

**Lehrstuhl für Experimentelle Ernährungsmedizin
der Technischen Universität München**

und

**III. Medizinische Klinik und Poliklinik
am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München**

Immunogenität von BCR-ABL-regulierten Tumorantigenen

Florian Scheich

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

**Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Michael Schemann

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dirk Haller
2. apl. Prof. Dr. med., Dr. med. habil. Helga Bernhard
3. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Arne Skerra

Die Dissertation wurde am 14.06.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 05.09.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	Die adaptive Immunität.....	1
1.1.2	Professionelle antigenpräsentierende Zellen.....	3
1.1.3	Struktur und Funktion von MHC-Molekülen	3
1.1.4	MHC-Klasse-I-Peptidprozessierung, -beladung und -präsentation.....	5
1.1.5	Aktivierung zytotoxischer T-Zellen.....	6
1.2	Identifizierung und Bedeutung von Tumorantigenen.....	7
1.3	Chronisch myeloische Leukämie (CML).....	10
1.3.1	Molekularbiologische Grundlagen der CML.....	10
1.3.2	Mechanismen der malignen Transformation von BCR-ABL positiven Zellen.....	11
1.3.2.1	BCR-ABL-induzierte, mitogene Signalkaskaden	12
1.3.3	Aktuelle Therapieansätze bei CML.....	13
1.3.3.1	Interferon- α -Therapie.....	13
1.3.3.2	Imatinib-Therapie.....	14
1.3.3.3	Knochenmarks- und Stammzelltransplantation.....	15
1.4	Immuntherapeutisches Potenzial der BCR-ABL positiven CML.....	16
1.5	Ziele und bearbeitete Fragestellung.....	18
2	Durchführung und Ergebnisse.....	20
2.1	Expansion von BCR-ABL spezifischen T-Zellen mit Hilfe von Peptid-beladenen dendritischen Zellen.....	20
2.1.1	Screening und T-Zell Klonierung nach ELISpot-Assay.....	21
2.1.2	Screening und T-Zell Klonierung mit Hilfe von MHC/Peptid-Multimerfärbung....	23
2.2	Vergleich der Immunogenität von BCR-ABL-regulierten Antigenen mit dem BCR-ABL Protein	25
2.2.1	Gezieltes Mutieren („ <i>site directed mutagenesis</i> “) von BCR-ABL zum Ausschalten der Kinaseaktivität.....	25
2.2.2	Generierung von Zielzellen die BCR-ABL in seiner Wildtyp oder Kinase defizienten Form exprimieren.....	28
2.2.2.1	Generierung von BCR-ABL exprimierenden LCLs.....	28
2.2.2.2	Generierung von BCR-ABL ⁺ DCs mittels mRNA-Elektroporation	29
2.2.3	Stimulation von CD8 ⁺ T-Zellen mit BCR-ABL exprimierenden DCs.....	31
2.2.3.1	DCs elektroporiert mit herkömmlicher IVT BCR-ABL mRNA.....	31
2.2.3.2	Test der Regulativen Fähigkeiten von BCR-ABL RNActive mRNA.....	32
2.2.3.3	T-Zellstimulation mit DCs, elektroporiert mit β -Globin stabilisierter BCR-ABL mRNA.....	34

2.2.3.4	Analyse der T-Zellspezifität mit DCs als Zielzellen.....	35
2.2.3.5	Test des T-Zellspezifitätsmusters in CML-Patient.....	37
2.2.3.6	Ausschluß unspezifischer NK-Zellaktivität.....	39
2.2.3.7	Berechnung des IFN- γ Spot Index.....	42
2.2.4	Untersuchung der Immunogenität von Imatinib mesylate behandelten, BCR-ABL exprimierenden DC.....	43
2.2.4.1	Einfluss von IM auf Maturation von DCs.....	43
2.2.4.2	Einfluss von IM auf T-Zellprimingkapazitäten von DCs.....	44
2.2.4.3	T-Zellstimulation mit IM-behandelten, BCR-ABL exprimierenden DCs.....	45
2.2.5	Untersuchung der Immunogenität von BCR-ABL exprimierenden Tumorzelllinien	46
2.2.6	Untersuchung der Granzym B Freisetzung von T-Zellen, die mit Bcr-Abl WT ⁺ bzw. -KD ⁺ DCs stimuliert wurden.....	47
2.3	Generierung von CTL-Klonen gegen das Tumorantigen Proteinase 3.....	48
3	Diskussion.....	51
3.1	Generierung BCR-ABL-reaktiver CTLs.....	51
3.2	Analyse des T-Zellrepertoires gegen BCR-ABL und BCR-ABL-regulierte Antigene.....	53
3.3	Generierung eines tumorlytischen CTL-Klons gegen das Tumorantigen Proteinase 3.....	59
4	Zusammenfassung.....	60
4.1	Summary.....	61
5	Material und Methoden.....	62
5.1	Geräte.....	62
5.2	Material.....	63
5.2.1	Chemikalien und biogene Substanzen.....	63
5.2.2	Radioaktive Substanzen.....	65
5.2.3	Zellkulturmedien, Zusätze und Wachstumsfaktoren.....	65
5.2.4	Peptide.....	66
5.2.5	Enzyme.....	66
5.2.6	Antikörper.....	66
5.2.7	Zelllinien.....	67
5.2.8	Oligonukleotide.....	67
5.2.9	DNA- und Protein Molekulargewichtsmarker.....	67
5.2.10	DNA/RNA Aufreinigungssysteme.....	68
5.2.11	Puffer und Standardlösungen.....	68
5.3	Methoden.....	70
5.3.1	Molekulabiologische Methoden.....	70
5.3.1.1	Transformation von kompetenten Bakterien.....	70

5.3.1.2	Plasmid-DNA-Amplifikation in einer LB-Flüssigkultur.....	70
5.3.1.3	Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien.....	71
5.3.1.4	RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen.....	72
5.3.1.5	<i>in vitro</i> Transkription (IVT) von mRNA.....	72
5.3.1.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA.....	73
5.3.1.7	DNA-Gelelektrophorese.....	73
5.3.1.8	Restriktionsverdau.....	74
5.3.1.9	Ligation von DNA.....	74
5.3.1.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	75
5.3.1.11	Gelextraktion.....	76
5.3.2	Zellkultur.....	77
5.3.2.1	Kultivierung von Zelllinien.....	77
5.3.2.2	Zellzahlbestimmung.....	77
5.3.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	77
5.3.2.4	Generierung von immortalisierten B-Zelllinien.....	77
5.3.2.5	Retrovirale Transduktion.....	78
5.3.2.6	Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs).....	79
5.3.2.7	Differenzierung und Ausreifung von DCs aus Monozyten.....	79
5.3.2.8	Exogene Peptidbeladung von Zellen.	80
5.3.2.9	Gentransfer in DC mittels mRNA-Elektroporation.....	80
5.3.2.10	Isolierung von CD8 ⁺ T-Zellen.....	81
5.3.2.11	Priming von CD8 ⁺ T-Zellen.....	81
5.3.2.12	Klonierung von T-Zellen.....	81
5.3.3	T-Zellspezifitätstests und Analysen.....	82
5.3.3.1	⁵¹ Cr-Freisetzungstest.....	82
5.3.3.2	ELISpot-Zytokinsekretionstest.....	84
5.3.3.3	Durchflusszytometrische Zellanalysen („FACS-Analyse“.....)	85
5.3.4	Proteinbiologische Methoden.....	87
5.3.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	87
5.3.4.2	Western Blotting und immunchemischer Proteinnachweis.....	88
5.3.5	Statistische Datenanalyse.....	89
6	Literatur.....	90
	Danksagung.....	96
	Appendix.....	97

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gamma
μg	10^{-6} Gramm
μl	10^{-6} Liter
μM	10^{-6} Mol
Abb.	Abbildung
ABL	„Abelson murine leukemia oncogene“
APC	Antigen-präsentierende Zelle („ <i>antigen presenting cell</i> “)
APS	Ammoniumpersulfat
BCR	„breakpoint cluster region“
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CD	Differenzierungscluster („ <i>cluster of differentiation</i> “)
cDNS	komplementäre DNS
CIAP	alkalische Phosphatase („ <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> “)
CTL	zytotoxische T-Zelle („ <i>cytotoxic T cell</i> “)
DC	dendritische Zellen („ <i>dendritic cell</i> “)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISpot	„enzyme-linked immunosorbent spot assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	„extracellular regulated kinase“
FACS	„Fluorescence-Activated Cell Sorter“
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor („ <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> “)
GrzB	Granzym B
HLA	„human leukocyte antigen“
IFN- α	Interferon α
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-7	Interleukin 7
IL-12	Interleukin 12
IL-15	Interleukin 15
IMDM	„Iscove's Modified Dulbecco's Media“
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LMP	„low molecular mass polypeptide“

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („ <i>major histocompatibility complex</i> “)
min	Minute
mM	10 ⁻³ Mol
MOI	„Multiplicity of infection“
mRNA	messenger RNA
ng	10 ⁻⁹ Gramm
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PE	Phycoerythrin
PGE-2	Prostaglandin E2
PI3-K	Phosphoinositol 3-Kinase
PKC δ	Proteinkinase C δ
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ras	„rat sarcoma“
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute medium“
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Std.	Stunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetatpuffer
TAP	„transporter associated with antigen processing“
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF- β	„transforming growth factor“ β
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor α („ <i>tumor necrosis factor α</i> “)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit („ <i>unit</i> “)
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Als Immunsystem (vom lateinischen *immunis* für „frei“, „unberührt“, „verschont“) bezeichnet man das Abwehrsystem des Menschen bzw. der höheren Wirbeltiere, das einerseits mögliche Gefahren durch eingedrungene Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten abwendet, andererseits aber auch entartete, maligne körpereigene Zellen bekämpft. Um diese Aufgaben zu bewerkstelligen hat sich das Immunsystem zu einem komplizierten Netzwerk aus verschiedenen Organen, Zelltypen und Molekülen entwickelt, das in der Lage ist, körpereigene Strukturen von fremden zu unterscheiden. Grundsätzlich lassen sich die Schutzmechanismen des Immunsystems einer angeborenen und einer erworbenen („adaptiven“) Immunantwort zuordnen.

1.1.1 Angeborene und adaptive Immunität

Eine angeborene, oder auch unspezifische Immunität bilden zum einen physikalische Barrieren (z.B. Haut, Schleimhäute), zum anderen das Komplementsystem, Phagozyten und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), womit verschiedene Krankheitserreger in einer ersten Abwehrreaktion durch die Erkennung konservierter Strukturen bekämpft werden können. Diese Mechanismen zeichnen sich einerseits durch eine geringe Spezifität und fehlenden Schutz vor einer erneuten Infektion („Gedächtnis“) aus, andererseits werden im Rahmen einer solchen Immunantwort wichtige Weichen für die im Anschluß daran folgende spezifische Immunreaktion gestellt.

Eine adaptive, oder auch spezifische Immunantwort hat zum einen die Aufgabe, die angeborene Immunantwort zu verstärken bzw. zu fokussieren. Zum anderen ist sie für das sogenannte immunologische Gedächtnis verantwortlich, d.h. dass eine erneute Infektion mit dem gleichen Krankheitserreger eine verstärkte und beschleunigte Immunantwort auslöst. Die adaptive Immunantwort basiert auf der klonalen Selektion von verschiedenen Arten von Lymphozyten. Mit einer Vielzahl an unterschiedlichen hochspezifischen Rezeptoren ermöglichen diese Zellen dem Immunsystem die Erkennung fremder Antigene und anschließend das Ausbilden eines Antigen-spezifischen immunologischen Gedächtnisses. Das adaptive Immunsystem kann weiter unterteilt werden in eine humorale und zelluläre Komponente.

Die humorale Immunantwort wird durch lösliche Antikörpermoleküle vermittelt, die von B-Lymphozyten sezerniert werden und die gegen membranständige Antigene, z.B. von

extrazellulären Krankheitserregern, oder gegen Toxine gerichtet sind. Komponenten des Komplementsystems (Plasmaproteine) können die ausgelöste Reaktion durch Erniedrigung der Aktivierungsschwelle der B-Lymphozyten verstärken.

Die Effektorzellen der zellulären Immunantwort sind die zytotoxischen T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL), charakterisiert durch Expression des Oberflächenrezeptors CD8. Sie sind in der Lage, virusinfizierte Zellen bzw. Tumorzellen über ihre spezifischen T-Zellrezeptoren zu erkennen und durch die Ausschüttung verschiedener Enzyme wie Perforin oder Granzymen zu lysieren. Durch Expression des Fas-Liganden (CD95L, CD178) ist ein CTL in der Lage, durch Bindung an Fas auf der Zielzelle ein Apoptosesignal auszulösen.¹

Weiterer Bestandteil der zellulären Immunantwort sind die T-Helferzellen (Th-Zellen), charakterisiert durch Expression des Rezeptors CD4 und unterteilbar in Th₁- und Th₂-Zellen). Sie unterstützen, im Fall von Th₁-Zellen, zum einen die Proliferation von CTLs durch Sezernierung des Cytokins Interleukin-2. Zum anderen exprimieren Th₁-Zellen Cytokine wie Interferon- γ und GM-CSF oder das Glykoprotein CD40 Ligand, was die Effektivität von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie dendritischen Zellen (DCs), zur Aktivierung von T-Zellen verstärkt. Th₂-Zellen produzieren, neben anderen Zytokinen, hauptsächlich Interleukin-4 und -5, was spezifisch die Antikörperproduktion von B-Zellen aktiviert (Übersicht: siehe ²).

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) konnten in den letzten Jahren als weitere Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen identifiziert werden. Von T-Helferzellen werden sie durch zusätzliche Expression des Oberflächenmarkers CD25 in Kombination mit dem Transkriptionsfaktor FoxP3 unterschieden. Ihnen kommt die wichtige Aufgabe zu, überschießende und autoreaktive Immunreaktionen zu unterdrücken. Dabei kann zwischen natürlichen und induzierten T_{reg} unterschieden werden, die ihre suppressiven Funktionen entweder über direkten Zell-Zell-Kontakt, beispielsweise über Expression des Rezeptors CTLA-4, vermitteln, oder aber durch Sezernierung verschiedener Zytokine wie Interleukin-10 oder TGF- β .^{3,4,5}

Ein weiterer, erst 2006 näher definierter Subtyp der CD4⁺ T-Helferzellen sind die sogenannten Th₁₇-Zellen. Sie sind charakterisiert durch die Expression von IL-17 und werden induziert durch Interleukin-23, Interleukin-6 und TGF- β . Sie spielen eine Schlüsselrolle bei autoinflammatorischen Reaktionen⁶ und haben daher vermutlich entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung verschiedenster Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn.^{7,8}

1.1.2 Professionelle antigenpräsentierende Zellen

Bei der Initiierung einer T-Zell-vermittelten Immunantwort kommt APCs eine Schlüsselrolle zu. Zu den APCs werden Makrophagen, B-Lymphozyten und DCs gezählt.² DCs stellen dabei die potentesten APCs dar und sind nach heutigem Kenntnisstand als einzige APCs in der Lage, durch Antigenpräsentation und gleichzeitige Expression kostimulatorischer Moleküle, naive CTLs oder T-Helferzellen direkt zu aktivieren und zur klonalen Expansion anzuregen.⁹ Bislang wurden beim Menschen zwei DC-Linien beschrieben: myeloide DCs (DC1), die aus myeloiden Monozyten hervorgehen (Pre-DC1) und IL-12 produzieren um eine CTL- bzw. T_H1-Aktivierung zu induzieren, und DCs, die aus lymphoiden Vorläuferzellen hervorgehen und durch eine lediglich geringe IL-12-Freisetzung eine T_H2-Immunantwort induzieren (DC2).¹⁰ Nach Kontakt bzw. Aufnahme eines Antigens und gleichzeitiger Stimulation der zunächst unreifen DCs mit inflammatorischen Cytokinen (z.B. TNF α , IL-4, GM-CSF) beginnen die DCs das Gewebe in Richtung afferenter Lymphgefäße zu verlassen („*homing*“) und können kurz darauf in den T-Zellbereichen der Lymphknoten nachgewiesen werden.¹¹ Die nun reifen DCs haben einen veränderten Phänotyp und sind nicht mehr fähig weitere Antigene aufzunehmen. Sie sind nun in der Lage, durch Präsentation der zuvor aufgenommenen Antigene in Assoziation mit MHC-Molekülen, äußerst effizient T-Zellen zu stimulieren. Entscheidend für die Aktivierung naiver T-Zellen durch DCs ist hierbei, dass es sich tatsächlich um eine reife DC handelt, was durch die Expression charakteristischer kostimulatorischer Oberflächenmoleküle (z.B. CD80, CD86, CD83, HLA-DR) gekennzeichnet ist.¹² Eine Präsentation von Antigenen in Abwesenheit dieser Moleküle hat eine Anergie, also Inaktivität, der stimulierten T-Zellen zur Folge.¹³ Hintergrund dieses Mechanismus ist, dass durch ständige Präsentation von Selbst-Antigenen im peripheren Gewebe, z.B. durch unreife DCs, die T-Zell-Selbsttoleranz aufrechterhalten und damit Autoimmunität verhindert wird.

1.1.3 Struktur und Funktion von MHC-Molekülen

Allgemein bezeichnet der Begriff MHC („*major histocompatibility complex*“) eine Gruppe von Genen, die für MHC-Moleküle kodieren. Beim Menschen heißt dieser Komplex „*human leukocyte antigen*“ (HLA) und befindet sich auf Chromosom 6.¹⁴ MHC-Moleküle haben die Funktion, Peptide aus Proteinen zytosolischer oder extrazellulärer Herkunft zu binden und an der Zelloberfläche zu präsentieren. Prinzipiell kann man zwischen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen unterscheiden. Bezüglich ihrer Peptidbindungsspezifität zeigen MHC-Moleküle eine außerordentlich große Variabilität. Grundlage dafür ist zum einen die Polygenie der MHC-Gene, d.h. dass es mehrere MHC-Gene der Klasse I und II gibt (Beim Menschen:

Klasse I: HLA-A, -B und -C; Klasse II: HLA-DR, -DP und -DQ), die kodominant exprimiert werden. Zum anderen zeigen diese Gene einen starken Polymorphismus, d.h. für jedes MHC-Gen existieren verschiedene Allele. Dieser Polymorphismus der MHC-Gene findet sich in den MHC-Proteinen in der sogenannten Bindungsfurche wieder. Sie bildet eine spezifische Bindungstasche, die je nach Struktur von unterschiedlichen Peptiden besetzt werden kann. Entscheidend für eine effiziente Bindung sind hierbei komplementäre, nicht-kovalente Wechselwirkungen (van-der-Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen) zwischen Ankeraminoaciden des Peptids und der allelspezifischen Peptid-Bindungsfurche.¹⁵ Die Bindungsfurche von MHC-Klasse-I-Molekülen ist an beiden Enden geschlossen, und lässt daher nur die Bindung von 8-10 Aminosäure langen Peptidketten zu.¹⁶ MHC-Klasse II-Moleküle besitzen dagegen eine zu beiden Seiten offene Bindungsfurche, die Peptide unterschiedlicher Größe aufnehmen kann (9-25 Aminosäuren).¹⁷

MHC-Klasse I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert.¹⁸ Aufgebaut sind sie aus einer 45 kDa schweren α -Kette (Schwere Kette), die sich aus drei extrazellulären Domänen (α_{1-3}), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne zusammensetzt, und einer 12 kDa schweren β -Kette (β_2 -Mikroglobulin), die extrazellulär nicht-kovalent mit der α -Kette assoziiert ist. Die Peptid-Bindungsfurche wird von der α_1 und α_2 -Domäne der schweren Kette gebildet (siehe Abb.1A).

Dagegen werden MHC-Klasse-II-Moleküle lediglich in APCs exprimiert.¹⁸ Sie sind aus einer α -Kette (34 kDa) und einer β -Kette (29 kDa) mit jeweils zwei extrazellulären Domänen ($\alpha_{1/2}$, $\beta_{1/2}$), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne aufgebaut. Die α - und die β -Kette sind wie bei MHC-Klasse I-Molekülen nicht-kovalent miteinander verbunden. Die Peptid-Bindungsfurche wird hier von der α_1 und β_1 -Domäne gebildet. (Zur Übersicht siehe ¹⁸)

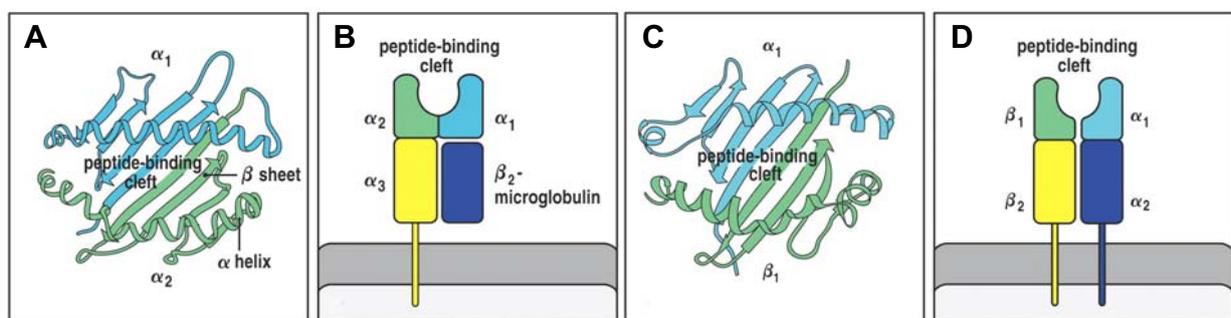


Abb. 1: Aufbau von MHC-Klasse I- und -Klasse II-Molekülen. (A) Aufsicht auf die Peptid-Bindungsfurche eines MHC-Klasse I-Moleküls, gebildet durch die α_1 - und α_2 -Domäne der α -Kette. (B) Schematischer Aufbau eines MHC-Klasse I-Komplexes. (C) Aufsicht auf die Peptid-Bindungsfurche eines MHC-Klasse II-Moleküls, gebildet durch die α_1 - und β_1 -Domäne. (D) Schematischer Aufbau eines MHC-Klasse II-Komplexes. (modifiziert nach ²)

1.1.4 MHC-Klasse-I-Peptidprozessierung, -beladung und -präsentation

Die auf der Zelloberfläche in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten Peptide stammen, im Gegensatz zu MHC-Klasse-II präsentierten Peptiden, aus endogenen, im Zytosol abgebauten Proteinen. Dies können einerseits Selbstproteine sein, oder aber virale oder Tumorspezifische Proteine. Nachdem derartige Proteine im Cytosol durch Polyubiquitinierung als „alt“ markiert worden sind, folgt ihr proteasomaler Abbau.¹⁹ Das Proteasom ist ein multikatalytischer, tonnenförmiger Komplex, dessen Grundgerüst, das 20S Proteasom, aus 28 Untereinheiten besteht, die sich wiederum in α - und β -Komponenten unterteilen lassen. Die Untereinheiten sind in vier Ringen aus jeweils sieben Untereinheiten so angeordnet, dass sie innerhalb des Proteasoms drei Hohlräume formen. Die β -Komponenten des zentralen Hohlraums sind hierbei für die katalytische Aktivität des Proteasoms, also die Peptidprozessierung, verantwortlich.²⁰ Es existieren verschiedene Proteasom-Isoformen. Als immunologisch bedeutendste ist hier das sog. Immunoproteasom zu nennen.²¹ Es beeinflusst insbesondere bei professionellen antigenpräsentierenden Zellen oder nach IFN- γ Induktion entscheidend die Peptidprozessierung.²²

Neueste Erkenntnisse haben ergeben, dass allerdings nicht nur, wie oben erwähnt, „alte“ und ausgediente Proteine einem proteasomalen Abbau unterzogen werden, sondern auch, durch Fehler bei der mRNA-Translation entstandene, missgefaltene und fehlerhafte Proteine, sog. „*defective ribosomal products*“ (DRiPs).²³ Peptide aus solchen DRiPs haben demnach einen wesentlichen Anteil am gesamten MHC-Klasse-I-präsentierten Peptidrepertoire auf der Oberfläche einer Zelle.^{24,25}

Die proteasomal generierten Peptide werden nun ATP-abhängig von sog. TAP-Proteinen („*transporter associated with antigenprocessing*“) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wobei bevorzugt Peptide mit hydrophoben bzw. basischen Resten am C-Terminus von TAP-Proteinen transportiert werden.²⁶ Für die nun im ER folgende Beladung der MHC-Klasse-I-Moleküle mit Peptiden, wirken verschiedene Faktoren zusammen. Hier wären vor allem die Chaperone Calnexin und Calretikulin und das TAP-assoziierte Protein Tapasin zu nennen, die den MHC-Klasse-I-Komplex während seiner Faltung im ER stabilisieren und seine Peptidbeladung koordinieren.^{27,28} Nach diesem Vorgang wird der MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex schließlich über den Golgi-Apparat zur Antigenpräsentation an die Zelloberfläche transportiert.

1.1.5 Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten

T-Zellen entstammen wie alle anderen Zellen des hämatopoetischen Systems einer hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks. Sie durchlaufen im Zuge ihrer Reifung, die im Thymus stattfindet, positive und negative Selektionsmechanismen. Dabei werden einerseits solche T-Zellen selektioniert, die mit mittlerer Affinität Peptide in Kontext mit Selbst-MHC-Molekülen erkennen (positive Selektion)²⁹, andererseits werden autoreaktive T-Zellen depletiert, die mit hoher Affinität gegen körpereigene Antigene gerichtet sind (negative Selektion), um ausschließliche Reaktivität gegen Selbst-MHC-präsentierte Fremdanigene sicherzustellen.³⁰ Insbesondere die Relevanz der negativen Selektion wird bei Autoimmunerkrankungen deutlich, bei denen es zu einer Immunreaktion gegen körpereigene Antigene kommt. Anschließend treten die T-Zellen einen Kreislauf durch den Blutstrom, das Lymphgefäßsystem und die peripheren Lymphorgane an, der ca. 24 Std. dauert.³¹ Aus dem Thymus austretende T-Zellen, die noch nicht mit dem auf ihren T-Zellrezeptor (TCR) passenden MHC-Peptid-Komplex in Kontakt gekommen sind, bezeichnet man als naiv. Die Aktivierung, das sog. „*priming*“, von naiven CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen findet in der Peripherie in dem einer Infektion am nächsten gelegenen Lymphknoten statt. Sie setzt neben der stabilen Bindung vom TCR an einen MHC-Peptid-Komplex die Signaltransduktion über eine Reihe weiterer kostimulatorischer Moleküle voraus, wie sie nur von professionellen APCs wie DCs exprimiert werden (1.1.2).³² Diese begeben sich, nach Aktivierung am Ort der Infektion, ebenfalls zu dem der Infektion am nächsten gelegenen Lymphknoten. Eine wichtige Rolle bei diesen Wechselwirkungen zwischen T-Zelle und APC nehmen hierbei die Rezeptoren CD80 und CD86 auf den APC ein, die an CD28 auf den T-Zellen binden.³³ Die Bindung des CD8-Rezeptors der T-Zelle an die $\alpha 3$ -Domäne des MHC-Klasse I-Moleküls wirkt zusätzlich stabilisierend auf den TCR-MHC-Peptid-Komplex (Abb. 2).³⁴

Die Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen, bei gleichzeitiger TCR-MHC-Peptid Bindung, hat, wie unter Punkt 1.1.2 bereits angesprochen, T-Zell-Anergie zur Folge.¹³ Im Zuge der durch diese Wechselwirkungen ausgelösten T-Zellaktivierung beginnen die T-Zellen zu proliferieren und produzieren zur autokrinen Stimulation verstärkt den T-Zellwachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2). Die Expression einer hochaffinen α -Kette des IL-2 Rezeptors auf den T-Zellen verstärkt zusätzlich den Effekt des IL-2. Als Folge dieser Proliferation kommt es zur klonalen Expansion von T-Zellen mit einem bestimmten TCR. In solch einem aktivierten Zustand sind zytotoxische T-Zellen (CTL) schließlich in der Lage ihre Effektorfunktion, wie unter Punkt 1.1.1 beschrieben, auszuführen.

