- γ -ELISpot auf ihre IFN- γ -Sekretion getestet werden. Als Zielzellen wurden dabei HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- bzw. HER3₃₅₆₋₃₆₄- peptidbeladene T2 Zellen sowie HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanomzelllinien SK-MEL-29 bzw. SK-MEL-37 eingesetzt (Abb. 5b).

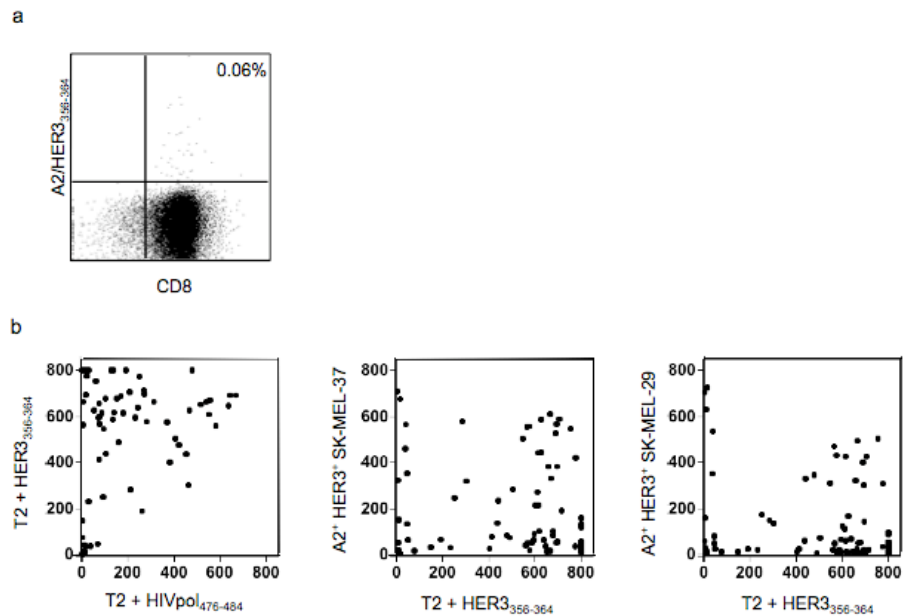


Abb. 5 Generierung HER3₃₅₆₋₃₆₄- spezifischer zytotoxischer T- Zell- Linien durch Stimulation mit HER3₃₅₆₋₃₆₄-beladenen HLA-A2⁺ DCs. (a) Tetramerkfärbung der T- Zell- Kultur auf HER3₃₅₆₋₃₆₄ nach zwei Stimulationen. (b) Suchtest der T- Zell- Kultur mittels IFN- γ -ELISpot auf HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- bzw. HER3₃₅₆₋₃₆₄-Peptid beladenen T2 Zellen und HLA-A2⁺HER3⁺ Melanomzelllinien SK-MEL-29 und SK-MEL-37

Es konnten acht T- Zell- Klone expandiert werden, die sowohl die mit HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid beladenen T2 Zellen als auch die HLA-A2⁺ HER3⁺ Tumorzelllinien erkannten. Außerdem wurden zusätzlich zwei peptidspezifische T- Zell- Linien als Kontrolle expandiert, d. h. diese T- Zell- Klone erkannten nur die mit HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid beladenen T2 Zellen, die Melanomzelllinien wurden jedoch nicht erkannt (Abb. 6).

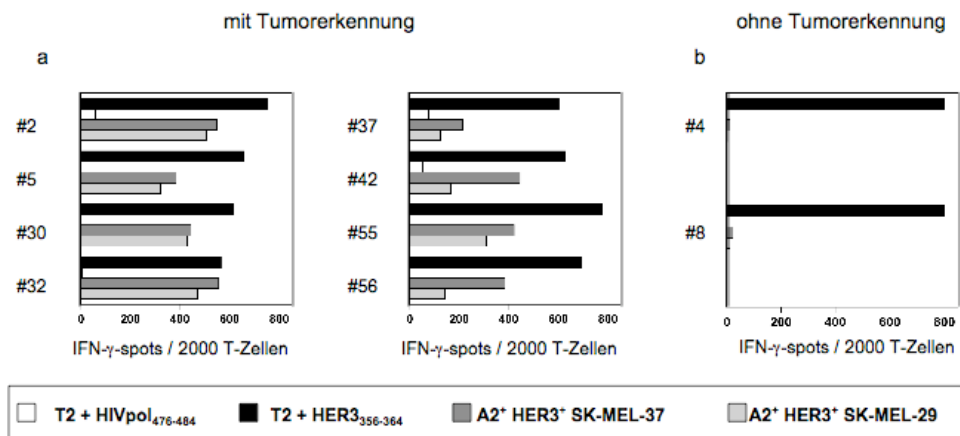


Abb. 6 Unterschiedliche Tumorerkennung der HER3- reaktiven CD8⁺ Klone nach erster Expansion im IFN-γ-ELISpot. (a) Acht tumorspezifische CTL- Klone erkennen die Tumorzelllinien SK-MEL-29 und SK-MEL-37 (b) Zwei T- Zell- Klone sind nur HER3₃₅₆₋₃₆₄- peptidspezifisch und erkennen keine Melanomzelllinien

Die fünf HER3- reaktiven T- Zell- Klone, die die höchste Tumor- und Peptiderkennung zeigten, wurden nun für alle nachfolgenden Funktionsteste eingesetzt, T- Zell- Klone #5, #30, #37, #42 und #56.

4.3 Die alloreaktiven HER3⁺ CD8⁺ Klone sind A2/HER3₃₅₆₋₃₆₄- Multimer positiv mit einer geringen Kreuzreaktivität zu dem A2/HER2₃₆₉₋₃₇₇- Multimer

Sowohl alle tumorspezifischen (z. B. CTL- Klon #30), als auch die peptidspezifischen T- Zell- Klone (z. B. CTL- Klon #83) ließen sich mit dem HLA-A0201/HER3₃₅₆₋₃₆₄- Multimer anfärben (Abb. 7).

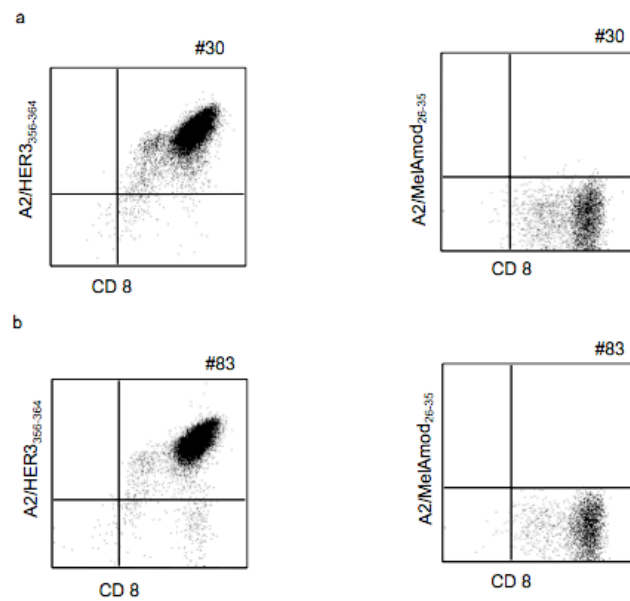


Abb. 7 HER3₃₅₆₋₃₆₄- Tetramerfärbung der HER3₃₅₆₋₃₆₄- spezifischen T- Zell- Klone.
 (a) Der tumorspezifische CTL- Klon #30 und (b) der peptidspezifische Klon #83 lassen sich mit dem HER3₃₅₆₋₃₆₄- Multimer anfärben

Wie am Beispiel von dem tumorspezifischen T- Zell- Klon #30 gezeigt, können die HER3-spezifischen T- Zell- Klone zudem mit einem HLA-A0201/HER2₃₆₉₋₃₇₇- Multimer minimal angefärbt werden, jedoch zeigte sich keine spezifische Anfärbung mit dem HLA-A0201/HER4₃₆₁₋₃₆₉- Tetramer (Abb. 8).

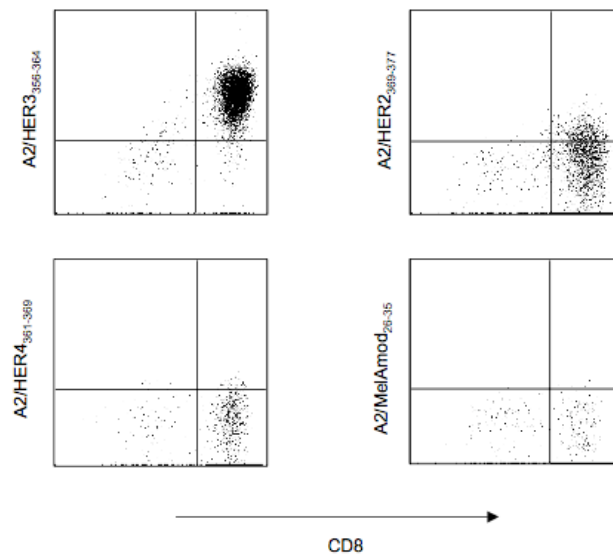


Abb. 8 Kreuzreaktivität zum HER2₃₆₉₋₃₇₇-Multimer am Beispiel von T- Zell- Klon #30
 CTL- Klon #30 weist eine Kreuzreaktivität zum HER2₃₆₉₋₃₇₇-Multimer auf, aber nicht zum HER4₃₆₁₋₃₆₉-Multimer

Das V β -Motiv der verschiedenen CD8⁺ Klone konnte mit den üblichen Antikörpern für die V β -Motiv- Bestimmung nicht bestimmt werden, allerdings konnten wir durch Sequenzierung des TCR von CTL- Klon #42 eine Monoklonalität nachweisen (Daten nicht gezeigt).