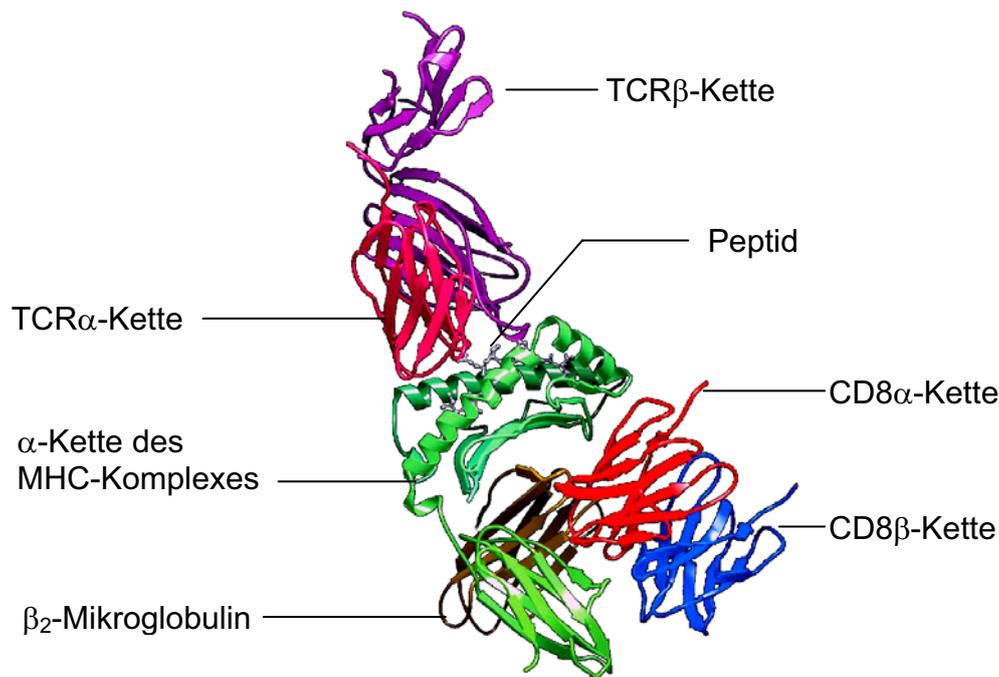


Abb. 2: Darstellung eines TCR-MHC-Klasse I-Komplexes zusammen mit einem an den MHC-Komplex gebundenen CD8-Rezeptor. CD8 bindet an die $\alpha 3$ -Domäne des MHC-Komplexes und beeinflusst daher nicht die Bindung des TCR an das MHC-gebundene Peptid, stabilisiert jedoch den gesamten Komplex. Darstellung als Ribbon-Diagramm, zur besseren Unterscheidung ist das Peptid als Backbone-Darstellung (grau) abgebildet. (modifiziert nach ²)

1.2 Identifizierung und Bedeutung von Tumorantigenen

Tumorzellen unterscheiden sich in ihrem Proteom erheblich von gesunden Zellen desselben Gewebes. Die Expression tumorspezifischer Proteine zieht die Präsentation dieser Antigene auf der Tumorzelloberfläche nach sich, was wiederum dem Immunsystem theoretisch eine Möglichkeit bietet, Tumorzellen von gesunden Zellen zu unterscheiden und als „fremd“ zu erkennen. Sowohl im murinen als auch im humanen System konnte diese spezifische Erkennung von Tumor-assoziierten Antigenen durch T-Lymphozyten bereits vor Jahren nachgewiesen werden. Zur spezifischen Identifizierung von immunogenen Tumorantigenen kamen dabei verschiedene Methoden zur Anwendung:

Die ersten Tumorantigene konnten durch die Analyse Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TILs) identifiziert werden. Vor allem Melanom-spezifische Antigene konnten identifiziert werden, indem HLA-identische Melanomzelllinien, die von den TILs nicht erkannt wurden, mit einer großen Menge unterschiedlicher cDNAs (cDNA Bibliotheken) transfiziert wurden, die aus von TILs-erkannten Melanomzellen isoliert worden waren.^{35,36}

Bei der SEREX („serological screening of cDNA-libraries“)-Methode hingegen macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass in Patientenserum vielfach Antikörper gegen Tumorantigene nachgewiesen werden können. Das Serum dieser Patienten kann zum Screening von *in vitro*-

translatierten cDNA Bibliotheken eingesetzt werden, die aus Tumorzellen der Patienten oder Zelllinien isoliert worden waren.³⁷

Eine weitere Möglichkeit bietet die direkte Eluierung, also Ablösung und Isolierung von MHC-gebundenen Peptiden von der Oberfläche von Tumorzellen. Die Identifizierung erfolgt anschließend durch massenspektrometrischen Analyse dieser Peptide.³⁸

Schließlich konnten in den letzten Jahren auch durch den Einsatz von DNA-Chips („*microarrays*“) tumorspezifisch exprimierte Proteine identifiziert werden und mit Hilfe einer sog. „*epitope-prediction*“ Software (z.B. unter www.syfpeithi.de) aus diesen Proteinen hervorgehende, tumorassoziierte Epitope eingegrenzt werden.³⁹

Bislang entdeckte Tumorantigene lassen sich anhand ihres Expressionsmusters und weiterer Kriterien in verschiedene Gruppen unterteilen⁴⁰:

- Tumorspezifische, nicht-mutierte Antigene

Die Proteine, aus denen diese Antigene hervorgehen, werden lediglich in Tumorzellen und nicht in gesunden, adulten Zellen exprimiert. Hierzu werden auch die sogenannten „*cancer-testis*“ (CT) Antigene dazugezählt, die neben Tumorzellen auch in Zellen der Keimbahn exprimiert werden, die allerdings keine MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Proteine der MAGE-Familie gehören zu dieser Gruppe, aber auch das durch die SEREX-Methode identifizierte Protein NY-Eso1.⁴¹ Die Ursache der tumor- bzw. keimzellspezifischen Expression scheint im Fall dieser Gene eine Demethylierung der DNA zu sein, die unspezifisch das gesamte Genom erfasst und die Promotoren der CT-Antigene aktiviert.

- Gewebsspezifische, nicht-mutierte Differenzierungsantigene

Antigene, die von Zellen des gleichen Gewebetyps wie der des Tumors exprimiert werden. Beispielsweise relevant bei Melanozyten die die Antigene Melan-A, gp100, Tyrosinase und TRP („*tyrosinase related protein*“) exprimieren.^{42,43}

- Antigene, die nach Genfusionen oder -mutationen exprimiert werden

Der Austausch einzelner Aminosäuren oder ganzer Genabschnitte in einem Protein kann ebenfalls die Generierung und Präsentation neuer, für den Körper als „fremd“ angesehener Antigene zur Folge haben. Prominentestes Beispiel stellt hier das BCR-ABL Fusionsprotein dar, dessen Immunogenität im Rahmen dieser Arbeit näher beleuchtet werden soll (1.3). Im Zelladhäsionsmolekül β -Catenin führt dagegen eine einzige Punktmutation zur Entstehung eines immunogenen HLA-A24 restringierten Epitopes.⁴⁴

- Überexprimierte Antigene
Modifikationen im Promotorbereich eines Gens oder Genamplifikationen können zur Überexpression dieses Gens und damit zur Präsentation immunologisch relevanter Epitope führen. Dies ist beispielsweise bei der onkogenen Rezeptortyrosinkinase humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2 (HER2/ErbB2)⁴⁵ oder dem Tumorsuppressorprotein p53 der Fall.⁴⁶
- Virale Antigene
Aus Proteinen, die im Genom bestimmter onkogener Viren codiert sind, können ebenfalls immunogene Epitope hervorgehen. Als Beispiel sind hier die Proteine E6 und E7 aus dem humanen Papilloma-Virus (HPV) zu nennen.⁴⁷
- Posttranslational modifizierte Antigene
Seit kurzem gibt es Berichte über die Präsentation von posttranslational veränderten Epitopen auf MHC-Komplexen. So konnten in vivo phosphorylierte⁴⁸ oder glykosylierte⁴⁹ Epitope auf MHC-Klasse-I-Komplexen gefunden werden und Epitope, die aus dem Prozess des sogenannten „*peptide splicing*“ hervorgehen. Dabei werden zwei kleinere Epitop-Fragmente aus demselben Protein durch noch unbekannte Mechanismen miteinander verknüpft und so ein neues, „fremdes“ Epitop gebildet.^{50,51}

Die Tatsache, dass heutzutage von verschiedenen Tumorvarianten aus unterschiedlichen Geweben immunogene Tumorantigene isoliert werden konnten, wirft die Frage auf, warum sich trotz Expression solcher Antigene im Menschen überhaupt Tumore entwickeln und diese nicht sofort nach ihrer Entstehung durch ein funktionierendes Immunsystem zerstört werden. Die Erklärung dieses Phänomens ist vielschichtig und bislang nicht vollständig geklärt. Eine Erklärung für eine fehlende Immunreaktion gegen Autoantigene ist die negative Selektion von T-Zellen im Thymus bzw. der Mechanismus der peripheren Toleranz zur Verhinderung von Autoreaktivität, wobei potentiell Tumor-reaktive T-Zellen deletiert bzw. inaktiviert werden. Eine weitere wichtige Rolle spielen Mechanismen von Tumoren, der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen, sog. „*tumor-escape*“-Mechanismen. Die verringerte Expression unterschiedlicher Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie beispielsweise kann die Anzahl immunogener Peptide, die auf der Tumorzelloberfläche präsentiert werden drastisch herabsetzen und damit eine T-Zellerkennung verhindern.⁵² Weitere bekannte Mechanismen beeinflussen dagegen die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber verschiedener Apoptose-signalen.^{53,54}

1.3 Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) handelt es sich um eine Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, die durch eine starke Vermehrung aller granulozytären Vorstufen im Blut gekennzeichnet ist.⁵⁵

Der pathogenetische Schlüsselmechanismus, der der Entstehung der CML zu Grunde liegt konnte bereits 1960 von Nowell und Hungerford aufgeklärt werden. Sie fanden in CML-Patienten eine charakteristische Chromosomentranslokation, die sich durch ein verkürztes Chromosom 22 auszeichnete, das von diesem Zeitpunkt an sogenannte Philadelphia (Ph)-Chromosom.⁵⁶ Heute dient das Ph-Chromosom als zytogenetischer Marker der CML, der bei ca. 95% aller CML-Patienten nachgewiesen werden kann. Circa 15% aller Leukämien zählen zur CML und mit 1-2/100000 Inzidenzen pro Jahr ist die CML die häufigste in der Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen, die im Median zwischen dem 45. und dem 55. Lebensjahr auftritt.⁵⁷

Der Krankheitsverlauf der CML beginnt mit einer chronischen Phase, die von einer massiven Expansion leukämischer Stammzellen gekennzeichnet ist, aus denen zwar noch nahezu alle hämatopoetischen Linien hervorgehen können, die sich allerdings der normalen Wachstumskontrolle entzogen haben und unkontrolliert proliferieren. Diese Phase dauert im Schnitt 3-4 Jahre. Über eine sogenannte Akzelerierte Phase, die vermutlich durch die Aquisition zusätzlicher chromosomaler Abnormalien ausgelöst wird, folgt der Übergang zur finalen Krankheitsphase, der sogenannten Blastenkrise. Der Anteil undifferenzierter, transformierter Vorläuferzellen in Knochenmark und peripherem Blut steigt nun rapide an und endet trotz Behandlung häufig nach 3-6 Monaten mit dem Tod des Patienten.⁵⁸

1.3.1 Molekularbiologische Grundlagen der CML

Im Jahr 1985 konnte gezeigt werden, dass aufgrund der Chromosomentranslokation, die im Ph-Chromosom resultiert, aus Bestandteilen von Chromosom 9 und Chromosom 22 ein charakteristisches Fusionsgen entsteht: das normalerweise auf Chromosom 9 lokalisierte Protoonkogen c-ABL, welches eine Tyrosinkinase kodiert, fusioniert mit dem BCR (*breakpoint cluster region*)-Gen auf Chromosom 22.⁵⁹ Aus dieser Translokation resultiert das Fusionsgen BCR-ABL.⁶⁰

Der Translokationsbruchpunkt auf Chromosom 9 liegt stets oberhalb des ABL Exons a2,⁶¹ der Bruchpunkt auf Chromosom 22 hingegen liegt bei 40% aller CML-Patienten zwischen den BCR Exons b2 und b3, bei 55% zwischen BCR Exon b3 und b4.⁶² Nach der Translokation bilden die BCR- und ABL-Gene unabhängig von der Lage des Bruchpunktes eine

transkriptionelle Einheit, die vom Promotor des BCR-Gens reguliert wird.⁶³ Das nach Translation aus der Fusion hervorgehende BCR-ABL Protein ist 210kDa (p210) schwer und besitzt konstitutiv aktive Tyrosinkinaseaktivität.^{64,65} Alternativ zu p210 kann in Fällen von Ph⁺ akuter lymphatischer Leukämie (ALL) eine kürzere, 190kDa Variante (p190) von BCR-ABL nachgewiesen werden. Nachfolgend steht die Bezeichnung BCR-ABL für die p210 Variante des Proteins.

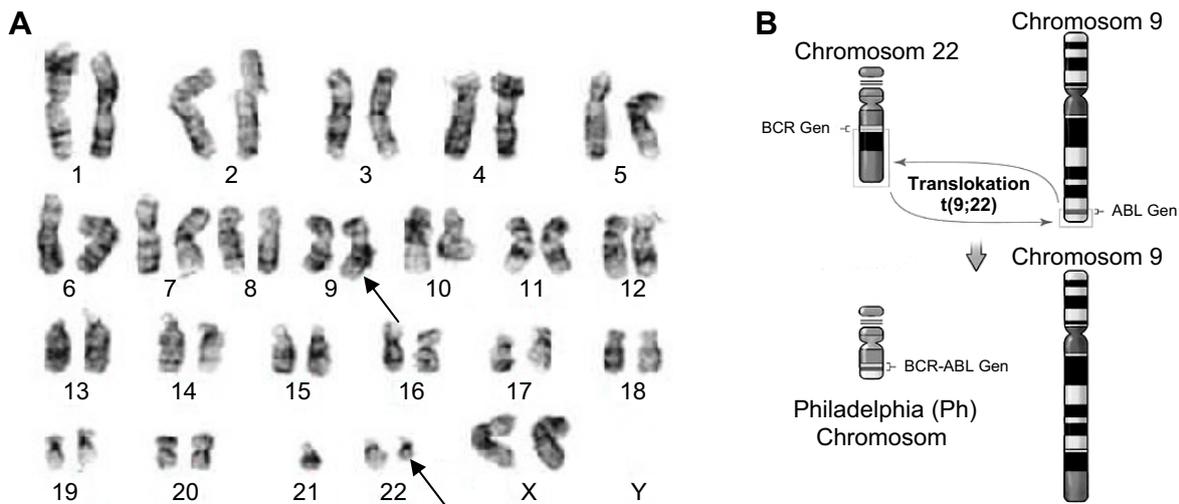


Abb. 3: Darstellung des Philadelphia Chromosoms. (A) Karyogramm eines CML-Patienten mit typischer Chromosomentranslokation t(9;22). Pfeile zeigen das mutierte Chromosom 9 bzw. das Ph-Chromosom an. (Haukeland Universität, HelseBergen, Norwegen) **(B)** Schematische Darstellung der Chromosomentranslokation t(9;22), aus der das Ph-Chromosom mit dem Fusionsgen BCR-ABL hervorgeht.

1.3.2 Mechanismen der malignen Transformation von BCR-ABL positiven Zellen

Die pathogenetischen Mechanismen, die der Transformation von Zellen, die das BCR-ABL Fusionsprotein exprimieren, zugrunde liegen, sind äußerst komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die Tyrosinkinase c-ABL hat ihren Namen von einem 1970 von Abelson entdeckten viralen Homolog v-ABL im Genom des murinen Leukämievirus muLV.⁶⁶ Beim humanen c-ABL handelt es sich um eine 145kD schwere, zytoplasmatisch und nukleär lokalisierte Tyrosinkinase.^{67,68} Durch Aufklärung der strukturellen Domänen von c-ABL konnten zahlreiche Funktionen des Proteins aufgedeckt werden. Eine Schlüsselrolle nehmen hierbei die SRC-Homologie Domänen ein: SH1 ist für die Kinaseaktivität verantwortlich. Die SH2 und SH3 Domäne sind für die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen und für die Vermittlung regulatorischer Funktionen verantwortlich.⁶⁸ Zusätzlich befindet sich C-terminal ein nukleäres Translokationssignal und Aktin- bzw. DNA-Bindungsstellen.^{69,70} Unter anderem konnte c-ABL

eine wichtige Rolle als negativer Regulator des Zellzyklus zugeordnet werden,⁷¹ aber auch eine Beteiligung an der Reparatur von Strahlungs-induzierten Schäden an der DNA.⁷²

In BCR-ABL negativen Zellen unterliegt die Tyrosinkinaseaktivität von c-ABL einer engen Kontrolle. Die Fusion von BCR mit c-ABL ermöglicht zum einen die Dimerisierung des Onkoproteins, wodurch es zur gegenseitigen Phosphorylierung von zwei BCR-ABL Proteinen an Tyrosinresten im jeweiligen Bereich des c-ABL „*kinase-activation loop*“ kommt. Dies hat zur Folge, dass die Kinaseaktivität des Fusionsproteins konstitutiv stark erhöht ist.⁷³ Zum anderen führen die BCR-Sequenzen zu einer vorwiegend zytoplasmatischen Lokalisation von BCR-ABL und zu seiner Assoziation mit Aktinfilamenten. Dies und die nun unkontrollierte Kinaseaktivität führen zur Aktivierung verschiedenster intrazellulärer Effektorproteine und Signalkaskaden, mit der Folge einer Deregulierung der Zellproliferation, verringerter Zelladhärenz und einer reduzierten Apoptoserate, was letztlich zur malignen Transformation BCR-ABL positiver Zellen führt.^{74,75}

1.3.2.1 BCR-ABL-induzierte, mitogene Signalkaskaden

Im Gegensatz zu gesunden Zellen, die zur Anregung von Proliferation und Differenzierung verschiedene Zytokin-induzierte Signale benötigen, sind maligne CML Zellen nicht auf solche Signale angewiesen. Dies ist dadurch zu erklären, dass, wie oben bereits erwähnt, durch die deregulierte BCR-ABL Tyrosinkinase multiple Signaltransduktionskaskaden angeschaltet werden, die sowohl mit mitogenen als auch mit anti-apoptotischen Effektorfunktionen in Verbindung gebracht werden können (Abbildung 4). Neben der Bindung verschiedener Adapterproteine wie CRKL⁷⁶, GRB-2⁷⁷ oder CBL⁷⁸ zählen der Ras⁷⁹, PI-3-Kinase⁸⁰- und STAT5-Signaltransduktionsweg⁸¹ zu den wichtigsten BCR-ABL induzierten Signalkaskaden, die wiederum, teilweise überschneidend, weitere Substrate und Signalmoleküle binden und aktivieren. Ein gezieltes Ausschalten der BCR-ABL Kinasedomäne unterbindet all diese Wechselwirkungen. In Expressionsstudien konnte durch solch einen „knock out“ der BCR-ABL Kinase das Ausmaß der von BCR-ABL beeinflussten Signalwege bzw. Genexpression auf das Expressionsmuster einer Zelle aufgeklärt werden (Abbildung 4B).⁸²

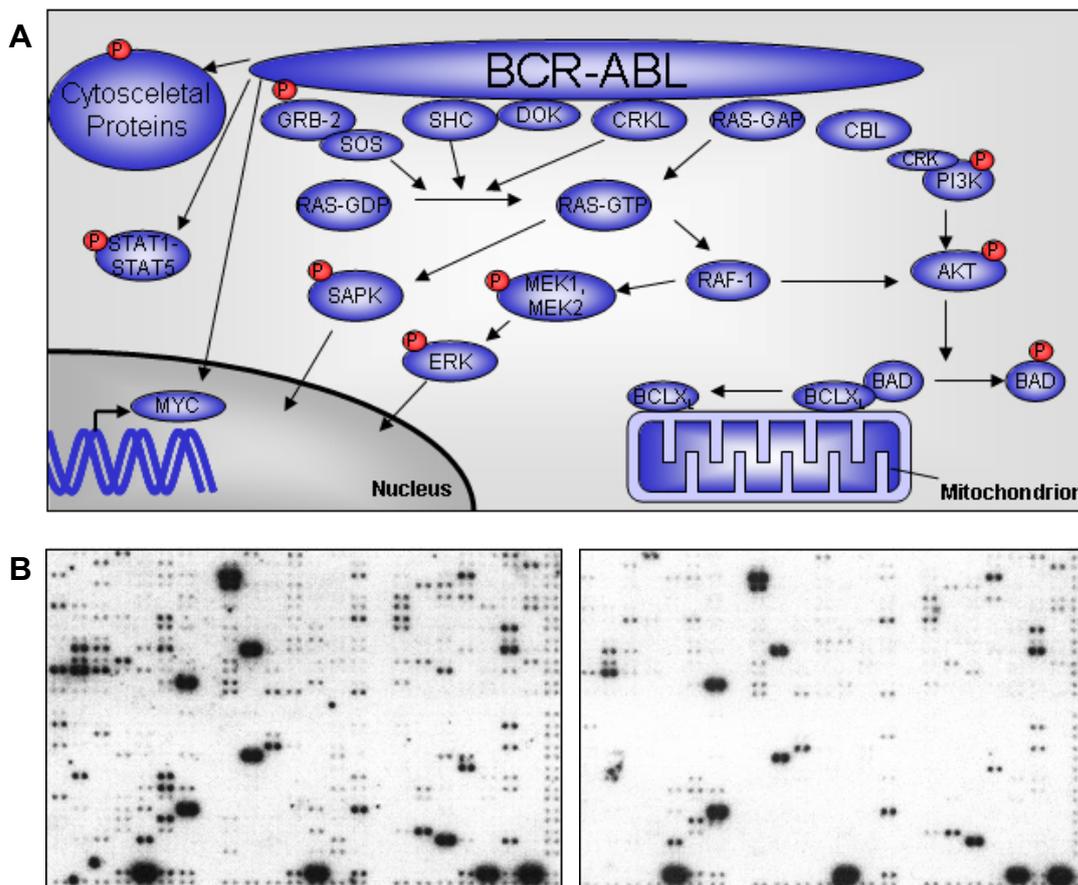


Abb. 4: (A) Wichtigste BCR-ABL Adapterproteine und induzierte Signalkaskaden. (B) Mikroarray Analyse der Genexpression von Ba/F3 Zellen, links mit kinase-aktivem BCR-ABL, rechts mit kinase-inaktivem BCR-ABL (zur Verfügung gestellt von Dr. Nikolas von Bubnoff, Klinikum rechts der Isar).

1.3.3 Aktuelle Therapieansätze bei CML

In der Vergangenheit stellte das Chemotherapeutikum Hydroxyurea (Litalir[®], Bristol-Myers Squibb) die Initialtherapie bei CML dar. Es unterdrückt unspezifisch die Proliferation bösartiger leukämischer, aber auch gutartiger Zellen. Effektivere und gerichtete Therapiemöglichkeiten bieten dagegen die Behandlung mit dem Zytokin Interferon- α , die spezifische Inhibierung der BCR-ABL Kinase durch Inhibitoren wie Imatinib Mesylate (STI571, IM, Gleevec[®], Novartis) oder eine allogene Stammzell- bzw. Knochenmarkstransplantation.

1.3.3.1 Interferon- α -Therapie

Bei Interferon- α handelt es sich um ein antiviral und antiproliferativ wirkendes Glykoprotein.⁸³ Es ist in der Lage, die Adhäsion maligner Leukämiezellen an das Knochenmark-Stroma zu normalisieren und interagiert intrazellulär mit verschiedenen Signaltransduktionswegen und immunologisch relevanten Regulationsmechanismen.⁸⁴ Der genaue Wirkmechanismus von Interferon- α ist dabei allerdings noch immer unklar. Bei einem hohen Prozentsatz von CML-Patienten lassen sich durch Interferon- α stabile hämatologische

Remissionen erzielen, bei 10-38% sogar eine komplette zytogenetische Remission.⁸⁵ Aus diesem Grund zählte die Behandlung mit Interferon- α bis zur Markteinführung von Imatinib im Jahr 2001 zur Standardtherapie von CML-Patienten. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf wird die Wirkung von Interferon- α allerdings schwächer. Ein weiterer gravierender Nachteil dieser Behandlung ist, dass der leukämische Stammzellklon im Patienten nicht eradiziert wird, eine komplette Heilung also nicht möglich ist

1.3.3.2 Imatinib-Therapie

Wie bereits beschrieben, ist das initiale Ereignis, das zur Entwicklung einer CML führt, die Expression der BCR-ABL Tyrosinkinase, die bei der malignen Transformation von Zellen eine zentrale Rolle einnimmt. Die Entwicklung des selektiven Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib Mesylate zielte daher darauf ab, spezifisch die Kinaseaktivität von BCR-ABL zu inhibieren, und somit die Transformation BCR-ABL positiver Zellen zu verhindern.

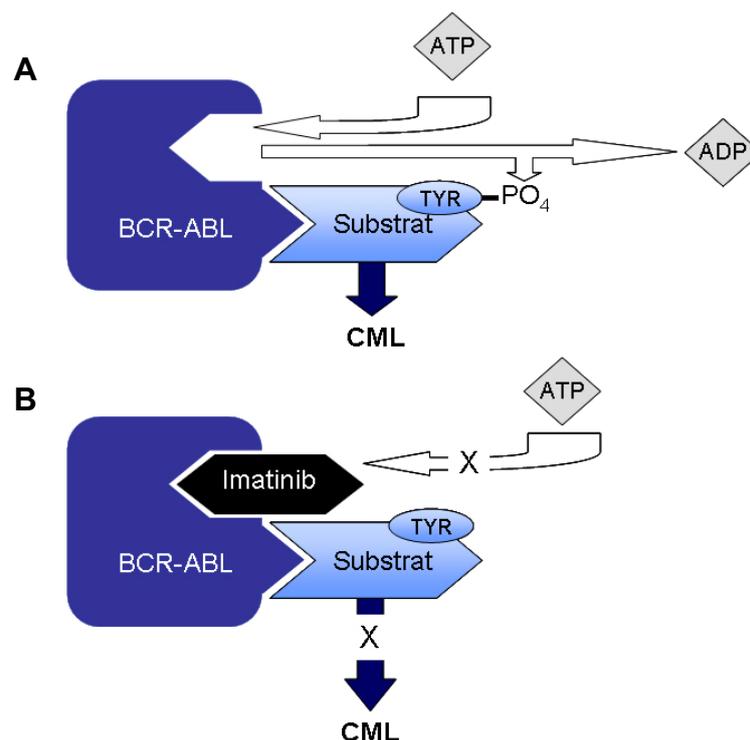


Abb. 5: Wirkmechanismus von Imatinib. (A) Im Normalfall findet nach Bindung von ATP an BCR-ABL eine Substratphosphorylierung statt. Durch nachfolgende Aktivierung weiterer Signalwege kommt es zur malignen Transformation der Zelle. (B) Die Bindung von Imatinib blockiert die ATP-Bindungsstelle von BCR-ABL. Es findet keine Phosphorylierung von Substraten und keine maligne Transformation statt.

Der ursprünglich 1990 in einem Screening zur Entdeckung eines Inhibitors gegen die Protein Kinase C (PKC) identifizierte Wirkstoff Imatinib ist ein 2-Phenylaminopyrimidinderivat, das spezifisch und irreversibel an die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase-Domäne des BCR-

ABL Proteins bindet und die Kinase dadurch inhibiert.^{86,87} BCR-ABL ist somit nicht mehr in der Lage Substrate zu phosphorylieren und der Prozess der malignen Transformation wird unterbrochen (Abbildung 5).