4.4 HER3- reaktive CTL sind funktionell hochavide und weisen eine Kreuzreaktivität mit niedriger Avidität zum HER2₃₆₉₋₃₇₇- Peptid auf

In einem ⁵¹Cr- Freisetzungstest wurden die Aviditäten der fünf CTL- Klone für die HER1₃₆₄₋₃₇₂-, HER2₃₆₉₋₃₇₇-, HER3₃₅₆₋₃₆₄- und HER4₃₆₁₋₃₆₉- Peptide im Rahmen einer Peptidtitration bestimmt. Dabei konnten alle fünf tumorspezifischen T- Zell- Klone, hier am Beispiel von T- Zell- Klon #30, mit einer Avidität von 10⁻¹⁰ M das HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid erkennen, eine geringe Erkennung des HER2₃₆₉₋₃₇₇- Peptids war nur in hohen Peptidkonzentrationen von 10⁻⁵ M (10 μ g/ml) zu sehen. Eine Erkennung der HER1₃₆₄₋₃₇₂- und HER4₃₆₁₋₃₆₉- Peptide konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 9a). Zusätzlich wurde in einem IFN- γ -ELISA getestet, ob auch hier die T- Zell- Klone in der Lage waren, die vier verschiedenen HER- Peptide zu erkennen und spezifisch IFN- γ zu produzieren. Wie in Abb. 9b anhand T- Zell- Klon #30 ersichtlich, ist bei Erkennung von

HER3₃₅₆₋₃₆₄- beladenen und in geringerem Maße auch bei HER2₃₆₉₋₃₇₇- beladenen T2 Zellen eine spezifische IFN- γ -Produktion vorhanden.

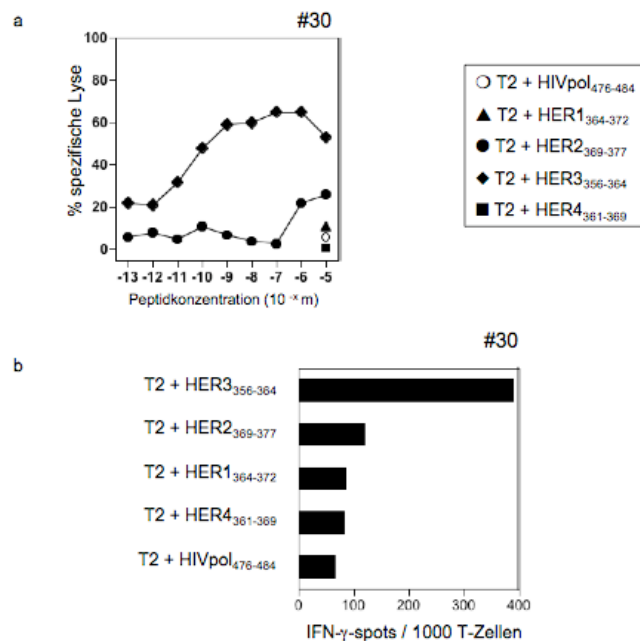


Abb. 9 Avidität des CTL-Klon #30 zu den verschiedenen HER- Peptidepitopen
 (a) T2 Zellen beladen mit den HER1- bis HER4- Peptiden im ⁵¹Cr- Freisetzungstest im Verhältnis E:T 90:1
 (b) IFN- γ -Elisot nach Inkubation mit HER1- bis HER4- beladenen T2 Zellen

4.5 Die HER3- spezifischen T- Zell- Klone erkennen HLA-A2⁺ HER3⁺ Tumorzelllinien und produzieren IFN- γ

Anschließend wurden die expandierten HER3- reaktiven T- Zell- Klone auf ihre Zytokinsekretion im ELISA in Bezug auf HER3⁺ Melanom- und Mammakarzinomzelllinien untersucht. Am Beispiel von CTL- Klon #30 konnte gezeigt werden, dass im ELISA eine spezifische Erkennung von IFN- γ vorbehandelten, HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanomzelllinien SK-MEL-29, SK-MEL-37 und NW-MEL-38 anhand der spezifischen IFN- γ -Produktion nachweisbar war. Als Positivkontrolle für den Test wurden T2 Zellen mit dem HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid beladen, woraufhin die T- Zell- Klone bei Erkennung als Antwort IFN- γ produzierten. T2 Zellen beladen mit dem HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- Peptid und die HLA-A2⁻ HER3⁺ Melanomzelllinie MUC-MEL-1 dienten als Negativkontrolle, welche nicht von den CTL- Klonen erkannt wurden, sichtbar anhand der ausgebliebenen IFN- γ -Produktion (Abb. 10a).

Außerdem konnte am Beispiel von T- Zell- Klon #56 im IFN- γ -ELISA gezeigt werden, dass die CTL- Klone in der Lage sind, bei Erkennung der mit IFN- γ vorbehandelten HLA-A2⁺ HER3⁺ Mammakarzinom Zelllinien MCF7 und KS 24.22 IFN- γ zu produzieren. Auch hier wurden als Positivkontrolle die T2 Zellen mit dem HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid beladen und von den T- Zell- Klonen mit einer IFN- γ -Produktion beantwortet. Als Negativkontrollen wurden wiederum HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- Peptid beladene T2 Zellen und die HLA-A2⁻ HER3⁺ Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 eingesetzt (Abb. 10b).

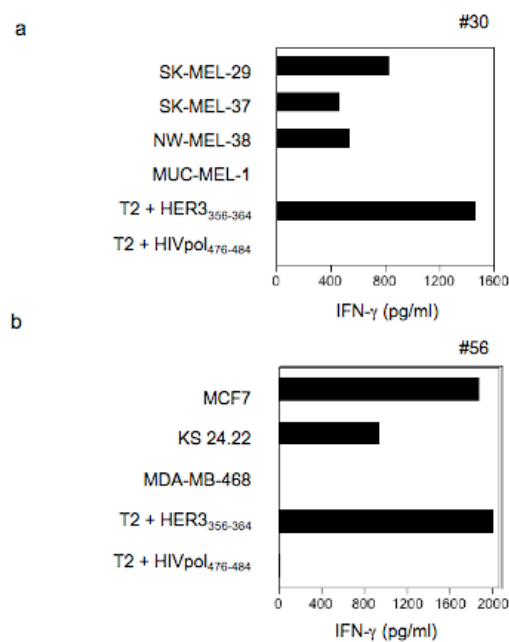


Abb. 10 HER3₃₅₆₋₃₆₄- reaktive T- Zell- Klone sind in der Lage HLA-A2⁺ HER3⁺ Tumorlinien zu erkennen und IFN- γ zu produzieren (a) spezifische IFN- γ -Produktion von CTL- Klon #30 im IFN- γ -ELISA bei Erkennung der Melanomzelllinien SK-MEL-29, SK-MEL-37 und NW-MEL-38 und (b) der Mammakarzinom Zelllinien MCF7 und KS 24.22 durch CTL Klon #56

4.6 HER3- reaktive CD8⁺ Klone lysieren HLA-A2⁺ HER3⁺ Tumorzelllinien

Als essentieller Bestandteil dieser Dissertation wurde die lytische Aktivität der HER3- reaktiven T-Zellen getestet, das heißt HER3- überexprimierende Zelllinien (v. a. Mammakarzinomzelllinien) sollten von den T-Zellen erkannt und lysiert werden. Dafür wurde ein radioaktives Testverfahren gewählt, welches auf der Freisetzung von ⁵¹Cr durch lysierte Zellen beruht und in der T- Zell- Forschung schon lange etabliert ist. In diesem Testverfahren wurden zuerst die HER3- reaktiven T- Zell- Linien für vier Stunden mit HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanomzelllinien SK-

MEL-29, SK-MEL-37 und NW-MEL-38 zusammengesetzt. Hierbei konnte man am Beispiel von CTL- Klon #56 sehen, dass die T- Zellen die Melanomzelllinien SK-MEL-29, SK-MEL-37 und NW-MEL-38 mit IFN- γ -Vorbehandlung erkennen und lysieren können. Als Positivkontrolle wurden T2 Zellen mit dem HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid beladen. Keine Lyse sah man bei den eingesetzten Negativkontrollen T2 + HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- Peptid und der HLA-A2⁻ HER3⁺ Melanomzelllinie MUC-MEL-1 (Abb. 11).

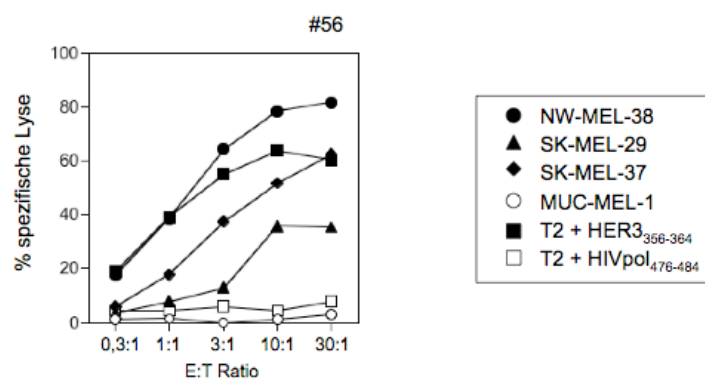


Abb. 11 HER3₃₅₆₋₃₆₄⁻ reaktive CTL- Klon lysieren spezifisch HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanomzell-Linien Lyse von den IFN- γ vorbehandelten Melanomzelllinien SK-MEL-29, SK-MEL-37 und NW-MEL-1 durch CTL- Klon #56 im ⁵¹Cr-Freisetzungstest

Als nächstes wurden die beiden Mammakarzinomzelllinien MCF7 und KS 24.22 im ⁵¹Cr-Freisetzungstest getestet. Auch hier konnte anhand von Klon #56 gezeigt werden, dass die Mammakarzinomzellen nach IFN- γ -Vorbehandlung von den T- Zell- Klonen erkannt und spezifisch lysiert wurden. Als Positivkontrolle wurden wiederum HER3₃₅₆₋₃₆₄- beladene T2 Zellen eingesetzt, als Negativkontrollen HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- beladene T2 Zellen und die HLA-A2⁻ HER3⁺ MDA-MB-468 (Abb. 12).

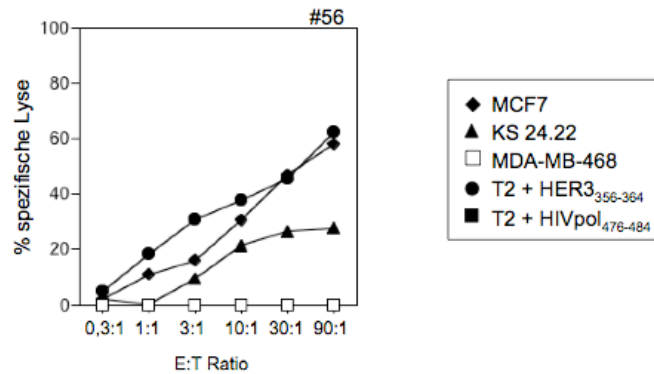


Abb. 12 HER3₃₅₆₋₃₆₄-reaktive T-Zell-Klone lysieren spezifisch HLA-A2⁺ HER3-überexprimierende Mammakarzinom Zelllinien. Der HER3-spezifische T-Zell-Klon #56 lysiert im ⁵¹Cr-Freisetzungstest die Brustkrebszelllinien KS 24.22 und MCF7 nach IFN- γ -Vorbehandlung.

Wurden die HLA-A2-positiven HER3⁺ Karzinomzelllinien mit bzw. ohne IFN- γ vorbehandelt, konnten verschiedene Ergebnisse erzielt werden. Die Melanomzelllinien SK-MEL-29, SK-MEL-37 und NW-MEL-38 sowie die Mammakarzinomzelllinie MCF7 wurden unabhängig von einer IFN- γ -Vorbehandlung im ⁵¹Cr-Freisetzungstest erkannt:

1. SK-MEL-29: ohne IFN- γ -Vorbehandlung: maximale Lyse 34 %
mit IFN- γ -Vorbehandlung: maximale Lyse 51 % (CTL-Klon #42)
2. SK-MEL-37: ohne IFN- γ -Vorbehandlung: maximale Lyse 49 %
mit IFN- γ -Vorbehandlung: maximale Lyse 51 % (CTL-Klon #42)
3. NW-MEL-38: ohne IFN- γ -Vorbehandlung: maximale Lyse 52 %
mit IFN- γ -Vorbehandlung: maximale Lyse 52 % (CTL-Klon #37)
4. MCF 7: ohne IFN- γ -Vorbehandlung: maximale Lyse 100 %
mit IFN- γ -Vorbehandlung: maximale Lyse 82 % (CTL-Klon #30)

Dagegen wurde die Mammakarzinomzelllinie KS 24.22 von den T-Zellen im ⁵¹Cr-Freisetzungstest erst nach IFN- γ -Vorbehandlung erkannt und lysiert (CTL-Klon #37: ohne IFN- γ -Vorbehandlung: maximale Lyse 22 %; mit IFN- γ -Vorbehandlung: maximale Lyse 45 %).

4.7 Die Lyse der HLA-A2⁺ HER3⁺ Tumorzelllinien ist HLA-A2/HER3- abhängig

Zum Nachweis der HER3- spezifischen Lyse von Tumorzelllinien wurde ein sogenannter „hot/cold target inhibition“ Test durchgeführt. Dafür wurden die HER3₃₅₆₋₃₆₄- spezifischen T- Zell- Klone für 30 Minuten mit den HER3₃₅₆₋₃₆₄- bzw. HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- peptidbeladenen HLA-A2- positiven T2 Zellen präinkubiert. Dadurch wurde erwartet, dass die T- Zell-Klone in der Inkubationszeit die T2 Zellen mit dem relevanten HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid, jedoch nicht die T2 Zellen mit dem irrelevanten HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- Peptid erkannten. Danach wurden zusätzlich ⁵¹Chrom- markierte HLA-A2⁺ HER3⁺ Zelllinien mit in die Kultur gegeben, für 4 Stunden inkubiert und danach wurde die ⁵¹Cr- Abgabe in den Überstand gemessen. Durch die Präinkubation der HER3₃₅₆₋₃₆₄- spezifischen T- Zell- Klone mit dem relevanten HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid wurden die Vorräte an zytotoxischen Proteinen, wie z. B. Perforin, erschöpft, so dass die Lyse der HER3⁺ HLA-A2⁺ Tumorlinien nicht mehr möglich war. Wie am Beispiel von T- Zell- Klon #56 in Abbildung 13 gezeigt, sind die CTL- Klone nicht in der Lage die IFN-γ vorbehandelten HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanomzelllinien SK-MEL-29 (a), SK-MEL-37 (b) und NW-MEL-38 (c) zu lysieren, nachdem sie zuvor mit dem HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid inkubiert worden waren. Als Kontrolle wurden zum einen die T- Zell- Klone nur mit den SK-MEL-29, SK-MEL-37 bzw. NW-MEL-38 zusammengesetzt, woraufhin diese von den T-Zellen lysiert wurden. Wurden die CTL- Klone mit HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- Peptid beladenen T2 Zellen präinkubiert und danach erst mit den Melanomzelllinien zusammengesetzt, war die Lyse der Tumorzelllinien nicht inhibiert (Abb. 13).

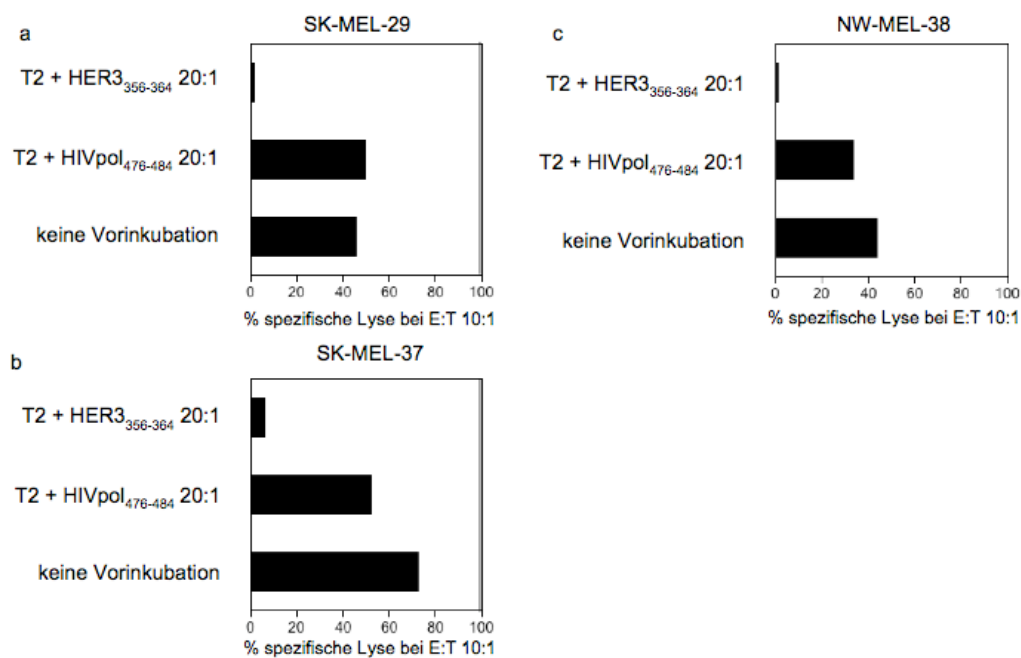


Abb. 13 HER3₃₅₆₋₃₆₄⁻ reaktiver T- Zell- Klon #56 lysiert Melanomzelllinien HER3 spezifisch ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit den ⁵¹Cr- markierten Melanomzelllinien (a) SK-MEL-29, (b) SK-MEL-37 und (c) NW-MEL-38 nach IFN- γ -Vorbehandlung als Zielzellen nach Vorinkubation der T- Zell- Linie mit HIV₄₇₆₋₄₈₄⁻ bzw. HER3₃₅₆₋₃₆₄⁻ beladenen unmarkierten T2 Zellen im Verhältnis 20:1