Bei 95% der CML-Patienten in chronischer Phase kann mit Imatinib eine hämatologische Remission, in 70% sogar eine komplette zytogenetische Remission erreicht werden. Bei Patienten in akzelerierter Phase bzw. Blastenkrise sinkt die Rate an hämatologischen Remissionen allerdings auf 69% bzw. 29%.⁸⁸ Vor allem in einer frühen Krankheitsphase stellt die Behandlung mit Imatinib einen enormen Fortschritt dar und zählt daher inzwischen zur CML-Standardtherapie. Langfristig ist jedoch nach neuesten Erkenntnissen auch mit Imatinib keine vollständige Heilung eines CML-Patienten möglich, da zum einen ruhende leukämische Stammzellen nicht von Imatinib angegriffen werden können, und daher nach Absetzen des Medikamentes, selbst nach jahrelanger Behandlung, jederzeit eine erneute CML auslösen können.⁸⁹ Zum anderen wurden bei einer Vielzahl von Patienten Resistenzen gegen Imatinib beobachtet, die durch BCR-ABL-abhängige (BCR-ABL Genamplifikation, Mutationen in BCR-ABL) oder BCR-ABL-unabhängige Mechanismen (z.B. der Aktivierung alternativer leukämischer Signaltransduktionswege) zustande kommen können.^{90,91} Derzeit werden verschiedene Nachfolger von Imatinib entwickelt, bei denen diese Probleme minimiert werden sollen.⁹²

1.3.3.3 Knochenmark- und Stammzelltransplantation

Eine Knochenmarktransplantation stellt für CML-Patienten derzeit die einzige Heilungsmöglichkeit dar. Im Zuge einer solchen Behandlung wird zunächst das Knochenmark des CML-Patienten durch Chemotherapie vollständig zerstört und anschließend durch Knochenmark eines gesunden Spenders ersetzt. Das Hauptproblem, das dabei auftreten kann, ist die sogenannte „*graft-versus-host-disease*“ (GVHD), bei der Spender-Lymphozyten eine Immunreaktion gegen Zellen des Empfängers auslösen und dadurch gesunde Zellen des Empfängers (v.a. in der Haut, den Schleimhäuten, dem Gastrointestinaltrakt und der Leber) zerstört werden.^{93,94} Dieser Effekt stellt die häufigste Todesursache nach einer Knochenmarktransplantation dar und tritt häufiger ein, wenn das Knochenmark von einem HLA-kompatiblen Spender, und nicht von einem engen Verwandten stammt. Eine gewünschte Immunreaktion von Lymphozyten des Spenders gegen Zellen des Empfängers stellt dagegen der sogenannte „*graft-versus-leukemia-effect*“ (GVL) dar, bei dem sich die Immunzellen des Spenders spezifisch gegen maligne Leukämiezellen des Empfängers richten.⁹⁵ Durch nachträgliche Infusionen von Spenderlymphozyten („*donor lymphocyte infusion*“, DLI) wird in

einigen Fällen versucht, solch einen Effekt zu induzieren bzw. zu verstärken, wodurch komplette zytogenetische Remissionen induziert werden konnten.⁹⁶

Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von geeigneten Spendern und den Risiken einer Knochenmarktransplantation ist eine solche Behandlung allerdings nur für etwa die Hälfte aller CML-Patienten geeignet.⁹⁷

1.4 Immuntherapeutisches Potenzial der BCR-ABL positiven CML

Die oben dargestellten Behandlungsmöglichkeiten sind zwar in der Lage, den Krankheitsverlauf der CML und die Lebensqualität der Patienten wesentlich zu verbessern, eine Heilung ist jedoch, mit Ausnahme einer Knochenmarktransplantation, nicht möglich. Eine Alternative bzw. eine Möglichkeit, die Gefahren einer minimalen Resterkrankung („*minimal residual disease*“, MRD), v.a. bei Patienten unter Imatinib-Behandlung, zu verringern, bietet eine BCR-ABL-gerichtete Immuntherapie. Das Potential einer Immuntherapie zur Behandlung der CML zeigt sich bei den oben erwähnten „*donor lymphocyte infusions*“ nach einer Knochenmarktransplantation, die über den von Spender-Lymphozyten vermittelten *graft-versus-leukemia-effect* zu einer vollständigen Rückbildung der Leukämie führen kann.⁹⁶

Da es sich bei BCR-ABL um ein Fusionsprotein handelt, das in gesunden Zellen nicht exprimiert wird, stellt dieses Protein ein besonders interessantes Ziel für eine immuntherapeutische Behandlung dar. So ist anzunehmen, dass Leukämie-spezifische, chimäre Peptide aus dem Bruchpunktbereich von BCR-ABL, die sowohl aus Aminosäuren des BCR-Teils, als auch aus denen des ABL-Teils bestehen, von T-Zellen potentiell als fremd erkannt werden, wenn sie auf MHC-Komplexen präsentiert werden. Wegen seiner vorwiegend zytoplasmatischen Lokalisierung kann man davon ausgehen, dass das BCR-ABL-Protein größtenteils, nach proteosomalem Abbau, über den MHC-Klasse I-Weg prozessiert und präsentiert wird.

Mit Hilfe von *in vitro* Bindungsstudien, aber auch prädiktiver Peptidbindungssoftware (www.syfpeithi.de), konnten verschiedene, potentiell immunogene MHC-Klasse-I-bindende BCR-ABL Bruchpunktpeptide mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren identifiziert werden. Tabelle I unter Punkt 2.1 zeigt eine Zusammenfassung der bislang identifizierten Peptide. Besonders hohe Bindungsaffinität zeigen hierbei die Nonamere KQSSKALQR (HLA-A3 bindend), GFKQSSKAL (HLA-B8 bindend) und ATGFKQSSK (HLA-A11 bindend) (Abbildung 6).

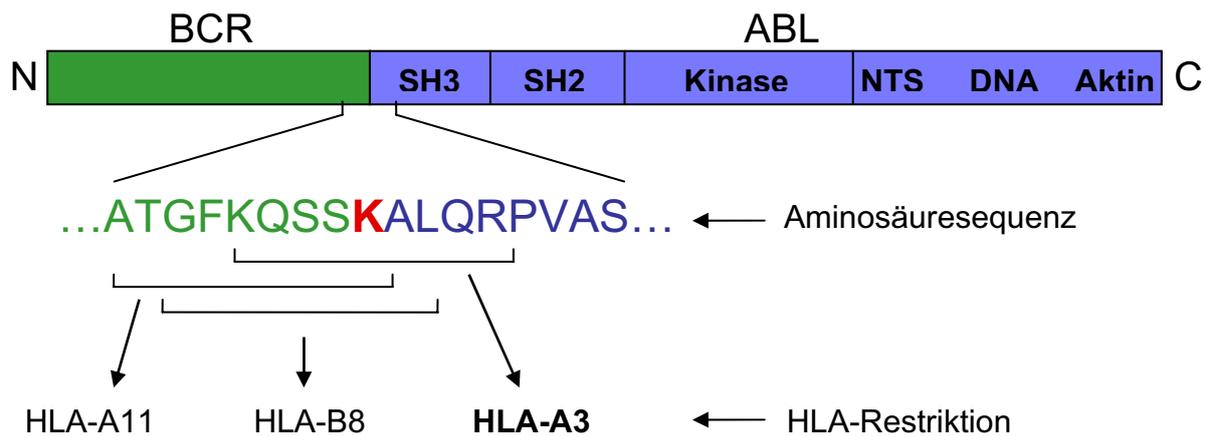


Abb. 6: Drei Beispiele von MHC-Klasse I-Peptidliganden aus der Fusionsregion des BCR-ABL-Proteins, identifiziert über *in vitro* Peptid-Bindungsstudien. Durch die Fusion von BCR und ABL wird im direkten Fusionsbereich die rot dargestellte Aminosäure Lysin (K) exprimiert. Das HLA-A3-restringierte Peptid KQSSKALQR ist das bislang einzige, bei dem indirekt eine endogene Prozessierung nachgewiesen werden konnte.⁹⁸

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass sich spezifisch gegen diese Peptide CTL-Populationen generieren lassen.⁹⁹⁻¹⁰¹ Entgegen der aus diesen Arbeiten gezogenen Schlussfolgerungen kann dies allerdings nur eingeschränkt als Beweis für eine tatsächliche intrazelluläre Peptidprozessierung gewertet werden, da zur T-Zellstimulation ausschließlich antigenpräsentierende Zellen eingesetzt wurden, die exogen mit synthetisch hergestellten Peptiden beladen wurden, ohne die intrazelluläre proteosomale Peptidprozessierung zu berücksichtigen. Der korrekte proteosomale Abbau des BCR-ABL Fusionsproteins zu einem HLA-präsentierten, BCR-ABL spezifischen Fusionspeptid konnte bislang nur von einer Arbeitsgruppe, durch die Eluierung eines solchen Peptides von der Oberfläche einer CML-Zelllinie, gezeigt werden.⁹⁸ Versuche anderer Arbeitsgruppen, diese Ergebnisse nachzuvollziehen, verliefen allerdings erfolglos.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Trotz dieser kontroversen Ergebnisse wurden auf deren Basis mehrere klinische Vakzinierungsstudien initiiert, bei denen verschiedene Kombinationen von BCR-ABL Fusionspeptiden zum Einsatz kamen. Im Rahmen dieser Studien konnten zum einen vereinzelt Remissionen induziert werden,¹⁰⁵ andere Arbeitsgruppen dagegen konnten die erzielten Ergebnisse nicht eindeutig mit den verabreichten Vakzinen in Verbindung bringen.¹⁰⁶ Insgesamt spiegeln die bislang publizierten Ergebnisse dieser BCR-ABL-Peptidvakzinierungsstudien also die oben beschriebenen heterogenen Ergebnisse der *in vitro* Experimente wider.

1.5 Ziele und bearbeitete Fragestellung

Das Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es, T-Zellklone zu generieren, die spezifisch BCR-ABL Bruchpunktpeptide erkennen. Hierbei sollte, aufgrund der bislang eher widersprüchlichen publizierten Ergebnisse, insbesondere untersucht werden, ob diese T-Zellen endogen prozessierte BCR-ABL Epitope erkennen.

Wie in der Einleitung dargestellt, ist die Haupteigenschaft des BCR-ABL Onkoproteins seine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität und die daraus folgende Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden und Adapterproteine, was nachfolgend in der malignen Transformation einer Zelle resultiert. Vor kurzem wurde gezeigt, dass diese Antigene, die durch BCR-ABL Kinaseaktivität hochreguliert werden, in Kontext mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche BCR-ABL⁺ Zellen präsentiert werden. Die Relevanz dieser Antigene in einer T-Zell-Immunantwort gegen BCR-ABL positive Zellen ist bislang jedoch unklar.¹⁰²

Weiterhin konnten mit sogenannten „*donor lymphocyte infusions*“ (DLI) in rezidierten CML-Patienten nach allogener Stammzelltransplantation komplette zytogenetische Remissionen erzielt werden, was die prinzipiell hohe Immunogenität von CML Zellen bzw. Stammzellen verdeutlicht.⁹⁶

Aus diesen Erkenntnissen ergab sich die zentrale Hypothese dieser Arbeit, nämlich dass BCR-ABL Kinaseaktivität die Expression verschiedenster Antigene nach sich zieht, die wesentlich zur Immunogenität einer BCR-ABL⁺ Zelle beitragen.

Im Hauptteil der Arbeit wurde daher untersucht, was für einen Einfluss die BCR-ABL Tyrosinkinase auf die Immunogenität einer BCR-ABL⁺ Zelle hat, wobei die Immunogenität BCR-ABL-regulierter Antigene mit der von Antigenen aus dem eigentlichen BCR-ABL Fusionsprotein verglichen wurde.

Realisiert wurde dies durch den Einsatz eines Kinase-defizienten BCR-ABL Konstruktes (BCR-ABL KD), das zum Zwecke der T-Zellstimulation in antigenpräsentierende, dendritische Zellen eingebracht wurde. Die Immunogenität dieser Zellen kann so direkt mit der von Zellen verglichen werden, die ein Kinase-aktives BCR-ABL Wildtyp (BCR-ABL WT) Konstrukt exprimieren. Auf diese Weise ist es möglich, das T-Zellrepertoire gegen BCR-ABL-regulierte Antigene direkt mit dem T-Zellrepertoire gegen Antigene zu vergleichen, die ihren Ursprung im eigentlichen BCR-ABL Fusionsprotein haben. Nach Analyse von T-Zellen gesunder Spender wurde das T-Zellrepertoire von CML-Patienten untersucht und mit dem gesunder Spender verglichen.

Da bei der Etablierung von Immuntherapien der Wahl der angegriffenen Zielstruktur eine Schlüsselrolle zukommt, ist die im Rahmen dieser Arbeit geplante Aufklärung des

immunogenen Potentials von BCR-ABL-regulierten Tumorantigenen von erheblicher Bedeutung bei der zukünftigen Planung immuntherapeutischer Studien gegen CML. Sollte sich in dieser Arbeit zeigen, dass BCR-ABL-regulierte Tumorantigene eine signifikant höhere Immunogenität als Antigene des BCR-ABL Fusionsproteins besitzen, kann davon ausgegangen werden, dass sich diese Ergebnisse im Fall von zukünftigen klinischen Studien in positiveren Ergebnissen widerspiegeln werden als in bisherigen Studien, die ihren Schwerpunkt auf BCR-ABL Fusionsantigene gesetzt haben.

Schließlich wird im letzten Teil dieser Arbeit die Generierung eines CD8⁺ T-Zellklones dargestellt, der spezifisch gegen das in myeloischen Leukämien überexprimierte¹⁰⁷ Antigen Proteinase 3 gerichtet ist. Proteinase 3, oder Myeloblastin, ist eine 26kDa große Serinprotease, die in azurophilen Granula nachgewiesen werden kann.¹⁰⁸ Es gibt Hinweise darauf, dass diese Protease direkt zum malignen Phänotyp leukämischer Zellen beiträgt, da die Inhibierung von Proteinase 3 die Proliferation verschiedener leukämischer Zelllinien unterdrückt.¹⁰⁹ Kombiniert mit seiner hohen Expression in myeloischen Leukämien macht dies Proteinase 3 als immunologische Zielstruktur besonders interessant. In bestimmten Autoimmunerkrankungen werden spezifisch Antikörper (ANCA, "*antineutrophil cytoplasmic antibodies*") gegen Proteinase 3 gebildet, was die Immunogenität von Proteinase 3 nochmals verdeutlicht.¹¹⁰ Mit dem HLA-A2 restringierten Proteinase 3-CTL-Epitop PR1 (p169-177, AS-Sequenz: VLQELNVN) konnten in CML-Patienten bereits spezifische Immunantworten induziert werden.¹¹¹

Bei den nachfolgenden Spezifitätsanalysen des Klons stand die Fragestellung im Vordergrund, ob dieser Klon das endogen prozessierte Proteinase 3 Epitop erkennt oder lediglich Zielzellen, die exogen mit dem entsprechenden Peptid beladen wurden. Langfristiges Ziel ist hierbei der adoptive Transfer des TCR dieses Klones (TCR-Transfer). Dadurch bietet sich die Möglichkeit einer direkten Spezifitätsübertragung auf T-Zellen, z.B. eines CML-Patienten, um so den langwierigen und arbeitsaufwändigen Weg, autologe PR1-spezifische T-Zellklone aus dem T-Zellpool eines Patienten zu isolieren bzw. expandieren, zu umgehen.

2. Ergebnisse

2.1 Expansion von BCR-ABL spezifischen T-Zellen mit Hilfe von Peptid-beladenen dendritischen Zellen

Der experimentelle Ablauf zur Generierung bzw. Expansion von BCR-ABL spezifischen T-Zellen sah zunächst eine selektive T-Zellaktivierung (nachfolgend „*priming*“ genannt) von CD8⁺ T-Zellen vor, die aus dem Blut gesunder Spender isoliert worden waren. Das Priming sollte mit Hilfe von dendritischen Zellen (DCs) erfolgen, die vor der Kokultivierung mit den T-Zellen exogen mit einem Peptid aus der BCR-ABL Bruchpunktregion beladen werden („*peptide pulsing*“). Zur Auswahl eines solchen Peptides wurde zunächst eine Literaturrecherche nach bereits bekannten Epitopen durchgeführt. Die Veröffentlichungen über immunogene BCR-ABL Bruchpunktpeptide wurden v.a. bezüglich der Effektivität der Prozessierung bzw. HLA-Präsentierung der untersuchten Epitope bewertet. Tabelle 1 zeigt die Aminosäuresequenzen bzw. entsprechende HLA-Restriktion der bislang veröffentlichten HLA Klasse I bzw. II bindenden Epitope aus der BCR-ABL Bruchpunktregion. Als vielversprechendstes Epitop erwies sich demnach die HLA-A3 restringierte Aminosäuresequenz KQSSKALQR an Position 924 des BCR-ABL Proteins. Der C-terminale Teil der Sequenz vor dem zentralen Lysin (K) entstammt der dem BCR-Teil des Fusionsproteins, der N-terminale Teil aus dem c-abl Protein. Die von Clark *et al.* durchgeführte Studie zum massenspektrometrischen Nachweis dieses Nonamers auf der Oberfläche von BCR-ABL exprimierenden Zellen (K562 Zellen) spricht für eine effektive Prozessierung bzw. HLA-Bindung.⁹⁸

Aufgrund dieser Daten wurden alle in dieser Arbeit vorgestellten Versuche zur Generierung von BCR-ABL spezifischen T-Zellen mit diesem HLA-A3 restringierten Peptid KQSSKALQR, im folgenden p924-932 genannt, durchgeführt.

Nach Priming und nachfolgenden wöchentlichen Restimulationen (5.3.2.11) wurden die im Laufe dieser Stimulationen expandierten T-Zellen verschiedensten Spezifitätsanalysen unterzogen. Zum einen wurden die T-Zellen in einem ELISpot-Assay (5.3.3.2) auf die spezifische Produktion von Cytokinen hin untersucht (2.1.1). Zum anderen wurden die T-Zellen im Durchflusszytometer nach MHC/Peptid-Multimerfärbung analysiert (2.1.2).

HLA-Typ	Aminosäuresequenz	Referenzen
HLA-A11	ATGFKQSSK	- Bocchia et al. ⁹⁹ - Pinilla-Ibarz et al. ¹⁰⁶
HLA-A3	KQSSKALQR	- Buzyn A. et al. ¹¹² - Clark R.E. et al. ⁹⁸ - Bocchia, M. et al. ⁹⁹ - Pinilla-Ibarz et al. ¹⁰⁶
HLA-A3/A11	HSATGFKQSSK	- Buzyn A. et al. ¹¹² - Bocchia, M. et al. ⁹⁹ - Pinilla-Ibarz et al. ¹⁰⁶ - Norbury et al. ¹⁰¹
HLA-B8	GFKQSSKAL	- Bocchia, M. et al. ⁹⁹ - Pinilla-Ibarz et al. ¹⁰⁶ - Norbury et al. ¹⁰¹
HLA-A2.1	SKALQRPV SSKALQRPV QSSKALQRPV	Yotnda, P. et al. ¹¹³
HLA-A24	TGFKQSSKALQRPVAS	Nieda M. et al. ¹¹⁴
HLA-DRB1*0401	ATGFKQSSKALQRPVAS	Bosch GJ et al. ¹¹⁵
HLA-DRB1*0901	ATGFKQSSKALQRPVAS	Yasukawa M. ¹¹⁶
HLA-DRB5*0101 + DRA(DR2a)	IVHSATGFKQSSKALQRPVASFEP	Sun, J.Y. et al. ¹¹⁷
HLA-DRB1*0101	GFKQSSKALQR	Mannering, S.J. et al. ¹¹⁸

Tabelle 1: Bislang bekannte MHC-Klasse I oder II bindende Bruchpunktpeptide des BCR-ABL Fusionsproteins mit den jeweiligen HLA Klasse I bzw. Klasse II Restriktionen und zugehörigen Publikationen.

2.1.1 Screening und T-Zell Klonierung nach ELISpot-Assay:

Im hier dargestellten Ansatz wurden CD8⁺ T-Zellen eines gesunden, HLA-A3⁺ Spenders mit autologen DCs kokultiviert („*priming*“, siehe 5.3.2.11), die vorher mit dem oben erwähnten BCR-ABL spezifischen Peptid p924-932 beladen worden waren. Nach zwei wöchentlichen Restimulationen folgte die Spezifitätsanalyse im ELISpot Assay. Hierbei wurden Aliquots der nun dreifach stimulierten CD8⁺ T-Zellpopulationen auf ELISpot Platten ausgesät und 24 Std. mit verschiedenen Zielzellen kokultiviert. Danach wird, im Fall einer spezifischen Reaktion gegen die Zielzelle, in einer Farbreaktion die Produktion des Zytokines IFN- γ nachgewiesen (ELISpot: siehe 5.3.3.2).

Als Zielzellen im ELISpot Assay wurden hier autologe DCs ausgewählt, die entweder wie bei den vorangegangenen Stimulationsreihen mit p924-932, oder aber einem irrelevanten Peptid (hier: HIV_{p476-484}) beladen worden waren.

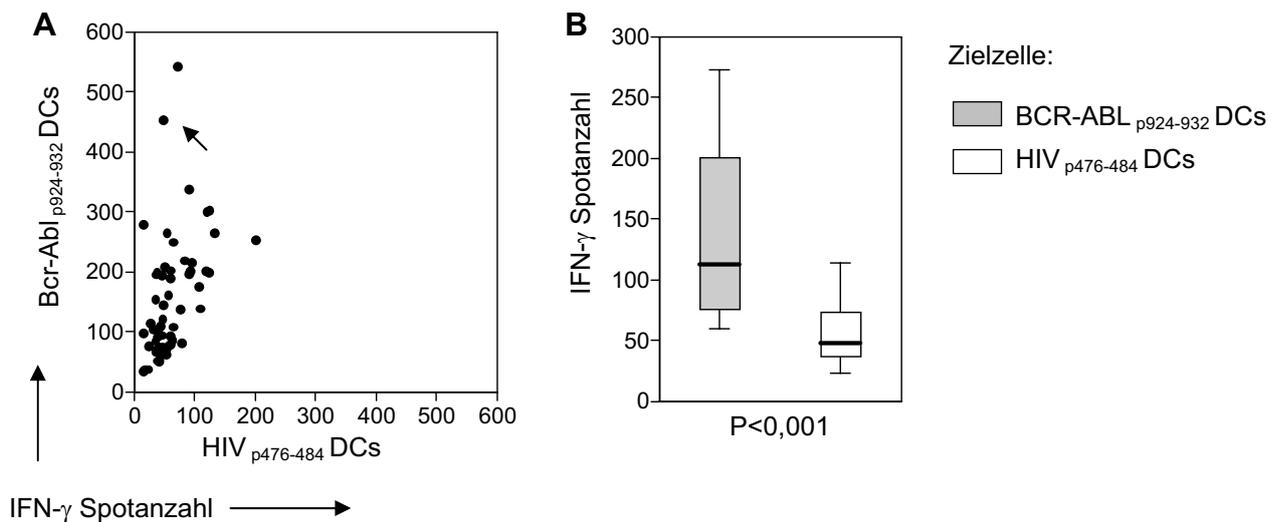


Abb. 7: Generierung von BCR-ABL_{p924-932} reaktiven T-Zellpopulationen nach Priming und Restimulation mit Peptid beladenen DCs. (A) Dot Plot Darstellung eines IFN- γ ELISpot Assay nach drei Stimulationen mit BCR-ABL_{p924-932}. (B) Box Plot Darstellung des ELISpot Assay aus (A) zur statistischen Auswertung, die Boxen repräsentieren den interquartilen Bereich, die Balken in den Boxen zeigen die mediane Spotanzahl der T-Zellpopulationen. (P-Wert-Bestimmung: Mann-Whitney Test)

In Abbildung 7 wird die IFN- γ Produktion der einzelnen T-Zellpopulationen nach Kokultur mit den beiden Zielzellen dargestellt. Jeder Punkt im Dot Plot Diagramm von Abbildung 7A entspricht hierbei der IFN- γ Produktion einer T-Zellpopulation. Deutlich erkennbar ist eine höhere Reaktivität gegen DCs, die mit BCR-ABL Peptid beladen wurden. Nach einer statistischen Auswertung der Daten in einem Box Plot Diagramm (Abb. 7B) stellte sich diese Reaktivität als signifikant ($P < 0,001$) höher heraus. Bei solch einem Diagramm zeigt der Strich innerhalb der Boxen die jeweiligen Medianwerte der IFN- γ Produktion der einzelnen T-Zellpopulationen an. Das obere und untere Ende der Boxen entspricht dem sog. interquartilen Bereich (25% der Werte über bzw. unter dem Medianwert). Die vertikalen Striche („whisker“) über bzw. unter den Boxen enden am zehnten bzw. neunzigsten Perzentil. Der signifikante Unterschied weist auf ein erfolgreiches Priming und eine selektive T-Zellaktivierung gegen das BCR-ABL Peptid hin.

Die mit einem Pfeil markierte T-Zellpopulation wurde nach der Methode der „limiting dilution“ (5.3.2.12) kloniert, mit dem Ziel einen BCR-ABL spezifischen T-Zellklon zu generieren. Allerdings erwiesen sich alle aus dieser Population hervorgegangenen T-Zellklone als unspezifisch.

Da es auch in Wiederholungen des dargestellten Experimentes nicht gelang, ausgehend von einem ELISpot Assay BCR-ABL spezifische Klone zu isolieren, wurde als nächstes eine andere Methode getestet, um BCR-ABL spezifische T-Zellpopulationen bzw. Klone zu generieren (2.1.2)

2.1.2 Screening und T-Zell Klonierung mit Hilfe von MHC/Peptid-Multimerfärbung

Das im folgenden Teil dargestellte Experiment verlief, abgesehen von der abschließenden Spezifitätsanalyse, analog zum vorherigen. Wiederum wurden $CD8^+$ T-Zellen einer gesunden, $HLA-A3^+$ Spenderin mit autologen, $BCR-ABL_{p924-932}$ beladenen DCs stimuliert bzw. wöchentlich restimuliert. Die Spezifität der stimulierten T-Zellpopulationen wurde vor der ersten Stimulation (Abb. 8A) und nach der zweiten Stimulation (Abb. 8B) nach Anfärbung mit einem $BCR-ABL_{p924-932}$ spezifischen MHC/Peptid-Multimer (im folgenden „Tetramer“ genannt) im Durchflusszytometer (FACS, 5.3.3.3) analysiert.

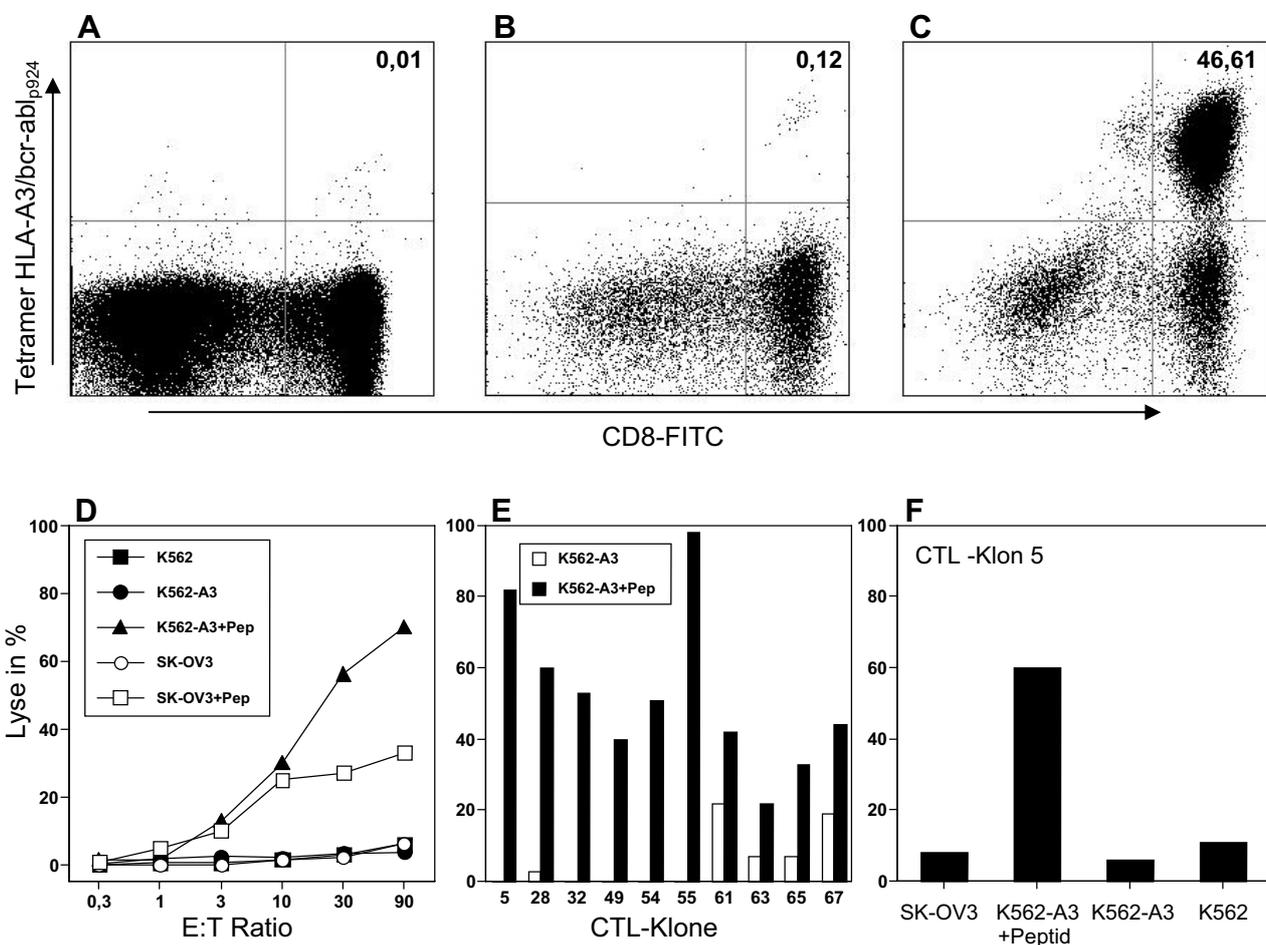


Abb. 8: Generierung von BCR-ABL-Peptid-spezifischen $CD8^+$ T-Zellpopulationen bzw. Klonen: (A) BCR-ABL Tetramer-Färbung von unbehandelten PBMCs von Spender CK. (B) Tetramer-Färbung nach zwei Stimulationen mit BCR-ABL-Peptid (HLA-A3/BCR-ABL_{p924-932}) beladenen, reifen DCs. Isolation der doppelt positiven Population im FACS. (C) Tetramer-Analyse der isolierten und expandierten T-Zellpopulation. (D) ^{51}Cr -Freisetzungstest mit T-Zellpopulation aus Abbildung C und verschiedenen Zielzellen. K562-A3+Pep und SK-OV3+Pep wurden vor dem Test mit dem Peptid BCR-ABL_{p924-932} beladen. (E) BCR-ABL_{p924-932} spezifische Klone nach „limiting dilution“ der Population aus Abb. C. (F) ^{51}Cr -Freisetzungstest von Klon 5 (siehe E) nach weiterer Expansion bestätigt Spezifität gegen BCR-ABL Bruchpunkteptid.

Abbildung 8A zeigt die Frequenz an Tetramer/CD8 doppelt positiven T-Zellen im Blut des Spenders ohne vorherige DC Stimulation („*precursor*“-Frequenz). Nach zwei Stimulationen mit BCR-ABL_{p924-932} beladenen DCs konnte eine selektive Expansion von BCR-ABL spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der FACS-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 8B). Die Tetramer⁺ gefärbten T-Zellen wurden daraufhin in einem MoFlow FACS-Sorter isoliert (Abb. 8C). In einem ⁵¹Cr-Freisetzungstest (5.3.3.1) wurde die Spezifität dieser im FACS-Sort angereicherten T-Zellpopulation bezüglich CML-Zelllinien getestet (Abb.8D). Als Zielzelllinie wurde die mit HLA-A3 stabil transduzierte BCR-ABL⁺ CML-Zelllinie K562-A3 verwendet. Als weitere Positivkontrolle diente die mit dem BCR-ABL Peptid beladene, BCR-ABL⁻ und HLA-A3⁺ Zelllinie SK-OV3. Aus Abbildung 8D wird ersichtlich, dass ausschließlich die mit BCR-ABL_{p924-932} beladenen, HLA-A3 exprimierenden Zelllinien lysiert wurden, was die Spezifität der T-Zellpopulation gegen dieses Peptid bestätigt (Abb. 7D). Die nicht Peptid-beladene Zelllinie K562-A3, die ebenfalls das BCR-ABL Peptid p924-932 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren sollte, wurde allerdings nicht lysiert.

Gleichzeitig erfolgte die Klonierung der isolierten T-Zellpopulation nach der „*limiting dilution*“-Methode (5.3.2.12), um spezifische T-Zellklone zu generieren. Von 69 gewachsenen Klonen zeigten 10 Klone eine spezifische Lyse von BCR-ABL_{p924-932} beladenen K562-A3 Zellen (Abb. 8E). K562-A3 Zellen, die nicht mit Peptid beladen worden waren, wurden von diesen Klonen, wie schon vorher bei der oligoklonalen T-Zellpopulation festgestellt, nicht lysiert. Nach Expansion der Klone wurde diese Spezifität im Lyse-Assay mit weiteren Zielzellen bestätigt (Abb. 8F).

CD8⁺ T-Zellen, die mit Peptid beladenen DCs stimuliert worden waren, waren demnach nicht in der Lage, das endogen prozessierte BCR-ABL Antigen auf K562-A3 Zellen zu erkennen, die nicht mit BCR-ABL_{p924-932} exogen beladen worden waren.

2.2 Vergleich der Immunogenität von BCR-ABL-regulierten Antigenen mit dem BCR-ABL Protein

Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit sollte ausgehend von den bisher dargestellten Ergebnissen die Immunogenität des gesamten BCR-ABL Proteins untersucht werden, d.h. das Potential dieses Proteins, eine T-Zell-vermittelte Immunantwort auszulösen. Gleichzeitig sollte untersucht werden, welchen Einfluss die konstitutiv aktive BCR-ABL Tyrosinkinase auf die Immunogenität einer BCR-ABL⁺ Zelle hat. Der experimentelle Ablauf, um diese Fragen aufzuklären, sah vor, das gesamte BCR-ABL Gen in DCs zu transferieren und mit diesen Zellen T-Zellstimulationen durchzuführen.

Als effiziente Methode erwies sich zum Transfer des BCR-ABL Gens in reife DCs die Elektroporation mit BCR-ABL mRNA (5.3.2.9). Die Optimierung dieser Methode wird unter Punkt 2.2.2.2 beschrieben.

Nach insgesamt drei Stimulationen mit BCR-ABL⁺ DCs sollte mit verschiedenen Kombinationen von Zielzellen die Spezifität dieser T-Zellen bestimmt werden. Als Zielzellen sollten eingesetzt werden:

- Autologe Zellen (DCs, mit denen vorher schon T-Zellstimulationen durchgeführt wurden oder aber EBV-immortalisierte B Zellen), die BCR-ABL in seiner Wildtyp Variante exprimieren.
- Autologe Zellen, die eine Kinase-defiziente Mutante von BCR-ABL exprimieren
- Autologe, BCR-ABL negative Zellen

Durch den Vergleich der Immunogenität von Zielzellen, die eine Kinase-defiziente BCR-ABL Mutante exprimieren bzw. Kinase-aktives BCR-ABL, kann, wie oben erwähnt, zum einen die Immunogenität des BCR-ABL Proteins selbst beurteilt werden, zum anderen kann diese Immunogenität direkt mit der von BCR-ABL Kinase-regulierten Proteinen verglichen werden.

2.2.1 Gezieltes Mutieren („site directed mutagenesis“) von BCR-ABL zum Ausschalten der Kinaseaktivität

Um den oben dargestellten Versuchsansatz zu verwirklichen, musste zunächst eine Kinase-defiziente Variante von BCR-ABL geschaffen werden. Die Möglichkeit durch gezieltes Mutieren einer Base bzw. Aminosäure im Bereich der ATP-Bindungstasche von BCR-ABL die Tyrosinkinaseaktivität dieses Proteins auszuschalten, wurde bereits vor Jahren von Charles Sawyers (UCLA, Los Angeles, Californien, USA) dargestellt. Die damals beschriebene

Mutation von BCR-ABL an Position 1172 von Lysin (K) zu Arginin (R) wurde hier in das BCR-ABL Wildtyp Konstrukt wie nachfolgend beschrieben eingefügt.

Zunächst wurde ein Primer synthetisiert, der in dem zu mutierenden Bereich auf dem BCR-ABL Gen bindet und an der zu mutierenden Position eine nicht homologe, der Mutation entsprechenden Base besitzt (Abbildung 9A, Primer Mut1-fo). Der zweite Primer befindet sich in 3'-Richtung des BCR-ABL Gens im Bereich einer Aat II-Restriktionsschnittstelle (Primer Mut1-rev). Es folgte PCR mut-1. Das Produkt dieser PCR trägt die in Abbildung 9 als roter Kasten dargestellte Mutation K1172R und diente in der nächsten PCR (PCR mut-2) als Primer (Abbildung 9B, Primer Mut2-rev). Der zweite Primer dieser PCR befindet sich in 5'-Richtung des BCR-ABL Gens im Bereich einer Kpn I Restriktionsschnittstelle (Primer Mut2-fo). Abbildung 9C zeigt das PCR-Produkt von PCR mut-2. Nach einem KpnI/AatII Restriktionsverdau (Abbildung 9D) folgte die Ligation dieses mutierten BCR-ABL Fragmentes in ein ebenfalls KpnI/AatII verdautes BCR-ABL Gen (Abbildung 9E).

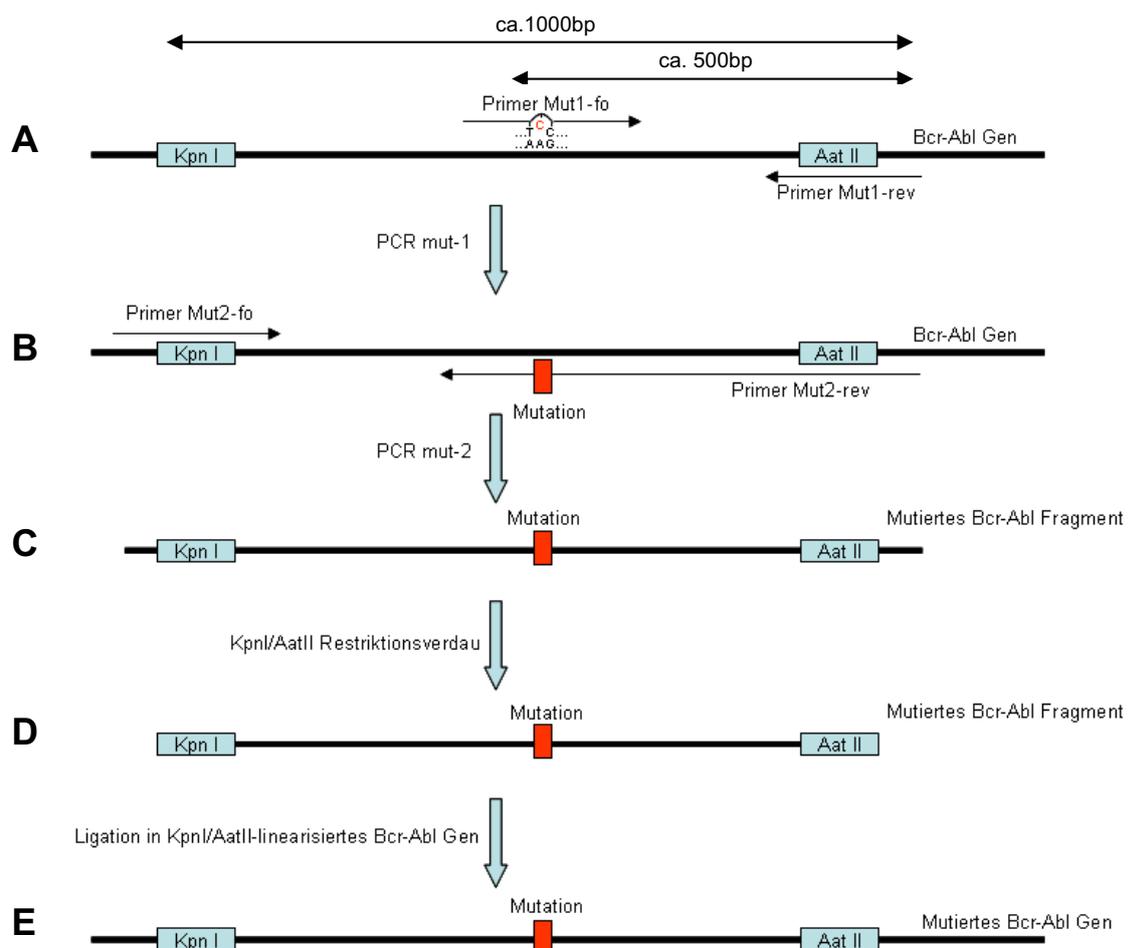


Abb. 9: Schematisierte Darstellung der PCR-Strategie zur Generierung der Kinase-defizienten BCR-ABL Mutante K1172R.

Die Abbildungen 10A bis D zeigen die Ergebnisse der in Abbildung 9 dargestellten PCRs bzw. der Ligation. Abbildung 10A zeigt das Ergebnis von PCR mut-1. Das PCR Produkt wurde aus dem Gel eluiert und als Primer Mut2-rev in PCR mut-2 eingesetzt. Abbildung 10B zeigt das Ergebnis dieser PCR mit dem gewünschten PCR-Produkt von ca. 1000bp Größe. Das 500bp große DNA-Stück, das auf diesem Bild erkennbar ist, entspricht dem als Primer eingesetzten PCR-Produkt aus PCR-mut1. Das 1000bp große PCR-Produkt von PCR mut-2 wurde aus dem Gel eluiert und, entsprechend Abbildung 9D, mit den Restriktionsenzymen Kpn I und Aat II verdaut. Parallel wurde der Vektor pBluescript(pBSK)-p210 durch einen KpnI/AatII Verdau linearisiert. Mit diesem linearisierten Vektor und dem ebenfalls KpnI/AatII geschnittenen Insert wurde eine Ligation durchgeführt (5.3.1.9). Von sechs nach der Ligation gewachsenen Bakterienklonen wurde die Plasmid-DNA amplifiziert, isoliert und in einem KpnI/AatII Verdau auf den korrekten Einbau des mutierten BCR-ABL Inserts getestet (Abbildung 10C). Bei den Klonen vier und sechs konnte das mutierte BCR-ABL Fragment nachgewiesen werden.

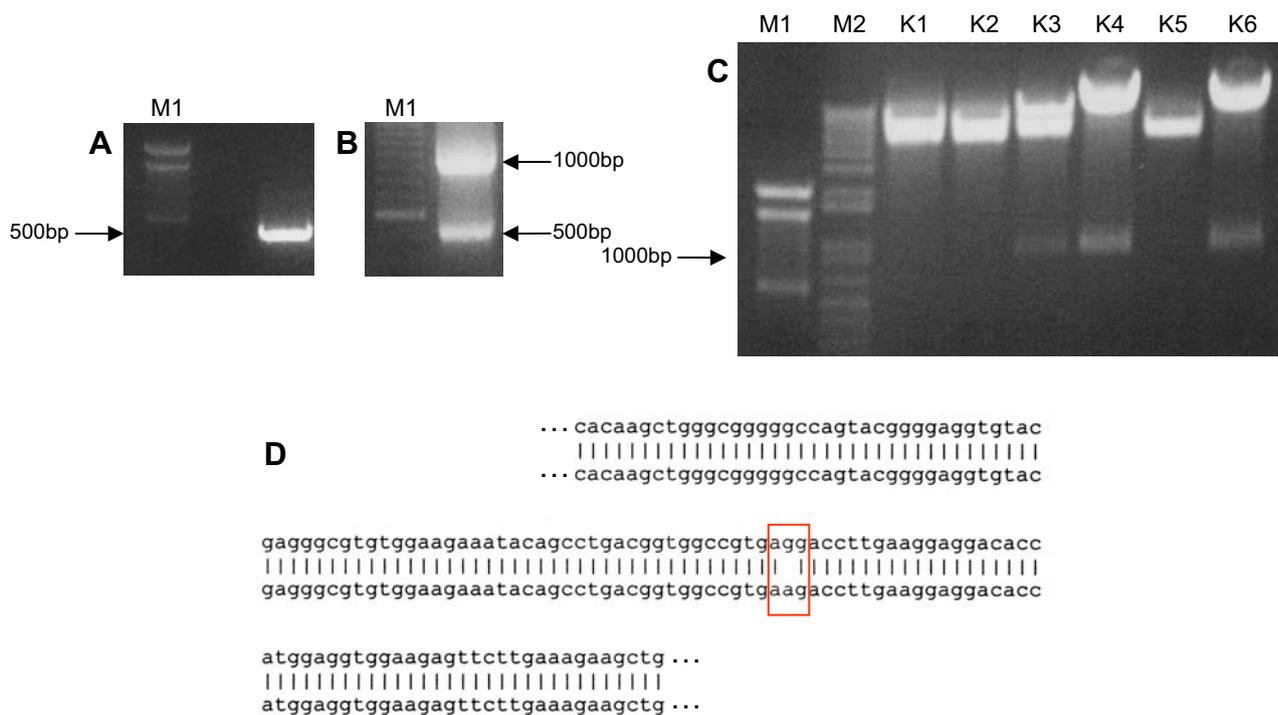


Abb. 10: Mutation der BCR-ABL Kinasedomäne durch „site directed mutagenesis“. (A) Ergebnis von PCR mut-1.(B) Ergebnis von PCR mut-2. (C)Testverdau (KpnI/AatII) von sechs Bakterienklonen K1-K6 nach Ligation des PCR-Produktes aus Abb. 4B in einen linearisierten pBSK-Vektor. Klon vier und sechs tragen das entsprechende Insert und wurden sequenziert. (D) Ausschnitt von Sequenzierung des Klon vier. Die obere Nukleotidsequenz zeigt die sequenzierte BCR-ABL Mutante, die mit dem BCR-ABL Wildtyp verglichen wird (untere Nukleotidsequenz). Der Kasten markiert das mutierte Codon (AAG → AGG). M1: Marker 1, 100bp ladder; M2: Marker 2, 1kb ladder.

Zur Kontrolle, ob die klonierten Konstrukte tatsächlich die gewünschte Punktmutation enthalten, und zum Ausschluss von PCR-bedingten weiteren Mutationen, z.B. durch Ablesefehler der eingesetzten Taq Polymerase, wurden die Klone vier und sechs sequenziert. Klon sechs zeigte neben der gewünschten Mutation weitere Punktmutationen, die vermutlich auf die oben beschriebenen Fehler bei der PCR zurückzuführen sind. Dieser Klon wurde verworfen. Im Gegensatz dazu zeigte Klon vier lediglich die gewünschte Punktmutation. Abbildung 10D zeigt einen Ausschnitt der Sequenzierung von Klon 4 im Bereich der Punktmutation, die rot markiert ist, und vergleicht sie mit der Wildtyp-Sequenz. Dieser Klon, bzw. seine DNA, wurde für die weiteren, in dieser Arbeit beschriebenen Versuche, in LB-Flüssigkulturen amplifiziert bzw. DNA Präparationen durchgeführt.

2.2.2 Generierung von Zielzellen die BCR-ABL in seiner Wildtyp oder Kinase-defizienten Form exprimieren

Im Hinblick auf die geplanten T-Zellstimulationen mit BCR-ABL⁺ DCs wurden, wie oben bereits erwähnt, für die an diese Stimulationen anschließenden Spezifitätsanalysen Zielzellen benötigt, die erstens autologen Ursprungs sind und die zweitens BCR-ABL entweder in seiner Wildtyp oder in seiner oben beschriebenen Kinase defizienten Form exprimieren. Es wurden zwei verschiedene Arten von Zellen untersucht, die diesen Kriterien entsprachen: Stabil mit BCR-ABL transduzierte EBV-immortalisierte B Zelllinien (im folgenden LCL genannt), oder aber transient mit BCR-ABL transfizierte DCs von den jeweiligen T-Zellspendern.

2.2.2.1 Generierung von BCR-ABL exprimierenden LCLs

LCLs bieten, im vgl. zu DCs, die Vorteile einer leichten Kultivierbarkeit bzw. durch ihre hohe Proliferationsrate eine gute Verfügbarkeit. So wurden zunächst von den jeweiligen T-Zellspendern LCLs generiert (5.3.2.4), die mit den entsprechenden BCR-ABL Konstrukten stabil retroviral transduziert werden sollten. Hierfür musste das oben beschriebene Kinase-defiziente BCR-ABL Gen (BCR-ABL KD) in einen retroviralen Vektor (MigR1, siehe Abbildung 11A) kloniert werden, der eine stabile Integration in das Genom der LCLs ermöglicht. Durch Restriktion mit dem Enzym EcoR1 wurde das BCR-ABL KD Konstrukt aus dem pBSK Plasmid isoliert und in das MigR1 Plasmid inkloniert (Abbildung 11A). Das BCR-ABL Wildtyp (BCR-ABL WT) Konstrukt lag bereits in den MigR1 Vektor inkloniert vor.

Die nun folgende Virusgenerierung bzw. Virustransduktion der LCLs ist ausführlich unter Punkt 5.3.2.5 beschrieben. Die Transduktion von LCLs gelang stets mit einer Effizienz von ca.

1% (siehe Abb. 11B, links). Da es sich bei dem retroviral eingebrachten Vektor um einen bicistronische Vektor handelt (Abb. 11A), bei dem eGFP („*enhanced green fluorescent protein*“) koexprimiert wird, ist es nach dem Gentransfer in die LCLs möglich, die transfizierten Zellen mittels FACS zu sortieren (FACS-basierte Zellsortierung: 5.3.3.3). Die sortierten Zielzellen exprimieren bis zu 90% eGFP (siehe Abb. 11B, rechts).

Zur Überprüfung, ob die eingefügte Punktmutation im BCR-ABL Gen tatsächlich den gewünschten Effekt hat, die Kinasedomäne zu inaktivieren, wurden nun von den BCR-ABL WT-, BCR-ABL KD- und MigR1-exprimierenden LCLs Lysate hergestellt und eine Western Blot Analyse (5.3.4.2) durchgeführt mit Antikörpern, die zum einen phosphorylierte Tyrosinreste erkennen, oder aber gegen spezifische Strukturen in c-Abl bzw. BCR-ABL gerichtet sind. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 11C. Deutlich ist zu erkennen, dass die Kinaseaktivität im mutierten BCR-ABL KD Konstrukt vollständig ausgeschaltet wurde.

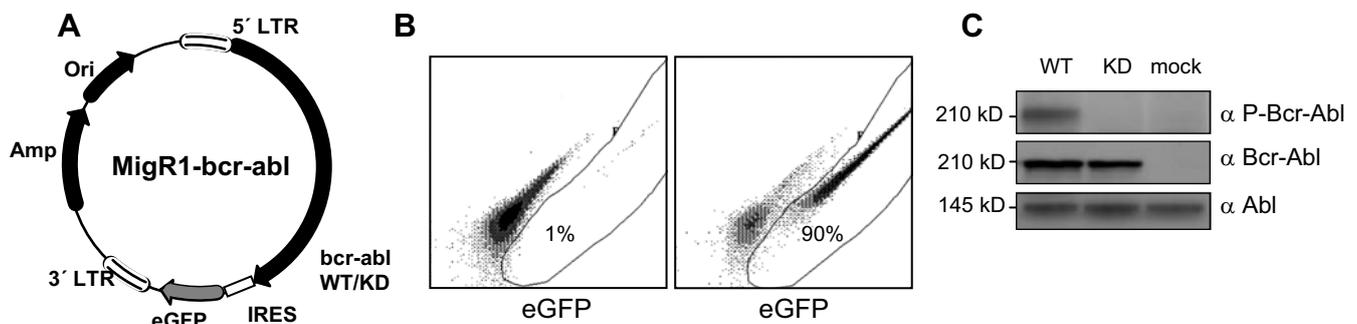


Abb. 11: Transduktion und Anreicherung von BCR-ABL exprimierenden LCLs. (A) Karte des retroviralen, bicistronischen Vektors MigR1-BCR-ABL. (B) links: FACS Analyse von MigR1 BCR-ABL WT transduzierten LCLs. Rechts: FACS Analyse von MigR1 BCR-ABL WT transduzierten LCLs und nach FACS-Sortierung. (C) Western Blot mit BCR-ABL WT, -KD oder mock transduzierten LCLs und α -phospho-Tyrosin Antikörper (oben) bzw. α -Abl Antikörper (mitte/unten).

2.2.2.2 Generierung von BCR-ABL[±] DCs mittels mRNA-Elektroporation

Eine Alternative zu LCLs bieten autologe DCs, die transient mit BCR-ABL transfiziert wurden. Da sich DCs allerdings nur bedingt mit Plasmid-DNA transfizieren lassen,¹¹⁹ wurde im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit untersucht, reife DCs mit *in vitro*-transkribierter (IVT) mRNA zu transfizieren. Unter Punkt 5.3.1.5 wird die Methode der IVT näher erläutert.

Zunächst wurden DCs mit eGFP-mRNA zu Optimierungszwecken unter verschiedenen Bedingungen transfiziert. Hierbei stellte sich die Elektroporation mit einem sog. "square wave" Protokoll als am effizientesten heraus bei einer gleichzeitig sehr hohen Überlebensrate (siehe 5.3.2.9 für detailliertes Elektroporations-Protokoll). Abbildung 12A zeigt eine FACS Analyse von DCs 24 Std. nach Elektroporation mit 10 μ g eGFP mRNA mit zwei verschiedenen

Protokollen. Deutlich ist hier die Überlegenheit des „square wave“ Protokolls (dunkelgraue Kurve) gegenüber einem exponentiellen Protokoll (hellgraue Kurve) zu erkennen.

Zum nun folgenden Nachweis der Antigen-präsentierenden Funktion der elektroporierten DCs wurde zunächst als Modellantigen das Matrix Phosphoprotein pp65 des Cytomegalievirus (CMV) eingesetzt, da in der Arbeitsgruppe bereits CMV/pp65_{p495-503}-spezifische CTL Klone etabliert sind. Dazu wurden reife, HLA-A2⁺ DCs mit mRNA des CMV-Proteins pp65 elektroporiert und als Zielzellen für die HLA-A2-restringierten, pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen CTL-Klone in einem ⁵¹Cr-Freisetzungstest eingesetzt. Die CMV-spezifischen T-Zellklone lysierten DCs, die zu verschiedenen Zeitpunkten vor dem Test mit CMVpp65 mRNA elektroporiert worden waren (Abb. 12B). Dieser Lyse-Assay bestätigte die Effizienz der Elektroporation auf immunologischer Ebene. Da 24 Stunden nach Elektroporation die höchste Lyse der Zielzellen erreicht wurde (Abb. 12B rechts), wurde in zukünftigen Experimenten dieser Zeitpunkt zum T-Zell Priming festgelegt. Neben der lytischen Aktivität wurde in einem IFN- γ ELISpot (5.3.3.2) auch die Cytokinausschüttung der CTL Klone nach Inkubation mit pp65 mRNA elektroporierten DCs überprüft. Abbildung 12C zeigt eine spezifische IFN- γ Produktion 24 Stunden nach Gentransfer, analog zum vorherigen Ergebnis des ⁵¹Cr-Freisetzungstest.

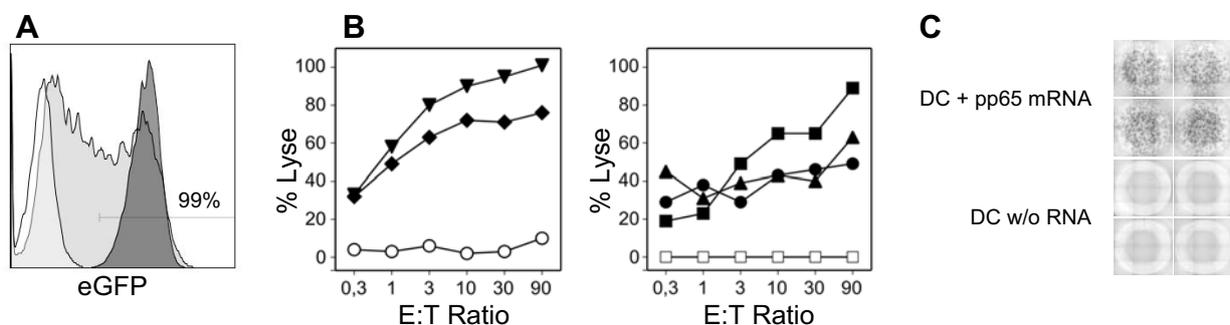


Abb. 12: Gentransfer in monozytäre DCs durch mRNA-Elektroporation. (A) FACS Analyse von DCs 24 Stunden nach Elektroporation von eGFP mRNA. Hellgrau: exponentielles Protokoll (300V, 150 μ F). Dunkelgrau: „square wave“ Protokoll (500V, 0,5 ms). (B) ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit pp65 spezifischem CTL Klon und DCs die zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor dem Test mit pp65 mRNA elektroporiert wurden. Links: Als Positivkontrolle bei diesem Test dienten pp65-Peptid beladene T2 Zellen (\blacktriangledown) bzw. pp65⁺ LCL Zelllinien (\blacklozenge). Als Negativkontrolle dienten T2 Zellen die mit einem irrelevanten HIV Peptid beladen wurden (\circ). Rechts: DCs wurden zu unterschiedlichen Zeiten vor dem Test mit pp65 bzw. irrelevanter mRNA elektroporiert: DC w/o RNA (\square), DC 5h pp65 mRNA (\bullet), DC 15h pp65 mRNA (\blacktriangle), DC 24h pp65 mRNA (\blacksquare). (C) ELISpot Assay mit pp65 spezifischem CTL Klon und pp65 mRNA elektropotierten DCs. Durchschnittliche Spotanzahl pp65⁺DC: 675 Spots. Durchschnittliche Spotanzahl DC w/o RNA: 3,5.