In Abbildung 14 wurde der gleiche „hot/cold target inhibition assay“ mit Mammakarzinom-Zelllinien als Zielzellen durchgeführt. Auch hier konnten die IFN- γ vorbehandelten HLA-A2⁺ HER3⁺ Brustkrebszelllinien MCF7 (a) und KS 24.22 (b) nicht mehr von dem T- Zell- Klon #56 lysiert werden, nachdem sie mit den HER3₃₅₆₋₃₆₄⁻ beladenen T2 Zellen zusammengesetzt worden waren. Doch wenn die T- Zellen zuvor mit T2 Zellen präinkubiert wurden, die mit dem irrelevanten HIVpol₄₇₆₋₄₈₄ beladen worden waren, konnten die T- Zell- Klone danach die Brustkrebszelllinien lysieren. Als zusätzliche Kontrolle wurden wiederum die T- Zellen nur mit den Mammakarzinomzelllinien inkubiert, welche daraufhin erkannt und lysiert wurden (Abb. 14).

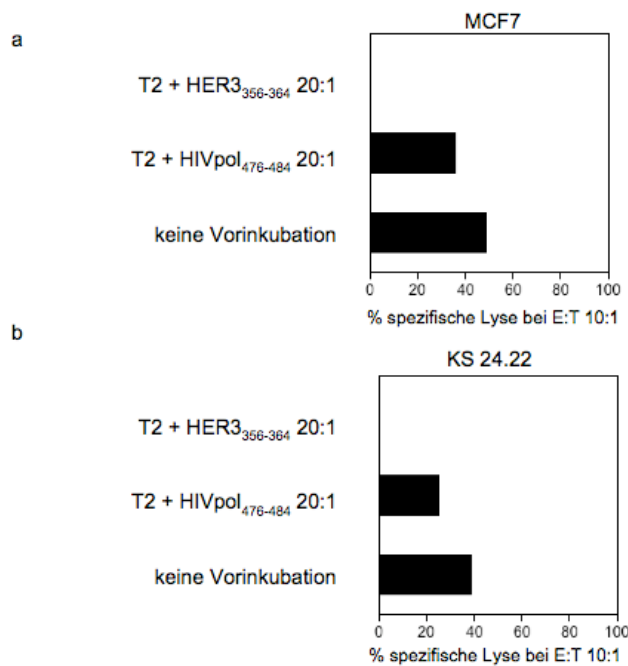


Abb. 14 HER3₃₅₆₋₃₆₄-reaktive T- Zell- Klone #37 (a) und #56 (b) lysieren Mammakarzinom Zelllinien HER3 spezifisch ⁵¹Cr- Freisetzungstest mit den Brustkrebs Zelllinien (a) MCF7 und (b) KS 24.22 nach IFN- γ -Vorbehandlung als Zielzellen nach Vorinkubation der T- Zell- Linie mit HIV₄₇₆₋₄₈₄⁻ bzw. HER3₃₅₆₋₃₆₄⁻ beladenen unmarkierten T2 Zellen im Verhältnis 20:1

4.8 Erkennung der HER3-positiven/HER2-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 tA2 im IFN- γ -ELISA und im ⁵¹Cr- Freisetzungstest

Die in dieser Dissertation verwendeten HLA-A2⁺ HER3- überexprimierenden Brustkrebszellen exprimieren HER3 und auch HER2. In Studien wurden Kreuzreaktivitäten zwischen HER3 und HER2 beschrieben (Conrad et al. 2008:8142), weswegen wir die HER3- spezifischen Klone mit der MDA-MB-468 Zelllinie zusammensetzten, die nur HER3 und nicht HER2 exprimiert (Abb. 15a). Da diese Zelllinie kein HLA-A2 exprimiert, wurde sie für die Tests transient mit der Vektor pCDNA3.1- HLA-A2 transfiziert (Abb.15b).

Hierbei zeigt sich, dass die HER3- spezifischen T- Zellen die MDA-MB-468 Zelllinie im IFN- γ -ELISA nach HLA-A2 Transfektion erkennen (Abb. 15c). Somit kann gezeigt werden, dass die HER3-reaktiven T- Zell- Klone zwar Kreuzreaktivitäten zum HER2 aufweisen können, aber die Erkennung und Tötung der Zielzellen HER3- spezifisch durchgeführt wird.

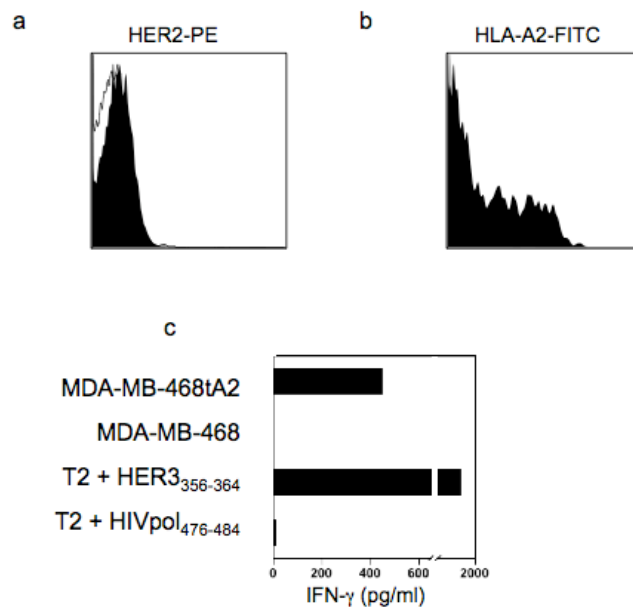


Abb. 15 HER3₃₅₆₋₃₆₄-reaktiver T- Zell- Klon #42 erkennt HER3- exprimierende Mammakarzinom Zelllinie MDA-MB-468 (a) MDA-MB-468 exprimiert kein HER2 (b) Expression von HLA-A2 nach Transfektion (c) Erkennung der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 im IFN- γ -ELISA nach Transfektion mit 1 μ g pcDNA HLA-A2

5 Diskussion

In der Vergangenheit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass T- Zellen, die gegen das immundominante HLA-A2- restringierte Peptidepitop HER2₃₆₉₋₃₇₇ gerichtet waren, HLA-A2⁺ HER2- überexprimierende Tumorzellen lysieren (Anderson et al. 2000:4196; Brossart et al. 1998:734; Keogh et al. 2001:791; Rongcun et al. 1999:1040; Seliger et al. 2000:355) und *in vivo* eliminieren konnten (Bernhard et al. 2008:277; Lustgarten et al. 2004:754; Peoples et al. 2005:7543). Von unserer Gruppe wurde publiziert, dass HER2₃₆₉₋₃₇₇- spezifische T- Zellen die Eigenschaft zur Kreuzreaktion mit HER2₃₆₉₋₃₇₇- korrespondierenden, HLA-A2- restringierten HER3₃₅₆₋₃₆₄- bzw. HER4₃₆₁₋₃₆₉- Peptidepitopen besitzen, die durch uns erstmals beschrieben wurden (Conrad et al. 2008:8142). Der Grund dafür ist vermutlich, dass die einzelnen Mitglieder der HER- Familie starke Homologien in den Peptidsequenzen aufweisen, die HLA-A2- Bindungsmotive an Position 2 und 9 haben sogar gleiche Sequenzen (HER3: KILGNLDFL, HER2: KIFGSLAFL).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden daraufhin HER3₃₅₆₋₃₆₄- spezifische T- Zellen isoliert, die als Ausgangsprodukt für einen adoptiven T- Zell- Rezeptor- Transfer für HER3- überexprimierende Brustkrebspatienten dienen sollen. Denn in Studien wird immer eindeutiger, dass HER3 ein wichtiger negativer prognostischer Faktor nicht nur in Brustkrebs sondern auch bei anderen Krebsarten wie z. B. Karzinomen des Magen-Darmtraktes, Ovarialkarzinom, Melanom, nicht- kleinzelliges Lungenkarzinom sowie Plattenepithelkarzinom der Zervix ist und mit einem geringeren Überleben assoziiert ist (Beji et al. 2012:959; Fuchs et al. 2007:960; Hayashi et al. 2008:7843; Reschke et al. 2008:5188; Tanner et al. 2006:4321; Yi et al. 1997:142). Besonders die Koexpression von HER3 und HER2 in Brustkrebs scheint synergistische negative Effekte auf die Prognose der Patienten zu haben (Wiseman et al. 2005:1770), wobei HER2 das HER3 für die Tumorzellproliferation benötigt (Holbro et al. 2003:103). Im Gegensatz dazu ist die Signifikanz von HER4- Expressionen in Tumoren auf das Überleben von Patienten momentan noch ungeklärt. Während beim Mammakarzinom die HER4- Expression eindeutig mit einem besseren Überleben assoziiert werden konnte (Sassen et al. 2008:1; Witton et al. 2003:292), wurde bei anderen Tumorarten, wie z. B. dem Hepatozellulären Karzinom (HCC) oder auch dem adenosquamösen Zervixkarzinom, kein Effekt der HER4- Expression auf das Überleben nachgewiesen (Fuchs et al. 2007:961; Ito et al. 2001:1380).