2.2.3 Stimulation von CD8⁺ T-Zellen mit BCR-ABL exprimierenden DCs

2.2.3.1 DCs elektroporiert mit herkömmlicher IVT BCR-ABL mRNA

Nachdem im Rahmen der Zielzellgenerierung eine effiziente Methode etabliert worden ist, um Kinase-aktives BCR-ABL transient in DCs zu transfizieren, wurden nun T-Zellstimulationen mit diesen DCs durchgeführt, um spezifische zytotoxische T-Zellen zu aktivieren, die gegen BCR-ABL-regulierte Antigene bzw. Antigene des BCR-ABL Fusionsproteins selbst gerichtet sind. Nach zwei Stimulationen von MACS isolierten (5.3.2.10) CD8⁺ T-Lymphozyten eines gesunden Spenders im Abstand von einer Woche wurde die Spezifität der proliferierten T-Zellpopulationen in einem IFN- γ ELISpot Assay getestet. Abbildung 13 zeigt die Analyse dieses Testes. Als Zielzellen wurden autologe LCLs verwendet, die stabil, wie unter Punkt 2.2.2.1 beschrieben, mit BCR-ABL WT, -KD oder nur dem Leer-Vektor (Negativkontrolle) transduziert wurden. Die IFN- γ Produktion bzw. Spotanzahl pro T-Zellpopulation und jeweiliger BCR-ABL WT⁺ oder -KD⁺ Zielzelle wurde mit der IFN- γ Produktion der Negativkontrolle verglichen.

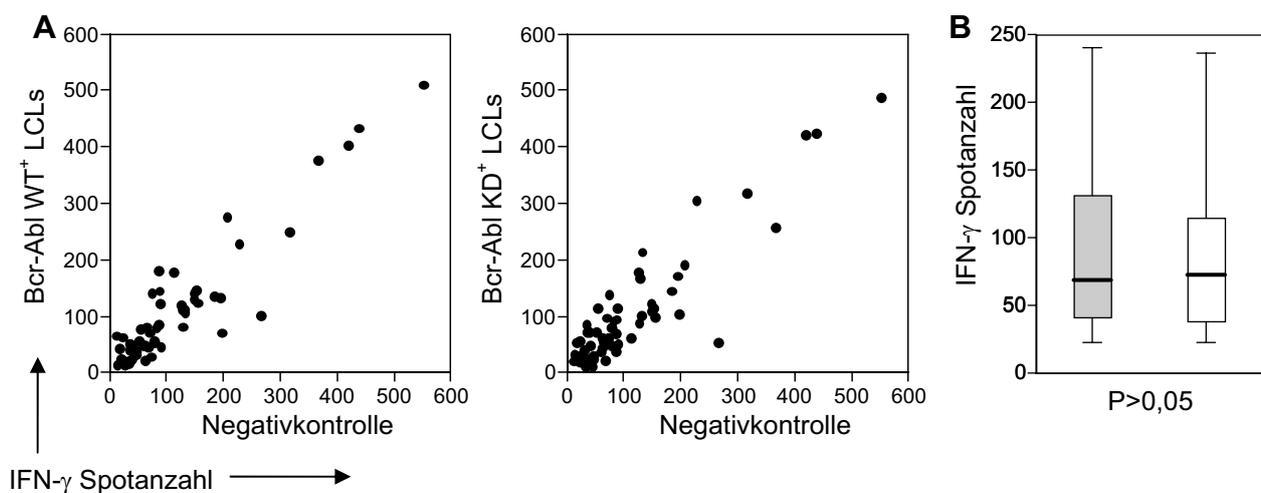


Abb. 13: Analyse des T-Zellrepertoires gegen BCR-ABL-regulierte Antigene. (A) Auswertung des ELISpot Assay in einem Punkte Diagramm (Dot Plot) nach zwei Stimulationen mit BCR-ABL WT elektroporierten, autologen DCs. Als Zielzellen dienten autologe, BCR-ABL WT bzw. -KD transduzierte LCLs. BCR-ABL negative LCLs dienten als Negativkontrolle. Links: Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL WT⁺ LCLs und gegen die Negativkontrolle. Rechts: Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL KD⁺ LCLs und gegen die Negativkontrolle. (B) Box Plot Darstellung des ELISpot Assay aus (A) zur statistischen Auswertung. Die Boxen repräsentieren den interquartilen Bereich, die Balken in den Boxen zeigen die mediane Spotanzahl der T-Zellpopulationen. Graue Box: BCR-ABL WT⁺ Zielzellen. Weiße Box: BCR-ABL KD⁺ Zielzellen

Aus Abbildung 13 wird deutlich, dass im Vergleich zur Negativkontrolle keine spezifische T-Zellreaktivität gegen BCR-ABL oder BCR-ABL-regulierte Antigene nachweisbar ist.

In Abbildung 13B wurden die Werte der Punktwolken für eine weitergehende statistische Auswertung in ein Box Plot Diagramm übertragen. Der aus dieser Graphik berechnete p-Wert

ist größer als 0.05, zeigt also keinen signifikanten Unterschied zwischen BCR-ABL WT⁺ und KD⁺ Zielzellen.

Zur Optimierung des Stimulationsprotokolls wurden nun verschiedene Parameter im experimentellen Ablauf modifiziert, um mögliche Fehlerquellen oder Schwachpunkte auszuschalten bzw. zu minimieren.

2.2.3.2 Test der Regulativen Fähigkeiten von β -Globin stabilisierter BCR-ABL mRNA

Zunächst sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass keine spezifischen T-Zellen gegen BCR-ABL oder BCR-ABL-regulierte Antigene nachgewiesen werden konnten aufgrund von zu instabiler mRNA in den zum Priming elektroporierten DCs. Das heißt, dass ein transfiziertes mRNA Molekül vor seiner Degradation nicht häufig genug von Ribosomen translatiert wird. Eine daraus folgende geringe Menge an BCR-ABL Protein pro Zelle kann zur Folge haben, dass keine ausreichende Menge an BCR-ABL oder BCR-ABL-regulierten Proteinen nach proteosomalem Abbau auf MHC Moleküle geladen und präsentiert werden. Folglich kann nach Kontakt mit T-Zellen keine spezifische Immunreaktion initiiert werden.

Eine effiziente Translation von mRNA erfordert prinzipiell eine 7-Methylguanylat-Gruppe, die sog. Cap-Gruppe in 5' Richtung („*upstream*“) des codierenden Bereiches. Ein sog. Poly(A)-Schwanz in 3' Richtung („*downstream*“) des codierenden Bereiches trägt ebenfalls zur Translationsinitiation bei, hat aber vor allem wesentlichen Anteil an der Stabilisierung der mRNA. Sowohl Cap Struktur als auch Poly(A)-Schwanz sind Bestandteile der bis dato verwendeten IVT mRNA. Zur weiteren Optimierung der mRNA Stabilität wurde die Erkenntnis genutzt, dass der Einschub einer untranslatierten Sequenz des *Xenopus* β -Globin Genes zwischen codierenden Bereich und Poly(A)-Schwanz die Stabilität der mRNA entscheidend verbessert (Abbildung 14).¹²⁰ Das Patent auf diese Art der mRNA-Stabilisierung hält die Firma CureVac (Tübingen), die daher die IVT der β -Globin stabilisierten mRNA (sog. RNActive) übernommen hat.

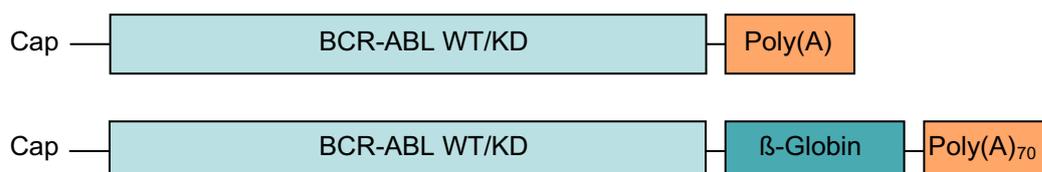


Abb. 14: Schematische Darstellung des Aufbaus herkömmlicher IVT mRNA (oben) und β -Globin stabilisierter „RNActive“ mRNA (unten).

Vor einer weiteren T-Zellstimulation sollte nun zunächst getestet werden, ob sich nach Elektroporation von BCR-ABL RNAActive in DCs die Aktivierung von bekannten BCR-ABL-regulierten Genen bzw. Leukämie-assoziierten Genen nachweisen lässt. Hierzu wurden DCs mit 25µg BCR-ABL WT oder -KD RNAActive elektroporiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Gentransfer RNA aus diesen Zellen isoliert (5.3.1.4). Nach reverser Transkription (5.3.1.10) wurden PCRs durchgeführt, um zum einen die transferierte BCR-ABL mRNA nachzuweisen (Positivkontrolle), zum anderen, um die oben erwähnten BCR-ABL-regulierten bzw. Leukämie-assoziierten Gene nachzuweisen (Abbildung 15).

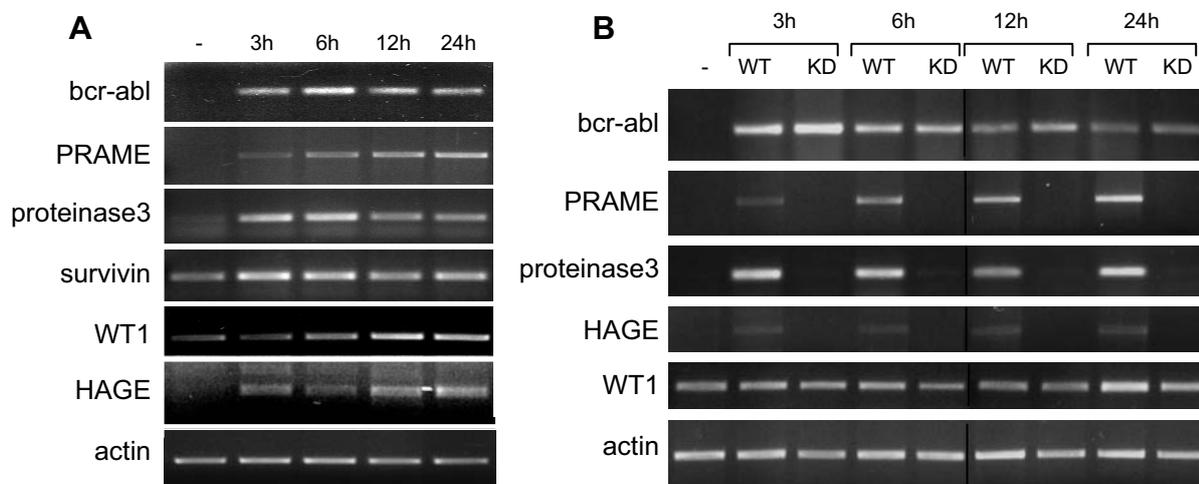


Abb. 15: Regulation von BCR-ABL assoziierten Genen durch BCR-ABL Kinaseaktivität. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Elektroporation von BCR-ABL WT mRNA (A) bzw. BCR-ABL KD mRNA (B) wurden RT-PCR von verschiedenen BCR-ABL-regulierten und CML assoziierten Genen durchgeführt. PRAME, proteinase 3 und HAGE zeigen eine deutliche, Bcr.Abl Kinase-abhängige Regulation.

In Abbildung 15A bzw. B ist eine deutliche Regulation der Gene PRAME, Proteinase 3 und HAGE erkennbar. PRAME (*Preferentially expressed antigen of melanoma*) ist ein bekanntes, BCR-ABL-reguliertes Tumorantigen¹²¹ und zeigt eine starke BCR-ABL Kinase abhängige Hochregulierung, die bis 24 Stunden nach Gentransfer ansteigt. Die Serinprotease Proteinase 3, auch bekannt als Myeloblastin, wird normalerweise in azurophilen Granula von myeloiden Zellen exprimiert, aber auch in leukämischen myeloiden Zellen. Proteinase 3 wird ebenfalls von BCR-ABL hochreguliert, allerdings schneller als PRAME. Die Expression des erst kürzlich entdeckten, sog. „*cancer testis*“ (CT) Proteins HAGE wird ebenfalls durch BCR-ABL Kinaseaktivität induziert. CT-Proteine zeichnen sich durch eine auf Hoden bzw. verschiedene Tumore beschränkte Expression aus und bieten sich daher als immuntherapeutische Ziele an. HAGE wird ebenfalls in manchen Fällen von chronisch myeloider Leukämie überexprimiert.¹²²

Andere CML assoziierte Proteine wie z.B. WT-1 (Abb.15), Survivin, MPP11, RHAMM oder NY-Eso zeigten keine Expressionsinduktion.

Dieser Test zeigte, dass die β -Globin stabilisierte BCR-ABL mRNA effizient translatiert werden kann, so dass sich in der Zelle genügend BCR-ABL Protein anreichern kann, um in ausreichendem Maße verschiedene Adapterproteine bzw. Signalwege zu aktivieren. Mit DCs, die mit derartiger BCR-ABL mRNA transfiziert worden sind, wurden die folgenden T-Zellstimulationen durchgeführt.

2.2.3.3 T-Zellstimulation mit DCs, elektroporiert mit stabilisierter β -Globin stabilisierter BCR-ABL mRNA

Nach zweimaliger Stimulation von $CD8^+$ T-Zellpopulationen eines gesunden Spenders mit BCR-ABL RNAactive transfizierten DCs, folgte wiederum, wie schon unter Punkt 2.2.3.1, ein ELISpot Screening Assay mit autologen LCLs als Zielzellen, die stabil mit BCR-ABL WT, -KD oder lediglich dem Leervektor transduziert worden sind. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis dieses Versuches.

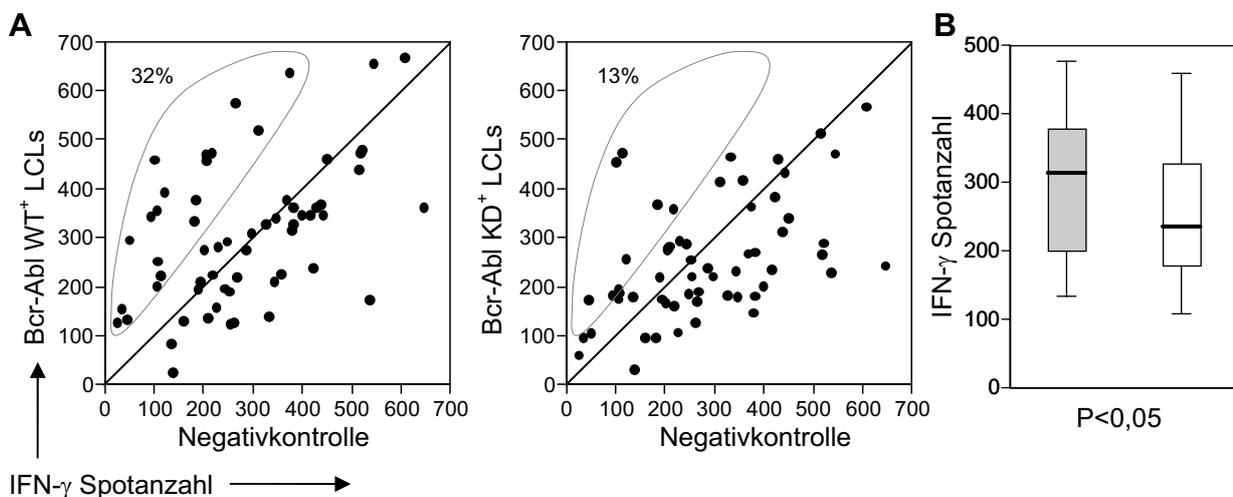


Abb. 16: Analyse des T-Zellrepertoires gegen BCR-ABL-regulierte Antigene. (A) Auswertung des ELISpot Assay in einem Dot Plot nach zwei Stimulationen mit BCR-ABL WT RNAactive-elektroporierten, autologen DCs. Zielzellen: autologe, BCR-ABL WT bzw. -KD transduzierte LCLs. Negativkontrolle: BCR-ABL negative, autologe LCLs. Links: Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL WT⁺ LCLs und gegen die Negativkontrolle. Rechts: Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL KD⁺ LCLs und gegen die Negativkontrolle. Der dargestellte Prozentsatz in den Diagrammen entspricht dem Anteil der T-Zellpopulationen, der gegen BCR-ABL-regulierte (A, links) bzw. von BCR-ABL abstammende (A, rechts) Antigene gerichtet ist (Populationen innerhalb des eingezeichneten, runden „gates“) (B) Box Plot Darstellung des ELISpot Assay aus (A) zur statistischen Auswertung. Graue Box: BCR-ABL WT⁺ Zielzellen. Weiße Box: BCR-ABL KD⁺ Zielzellen. P<0,05: marginal signifikanter Unterschied zwischen BCR-ABL WT⁺ und KD⁺ Zielzellen

In Abbildung 16A bzw. C ist eine leichte, allerdings nur marginal signifikante ($P < 0,05$) Verschiebung der T-Zellspezifität in Richtung der BCR-ABL WT exprimierenden Zielzellen erkennbar, ein erster Hinweis auf die Immunogenität BCR-ABL-regulierter Antigene. Durch weitere Optimierungen des experimentellen Ansatzes sollte dieser Effekt nun verifiziert bzw. auf seine Signifikanz untersucht werden.

Einen wichtigen Parameter im oben beschriebenen Experiment stellen die im abschließenden ELISpot Assay eingesetzten Zielzellen dar. LCLs sind, als immortalisierte B Zellen, zwar fähig zur Antigenpräsentation, allerdings zählen sie nicht zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie DCs, die sich in ausgereiftem Zustand durch eine hohe Konzentration an Peptid-beladenen MHC-Komplexen auf ihrer Zelloberfläche auszeichnen. Aufgrund dieser Tatsache wurden die beschriebenen T-Zellstimulationen wiederholt und im anschließenden Screening, statt mit LCLs, mit autologen DCs getestet, die mit BCR-ABL WT, -KD RNAActive und leer elektroporiert (mock Kontrolle) worden sind.

2.2.3.4 Analyse der T-Zellspezifität mit DCs als Zielzellen

Nach diesmal dreimaliger Stimulation von $CD8^+$ T-Zellpopulationen eines gesunden Spenders (Initialen „KF“) mit autologen, BCR-ABL RNAActive transfizierten DCs folgte nun wie oben erwähnt die ELISpot Auswertung des Versuches mit BCR-ABL WT, -KD RNAActive und leer elektroporierten DCs. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis dieses Ansatzes.

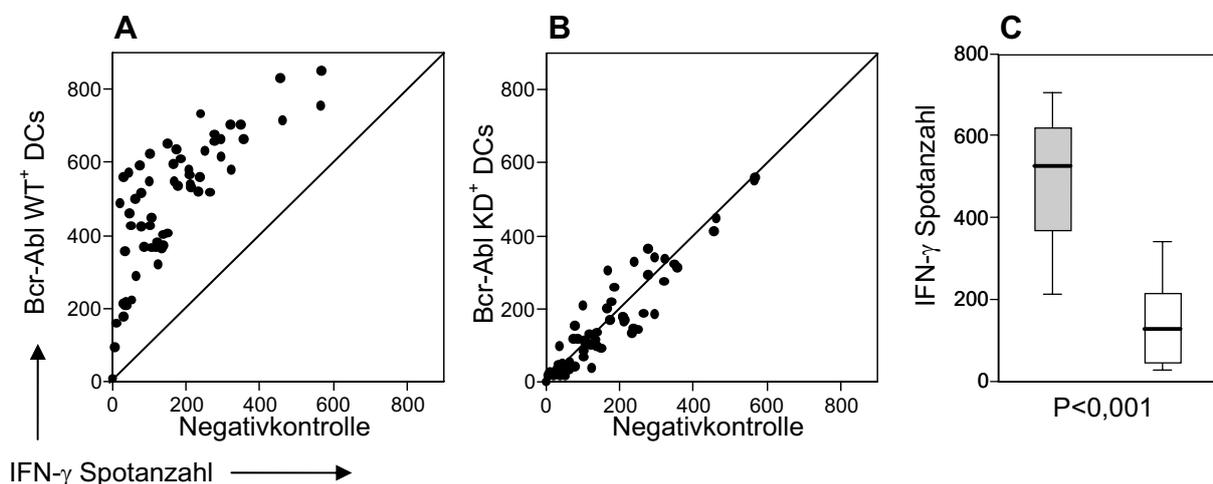


Abb. 17: Analyse des T-Zellrepertoires gegen BCR-ABL-regulierte Antigene. (A,B) Auswertung des ELISpot Assay in einem Dot Plot nach drei Stimulationen mit BCR-ABL WT RNAActive-elektroporierten, autologen DCs. Zielzellen: autologe, BCR-ABL WT bzw. -KD elektroporierte DCs. Negativkontrolle: mock-transfizierte, BCR-ABL negative DCs. (A) Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL WT⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. (B) Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL KD⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. (C) Box Plot Darstellung des ELISpot Assay aus (A) und (B) zur statistischen Auswertung. Graue Box: BCR-ABL WT⁺ Zielzellen. Weiße Box: BCR-ABL KD⁺ Zielzellen. $P < 0,001$: hoch signifikanter Unterschied zwischen BCR-ABL WT⁺ und KD⁺ Zielzellen.

Deutlich ist hier zu erkennen, dass die Kokultur der stimulierten T-Zellen mit BCR-ABL WT⁺ DCs als Zielzellen eine sehr viel höhere Zytokinausschüttung, also Reaktivität, im Vergleich zur mock-Kontrolle zur Folge hat. BCR-ABL KD⁺ Zielzellen hingegen induzierten keine spezifische IFN- γ Produktion. Abbildung 17C bestätigt die Signifikanz dieses Unterschiedes mit einem p-Wert von unter 0,001. T-Zellpopulationen die gegen das BCR-ABL Fusionsprotein gerichtet sind, würden in Abbildung 17B im Vergleich zu mock-transfizierten Zielzellen eine höhere Reaktivität gegen BCR-ABL KD⁺ Zielzellen zeigen, dies ist allerdings nicht der Fall. Daraus kann geschlossen werden, dass die T-Zellpopulationen, die in Abbildung 17A im Vergleich zur mock Kontrolle eine signifikant höhere Reaktivität gegenüber BCR-ABL WT⁺ Zielzellen zeigen, ausschließlich gegen Antigene gerichtet sind, die aus BCR-ABL-regulierten Proteinen stammen, und nicht aus dem eigentlichen BCR-ABL Fusionsprotein. BCR-ABL-regulierte Antigene haben demnach eine signifikant höhere Immunogenität als Antigene aus dem BCR-ABL Protein selbst. In Abbildung 18 A und B sind beispielhaft die Ergebnisse des ELISpot Assay von jeweils drei T-Zellpopulationen nach Priming mit BCR-ABL WT⁺ bzw. KD⁺ DCs dargestellt.

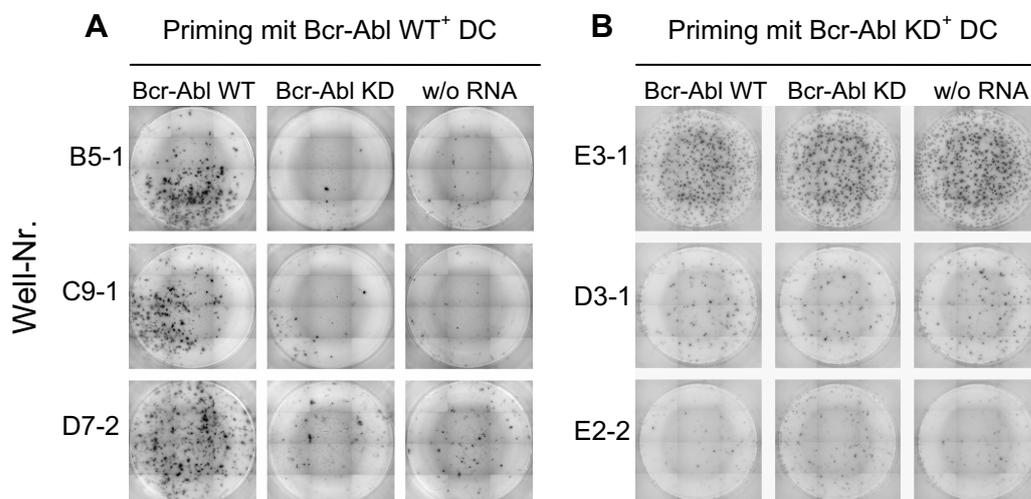


Abb. 18: Repräsentative ELISpot-Bilder von T-Zellpopulationen. (A) Nach Priming mit BCR-ABL WT⁺ DC, mit starker Reaktivität, d.h. IFN- γ Produktion, gegen BCR-ABL WT⁺ Zielzellen (linke Spalte). (B) Nach Priming mit BCR-ABL KD⁺ DC, mit unspezifischer Reaktivität.

Zur Reproduktion dieser Ergebnisse wurde der dargestellte Versuch mit weiteren gesunden Spendern wiederholt. Abbildung 19 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines analog durchgeführten Experimentes mit Zellen eines weiteren gesunden Spenders (RS).

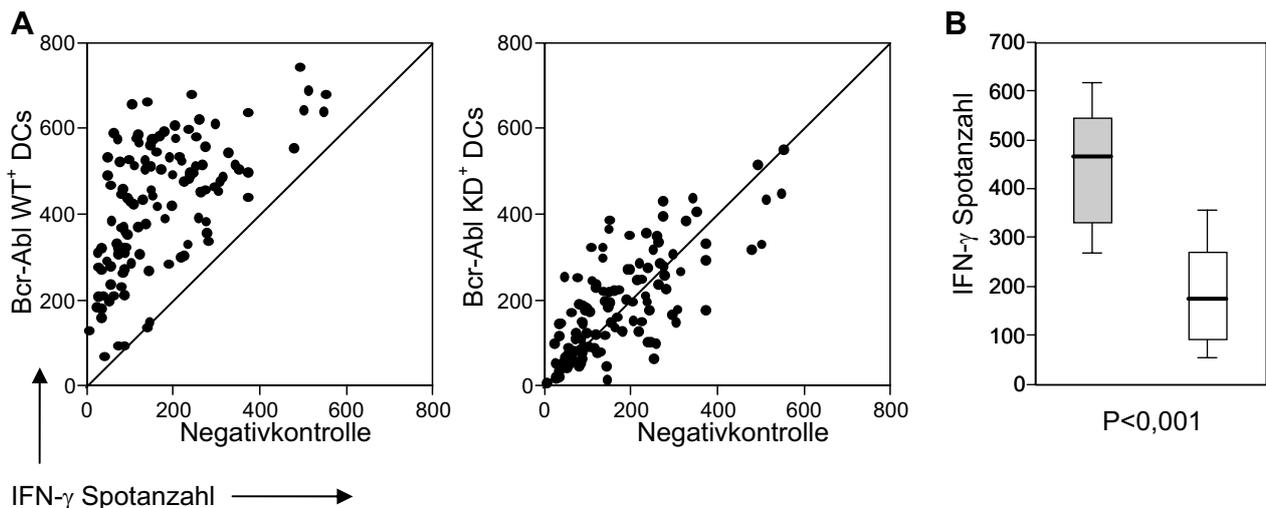


Abb. 19: Analyse des T-Zellrepertoires gegen BCR-ABL-regulierte Antigene. Wiederholung des unter Abb. 17 dargestellten Ansatzes mit einem anderen gesunden Spender. (A) Auswertung des ELISpot Assay in einem Dot Plot nach drei Stimulationen mit BCR-ABL WT **RNA**ctive-elektroporierten, autologen DCs. Zielzellen: autologe, BCR-ABL WT bzw. -KD elektroporierte DCs. Negativkontrolle: mock-transfizierte, BCR-ABL negative DCs. Links: Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL WT⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. Rechts: Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL KD⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. (B) Box Plot Darstellung des ELISpot Assay aus (A) zur statistischen Auswertung. Graue Box: BCR-ABL WT⁺ Zielzellen. Weiße Box: BCR-ABL KD⁺ Zielzellen. $P < 0,001$: hoch signifikanter Unterschied zwischen BCR-ABL WT⁺ und KD⁺ Zielzellen

Wiederum zeigt sich hier eine signifikant höhere Immunogenität der BCR-ABL-regulierten Antigene im Vergleich zu Antigenen aus dem eigentlichen BCR-ABL Fusionsprotein.

2.2.3.5 Test des T-Zellspezifitätsmuster in CML-Patient

Nachdem bisher lediglich das T-Zellrepertoire von gesunden Spendern betrachtet wurde, sollte nun untersucht werden, ob es Unterschiede gibt in Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie. Falls die bisher dargestellten Ergebnisse nicht der *in vivo* Situation entsprechen und es im Körper von Ph⁺ Leukämiepatienten zu einer Aktivierung von CTLs kommt die gegen das BCR-ABL Fusionsprotein gerichtet sind, so würden die aus dieser Immunreaktion hervorgegangenen Gedächtnis- („memory“-) T-Zellen bei erneuter *in vitro* Stimulation mit BCR-ABL⁺ DCs reaktiviert werden und der an die T-Zellstimulation anschließende ELISpot Assay würde ein anderes Ergebnis zeigen als zuvor bei den gesunden Spendern. Es wären T-Zellpopulationen nachweisbar, die sowohl bei Inkubation mit BCR-ABL WT⁺, als auch BCR-ABL KD⁺ Zielzellen eine spezifische Zytokinproduktion zeigen würden.

Um dies zu testen, wurden CD8⁺ T-Lymphozyten eines in kompletter Remission befindlichen CML-Patienten (OW), wie bereits beschrieben, dreifach mit autologen DCs stimuliert, die mit BCR-ABL RNActive transfiziert worden waren. Diese DCs wurden vor den T-Zellstimulationen auf ihre mögliche endogene BCR-ABL Expression getestet (Abb. 20).

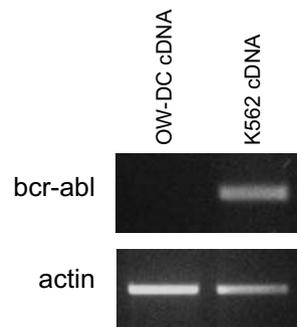


Abb. 20: Analyse der BCR-ABL-Expression in DCs von CML-Patient OW. Aus monozytären DCs des CML-Patienten OW wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR auf die Expression vom BCR-ABL p210 hin untersucht.

Nach diesem Test konnte eine endogene BCR-ABL-Expression in den DCs des Patienten ausgeschlossen werden.

Nach der nun folgenden dreimaligen Stimulation autologer T-Zellen mit BCR-ABL-elektroporierten DCs folgte zur Spezifitätsanalyse der abschließende ELISpot Assay (Abb. 21).

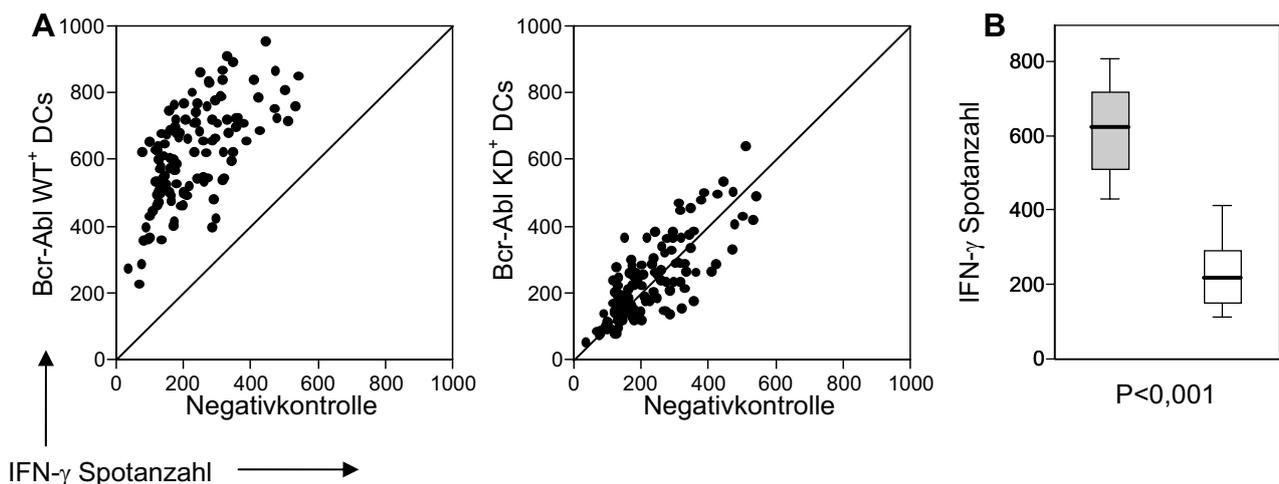


Abb. 21: Analyse des T-Zellrepertoires gegen BCR-ABL-regulierte Antigene. Wiederholung des unter Abbildung 11 dargestellten Ansatzes mit Zellen eines CML-Patienten. (A) Auswertung des ELISpot Assay in einem Dot Plot nach drei Stimulationen mit BCR-ABL WT RNAActive-elektroporierten, autologen DCs. Zielzellen: autologe, BCR-ABL WT bzw. -KD elektroporierte DCs. Negativkontrolle: mock-transfizierte, BCR-ABL negative DCs. Links: Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL WT⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. Rechts: Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL KD⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. (B) Box Plot Darstellung des ELISpot Assay aus (A) zur statistischen Auswertung. Graue Box: BCR-ABL WT⁺ Zielzellen. Weiße Box: BCR-ABL KD⁺ Zielzellen. P<0,001: hoch signifikanter Unterschied zwischen BCR-ABL WT⁺ und KD⁺ Zielzellen

Deutlich ist hier die Ähnlichkeit zur Situation in gesunden Spendern zu erkennen: BCR-ABL WT⁺ Zielzellen induzieren eine spezifische Zytokinproduktion im Vergleich zu den mock-Zielzellen. Bei BCR-ABL KD⁺ Zielzellen ist dies nicht der Fall. Es scheint also auch *in vivo* nicht zu einer spezifischen Aktivierung von CTLs zu kommen, die gegen das BCR-ABL

Fusionsprotein gerichtet sind, was wiederum für eine äußerst geringe Immunogenität des BCR-ABL Fusionsproteins spricht.

2.2.3.6 Ausschluß unspezifischer NK Zellaktivität

Die konstitutiv aktive BCR-ABL Tyrosinkinase hat direkten Einfluss auf die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I verwandte Moleküle MICA und MICB¹²³. Diese Moleküle sind Liganden des NK-(natürliche Killer) Zell-aktivierenden Rezeptors NKG2D¹²⁴. Da bekannt ist, dass CD8⁺ T-Zellen NKG2D exprimieren¹²⁵, musste nun die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die dargestellte hohe Reaktivität von T-Zellen gegen BCR-ABL-regulierte Antigene auf unspezifische T-Zellreaktivität via BCR-ABL-induzierter MICA- oder MICB-Bindung an NKG2D auf den T-Zellen zurückzuführen ist. Dafür wurden parallel T-Zellstimulationen mit DCs durchgeführt, die mit Kinase-defizienter BCR-ABL mRNA transfiziert worden sind, anstatt mit BCR-ABL WT mRNA, wodurch keine MICA/MICB Expression induziert wird.

T-Zellstimulation mit BCR-ABL KD⁺ DCs

Nach drei Stimulationen von CD8⁺ T-Zellen mit BCR-ABL KD⁺ DCs erfolgte die Analyse der T-Zellpopulationen im ELISpot. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente, die parallel zu den unter Punkt 2.2.3.4 bis 2.2.3.5 dargestellten Ansätzen und mit den gleichen Spendern bzw. Patienten durchgeführt wurden.

Deutlich ist in diesen Abbildungen zu erkennen, dass die mit BCR-ABL KD⁺ DCs stimulierten T-Zellen im ELISpot nach Kokultur sowohl mit BCR-ABL WT⁺ als auch mit BCR-ABL KD⁺ Zielzellen im Vergleich zu mock transfizierten Zielzellen keine spezifische Reaktivität zeigen. Die Anzahl an IFN- γ Spots unterscheidet sich nach Kokultur mit BCR-ABL WT⁺ oder KD⁺ bei beiden gesunden Spendern KF und RS bzw. dem CML-Patienten OW nicht signifikant. Dies bestätigte zum einen, dass die Spezifität der unter Punkt 2.2.3.4 bzw. 2.2.3.5 dargestellten T-Zellpopulationen tatsächlich auf eine HLA-vermittelte Reaktivität gegen BCR-ABL-regulierte Antigene zurückzuführen ist. Diese Antigene wurden beim Priming bzw. der Restimulation mit BCR-ABL KD⁺ DCs nicht präsentiert, daher wurden auch keine T-Zellen gegen BCR-ABL-regulierte Antigene aktiviert. Zum anderen, zeigte sich hier wiederum die geringe Immunogenität des eigentlichen BCR-ABL Proteins, gegen das keine reaktiven T-Zellpopulationen nachgewiesen werden konnten.

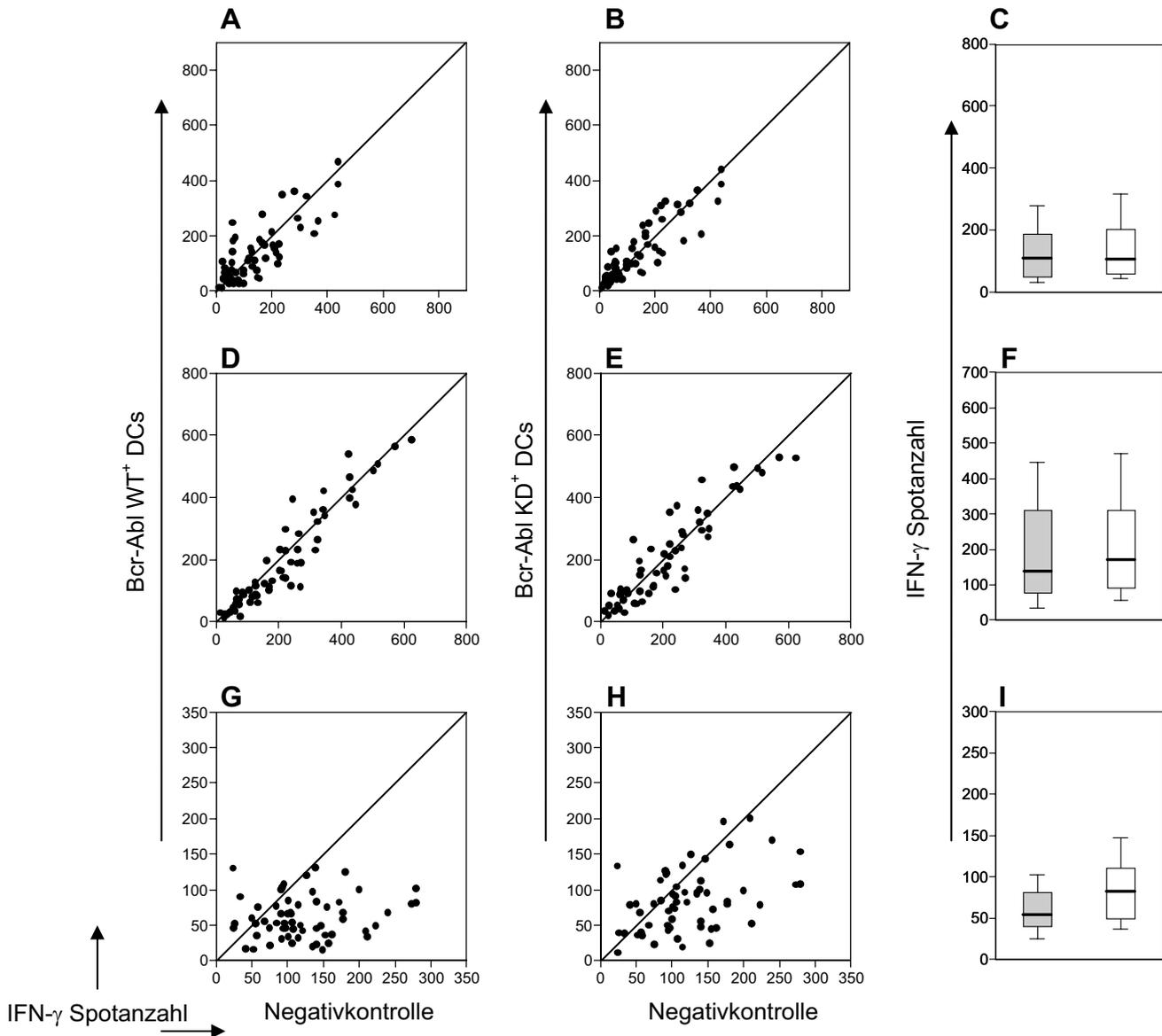


Abb. 22: T-Zellstimulation mit BCR-ABL KD⁺ DC induziert keine spezifische Reaktivität. (A-C) Ansatz mit gesundem Spender KF: Auswertung des ELISpot Assay nach drei Stimulationen mit BCR-ABL WT RNAActive-elektroporierten, autologen DCs. Zielzellen: autologe, BCR-ABL WT bzw. -KD elektroporierte DCs. Negativkontrolle: mock-transfizierte, BCR-ABL negative DCs. (A) Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL WT⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. (B) Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL KD⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. (C) Box Plot Darstellung des ELISpot Assay aus (A) und (B) zur statistischen Auswertung. Graue Box: BCR-ABL WT⁺ Zielzellen. Weiße Box: BCR-ABL KD⁺ Zielzellen. (D-F) Wie (A-C) aber Zellen von gesundem Spender RS. (G-I) Wie (A-C) aber Zellen von CML-Patient OW. Bei C, F und I: P>0,05; kein signifikanter Unterschied zwischen BCR-ABL WT⁺ und KD⁺ Zielzellen.

Antikörper-Blockade der MHC Komplexe

Eine weitere Möglichkeit eine unspezifische NK-Zellaktivität auszuschließen bzw. eine HLA-abhängige T-Zellaktivierung sicherzustellen bietet der Einsatz eines spezifisch an HLA-Klasse-I-Moleküle bindenden Antikörpers. Der Antikörper W6/32 bietet eine solche Spezifität und bindet bzw. blockiert sämtliche HLA-A, -B oder -C Moleküle.¹²⁶ Um die Auswirkungen einer HLA-Blockierung bei einer T-Zellstimulation zu untersuchen wurden CD8⁺ T-Zellen

wiederum dreifach mit BCR-ABL WT⁺ DCs stimuliert. Bei der abschließenden Analyse der T-Zellpopulationen im ELISpot, die in Abbildung 23 dargestellt ist, wurde nun die Reaktivität gegen autologe, BCR-ABL⁺ bzw. mock-transfizierte Zielzellen verglichen, die zum einen mit dem Antikörper W6/32 vorinkubiert wurden, oder mit einem IgG Kontrollantikörper, oder ohne einen Antikörper.

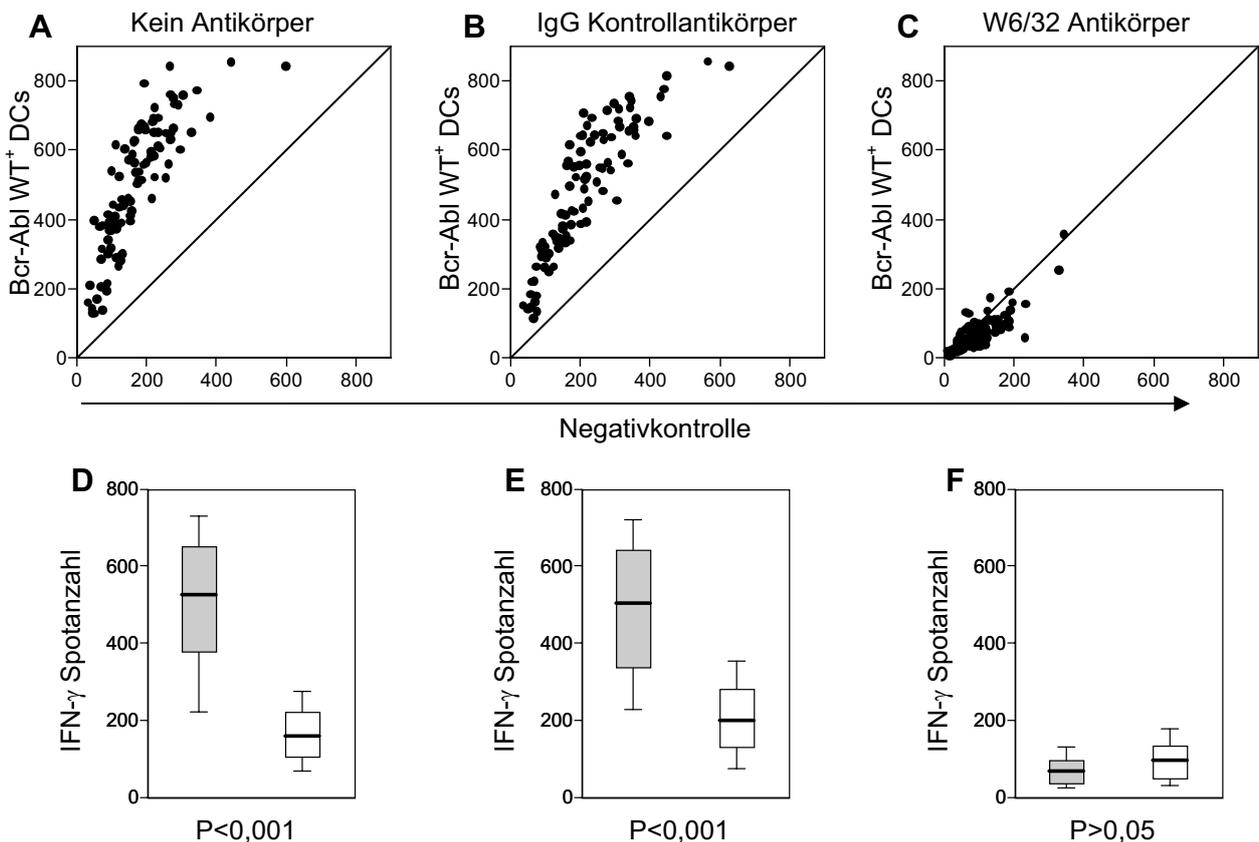


Abb. 23: Blockade der MHC Klasse I Moleküle inhibiert Reaktivität gegen BCR-ABL-regulierte Antigene. Inkubation der mit BCR-ABL WT⁺ Zielzellen mit einem IgG Kontrollantikörper (B) oder keinem Antikörper (A) resultiert wie schon vorher beobachtet, in einer Reaktivität der mit BCR-ABL WT⁺ DCs stimulierten T-Zellpopulationen gegen BCR-ABL WT exprimierende Zielzellen. Inkubation der Zielzellen mit W6/32 Antikörper (C) unterdrückt diese Reaktivität. Die dargestellten Box Plots (D-F) bestätigen die Signifikanz der IFN- γ ELISpot Ergebnisse ohne Antikörper (D) bzw. mit IgG Kontrollantikörper (E). Bei HLA-Blockade durch W6/32 ist kein signifikanter Unterschied zwischen BCR-ABL WT⁺ Zielzellen und mock-transfizierten Zielzellen feststellbar (F). Graue Kästen: BCR-ABL WT⁺ Zielzellen. Weiße Kästen: mock-transfizierte Zielzellen.

Nach Vorinkubation der Zielzellen mit dem Antikörper W6/32 ist hier eine stark eingeschränkte Reaktivität der T-Zellen erkennbar. Abbildung 23A und B zeigen eine spezifische T-Zellaktivität gegen BCR-ABL⁺ Zielzellen im Vergleich zu mock transfizierten Zellen. Diese Spezifität ist nach Blockade der HLA-Klasse-I-Moleküle auf den Zielzellen nicht mehr nachweisbar (Abbildung 23C). Dies bestätigt das Ergebnis aus Punkt 2.2.3.6.1, dass die beobachtete Reaktivität gegen BCR-ABL-regulierte Antigene auf eine T-Zellrezeptor (TCR)-

HLA-Wechselwirkung zurückzuführen ist, und nicht auf T-Zellaktivierung über aktivierende NK-Zellrezeptoren.

2.2.3.7 Berechnung des IFN- γ Spot Index

Zum direkten Vergleich der T-Zellreaktivität gegen BCR-ABL WT⁺ bzw. -KD⁺ Zellen bei gesunden Spendern und des CML-Patienten OW wurde ein sog. IFN- γ Spot Index (SI) bestimmt, der folgendermaßen berechnet wurde:

$$SI = (\emptyset \text{ Spotanzahl WT}^+ \text{ bzw. KD}^+ \text{ Zielzellen}) / (\emptyset \text{ Spotanzahl mock Zielzellen})$$

Ein SI um 1 deutet demnach auf unspezifische T-Zellreaktivität hin, da in diesem Fall die IFN- γ Spotanzahl, die durch BCR-ABL WT bzw. -KD exprimierende Zielzellen induziert wurde, der Spotanzahl entspricht, die mock-transfizierte Zielzellen induziert haben.

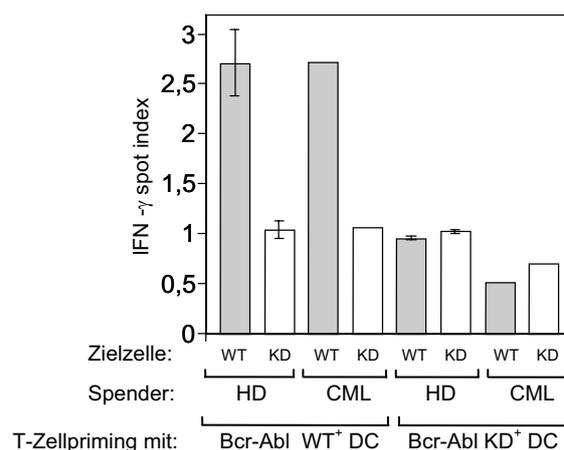


Abb. 24: Vergleich der T-Zellreaktivität gegen BCR-ABL-regulierte Antigene in gesunden Spendern und CML-Patienten. Im Balkendiagramm werden durch die Berechnung von IFN- γ Spot Indices die Ergebnisse aller bislang gezeigten ELISpot Ergebnisse verglichen. Bei gesunden Spendern: \pm Standardabweichung bei n = 3 Experimenten.

Der Vergleich der SI in gesunden Spendern und dem getesteten CML-Patienten, wie es in Abbildung 24 dargestellt wird, bestätigt die bisherigen Ergebnisse. Demnach zeigen T-Zellpopulationen von gesunden Spendern oder CML-Patienten, die mit BCR-ABL WT⁺ DCs stimuliert wurden, mit einem SI von ca. 2,5 eine hohe Reaktivität gegenüber BCR-ABL WT exprimierenden Zielzellen. BCR-ABL KD⁺ DCs hingegen waren nicht in der Lage eine solche Reaktivität zu induzieren, daher ergibt sich hier nur ein SI um 1 in gesunden Spendern und CML-Patienten.

2.2.4 Untersuchung der Immunogenität von Imatinib mesylate behandelten, BCR-ABL exprimierenden DC

Nachdem bisher gezeigt wurde, dass Kinase-aktives BCR-ABL, im Vergleich zu einer Kinase-defizienten Mutante von BCR-ABL die Immunogenität einer Zelle signifikant erhöht, sollten diese Ergebnisse nun mit Hilfe des BCR-ABL spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib mesylate (IM) bestätigt werden, um mögliche artifizielle Ergebnisse durch Einsatz der BCR-ABL KD Mutante auszuschließen. Hierzu sollten DCs vor der T-Zellstimulation mit BCR-ABL WT mRNA elektroporiert und parallel mit 3 μ M IM inkubiert werden. Diese Konzentration ist in BCR-ABL⁺ Zelllinien ausreichend, um BCR-ABL Kinaseaktivität vollständig zu unterdrücken. Da in einer kürzlich veröffentlichten Publikation¹²⁷ dargestellt wurde, dass IM die Maturation von DCs inhibiert bzw. die Fähigkeit von DCs, T-Zellen spezifisch zu aktivieren, wurden zunächst mit IM-behandelte DCs auf ihre Expression von kostimulatorischen Molekülen untersucht. Diese Moleküle haben entscheidenden Anteil bei der Aktivierung von T-Zellen. Anschließend wurde mit IM-behandelten bzw. -unbehandelten DCs und dem Tumorantigen MelanA ein T-Zellpriming durchgeführt um mögliche Unterschiede in der Primingkapazität der DCs zu detektieren.

2.2.4.1 Einfluss von IM auf Maturation von DCs

Zur Untersuchung des Einflusses von IM auf die Maturation von DCs wurde in einer FACS-Analyse die Expression verschiedener kostimulatorischer Moleküle untersucht, nachdem die DCs 48 Stunden lang, bei gleichzeitiger Maturation durch einen Zytokincocktail (5.3.2.7), mit verschiedenen Konzentrationen an IM inkubiert worden waren.

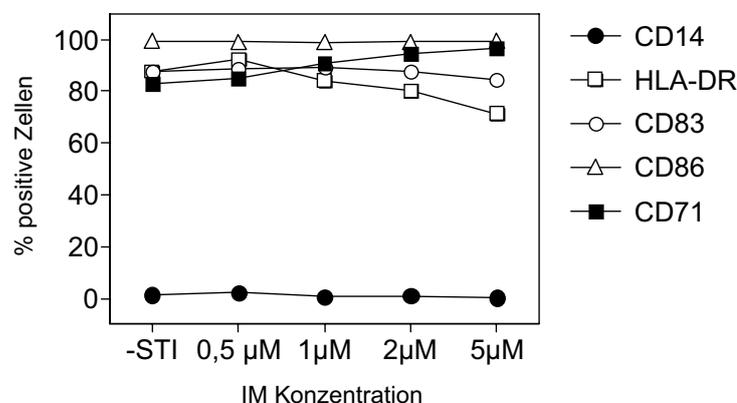


Abb. 25: FACS-Analyse von kostimulatorischen Molekülen von DCs nach 48 Stunden Maturation und Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an IM.

Wie aus Abbildung 25 hervorgeht wird die Expression der untersuchten kostimulatorischen Moleküle nicht signifikant beeinflusst. Einzig HLA-DR zeigt ab $5\mu\text{M}$ IM eine schwach herabgesetzte Expression von unter 80%. Ob dies ausreichend ist, um die Primingkapazität von DCs einzuschränken, wurde im folgenden Punkt untersucht.

2.2.4.2 Einfluss von IM auf T-Zellprimingkapazitäten von DCs

Um zu untersuchen ob sich IM, unabhängig von der Expression kostimulatorischer Moleküle, negativ auf die Primingkapazität von DCs auswirkt, wurde mit Hilfe eines bekannten immunogenen Peptides (p26-35) aus dem Tumorantigen MelanA³⁶ ein T-Zellpriming durchgeführt. Hierzu wurden, wie bereits oben beschrieben, DCs parallel zur Maturation mit $3\mu\text{M}$ IM inkubiert. Zum T-Zellpriming bzw. der nach einer Woche folgenden Restimulation wurden diese DCs mit MelanA_{p26-35} beladen und mit autologen T-Zellen kokultiviert. Jeweils 6 Tage nach dem Priming bzw. der Restimulation wurden die stimulierten T-Zellpopulationen mit einem MelanA_{p26-35}-spezifischen Tetramer gefärbt und im FACS auf ihre Spezifität untersucht.

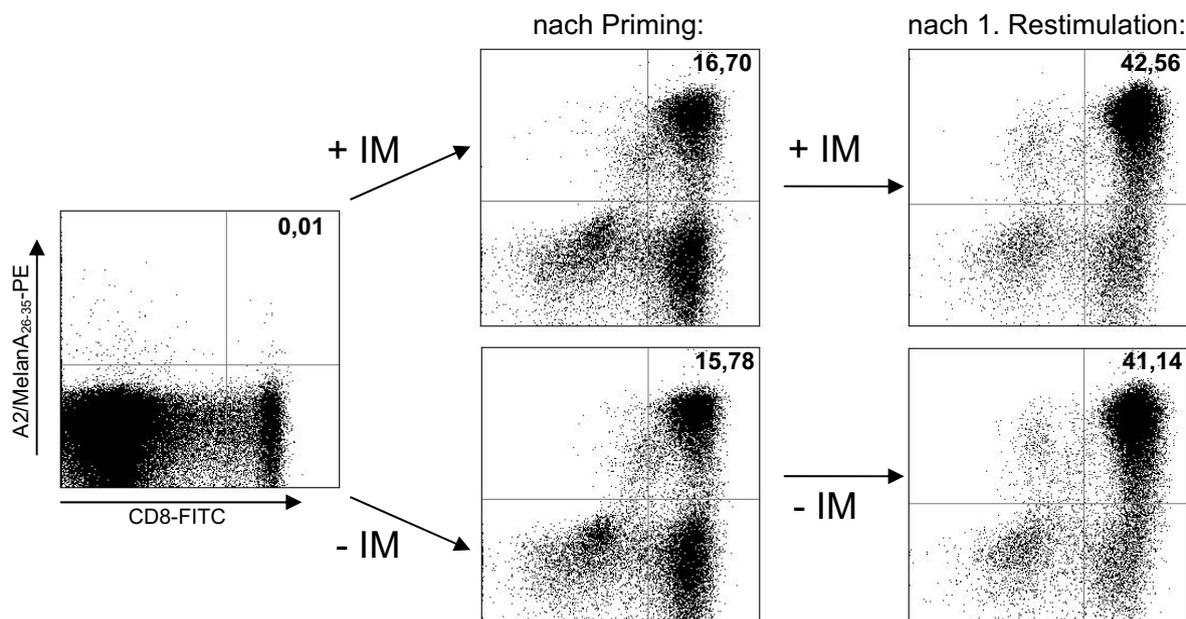


Abb. 26: IM hat keinen Einfluss auf die Priming Kapazitäten von DCs. Tetramer/CD8-FACS-Analyse von T-Zellen eines gesunden Spenders. Nach Priming von CD8⁺ T-Zellen mit MelanA_{p26-35} beladenen DCs kann, ausgehend von einer *ex vivo* Vorläuferfrequenz von 0,01% (linke Abbildung), bereits an Tag 6 nach dem Priming (mittlere Spalte) eine Tetramer⁺ Population von ca. 16% nachgewiesen werden, unabhängig von Inkubation mit IM. An Tag 6 nach der ersten Restimulation konnte diese Population auf ca. 42% expandiert werden (rechte Spalte), mit oder ohne IM.