Ein generelles Problem bei der Generierung von autologen T- Zell- Klonen mit synthetisch hergestellten Peptiden ist, dass die T- Zellen manchmal nicht in der Lage sind, endogen

prozessierte Peptidepitope zu erkennen und somit die Tumorzellerkennung ausbleibt (Bernhard et al. 2008:274; Conrad et al. 2008:8139; Keogh et al. 2001:793; Zaks et al. 1998:4902). Mögliche Gründe dafür sind zum einen eine eventuell unterschiedliche Peptidkonformation zwischen dem endogen prozessierten Peptid und dem synthetisch hergestellten (Zaks et al. 1998:4907). Zum anderen gibt es Hinweise darauf, dass das endogen prozessierte Peptid glykosyliert ist und auch dann von den MHC- Molekülen gebunden werden kann (Haurum et al. 1999:149), woraufhin der MHC- Peptid- Komplex von manchen T- Zellen nicht mehr erkannt wird. Um die Isolierung nicht tumorreaktiver T- Zellen zu verhindern, wurden im Rahmen unserer Forschungen mit HER2₃₆₉₋₃₇₇- spezifischen T- Zellen zwei alternative Stimulationsprotokolle geprüft. Zum einen wurden T- Zellen mit HLA-A2⁺ DC stimuliert, die vorher mit der kompletten HER2- mRNA transfiziert wurden. Der Vorteil ist, dass dabei die HER2- Epitope auf natürliche Weise im Rahmen der endogenen Prozessierung durch HLA- Moleküle an die Oberfläche der Zellen gebracht werden. Zum anderen wurden allogene HLA-A2-negative T- Zellen mit peptidbeladenen HLA-A2-positiven DC stimuliert. Zusammenfassend konnten durch beide Stimulationsprotokolle HER2₃₆₉₋₃₇₇- reaktive T- Zellen generiert werden, die in der Lage waren HLA-A2⁺ HER2⁺ Tumorzelllinien zu erkennen und zu lysieren (Conrad et al. 2008:8138-8139).

Ein zusätzliches Problem bei der Arbeit mit HER3 als Tumorantigen ist, dass die Isolierung HER3- spezifischer T- Zellen erschwert ist, da HER3 auch auf gesundem Gewebe exprimiert wird (Conrad et al. 2008:8143). Um eine Autoimmunität zu verhindern, werden hochavide T- Zellen deshalb schon im Thymus deletiert, so dass die natürliche T- Zell- Frequenz in der Regel zu niedrig ist, um isoliert zu werden. Das Problem der inaktiven T- Zellen wurde wiederum dadurch umgangen, dass T- Zellen und APC von verschiedenen HLA- Typen eingesetzt wurden. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass 1-10% der natürlichen T- Zellen in der Lage sind durch Kreuzreaktionen mit allophenen HLA- Typen zu interagieren (Detours et al. 2000:8479; Suchin et al. 2001:973). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden HLA-A2⁺ HER3₃₅₆₋₃₆₄- peptidbeladene DC von einem Spender mit HLA-A2-negativen T- Zellen eines anderen Spenders zum Priming und zur Restimulation benutzt. Die Konzentrationen des HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptids wurden extra niedrig gewählt (Priming: 1µg/ml; Restimulation: 500ng/ml), denn schon sehr geringe Peptidmengen reichen zur Stimulation von CD8⁺ T- Zellen aus, was durch die starke Bindung von CD8 an den Peptid- MHC- Komplex erklärbar ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Wahl zu hoher Peptidkonzentrationen bei der Stimulation nur niedrigavide CD8⁺ T- Zellen stimuliert werden, während hochavide CD8⁺ T- Zellen - wie sie bei einer allophenen

Stimulation zu erwarten sind - durch die Überstimulation in Apoptose gingen (Alexander-Miller et al. 1996:490-491).

Nach zweimaliger Stimulation HLA-A2⁻ CD8⁺ T- Zellen mit HLA-A2⁺ HER3₃₅₆₋₃₆₄-peptidbeladenen DC konnte eine HER3₃₅₆₋₃₆₄- positive Frequenz an CD8⁺ T- Zellen mit einem HLA-A2/HER3₃₅₆₋₃₆₄- Tetramer angefärbt, isoliert und kloniert werden. In dem darauf folgenden Test zur Identifizierung potentieller HER3₃₅₆₋₃₆₄- reaktiver T- Zell- Klone wurden als Zielzellen zum einen peptidbeladene T2 Zellen benutzt. Zum anderen wurden die HLA-A2⁺ Melanomzelllinien SK-MEL-29 und SK-MEL-37 getestet, da bekannt ist, dass auch HER3 in Melanomen exprimiert sein kann, welches mit einer schlechten Prognose einhergeht (Reschke et al. 2008:5188). Auch wir konnten in den Melanomzelllinien im Rahmen einer FACS- Analyse eine hohe Expression von HER3 feststellen (SK-MEL-29: Δ MFI 229, SK-MEL-37: Δ MFI 298). Trotzdem wurden die Melanomzelllinien nur von neun aus 27 potentiellen HER3₃₅₆₋₃₆₄-peptidspezifischen T- Zell- Klonen erkannt. Von diesen neun tumorspezifischen T- Zell- Klonen wurden fünf für die weiteren funktionellen Analysen ausgewählt (CM #5, #30, #37, #42, #56).

Da unsere Forschungsgruppe eine Kreuzreaktivität von HER2₃₆₉₋₃₇₇- reaktiven T- Zell-Klonen zu HER3 und auch HER4 beobachteten (Conrad et al. 2008:8142), testeten wir die HER3₃₅₆₋₃₆₄-spezifischen T- Zell- Klone auf Kreuzreaktivitäten zu HER1₃₆₄₋₃₇₂, HER2₃₆₉₋₃₇₇ und HER4₃₆₁₋₃₆₉. Allerdings konnten wir nur eine geringe Kreuzreaktivität in drei verschiedenen funktionellen Tests zu HER2, jedoch nicht zu HER1 und HER4 feststellen. Um die Avidität der HER3₃₅₆₋₃₆₄-spezifischen T- Zell- Klone zu den verschiedenen HER- Peptidepitopen zu demonstrieren, wurde eine Peptidtitration durchgeführt. Dabei zeigte sich eine hohe Avidität der HER3₃₅₆₋₃₆₄- reaktiven TCR zu dem HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptid mit einer halbmaximalen Lyse von bis zu 10⁻¹⁰ M, welche mit hoch aviden CMV- spezifischen TCRs vergleichbar ist (Neudorfer et al. 2007:125). Im Gegensatz dazu konnte nur eine niedrige Avidität von 10⁻⁵ M zu dem HER2₃₆₉₋₃₇₇- Peptid gezeigt werden. Eine Erkennung von den HER1₃₆₄₋₃₇₂- und HER4₃₆₁₋₃₆₉- Peptiden konnte nicht nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanomzelllinien SK-MEL-29 und SK-MEL-37 wurde eine weitere HER3- überexprimierende Melanomzelllinie NW-MEL-38 sowie zwei HLA-A2⁺ HER3- überexprimierende Mammakarzinomzelllinien MCF7 und KS 24.22 im IFN-γ-ELISA und im Lysetest getestet. Dabei konnte beobachtet werden, dass alle Tumorlinien von den T- Zellen erkannt und getötet wurden. Allerdings wurden alle Tumorlinien vor den Tests für 48 Stunden mit IFN-γ vorbehandelt um dem sogenannten Immunsystem- Ausweichmechanismus („Immune escape“) entgegen zu wirken. Wie schon seit den frühen 1980er Jahren beschrieben,

sind Tumorzellen in der Lage, der gegen sie gerichteten Immunantwort auszuweichen bzw. diese zu unterdrücken (Kumar et al. 1982:173). Dieses bezeichnet man als den so genannten Ausweichmechanismus („Immune escape“) der Tumorzellen. Neben möglichen Gründen wie Bildung einer physikalischen Barriere durch Kollagensekretion um den Tumor, direkte Suppression der Immunantwort z.B. durch TGF- β - Bildung oder aber auch Verlust von MHC-Molekülen auf der Tumoroberfläche kann es auch zum Verlust von Komponenten der Antigenprozessiermaschine (APM) kommen (Herrmann et al. 2004:219). Daraufhin können die T- Zell- Klone die Zelllinien nicht mehr erkennen und lysieren. Allerdings konnte festgestellt werden, dass durch IFN- γ -Vorbehandlung der Zelllinien zum einen MHC- Moleküle und zum anderen die Komponenten der APM wieder hochreguliert werden (Kayser et al. 2003:406) und dadurch Zelllinien wieder erkannt werden können.