In Abbildung 26 ist zum einen die hohe Immunogenität des Melanom-spezifischen Antigens MelanA_{p26-35} erkennbar. Bereits nach zwei Stimulationen mit reifen, Peptid-beladenen DCs

konnten die gegen dieses Antigen gerichteten T-Zellen auf ca. 40% der Geamtpopulation angereichert werden. Zum anderen wird hier deutlich, dass IM, entgegen der publizierten Ergebnisse,¹²⁷ keinen Einfluss hat auf die exklusive Fähigkeit von DCs, eine primäre Immunantwort auszulösen. Die Prozentsätze an Tetramer-positiven, also Antigen-spezifischen T-Zellen sind sowohl nach Priming als auch nach der ersten Restimulation nahezu identisch.

2.2.4.3 T-Zellstimulation mit IM-behandelten, BCR-ABL exprimierenden DC

Da gezeigt werden konnte, dass IM keinen Einfluss hat auf die Primingkapazitäten von DCs, wurden nun T-Zellstimulationen durchgeführt mit autologen, IM-behandelten bzw. -unbehandelten und BCR-ABL WT transfizierten DCs. Nach drei aufeinanderfolgenden Stimulationsrunden erfolgte die Spezifitätsanalyse der T-Zellpopulationen im ELISpot.

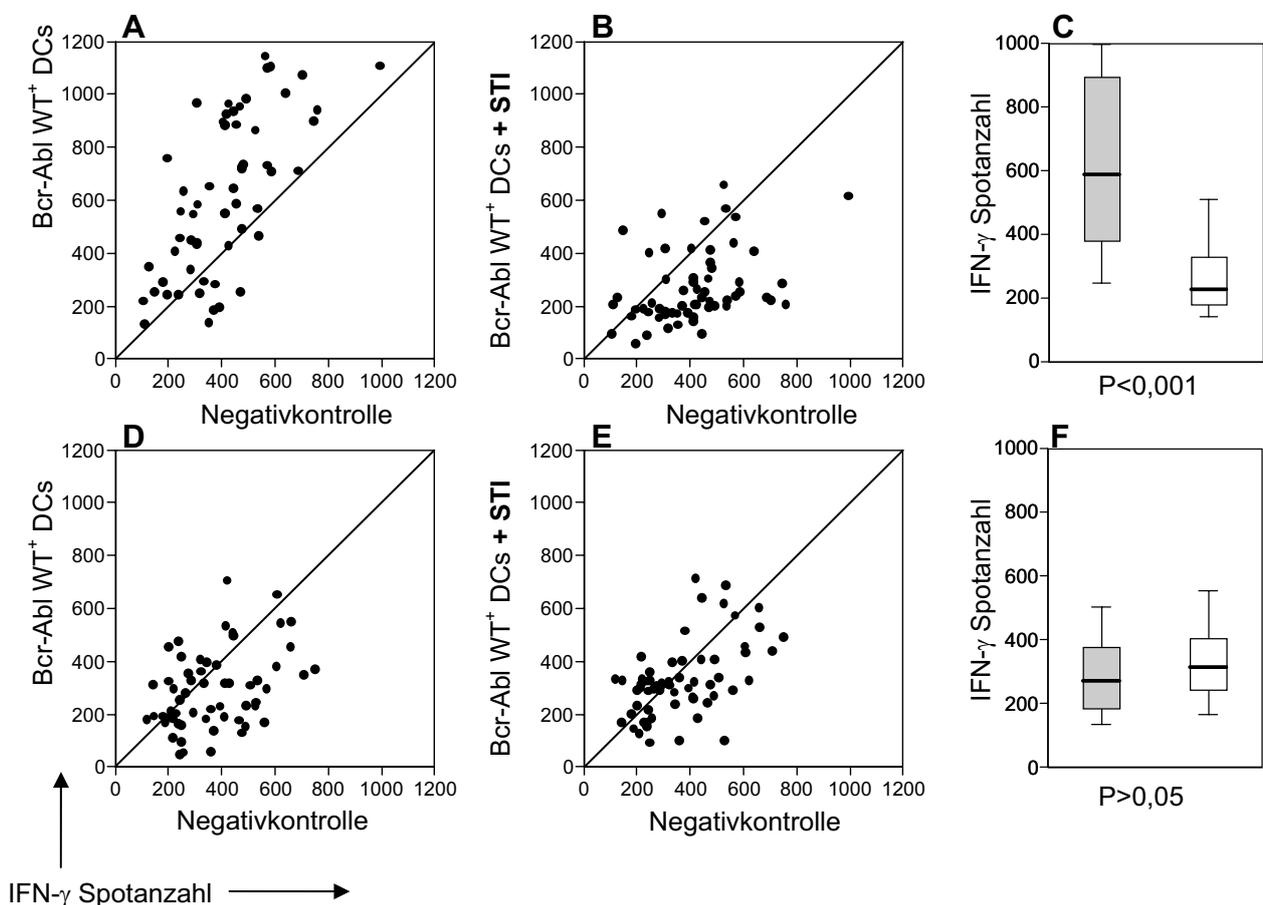


Abb. 27: Herabgesetzte Immunogenität von IM-behandelten, BCR-ABL⁺ DCs. (A-C) IFN- γ ELISpot Assay nach drei Stimulationen mit BCR-ABL WT⁺ RNActive-elektroporierten, autologen DCs. Zielzellen: autologe, BCR-ABL WT elektroporierte DCs, IM-behandelt oder -unbehandelt. Negativkontrolle: mock-transfizierte, BCR-ABL negative DCs. (A) Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL WT⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. (B) Vergleich der Reaktivität gegen IM-behandelte, BCR-ABL WT⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. (C) Box Plot Darstellung des ELISpot Assay aus (A) und (B) zur statistischen Auswertung. Graue Box: BCR-ABL WT⁺ Zielzellen ohne IM. Weiße Box: BCR-ABL WT⁺ Zielzellen nach IM Behandlung. (D-F) IFN- γ ELISpot Assay nach drei Stimulationen mit **IM-behandelten**, BCR-ABL WT⁺ RNActive-elektroporierten, autologen DCs. Zielzellen wie in (A-C).

Als Zielzellen wurden in diesem Assay ebenfalls autologen, IM-behandelten bzw. unbehandelten und BCR-ABL WT transfizierten DCs bzw. mock transfizierte DCs verwendet. Deutlich ist bei Betrachtung der Box Diagramme in Abbildung 27 zu erkennen, dass die Behandlung von BCR-ABL WT⁺ DCs mit IM die Immunogenität dieser Zellen deutlich auf das Niveau der BCR-ABL KD⁺ DCs herabsetzt, welches dem der Negativkontrolle entspricht.

2.2.5 Untersuchung der Immunogenität von BCR-ABL exprimierenden Leukämie-Zelllinien

Bislang konnte gezeigt werden dass T-Zellen, die wiederholt mit BCR-ABL WT exprimierenden DCs stimuliert werden, spezifisch aktiviert werden gegen BCR-ABL-regulierte Antigene, die ihnen von antigenpräsentierenden Zellen wie DCs präsentiert werden. Nun sollte untersucht werden ob diese Spezifität auch bei Einsatz von BCR-ABL exprimierenden CML-Zelllinien bestätigt werden kann. Um dies zu realisieren wurden zunächst, wie bereits beschrieben, T-Zellstimulationen durchgeführt mit autologen, BCR-ABL WT⁺ oder KD⁺ DCs eines HLA-A2⁺, gesunden Spenders. Der anschließende Test der T-Zellspezifität erfolgte nun mit BCR-ABL⁺, HLA-A2⁺ oder HLA-A2⁻ CML-Zelllinien.

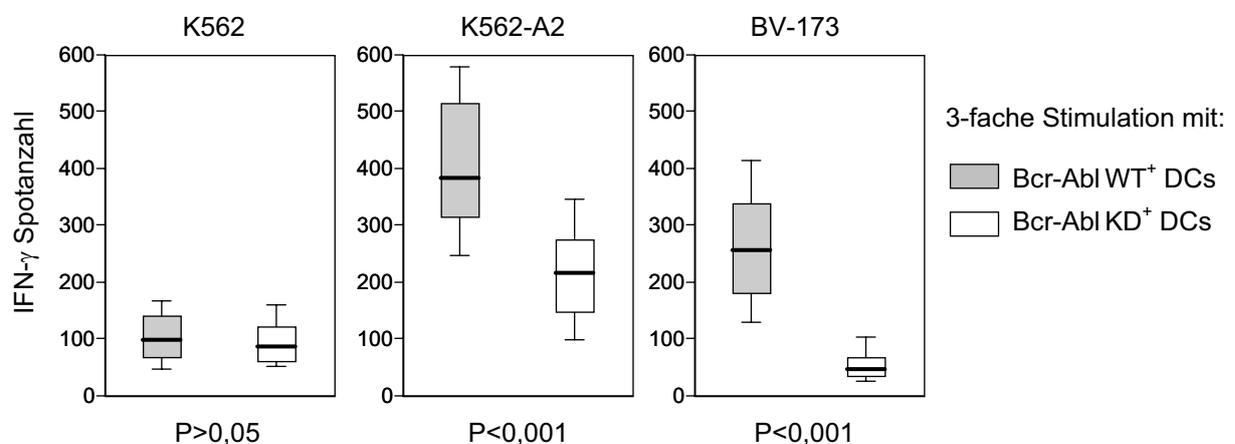


Abb. 28: T-Zellreaktivität gegen BCR-ABL⁺ Tumorzelllinien. ELISpot Assay nach drei Stimulationen mit autologen, HLA-A2⁺, BCR-ABL WT⁺ oder KD⁺ DCs. Zielzellen: Links: K562 Zellen (BCR-ABL⁺, HLA-A2⁻); Mitte: K562-A2 Zellen (BCR-ABL⁺, HLA-A2⁺); Rechts: BV-173 Zellen (BCR-ABL⁺, HLA-A2⁺).

Bei diesem Test zeigte sich, dass die Inkubation der mit BCR-ABL WT⁺ DCs stimulierten T-Zellen mit den BCR-ABL⁺ und HLA-A2⁺ Zelllinien K562-A2 und BV-173 in einer signifikant höheren IFN-γ Produktion dieser T-Zellen resultiert, im Vergleich zu BCR-ABL KD⁺ DCs stimulierten T-Zellen. Im Gegensatz dazu konnte bei K562 Zellen, die kein HLA-A2 präsentieren, keine spezifische IFN-γ Produktion nachgewiesen werden.

Wiederum bestätigte sich damit, dass die Stimulation von T-Zellen mit BCR-ABL WT⁺ DCs, die BCR-ABL-regulierte Antigene präsentieren, in einer signifikant höheren Reaktivität gegen BCR-ABL⁺ Zellen resultiert, als nach Stimulation mit BCR-ABL KD⁺ DCs, die keine BCR-ABL-regulierten Antigene, sondern nur Antigene des BCR-ABL Proteins selbst präsentieren.

2.2.6 Untersuchung der Granzym B Freisetzung von T-Zellen, die mit Bcr-Abl WT⁺ bzw. -KD⁺ DCs stimuliert wurden

In den bisher dargestellten ELISpot Assays wurde als Maß für T-Zellreaktivität die Produktion des Zytokins IFN- γ analysiert. Um zu überprüfen, ob neben Zytokinproduktion auch eine entsprechende Zytotoxizität der stimulierten T-Zellpopulationen nachweisbar ist, wurde die zytotoxische Aktivität indirekt durch Analyse der Granzym B (GrzB) Freisetzung untersucht. Granzym B zählt zur Familie der Serinproteasen und hat neben dem Poren-bildenden Protein Perforin entscheidenden Anteil an zytotoxischen Effektorfunktionen von T-Zellen.¹²⁸ Zum Nachweis von GrzB wurde der unter Punkt 2.2.3.4 dargestellte ELISpot Assay mit einem weiteren gesunden Spender und Antikörpern gegen GrzB wiederholt.

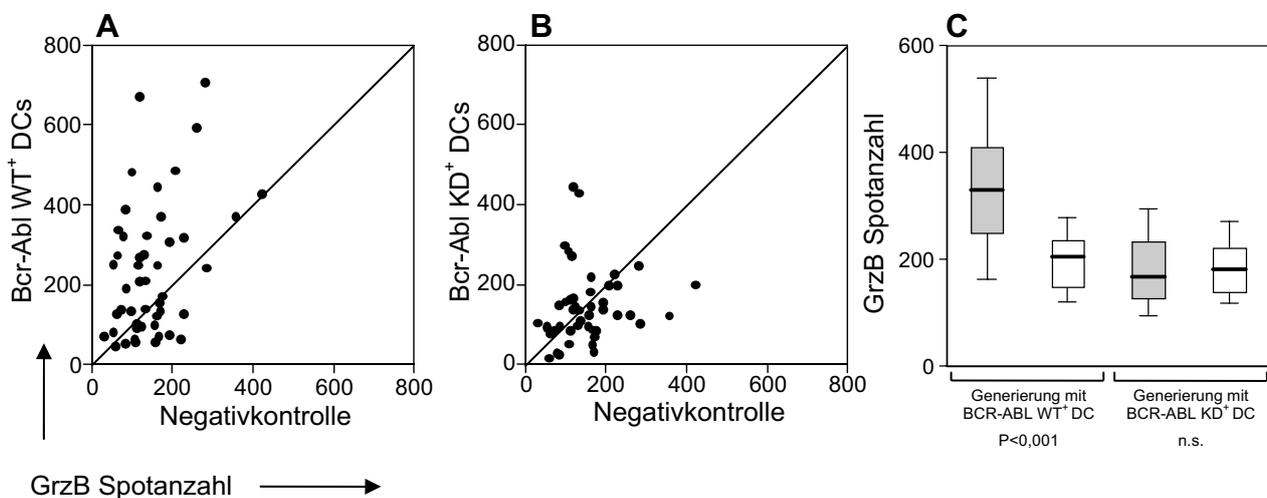


Abb. 29: Analyse der T-Zell-Zytotoxizität gegen BCR-ABL-regulierte Antigene. (A,B) Auswertung des GrzB-ELISpot Assay in einem Dot Plot nach drei Stimulationen mit BCR-ABL WT mRNA-elektroporierten, autologen DCs. Zielzellen: autologe, BCR-ABL WT bzw. -KD elektroporierte DCs. Negativkontrolle: mock-transfizierte, BCR-ABL negative DCs. (A) Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL WT⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. (B) Vergleich der Reaktivität gegen BCR-ABL KD⁺ DCs und gegen die Negativkontrolle. (C) Links: Box Plot Darstellung des ELISpot Assay aus (A) und (B) zur statistischen Auswertung. Rechts: Box Plot Darstellung des ELISpot Assay nach Stimulation mit BCR-ABL KD⁺ DCs. Graue Boxen: BCR-ABL WT⁺ Zielzellen. Weiße Boxen: BCR-ABL KD⁺ Zielzellen.

Deutlich ist in Abbildung 29 erkennbar, dass die Stimulation von T-Zellen mit BCR-ABL WT⁺ DCs in einer GrzB Produktion resultiert, die vergleichbar ist mit der zuvor untersuchten IFN- γ

Produktion und signifikant höher ist als die der T-Zellen, die mit BCR-ABL KD⁺ DCs stimuliert worden sind. T-Zellpopulationen, die mit BCR-ABL KD⁺ DCs (Abb. 29C, rechts) stimuliert wurden, zeigten im anschließenden ELISpot-Reaktivitätstest keine spezifische Granzym B Freisetzung nach Inkubation mit BCR-ABL WT⁺ DC, was wiederum die vorangegangenen Ergebnisse der IFN- γ ELISpots bestätigt.

2.3 Generierung von CTL-Klonen gegen das Tumorantigen Proteinase 3

Wie in der Einleitung bereits erwähnt kann die Serinprotease Proteinase 3, die normalerweise in azurophilen Granula von myeloiden Zellen exprimiert wird,¹⁰⁷ auch in leukämischen myeloiden Zellen nachgewiesen werden bzw. trägt zum malignen Phänotyp leukämischer Zellen bei.¹²⁹ Abbildung 15 zeigt, dass die Expression dieses Proteins direkt durch BCR-ABL Kinaseaktivität induziert werden kann. Verschiedene Publikationen haben die Relevanz eines HLA-A02-bindenden Proteinase 3 Epitopes an Position 169-177 (PR1, p169-177) zur Induktion einer Leukämie-spezifischen Immunantwort belegt.^{111,130}

Abschließend sollten daher T-Zellklone generiert werden, die spezifisch dieses endogen prozessierte Antigen aus Proteinase 3 erkennen. Hierfür wurden DCs eines HLA-A2⁺ gesunden Spenders mit PR1 beladen und CD8⁺ T-Zellen eines HLA-A2⁻ Spenders stimuliert. Diese allogene Stimulation der T-Zellen wurde gewählt, da es sich bei Proteinase 3 potentiell um ein Autoantigen handelt, und daher eine Depletion PR1-reaktiver T-Zellen im Thymus nicht ausgeschlossen werden kann. Bei T-Zellen eines HLA-A2⁻ Spenders kann es nicht zu einer solchen Depletion kommen. Nach zwei Stimulationen mit PR1-beladenen DCs konnte im FACS eine PR1-spezifische T-Zellpopulation nachgewiesen werden die durch FACS-Sortierung auf 75% angereichert werden konnte (Abbildung 30A). Diese Population wurde mit Hilfe der Methode der „*limiting dilution*“ kloniert (5.3.2.12). Nach der Klonierung folgte ein ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit den gewachsenen Klonen. Wie aus Abbildung 30B hervorgeht, konnte bei allen 6 gewachsenen Klonen, mit Ausnahme von Klon 2, lytische Aktivität gegenüber PR1 beladenen T2-Zellen nachgewiesen werden. Um zu überprüfen ob diese Klone auch das endogen prozessierte PR1-Epitop erkennen, wurden nun sämtliche Klone mit der Proteinase 3 exprimierenden, HLA-A2⁺ Zelllinie K562-A2 getestet. Abbildung 30C zeigt mit einer Lyse von knapp 40% eindeutig eine spezifische Erkennung dieser Zelllinie durch den PR1 Klon 6. Insbesondere beim Vergleich mit Abbildung 8 fällt hier auf, dass im Fall des Proteinase 3 Epitops PR1, im Gegensatz zu dem HLA-A3 bindenden BCR-ABL Epitop p924-932, eindeutig eine endogene Prozessierung des Epitops vorliegt bzw. eine Tumor-lytische

Aktivität des Klon, nicht nur eine Peptid-spezifische. Gleichzeitig bestätigt dies das große Potential dieses Antigens zur erfolgreichen Immuntherapie von CML. Alle anderen getesteten Klone zeigten eine höhere höhere Peptid-unabhängige Lyse, die auf eine unspezifische allogene Reaktivität gegen HLA-A2 zurückzuführen ist. Eine Tetramerfärbung von Klon 6 mit relevantem PR1 Tetramer und einem irrelevanten HLA-A2 Tetramer bestätigte seine Epitop-spezifische Reaktivität (Abbildung 30D). Die weiteren Spezifitätstests wurden daher auf diesen Klon beschränkt.

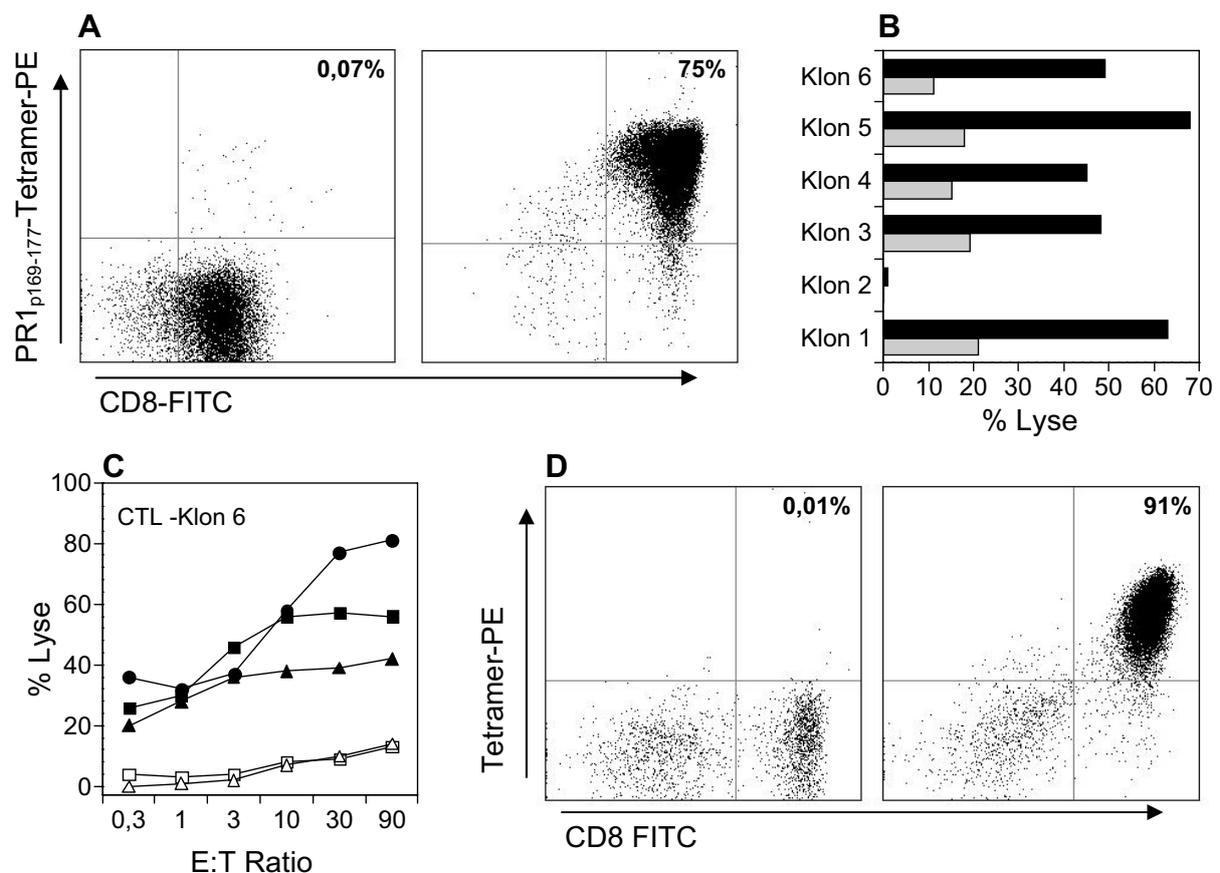


Abb. 30: Generierung einer Proteinase 3-spezifischen CD8⁺ T-Zellpopulation bzw. Klonen. (A) Links: Tetramer-FACS-Analyse einer zweifach mit PR1 beladenen DCs stimulierten T-Zellpopulation. Die doppelt positive Population von 0,07% wurde in einer FACS-Sortierung angereichert. Rechts: T-Zellpopulation nach Anreicherung im FACS. (B) ⁵¹Cr Freisetzungstest der aus der angereicherten T-Zellpopulation generierten T-Zellklone. Zielzellen: T2-Zellen beladen mit irrelevantem HIV_{p476-484}-Peptid (graue Balken) und PR1-Peptid (schwarze Balken). (C) ⁵¹Cr Freisetzungstest mit Klon 6. Zielzellen: T2-Zellen beladen mit HIV_{p476-484}-Peptid (□) oder PR1-Peptid (●), K562-Zellen (△), K562-A2-Zellen (▲) und K562-A2-Zellen beladen mit PR1-Peptid (■). (D) Tetramer-Analyse von Klon 6. Links: Färbung mit irrelevantem HIV_{p476-484}-Tetramer. Rechts: Färbung mit relevantem PR1-Tetramer.

Um die tumorlytische Aktivität von Klon 6 zu bestätigen und eine Kreuzreaktivität gegen ein anderes K562-A2-präsentiertes Epitop auszuschließen, wurde nun ein sogenannter „hot-cold-target“-Assay durchgeführt (5.3.3.1). Bei diesem modifizierten ⁵¹Cr-Freisetzungstest wurde der CTL Klon zunächst mit unmarkierten, PR1-Peptid beladenen T2-Zellen kokultiviert und

anschließend mit ^{51}Cr markierten K562-A2-Zellen inkubiert. Sofern ausschließlich eine CTL-Reaktivität gegen das PR1-Epitop besteht, wird die Aktivität der CTLs nach der Inkubation mit den unmarkierten, PR1-beladenen T2-Zellen erschöpft sein und bei anschließender Inkubation mit der Tumorzelllinie K562-A2 keine ^{51}Cr -Freisetzung messbar sein. Die Vorinkubation mit HIV_{p476-484} beladenen T2-Zellen sollte, bei ausschließlicher Reaktivität des Klon gegen PR1, die Lysierung der anschließend zugegebenen K562-A2-Zellen nicht beeinflussen.

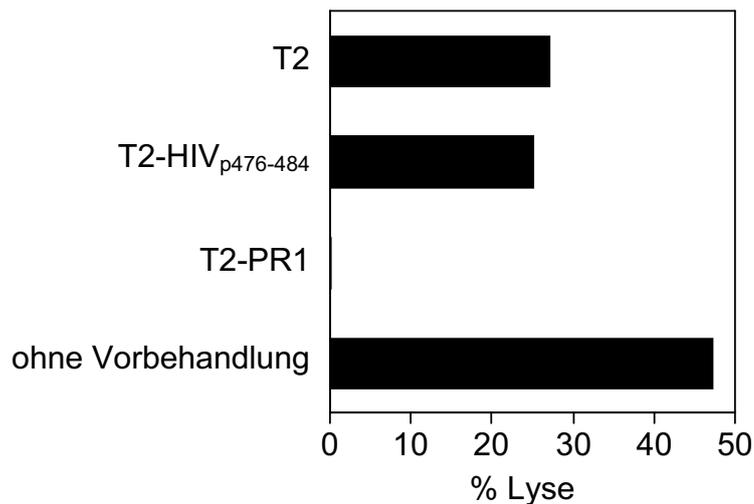


Abb. 31: „hot-cold-target“-Assay mit PR1-Klon 6. % Lyse bezeichnet die Lyse der ^{51}Cr markierten K562-A2 Zellen. Das Verhältnis K562-A2-Zellen zu CTLs betrug 40:1. Als Positivkontrolle dienten CTLs, die nicht mit T2-Zellen vorinkubiert wurden (untere Reihe). Als Negativkontrolle dienten unbeladene T2-Zellen (obere Reihe).

Abbildung 31 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Eindeutig ist erkennbar, dass die Vorinkubation mit PR1-beladenen T2-Zellen die lytische Aktivität von Klon 6 gegenüber K562-A2-Zellen vollständig unterdrückt. Die Beladung der T2-Zellen mit einem irrelevanten Peptid hat dagegen keinen Einfluss auf die Reaktivität der Klone, sie entspricht der Reaktivität gegenüber unbeladenen T2-Zellen.

Nachdem mit diesem Experiment die Spezifität des PR1 T-Zellklons 6 zweifelsfrei bestimmt werden konnte, wurde die RNA der T-Zellen isoliert. Langfristig soll hieraus für einen retroviralen T-Zell-Rezeptortransfer (TCR-Transfer) die Sequenz von α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors von Klon 6 bestimmt werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Spezifität dieses Klon direkt auf T-Zellen z.B. eines CML-Patienten zu übertragen und so den langwierigen und arbeitsaufwändigen Weg, autologe PR1-spezifische T-Zellklone aus dem T-Zellpool eines Patienten zu isolieren, zu umgehen.