Diese Beobachtungen konnten auch in der Arbeit mit HER2₃₆₉₋₃₇₇- spezifischen T- Zellen festgestellt werden, woraufhin die verschiedenen Tumorklinen aufgrund der unterschiedlichen Erkennung durch die T- Zellen in 3 Gruppen eingeteilt wurden (Conrad et al. 2008:8140). Zur ersten Gruppe gehörten Tumorklinen, wie z. B. die Melanomzelllinien SK-MEL-29 und SK-MEL-37, die unabhängig von der IFN- γ -Vorbehandlung von den T- Zell- Klonen erkannt und lysiert wurden. Auch im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte diese Beobachtung gestützt werden, denn die HER3₃₅₆₋₃₆₄- reaktiven T- Zell- Klone konnten diese Zelllinien in beiden Fällen erkennen und lysieren. Zusätzlich dazu wurde auch die dritte Melanomzelllinie NW-MEL-38 sowie die Mammarkarzinomzelllinie MCF7 unabhängig von der IFN- γ -Vorbehandlung im ⁵¹Cr-Freisetzungstest erkannt. In die zweite Gruppe wurden Zelllinien eingeteilt, die nur nach IFN- γ -Vorbehandlung von den T- Zellen erkannt wurden. Dazu gehört u. a. auch die im Rahmen dieser Doktorarbeit benutzte Brustkrebszelllinie KS 24.22, die auch von HER3₃₅₆₋₃₆₄- reaktiven T- Zell- Klonen nur nach IFN- γ -Vorbehandlung lysiert wurde. Zur dritten Gruppe zählten schlussendlich Zelllinien, die auch nicht nach IFN- γ -Vorbehandlung von den T- Zell- Klonen erkannt wurden, wobei diese im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht eingesetzt wurden.

Um zu zeigen, dass die Erkennung der HER3⁺ Melanom- und Brustkrebszelllinien HLA-A2-abhängig ist, wurden im IFN- γ -ELISA und im Lysetest Negativkontrollen mitgeführt. Zum einen die HLA-A2-negative HER3⁺ Melanomzelllinie MUC-MEL-1 und zum anderen die HLA-A2-negative HER3- überexprimierende Brustkrebslinie MDA-MB-468. Wie erwartet wurden beide HLA-A2- negativen Zelllinien nicht erkannt, was auf eine HLA-A2- Restriktion hinweist. Da fast alle HER3⁺ Zelllinien auch HER2 exprimieren, wurde geprüft, ob die Tumorklyse wirklich HER3- und nicht HER2- abhängig ist. Dafür wurde zum einen ein sogenannter „hot/cold target

inhibition“ Test durchgeführt, zum anderen wurde die nur HER3- exprimierende Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 zur weiteren Testung transient mit HLA-A2 transfiziert. Im „hot/cold target inhibition“ Test konnte man für alle HLA-A2⁺ HER3⁺ Melanom- und Brustkrebszelllinien zeigen, dass die Erkennung der Zelllinien gehemmt ist, wenn die T- Zell-Klone zuvor mit HER3₃₅₆₋₃₆₄- beladenen HLA-A2⁺ T2 Zellen inkubiert wurden. Denn bei der Erkennung der HLA-A2⁺ T2 Zellen werden von den zytotoxischen T- Zellen Proteine wie z. B. Perforin ausgeschüttet, die die Membran der Zielzellen zerstören. Nach der Lyse der Zielzellen ist der Vorrat an zytotoxischen Proteinen in der T- Zelle erschöpft, wodurch bei Zugabe weiterer HLA-A2⁺ HER3⁺ Tumorzelllinien keine Erkennung mehr vorhanden ist. Allerdings wurde die Erkennung der HLA-A2⁺ HER3⁺ Krebszelllinien bei Vorinkubation der T- Zellen mit HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- beladenen T2 Zellen nicht gehemmt, was auf eine HER3-Spezifität hinweist.

Bestätigt wurde die HER3- Spezifität der T- Zell- Klone durch die nur HER3- und nicht HER2- exprimierende Brustkrebslinie MDA-MB-468. Eingesetzt im IFN- γ -ELISA als Zielzelle konnte eine spezifische Erkennung nach HLA-A2-Transfektion nachgewiesen werden. Dadurch können wir demonstrieren, dass die HER3₃₅₆₋₃₆₄- reaktiven T- Zell- Klone das neu gefundene Peptidepitop HER3₃₅₆₋₃₆₄- spezifisch und HLA-A2- restringiert erkennen können.

Neben HER2 und EGFR/HER1 wird das tumorassoziierte Antigen HER3 immer attraktiver für eine Antigen- gerichtete Therapie. Denn zum einen ist HER3 ein negativer prognostischer Faktor nicht nur bei Brustkrebs, sondern z.B. auch bei Melanom- oder Magen- bzw. Kolonkarzinompatienten. Zum anderen kann es bei einer HER2- gerichteten Therapie, wie sie momentan bei Mammakarzinompatienten mit Trastuzumab in der adjuvanten Therapie und auch bei fortgeschrittenen Stadien durchgeführt wird, als Folge eines Ausweichmechanismus („Immune escape“) des HER2- überexprimierenden Tumors vor dem Immunsystem zu dem Wachstum von HER3- überexprimierenden Tumorzellen kommen (Czerniecki et al. 2007:1850; Knutson et al. 2004:1150-51; Singh et al. 2007:1887). Bislang existiert in der Karzinomtherapie noch keine Therapiestrategie, die HER3 allein als Angriffspunkt nutzt, aktuell wird lediglich ein HER3- Antikörper in klinischen Studien getestet (Baselga et al. 2009:10). Deswegen erscheint es sinnvoll einen T- Zell- Rezeptor- Transfer bei HLA-A2⁺ Patienten mit HER3⁺ Mammakarzinom und eventuell auch Patienten mit anderen HER3⁺ Krebsarten mit körpereigenen T- Lymphozyten durchzuführen, die durch Gentransfer den hochaviden HER3₃₅₆₋₃₆₄- TCR in sich tragen. Der Vorteil gegenüber dem adoptiven T- Zell- Transfer autologer, endogen tumorspezifischer T- Zellen ist, dass damit eine Vielzahl von Patienten behandelt werden kann, da der aufwändige Schritt der T- Zell- Isolierung und –Charakterisierung für jeden einzelnen Patienten wegfällt.

Einige Forschungsgruppen konnten bereits für andere Antigene demonstrieren, dass die transferierten T- Lymphozyten, die zuvor einem TCR- Gentransfer unterzogen worden waren, bei Tumorpatienten effektiv eine Tumorreaktivität zeigten (Clay et al. 1999:511; Engels et al. 2005:806; Morgan et al. 2003:3292; Morgan et al. 2006:127).

Ein Problem allerdings ist, dass die Mitglieder der HER- Familie auch in normalem Gewebe exprimiert werden (Crone et al. 2002:463; Gassmann et al. 1995:390; Stern 2003:89), weshalb nach einem adoptiven T- Zell- Transfer mit TCR- transduzierten T- Zellen die Gefahr von Autoimmunreaktionen besteht. Bis heute gibt es dazu nur Erkenntnisse bei T- Zell- Transfers mit HER2- spezifischen T- Zellen bei einer Patientin mit HER2-positivem Brustkrebs. Dabei zeigte sich, dass keine autoimmunen Erkrankungen während oder nach einem T- Zell- Transfer mit HER2- spezifischen T- Zellen induziert wurden (Bernhard et al. 2008:276). Um jedoch genauere Erkenntnisse über autoimmune Reaktionen im Rahmen eines T-Zell-Rezeptor- Transfers zu erlangen, werden momentan HER2- spezifische TCR-Transfers im Mausmodell untersucht. Weiterhin wird zukünftig angestrebt, HER3- spezifische TCR-Transfers ebenso im Mausmodell zu überprüfen. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch nur eine geringe Kreuzreaktivität mit niedriger Avidität zu HER2₃₆₉₋₃₇₇ festgestellt werden konnte, werden die Komplikationen als eher gering eingeschätzt. Eventuell könnte der Patient mit HER3- überexprimierendem Tumor sogar von einer Kreuzreaktivität zu HER2₃₆₉₋₃₇₇ profitieren, denn in Studien ist beschrieben, dass bei Brustkrebspatienten die Heterodimerisierung von HER3 und HER2 eine ungünstigere Prognose aufweist, als wenn nur HER3 oder HER2 alleine exprimiert wäre (Wiseman et al. 2005:1776). Außerdem könnte ein so genanntes „double targeting“ bei dem beide, HER3 und HER2, als Therapieangriffspunkt genutzt werden, der Herausselektion von HER3- überexprimierenden Tumorzellen bei HER2- gerichteten Therapien entgegenwirken (Czerniecki et al. 2007:1850; Knutson et al. 2004:1150-51; Singh et al. 2007:1887).

6 Zusammenfassung

Die Rezeptortyrosinkinase Humaner epithelialer Wachstumsfaktor 3 (HER3, ErbB3) ist ein tumorassoziiertes Antigen, welches im Mammakarzinom und anderen Tumoren überexprimiert wird und mit einer schlechten Prognose des Patienten assoziiert ist. Dadurch bietet es sich als therapeutische Strategie an, einen T- Zell- Rezeptor- Transfer bei HER3- überexprimierenden Brustkrebspatienten in fortgeschrittenen Stadien durchzuführen.

Ein Problem bei der Generierung HER3₃₅₆₋₃₆₄- spezifischer T- Zell- Klone ist, dass HER3 auch auf gesundem Gewebe exprimiert wird, was zur Deletion und Anergisierung spezifischer T- Zellen führt. Zur Vermeidung dieses Problems wurden allogene HLA-A2- restringierte HER3- spezifische T- Zell- Klone aus HLA-A2-negativen Spendern isoliert. Bei dem HLA-A2-restringierten Peptidepitop HER3₃₅₆₋₃₆₄ handelt es sich um ein korrespondierendes Epitop zu dem immundominanten HER2₃₆₉₋₃₇₇- Peptid, welches zytotoxische tumorlytische T- Zellen induzieren kann. Das HER3₃₅₆₋₃₆₄- Peptidepitop wurde zuerst von unserer Forschungsgruppe bei kreuzreaktiven HER2₃₆₉₋₃₇₇- spezifischen T- Zell- Klonen beschrieben. Durch die Stimulation mit HLA-A2⁺ HER3₃₅₆₋₃₆₄- peptidbeladenen DC konnte die Frequenz an HER3- spezifischen T- Zellen erhöht werden. Nach deren Isolierung wurden T- Zell- Klone generiert, die in der Lage waren, HLA-A2⁺ HER3⁺ Mammakarzinom- und Melanomzelllinien zu erkennen und zu lysieren. Außerdem wurde demonstriert, dass die Erkennung HER3- positiver Tumorlinien HLA-A2- abhängig ist.

Allerdings konnten die HER3- spezifischen T- Zellen manche HLA-A2⁺ HER3⁺ Tumorlinien erst nach IFN- γ -Vorbehandlung erkennen und lysieren, was für einen Ausweichmechanismus der Tumorzellen gegen die Immunantwort spricht.

Eine Kreuzreaktivität der HER3-spezifischen T- Zellen konnte nur zu dem HER2₃₆₉₋₃₇₇- Peptidepitop mit einer niedrigen Avidität nachgewiesen werden. Dadurch, dass eine Koexpression von HER3 mit HER2 zu einer synergistisch negativen Prognose bei Brustkrebspatienten führt, könnten die HER3- reaktiven T- Zell- Klone auch im Rahmen einer „double targeting“- Therapie eingesetzt werden. Diese HER3₃₅₆₋₃₆₄- spezifischen T- Zell- Klone sollen als Ausgangsprodukt für einen TCR- Gentransfer in primäre T- Lymphozyten von Brustkrebspatienten dienen, wobei sich der Prozess des TCR- Gentransfers momentan in unserer Forschungsgruppe in Arbeit befindet. Die artifiziell veränderten T- Zellen des Patienten sollen dann im Rahmen eines T- Zell- Rezeptor- Transfers wieder dem Patienten reinfundiert werden.

7 Literaturverzeichnis

Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Sarin A, Berzofsky JA. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J Exp Med* 1996;184:485-92

Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996;274:94-6

Anderson BW, Peoples GE, Murray JL, Gillogly MA, Gershenson DM, Ioannides CG. Peptide priming of cytolytic activity to HER-2 epitope 369-377 in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 2000;6:4192-200

Baselga J, Perez EA, Pienkowski T, Bell R. Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist* 2006;11 Suppl 1:4-12

Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 2009;9:463-75

Beji A, Horst D, Engel J, Kirchner T, Ullrich A. Toward the Prognostic Significance and Therapeutic Potential of HER3 Receptor Tyrosine Kinase in Human Colon Cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:956-68

Bernhard H, Neudorfer J, Gebhard K, Conrad H, Hermann C, Nahrig J, Fend F, Weber W, Busch DH, Peschel C. Adoptive transfer of autologous, HER2-specific, cytotoxic T lymphocytes for the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:271-80

Bernhard H, Salazar L, Schiffman K, Smorlesi A, Schmidt B, Knutson KL, Disis ML. Vaccination against the HER-2/neu oncogenic protein. *Endocr Relat Cancer* 2002;9:33-44

Bianco R, Shin I, Ritter CA, Yakes FM, Basso A, Rosen N, Tsurutani J, Dennis PA, Mills GB, Arteaga CL. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2003;22:2812-22

Brossart P, Stuhler G, Flad T, Stevanovic S, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 1998;58:732-6

Brunner KT, Mauel 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;14:181-96

Chen CH, Chernis GA, Hoang VQ, Landgraf R. Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9226-31

Clay TM, Custer MC, Sachs J, Hwu P, Rosenberg SA, Nishimura MI. Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J Immunol* 1999;163:507-13

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-48

Conrad H, Gebhard K, Kronig H, Neudorfer J, Busch DH, Peschel C, Bernhard H. CTLs directed against HER2 specifically cross-react with HER3 and HER4. *J Immunol* 2008;180:8135-45

Crone SA, Zhao YY, Fan L, Gu Y, Minamisawa S, Liu Y, Peterson KL, Chen J, Kahn R, Condorelli G, Ross J, Jr, Chien KR, et al. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2002;8:459-65

Czerniecki BJ, Koski GK, Koldovsky U, Xu S, Cohen PA, Mick R, Nisenbaum H, Pasha T, Xu M, Fox KR, Weinstein S, Orel SG, et al. Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Res* 2007;67:1842-52

Detours V, Perelson AS. The paradox of alloreactivity and self MHC restriction: quantitative analysis and statistics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8479-83

Disis ML, Calenoff E, McLaughlin G, Murphy AE, Chen W, Groner B, Jeschke M, Lydon N, McGlynn E, Livingston RB, et al. Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:16-20

Disis ML, Grabstein KH, Sleath PR, Cheever MA. Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. *Clin Cancer Res* 1999;5:1289-97

Engels B, Cam H, Schuler T, Indraccolo S, Gladow M, Baum C, Blankenstein T, Uckert W. Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 2003;14:1155-68

Engels B, Noessner E, Frankenberger B, Blankenstein T, Schendel DJ, Uckert W. Redirecting human T lymphocytes toward renal cell carcinoma specificity by retroviral transfer of T cell receptor genes. *Hum Gene Ther* 2005;16:799-810

Erickson SL, O'Shea KS, Ghaboosi N, Loverro L, Frantz G, Bauer M, Lu LH, Moore MW. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development* 1997;124:4999-5011

Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, Ioannides CG. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med* 1995;181:2109-17

Fuchs I, Vorsteher N, Buhler H, Evers K, Sehoul J, Schaller G, Kummel S. The prognostic significance of human epidermal growth factor receptor correlations in squamous cell cervical carcinoma. *Anticancer Res* 2007;27:959-63

Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 1995;378:390-4

Godkin AJ, Smith KJ, Willis A, Tejada-Simon MV, Zhang J, Elliott T, Hill AV. Naturally processed HLA class II peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide-MHC interactions. *J Immunol* 2001;166:6720-7.

Hamburger AW. The role of ErbB3 and its binding partners in breast cancer progression and resistance to hormone and tyrosine kinase directed therapies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008;13:225-33

Haurum JS, Hoier IB, Arsequell G, Neisig A, Valencia G, Zeuthen J, Neeffjes J, Elliott T. Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules in vivo. *J Exp Med* 1999;190:145-50

Hayashi M, Inokuchi M, Takagi Y, Yamada H, Kojima K, Kumagai J, Kawano T, Sugihara K. High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:7843-9

Herrmann F, Lehr HA, Drexler I, Sutter G, Hengstler J, Wollscheid U, Seliger B. HER-2/neu-mediated regulation of components of the MHC class I antigen-processing pathway. *Cancer Res* 2004;64:215-20.

Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, 3rd, Hynes NE. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8933-8

Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003;284:99-110

Hsieh AC, Moasser MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br J Cancer* 2007;97:453-7

Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Di Leva G, Merlo A, Triulzi T, Menard S, Croce CM, Tagliabue E. microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Res* 2009;69:2195-200

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:7065-70

Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Higashiyama S, Noda K, Miyoshi E, Monden M, Matsuura N. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2001;84:1377-83

Jhabvala-Romero F, Evans A, Guo S, Denton M, Clinton GM. Herstatin inhibits heregulin-mediated breast cancer cell growth and overcomes tamoxifen resistance in breast cancer cells that overexpress HER-2. *Oncogene* 2003;22:8178-86

Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 1997;27:3135-42

Karamouzis MV, Badra FA, Papavassiliou AG. Breast cancer: the upgraded role of HER-3 and HER-4. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:851-6

Katzel JA, Fanucchi MP, Li Z. Recent advances of novel targeted therapy in non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 2009;2:2

Kayser S, Watermann I, Rentzsch C, Weinschenk T, Wallwiener D, Guckel B. Tumor-associated antigen profiling in breast and ovarian cancer: mRNA, protein or T cell recognition? *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:397-409

Keogh E, Fikes J, Southwood S, Celis E, Chesnut R, Sette A. Identification of new epitopes from four different tumor-associated antigens: recognition of naturally processed epitopes correlates with HLA-A*0201-binding affinity. *J Immunol* 2001;167:787-96

Knutson KL, Almand B, Dang Y, Disis ML. Neu antigen-negative variants can be generated after neu-specific antibody therapy in neu transgenic mice. *Cancer Res* 2004;64:1146-51

Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9193-7

Kumar RK, Penny R. Escape of tumours from immunological destruction. *Pathology* 1982;14:173-9

Le XF, Lammayot A, Gold D, Lu Y, Mao W, Chang T, Patel A, Mills GB, Bast RC, Jr. Genes affecting the cell cycle, growth, maintenance, and drug sensitivity are preferentially regulated by anti-HER2 antibody through phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling. *J Biol Chem* 2005;280:2092-104

Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, Sliwkowski MX, Stern HM. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res* 2008;68:5878-87

Lemoine NR, Barnes DM, Hollywood DP, Hughes CM, Smith P, Dublin E, Prigent SA, Gullick WJ, Hurst HC. Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer. *Br J Cancer* 1992;66:1116-21

Liu B, Ordonez-Ercan D, Fan Z, Edgerton SM, Yang X, Thor AD. Downregulation of erbB3 abrogates erbB2-mediated tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Int J Cancer* 2007;120:1874-82

Lund CV, Popkov M, Magnenat L, Barbas CF, 3rd. Zinc finger transcription factors designed for bispecific coregulation of ErbB2 and ErbB3 receptors: insights into ErbB receptor biology. *Mol Cell Biol* 2005;25:9082-91

Lustgarten J, Dominguez AL, Cuadros C. The CD8+ T cell repertoire against Her-2/neu antigens in neu transgenic mice is of low avidity with antitumor activity. *Eur J Immunol* 2004;34:752-61

McArthur H. An overview of HER-targeted therapy with lapatinib in breast cancer. *Adv Ther* 2009;26:263-71

Melief CJ. Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur J Immunol* 2003;33:2645-54

Meyerhuber P, Conrad H, Starck L, Leisegang M, Busch DH, Uckert W, Bernhard H. Targeting the epidermal growth factor receptor (HER) family by T cell receptor gene-modified T lymphocytes. *J Mol Med* 2010;88:1113-21

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006;314:126-9

Morgan RA, Dudley ME, Yu YY, Zheng Z, Robbins PF, Theoret MR, Wunderlich JR, Hughes MS, Restifo NP, Rosenberg SA. High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens. *J Immunol* 2003;171:3287-95

Neudorfer J, Schmidt B, Huster KM, Anderl F, Schiemann M, Holzapfel G, Schmidt T, Germeroth L, Wagner H, Peschel C, Busch DH, Bernhard H. Reversible HLA multimers (Streptamers) for the isolation of human cytotoxic T lymphocytes functionally active against tumor- and virus-derived antigens. *J Immunol Methods* 2007;320:119-31

Panelli MC, Wunderlich J, Jeffries J, Wang E, Mixon A, Rosenberg SA, Marincola FM. Phase 1 study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp100. *J Immunother* 2000;23:487-98

Peoples GE, Gurney JM, Hueman MT, Woll MM, Ryan GB, Storrer CE, Fisher C, Shriver CD, Ioannides CG, Ponniah S. Clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine to prevent recurrence in high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23:7536-45

Phan GQ, Touloukian CE, Yang JC, Restifo NP, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA et al. Immunization of patients with metastatic melanoma using both class I- and class II-restricted peptides from melanoma-associated antigens. *J Immunother* 2003;26:349-56

Philip PA. Targeted therapies for pancreatic cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2008;2:S16-9

Piccart MJ, Di Leo A, Hamilton A. HER2 a 'predictive factor' ready to use in the daily management of breast cancer patients? *Eur J Cancer* 2000;36:1755-61

Reschke M, Mihic-Probst D, van der Horst EH, Knyazev P, Wild PJ, Hutterer M, Meyer S, Dummer R, Moch H, Ullrich A. HER3 is a determinant for poor prognosis in melanoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:5188-97

Ribas A, Butterfield LH, Glaspy JA, Economou JS. Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J Clin Oncol* 2003;21:2415-32

Robinson MK, Hodge KM, Horak E, Sundberg AL, Russeva M, Shaller CC, von Mehren M, Shchaveleva I, Simmons HH, Marks JD, Adams GP. Targeting ErbB2 and ErbB3 with a

bispecific single-chain Fv enhances targeting selectivity and induces a therapeutic effect in vitro. *Br J Cancer* 2008;99:1415-25

Rongcun Y, Salazar-Onfray F, Charo J, Malmberg KJ, Evrin K, Maes H, Kono K, Hising C, Petersson M, Larsson O, Lan L, Appella E, et al. Identification of new HER2/neu-derived peptide epitopes that can elicit specific CTL against autologous and allogeneic carcinomas and melanomas. *J Immunol* 1999;163:1037-44

Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001;411:380-4

Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 2009;21:233-40

Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 1996;272:1755-62

Sassen A, Rochon J, Wild P, Hartmann A, Hofstaedter F, Schwarz S, Brockhoff G. Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2008;10:R2

Schumacher TN. T-cell-receptor gene therapy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:512-9

Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem* 2007;282:1479-86

Seliger B, Rongcun Y, Atkins D, Hammers S, Huber C, Storkel S, Kiessling R. HER-2/neu is expressed in human renal cell carcinoma at heterogeneous levels independently of tumor grading and staging and can be recognized by HLA-A21-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer* 2000;87:349-59

Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, Moasser MM. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 2007;445:437-41

She QB, Solit D, Basso A, Moasser MM. Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway signaling. *Clin Cancer Res* 2003;9:4340-6

Singh R, Paterson Y. Immunoediting sculpts tumor epitopes during immunotherapy. *Cancer Res* 2007;67:1887-92

Smith BL, Chin D, Maltzman W, Crosby K, Hortobagyi GN, Bacus SS. The efficacy of Herceptin therapies is influenced by the expression of other erbB receptors, their ligands and the activation of downstream signalling proteins. *Br J Cancer* 2004;91:1190-4

Sommermeier D, Neudorfer J, Weinhold M, Leisegang M, Engels B, Noessner E, Heemskerk MH, Charo J, Schendel DJ, Blankenstein T, Bernhard H, Uckert W. Designer T cells by T cell receptor replacement. *Eur J Immunol* 2006;36:3052-9

Stern DF. ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res* 2003;284:89-98

Stern DF. ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008;13:215-23

Stern DF. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res* 2000;2:176-83

Stoica GE, Franke TF, Wellstein A, Morgan E, Czubayko F, List HJ, Reiter R, Martin MB, Stoica A. Heregulin-beta1 regulates the estrogen receptor-alpha gene expression and activity via the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 2003;22:2073-87

Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* 2001;166:973-81

Tanner B, Hasenclever D, Stern K, Schormann W, Bezler M, Hermes M, Brulport M, Bauer A, Schiffer IB, Gebhard S, Schmidt M, Steiner E, et al. ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:4317-23

Travis A, Pinder SE, Robertson JF, Bell JA, Wencyk P, Gullick WJ, Nicholson RI, Poller DN, Blamey RW, Elston CW, Ellis IO. C-erbB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators. *Br J Cancer* 1996;74:229-3

van der Horst EH, Murgia M, Treder M, Ullrich A. Anti-HER-3 MAbs inhibit HER-3-mediated signaling in breast cancer cell lines resistant to anti-HER-2 antibodies. *Int J Cancer* 2005;115:519-27

Wiseman SM, Makretsov N, Nielsen TO, Gilks B, Yorida E, Cheang M, Turbin D, Gelmon K, Huntsman DG. Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival. *Cancer* 2005;103:1770-7

Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 2003;200:290-7

Yannelli JR, Wroblewski JM. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine* 2004;23:97-113

Yi ES, Harclerode D, Gondo M, Stephenson M, Brown RW, Younes M, Cagle PT. High c-erbB-3 protein expression is associated with shorter survival in advanced non-small cell lung carcinomas. *Mod Pathol* 1997;10:142-8

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;58:4902-8

Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995;154:3821-35

zum Buschenfelde CM, Hermann C, Schmidt B, Peschel C, Bernhard H. Antihuman epidermal growth factor receptor 2 (HER2) monoclonal antibody trastuzumab enhances cytolytic activity of class I-restricted HER2-specific T lymphocytes against HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res* 2002;62:2244-7

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich tatkräftig beim Entstehen der Dissertation unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. Christian Peschel für die Möglichkeit, die Dissertation im hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar der technischen Universität durchzuführen.

Mein besonderer Dank für die hilfreiche Unterstützung und intensive Betreuung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht vor allem an meine Doktormutter Prof. Dr. Helga Bernhard.

Außerdem möchte ich mich herzlich bedanken bei Frau Dr. Heinke Conrad für die wunderbare Zusammenarbeit, für ihre Freundschaft sowie für ihre guten Ratschläge.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Frau Julia Neudorfer, Frau Barbara Kast und Frau Kathrin Hofer für die technische Assistenz und die tolle Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Ehemann Herrn Felix Schaller bedanken, der mir insbesondere bei computertechnischen Fragen und Problemen eine große Hilfe war.