3. Diskussion

3.1 Generierung BCR-ABL-reaktiver CTLs

Charakteristisches Merkmal der CML ist die Expression des onkogenen Fusionsproteins BCR-ABL, nachweisbar in 95% aller CML-Patienten. Eine Behandlungsstrategie, die derzeit in klinischen Studien experimentell zum Einsatz kommt, ist die Vakzinierung mit Peptiden aus dem Fusionsbereich von BCR-ABL. Aminosäuresequenzen aus diesem Bereich können immunogene Epitope darstellen, potentiell von spezifischen T-Zellen als fremd erkannt werden und eine Immunreaktion auslösen. Zwei essentielle Grundvoraussetzungen dafür sind eine korrekte intrazelluläre Prozessierung dieser Fusionspeptide und ihre Präsentation in Kontext mit MHC-Molekülen, was eine hochaffine Bindung an diese Komplexe voraussetzt. Klinische Studien wurden initiiert, obwohl diese zwei Parameter in Vorversuchen fast ausschließlich durch *in vitro* Bindungsstudien und *in vitro* durchgeführten proteosomalen Prozessierungen dieser Peptide verifiziert wurden. Zudem hatten diese Vorversuche in unterschiedlichen Arbeitsgruppen sehr heterogene und kontroverse Ergebnisse. Mit Hilfe von *in vitro* Bindungsstudien und prädiktiver Computerprogramme konnten Bocchia et al.⁹⁹ drei Antigene aus der Fusionsregion von BCR-ABL identifizieren, die hochaffin an verschiedene HLA-Klasse I-Moleküle binden. Es wurden T-Zellpopulationen spezifisch gegen diese Peptide generiert, allerdings, wie bereits in der Einleitung erwähnt, nur mit Hilfe von exogen mit synthetisch hergestelltem Peptid beladenen APCs, was den Schritt der intrazellulären Antigenprozessierung umgeht. Eine klinische Studie mit einem Peptidmix aus diesen drei Peptiden und zusätzlich längeren, MHC-Klasse II-bindenden Peptiden, für eine Stimulierung von CD4⁺ T-Zellen, war in der Lage vereinzelt Remissionen zu induzieren.¹⁰⁵ Allerdings ist nicht zweifelsfrei zu klären, ob dies auf die *in vivo* Expansion spezifischer, CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen, oder aber auf BCR-ABL spezifische CD4⁺ T-Helferzellen zurückzuführen ist.

Lediglich das HLA-A3-bindende Peptid KQSSKALQR (p924-932) konnte bislang auf der Oberfläche von CML-Zellen nachgewiesen werden, was als indirekter Beleg für korrekte intrazelluläre Prozessierung gewertet werden kann.⁹⁸ Andere Arbeitsgruppen konnten dieses Ergebnis jedoch bislang nicht reproduzieren,¹⁰² was vermutlich auf zu geringe Sensitivität der massenspektrometrischen Messungen in diesen Studien zurückzuführen ist. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher die Möglichkeit untersucht, T-Zellpopulationen gegen dieses HLA-A3-bindende Peptid p924-932 zu generieren, die nicht nur exogen mit diesem Peptid beladene APCs erkennen, sondern auch BCR-ABL⁺ CML-Zellen.

Durch den Einsatz von p924-932-spezifischen Multimeren, die spezifisch gegen p924-932 gerichtete T-Zellrezeptoren erkennen, konnte nach mehreren Versuchen mit unterschiedlichen,

HLA-A3⁺ gesunden Spendern eine Peptid-spezifische T-Zellpopulation isoliert und expandiert werden. Nach FACS-Sortierung der Population wurde ihre Spezifität in einem Chrom-Freisetzungstest mit verschiedenen HLA-A3-positiven und -negativen, BCR-ABL-positiven und -negativen Zelllinien getestet. Dabei hat sich eine eindeutige Spezifität der Population gegen das exogen beladene BCR-ABL Fusionspeptid p924-932 gezeigt. Die HLA-A3⁺ Zelllinien SK-OV3 und K562-A3 wurden nach Beladung mit p924-932 erkannt und lysiert. Bei K562-A3 Zellen handelt es sich um eine BCR-ABL⁺ CML-Zelllinie. Ohne exogene Peptidbeladung wurde diese Zelllinie allerdings nicht erkannt. Als Negativkontrolle dienten BCR-ABL⁻, HLA-A3⁺ SK-OV3 Zellen und BCR-ABL⁺, HLA-A3⁻ K562 Zellen.

Solch ein Peptid-spezifisches, aber nicht Tumor-lytisches Reaktivitätsmuster konnte auch im Zusammenhang mit anderen Tumorantigenen, wie z.B. MelanA, beobachtet werden¹³¹, obwohl im Fall von MelanA die Prozessierung und Präsentation dieses Antigens schon vor Jahren aufgeklärt wurde.³⁶ Für eine derartige T-Zellreaktivität gibt es verschiedene Erklärungen.

Die erste und favorisierte Möglichkeit ist eine prinzipiell geringe Immunogenität des Fusionspeptides p924-932. Das heißt, dass das Peptid p924-932 zwar korrekt prozessiert und auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC-Molekülen präsentiert wird, dass allerdings die gegen dieses Epitop gerichteten T-Zellen, beispielsweise durch Selektionsmechanismen gegen ein Epitop ähnlicher Struktur im Thymus, in ihrer Anzahl stark verringert oder vollständig deletiert werden. Die Präsentation des BCR-ABL Fusionspeptides auf DCs hätte in diesem Fall keine T-Zellaktivierung gegen das endogen prozessierte Epitop zur Folge.

Zum anderen kann es mit einer methodischen Problematik in Verbindung gebracht werden: Es ist nicht auszuschließen, dass die synthetisch erzeugten Peptide, mit denen die DCs zur T-Zellstimulation beladen wurden, eine minimal andere Konformation haben als die endogen prozessierten Peptide, beispielsweise durch ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster.⁴⁹ Dadurch ist es denkbar, dass diese Peptide, aufgrund ihrer daraus folgenden unterschiedlichen Tertiärstruktur, von anderen TCRs erkannt werden als endogen prozessierte Peptide. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist eine andere Art der Antigenbeladung der DCs, beispielsweise durch einen Transfer des kompletten BCR-ABL Gens durch Transfektion, um eine endogene Peptidprozessierung zu gewährleisten. Diese Möglichkeit wurde unter anderen im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht.

Eine dritte Erklärung kann allerdings auch eine prinzipiell zu geringe endogene Prozessierung des Peptides sein, die in einer zu kleinen Menge an präsentiertem p924-932 auf HLA-A3 auf der Zelloberfläche der getesteten Zelllinien resultiert. Die Zelllinien können folglich von p924-932-spezifischen T-Zellen nicht erkannt werden. Die Schwierigkeiten, die viele Arbeitsgruppen

bei der massenspektrometrischen Detektion von p924-932 auf der Oberfläche von CML Zellen haben, stützen diese Hypothese.

All diese Gründe sprechen gegen den alleinigen Einsatz des Peptides p924-932 in zukünftigen klinischen Vakzinierungsstudien. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse, aber auch aufgrund der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, kann nicht sichergestellt werden, dass die mit p924-932 beladenen APCs *in vivo* auch tatsächlich solche T-Zellen stimulieren, deren TCR in der Lage ist, anschließend spezifisch BCR-ABL⁺ Leukämiezellen zu erkennen und zu zerstören.

3.2 Analyse des T-Zellrepertoires gegen BCR-ABL und BCR-ABL-regulierte Antigene

In den letzten Jahren ist es verschiedenen Arbeitsgruppen gelungen *in vitro* spezifisch T-Zellen gegen unterschiedlichste Leukämie-spezifische Antigene generieren. Neben den Proteinen WT1 und Proteinase 3 nimmt hier BCR-ABL als Zielstruktur eine zentrale Rolle ein. Auf Basis dieser Untersuchungen wurden mit verschiedenen Antigenen klinische Studien initiiert, bei denen diverse immuntherapeutische Vakzinierungsstrategien zum Einsatz kamen, wie z.B. die direkte Verabreichung des entsprechenden Peptides oder von Peptid-beladenen, dendritischen Zellen. Die in den *in vitro* Experimenten gewonnenen, zum Teil vielversprechenden Ergebnisse ließen sich allerdings, wie oben bereits erwähnt, nicht uneingeschränkt auf diese Studien übertragen, die teilweise sehr heterogenen Ergebnisse hatten. So konnten *in vivo* gegen einzelne Antigene teilweise nur geringe T-Zellfrequenzen nachgewiesen werden und vielfach nur unzureichende therapeutische Effekte gemessen werden, was entgegen der vorherigen Annahmen auf eine eher geringe Immunogenität der einzelnen Antigene schließen lässt. Im Fall von BCR-ABL deuten die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit ebenfalls darauf hin.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte daher die Möglichkeit untersucht werden, dieser Problematik zu entgehen indem man Vakzinierungen nicht auf einzelne Antigene konzentriert, sondern ein breites Spektrum immunogener Zielstrukturen einsetzt. Im speziellen sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Tyrosinkinaseaktivität von BCR-ABL auf die Immunogenität einer Zelle hat, mit direktem Vergleich zum eigentlichen BCR-ABL Protein als Quelle möglicher Epitope.

Experimentell realisiert wurde dies mit der Durchführung optimierter *in vitro* T-Zellstimulationen mit dendritischen Zellen als professionelle APCs, die das gesamte Kinase-aktive BCR-ABL Gen exprimieren. Anschließend wurde die Spezifität dieser T-Zellpopulationen durch Einsatz von Zielzellen untersucht, die entweder das Wildtyp (WT)

BCR-ABL Konstrukt exprimieren, oder aber ein Kinase-defizientes (KD) BCR-ABL Konstrukt. Aus dem auf diese Weise gewonnenen Spezifitätsmuster kann direkt geschlossen werden, welche Art von Antigen wesentlich zur Immunogenität einer Zelle beiträgt: BCR-ABL Kinase-regulierte Antigene, bei Reaktivität gegen BCR-ABL WT exprimierende Zielzellen, oder Antigene aus dem BCR-ABL Protein bei Reaktivität sowohl gegen BCR-ABL WT als auch BCR-ABL KD exprimierende Zielzellen.

Nach Ausschalten der Kinase-Domäne im BCR-ABL Gen durch Positionsspezifische Mutagenese war es zu Beginn der Arbeit zunächst notwendig, eine Methode zur Übertragung des BCR-ABL WT oder -KD Gens in DCs gesunder Spender zu etablieren. Nach Ausschluss eines Gentransfers durch DNA-Transfektion aufgrund zu niedriger Effizienz und zu geringer Überlebensraten¹¹⁹, wurde die Möglichkeit eines retroviralen Gentransfers in Betracht gezogen, bei dem eine stabile Integration des Gens ins DC-Genom erfolgt. Da dendritische Zellen monozytären Ursprungs nicht proliferieren, was eine notwendige Voraussetzung für eine solche Integration ist, kamen diese Zellen hierfür nicht in Frage. Alternativ wurden daher DCs aus CD34⁺ Knochenmarksvorläuferzellen mit einem Zytokin-Cocktail differenziert und ausgereift. Während der Differenzierungsphase proliferieren diese Zellen und in dieser Phase erfolgte die retrovirale Transduktion. Mit dieser Methode ist es in der Arbeitsgruppe bereits gelungen, das Onkoprotein HER2 zur T-Zellstimulation in DCs aus CD34⁺ Vorläuferzellen zu übertragen.¹³² Diese Methode zeigte allerdings ebenfalls verschiedene gravierende Nachteile: Zum einen war die aus den CD34⁺ Vorläuferzellen differenzierte und ausgereifte DC-Population sehr heterogen, DC-typische Markerproteine wurden zumeist nur zu ca. 5% exprimiert, zum anderen stellte die Verfügbarkeit der CD34⁺ Vorläuferzellen ein Problem dar. Gewonnen wurden diese Zellen durch Leukapherese aus gesunden Spendern, deren Knochenmark zuvor durch Gabe von G-CSF mobilisiert worden war. Da diese Behandlung bei den meisten Probanden Knochenschmerzen verursacht, stellte sich die Suche nach freiwilligen Spendern als problematisch heraus.

Als dritte Alternative wurde daher die Möglichkeit untersucht, BCR-ABL in Form von mRNA in monozytäre DCs einzubringen. Diese Methode bietet im Vergleich zur DNA-Transfektion den Vorteil, dass das eingebrachte Gen nicht bis in den Zellkern eindringen muss um transkribiert bzw. translatiert zu werden. Dies führt zu höherer Transfektionseffizienz bei gleichzeitig weniger restriktiven Transferbedingungen (z.B. bei Elektroporation der Zellen), und ermöglicht damit höhere Überlebensraten. Der Vorteil zur retroviralen Transduktion ist die Möglichkeit, DCs monozytären Ursprungs einzusetzen, die zum einen aus peripherem Blut isoliert werden können, und damit eine wesentlich günstigere Verfügbarkeit besitzen, zum

anderen ist die aus Monozyten differenzierte und ausgereifte DC-Population wesentlich homogener als DCs aus CD34⁺ Vorläuferzellen, mit 80% bis 95% Expression der jeweiligen DC-typischen Markerproteine.

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

Nach Transfer von BCR-ABL mRNA wurde zunächst untersucht, ob ein regulatorischer Effekt der eingebrachten BCR-ABL Tyrosinkinase in der Zelle nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde die Expression verschiedener BCR-ABL-regulierter Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Gentransfer von BCR-ABL WT oder KD mittels RT-PCR untersucht. Auf diese Weise konnte die bereits bekannte Regulation des Tumorantigens PRAME (preferentially expressed antigen of melanoma) durch BCR-ABL bestätigt werden¹²¹, woraus gleichzeitig geschlossen werden kann, dass sich in der Zelle genügend BCR-ABL Protein anreichern kann, um in ausreichendem Maße verschiedene Adapterproteine bzw. Signalwege zu aktivieren. Die Serinprotease Proteinase 3, auch bekannt als Myeloblastin, wird normalerweise in azurophilen Granula von myeloiden Zellen exprimiert aber auch in leukämischen myeloiden Zellen.^{107,111} In dem hier dargestellten Test konnte erstmals die direkte Hochregulation von Proteinase 3 durch BCR-ABL gezeigt werden, die schneller als PRAME verläuft. Die Expression des erst kürzlich entdeckten, sog. „*cancer testis*“ Proteins HAGE¹²² wird ebenfalls durch BCR-ABL Kinaseaktivität induziert. Cancer testis Proteine zeichnen sich, wie in der Einleitung bereits erwähnt, durch eine auf Hoden bzw. verschiedene Tumore beschränkte Expression aus und bieten sich daher als immuntherapeutische Ziele an. HAGE wird ebenfalls in manchen Fällen von chronisch myeloider Leukämie überexprimiert.¹²² Andere CML-assoziierte Proteine wie z.B. WT-1, Survivin, MPP11, RHAMM oder NY-Eso1 zeigten dagegen keine Expressionsinduktion.

Besonders die hier gezeigte Regulation von Proteinase 3 unterstreicht die Relevanz dieses Tumorantigens bei der Entwicklung CML-gerichteter Immuntherapien, wie sie bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen initiiert wurden.¹³⁰ Aus diesem Grund wurde im letzten Teil dieser Arbeit ein Proteinase-spezifischer CD8⁺ T-Zellklon generiert (3.3).

Insgesamt bestätigte sich in diesem Test die Effizienz der BCR-ABL mRNA Elektroporation, um potentiell immunogene, BCR-ABL assoziierte Antigene hochzuregulieren.

Im nächsten Schritt erfolgte die Stimulation von T-Zellen gesunder Spender mit autologen DCs, die wie oben beschrieben mit BCR-ABL mRNA elektroporiert worden waren. In den anschließend erfolgten Spezifitätstests mit BCR-ABL WT⁺ bzw. KD⁺ DCs als Zielzellen war es nun, wie oben bereits beschrieben, möglich das immunogene Potential aller BCR-ABL-regulierter Antigene mit dem des BCR-ABL Proteins zu vergleichen. Diese Tests zeigten eine starke Reaktivität der stimulierten T-Zellpopulationen gegenüber BCR-ABL WT⁺ Zielzellen und nicht gegenüber BCR-ABL KD⁺ Zellen. Wiederholungen mit weiteren gesunden Spendern bestätigten diese Ergebnisse. In einem vorhergehenden Versuch bei dem der abschließende Spezifitätstest mit autologen lymphoblastoiden B-Zelllinien (LCLs) erfolgte, die stabil BCR-ABL WT bzw. KD exprimierten, konnte bereits die gleiche Tendenz der Reaktivität nachgewiesen werden, allerdings zeigten diese Ergebnisse nur marginale Signifikanz (P<0,05). Aus diesem Grund wurden in zukünftigen Versuchen BCR-ABL elektroporierte DCs als Zielzellen vorgezogen.

Aus diesen Ergebnissen kann zum einen die Schlussfolgerung gezogen werden, dass es sich beim BCR-ABL Protein, trotz seiner Eigenschaft als Fusionsprotein, nicht um ein immunodominantes Antigen handelt. Dies bestätigt die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit, die bereits auf eine schwache Immunogenität des Fusionspeptids p924-932 hingedeutet haben. Zum anderen konnte mit diesen Tests gezeigt werden, dass die Kinasedomäne von BCR-ABL ein entscheidendes Element darstellt für eine Verstärkung der Immunogenität von BCR-ABL⁺ Zellen.

Um die Möglichkeit von falsch-positiven Testergebnissen auszuschließen, aber auch um die Ergebnisse mit einem anderen experimentellen Ansatz zu bestätigen, wurden nun zur T-Zellstimulation bzw. Spezifitätskontrolle DCs verwendet, die, um die BCR-ABL KD Mutation zu imitieren, nach Transfektion mit BCR-ABL WT mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib mesylate (IM, Gleevec[®]) behandelt wurden. Die Behandlung der Zielzellen mit dem Inhibitor hat eine deutliche Verringerung der T-Zellreaktivität zur Folge, was dem vorher mit der BCR-ABL KD Mutante erreichten Ergebnis entspricht. Die Möglichkeit, dass die Behandlung der DCs mit IM diese Zellen in ihrer Ausreifung und ihren stimulatorischen Kapazitäten inhibiert, wie kürzlich von einer anderen Arbeitsgruppe berichtet wurde,¹²⁷ konnte durch Vorversuche mit dem Surrogat-Antigen MelanA und FACS-Analysen von IM-behandelten DCs ausgeschlossen werden.

BCR-ABL Kinaseaktivität hat direkten Einfluss auf die Expression die Proteine MICA und MICB (major histocompatibility complex class I chain-related molecules A and B), die Liganden für den aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D.^{123,133} Da CD8⁺ T-Zellen NKG2D

exprimieren¹²⁵ war es notwendig auszuschließen, dass die im ELISpot nachgewiesene T-Zellreaktivität auf eine unspezifische Aktivierung über BCR-ABL induzierte MICA- oder MICB-Bindung an NKG2D auf den T-Zellen zurückzuführen ist. Hierfür wurden parallel zu den oben beschriebenen T-Zellstimulationen mit BCR-ABL WT⁺ DCs, T-Zellen mit BCR-ABL KD⁺ DCs stimuliert und anschließend mit den gleichen Zielzellen wie oben beschrieben auf ihre Spezifität getestet. Bei unspezifischer T-Zellaktivierung über NK-Zellrezeptoren hätten diese Stimulationen bei einer anschließenden Spezifitätskontrolle mit BCR-ABL WT⁺ und KD⁺ Zielzellen das gleiche Spezifitätsmuster zur Folge, dass bereits in den oben beschriebenen Versuchen gemessen wurde. Dies war jedoch nicht der Fall. Weder BCR-ABL WT⁺ noch KD⁺ Zielzellen induzieren spezifische Zytokinproduktion in den mit BCR-ABL KD⁺ DCs stimulierten T-Zellen. Dies weist auf eine MHC-vermittelte T-Zellaktivierung hin. Den endgültigen Beweis hierfür lieferte anschließend der Einsatz eines HLA-Klasse-I blockierenden Antikörpers (α W6/32, α HLA-A, -B, -C). T-Zellstimulationen mit BCR-ABL WT⁺ DC unter Anwesenheit von α W6/32 bestätigten bei der darauf folgenden Spezifitätsanalyse die HLA-Abhängigkeit der T-Zellreaktivität.

Ein wichtiger Aspekt war es nun aufzuklären, ob in CML-Patienten ein vergleichbares Reaktivitätsmuster der CD8⁺ T-Zellen vorgefunden werden kann wie in den vorher getesteten gesunden Spendern. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit und der benötigten großen Zellmengen konnten lediglich von einem in kompletter zytogenetischer Remission befindlichen Spender die notwendigen T-Zellstimulationen durchgeführt werden. Hierbei konnte eindeutig gezeigt werden, dass dieser in Remission befindlicher Patient das gleiche T-Zellspezifitätsmuster aufweist wie die gesunden Spender. Wiederum konnte keinerlei Reaktivität gegen das BCR-ABL Fusionsprotein nachgewiesen werden, dagegen konnte eine signifikante T-Zellaktivität gegen BCR-ABL Kinase-regulierte Antigene gezeigt werden. Dies ist insofern eine wichtige Erkenntnis, da theoretisch die T-Zellreaktivität eines CML-Patienten in Remission durch die Anwesenheit von T-Memory-Zellen gegen CML-assoziierte Antigene oder Antigene aus dem BCR-ABL Protein (sofern diese existieren), ein anderes Muster als in gesunden Spendern aufweisen könnte. Da sich allerdings die gleiche Reaktivität wie in gesunden Spendern nachweisen lässt, kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Die Berechnung von sogenannten IFN γ -Spot Indizes (Berechnung: 2.2.3.7) zum direkten Vergleich der Reaktivitäten der BCR-ABL WT oder -KD stimulierten T-Zellen, nach jeweiligem Spezifitätstest mit BCR-ABL WT-, KD- oder Negativkontroll-Zelllinien, bestätigte eine ähnliche Situation in gesunden Spendern und CML-Patienten.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass das BCR-ABL Fusionsprotein keine signifikante Immunogenität aufweist. Weder durch den Einsatz von DCs, die mit Peptiden aus dem BCR-ABL Fusionsbereich beladen wurden, noch durch T-Zellstimulationen mit DCs die mit BCR-ABL mRNA transfiziert wurden, konnten T-Zellpopulationen expandiert werden die spezifisch gegen Antigene aus dem BCR-ABL Fusionsprotein gerichtet waren.

Zweitens konnte der BCR-ABL Kinasedomäne eine Schlüsselrolle für eine erhöhte Immunogenität von BCR-ABL⁺ Zellen zugewiesen werden. Es konnte eine starke, HLA-vermittelte T-Zellreaktivität spezifisch gegen BCR-ABL-regulierte Antigene detektiert werden. Eine Inhibierung der BCR-ABL Kinaseaktivität durch Mutation oder den Einsatz des spezifischen BCR-Abl Inhibitors IM resultierte in einer signifikanten Verringerung der Immunogenität der BCR-ABL⁺ antigenpräsentierenden Zellen. Dies entspricht mit großer Wahrscheinlichkeit der Situation, wie sie in CML-Patienten bei Behandlung mit IM vorliegt. Eine Ausnahme bilden hier jedoch, durch ihre IM-Insensitivität, ruhende leukämische Stammzellen und Zellen die durch verschiedene Mechanismen eine IM Resistenz aufweisen.¹³⁴

Der Assoziation der Kinaseaktivität eines Onkoproteins mit der Heraufregulierung von potentiell immunogenen Antigenen scheint dabei ein prinzipieller Mechanismus zu Grunde zu liegen, da ähnliche Erkenntnisse von einem anderen Onkoprotein vorliegen. So führt die Amplifikation der onkogenen Rezeptortyrosinkinase HER2 in Tumorzellen zu einer erhöhten Sensitivität für eine T-Zell-vermittelte Tumorlyse.¹³⁵

Eine Immuntherapie, z.B. eine Vakzinierung mit genetisch modifizierten DCs, die gegen ein breites Spektrum an BCR-ABL-regulierten Antigenen gerichtet ist, könnte, im Gegensatz zu den derzeit durchgeführten klinischen Studien mit BCR-ABL Fusionspeptiden, T-Zellen spezifisch gegen leukämische Stammzellen und IM-resistente Zellen aktivieren. Solch eine Studie wäre geeignet, spezifisch solche Zellen anzugreifen, die bei einem Großteil der CML-Patienten verantwortlich sind für die durch BCR-ABL RT-PCR nachweisbare minimale Resterkrankung („*minimal residual disease*“, MRD)¹³⁶, also IM-resistente Zellen oder IM-insensitive leukämische Stammzellen. Sie bietet damit eine Möglichkeit, diese Resterkrankung zu minimieren und so die Chancen für eine lang anhaltende Remission zu erhöhen. Hinzu kommt, dass es bei einer Vakzinierung, die sich nicht auf ein einzelnes Antigen oder Zielprotein konzentriert, mit geringerer Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Resistenzen kommt, da multiple Antigene auf unterschiedlichen HLA-Typen gleichzeitig zur Aktivierung von T-Zellen präsentiert werden.

3.3 Generierung eines tumorlytischen CTL-Klons gegen das Tumorantigen Proteinase 3

Nachdem im zweiten Teil der Arbeit gezeigt werden konnte, dass die BCR-ABL Kinaseaktivität die Expression der Serinprotease Proteinase 3 induziert, wurde im letzten Teil der Arbeit ein CD8⁺ T-Zellklon gegen ein bekanntes Proteinase 3-CTL-Epitop generiert.

Zur Generierung eines solchen Klones, gerichtet gegen das Proteinase 3-CTL-Epitop PR1 bzw. p169-177, wurden in einem allogenen Stimulationsansatz T-Zellen eines HLA-A2⁻ gesunden Spenders mit PR1-beladenen DCs eines HLA-A2⁺ gesunden Spenders stimuliert, um eine Depletion PR1-reaktiver, also potentiell autoreaktiver, T-Zellen im Thymus auszuschließen. Durch Einsatz der Proteinase 3 exprimierenden, HLA-A2⁺ Leukämiezelllinie K562-A2 konnte eindeutig die tumorlytische Aktivität eines CTL-Klons demonstriert werden, was die Relevanz dieses Antigens als immuntherapeutische Zielstruktur zur Behandlung der CML unterstreicht. Bislang konnte keine Publikation die Generierung eines derartigen Klones zeigen. Gerade im Vergleich mit der in Abbildung 8 dargestellten, BCR-ABL-spezifischen T-Zellpopulation zeigen sich gravierende Unterschiede im Reaktivitätsmuster des PR1-spezifischen Klons, da eine Reaktivität nicht nur gegen exogen mit dem relevanten Peptid beladene Zellen, sondern auch gegen Proteinase 3 exprimierende Tumorzellen gezeigt werden konnte.

Da es sich nicht um eine polyklonale CTL-Mischkultur handelt, bietet sich mit solch einem PR1-spezifischen Klon die Möglichkeit einer T-Zellrezeptor (TCR)-Isolation, mit anschließendem TCR-Transfer in allogene PBMCs bzw. T-Zellen eines CML-Patienten. Die Vorbereitungen für solch einen Transfer, beispielsweise die RNA-Isolation aus den T-Zellen, werden derzeit getroffen. Die durch einen TCR-Transfer ermöglichte Spezifitätsübertragung bietet eine wesentliche Vereinfachung um Tumor-spezifische CTLs aus T-Zellen eines Patienten zu generieren. Diese damit einhergehende Beschleunigung des Verfahrens kann, gerade in Bezug auf ein Fortschreiten der Erkrankung, von erheblicher Bedeutung bei der Behandlung von CML-Patienten sein.

4. Zusammenfassung

Das initiale Ereignis, das zur Entwicklung einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) führt, ist die aus einer Chromosomentranslokation resultierende Expression des onkogenen Fusionsproteins BCR-ABL, einer konstitutiv aktiven Tyrosinkinase. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Immuntherapien zur alternativen Behandlung der CML wurde in der vorliegenden Arbeit die Immunogenität des BCR-ABL-Fusionsproteins selbst, und der durch die BCR-ABL Kinase hochregulierten Antigene untersucht.

Zur selektiven Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen wurde die *in vivo* stattfindende, physiologische Interaktion zwischen antigenpräsentierenden, dendritischen Zellen (DC) und T-Zellen, die zu einer effektiven Immunabwehr führt, *in vitro* imitiert. Hierfür musste zunächst eine Methode etabliert werden, die es erlaubt das BCR-ABL Gen mit hoher Effizienz transient in DCs zu transferieren. Als am effizientesten stellte sich dabei der Gentransfer mittels mRNA-Elektroporation heraus, der mittels RT-PCR- und FACS-Analysen überprüft wurde. Mit diesen BCR-ABL-transgenen DCs wurden repetitiv autologe, CD8⁺ T-Zellen stimuliert. Die anschließend durchgeführte Spezifitätskontrolle dieser T-Zellen erfolgte mit Zielzellen, die entweder BCR-ABL Wildtyp oder eine Kinase-defiziente Mutante von BCR-ABL exprimieren. Dadurch konnte analysiert werden, ob die stimulierten T-Zellen gegen das BCR-ABL Protein selbst aktiviert wurden oder aber gegen Antigene gerichtet sind, die mit der Kinaseaktivität von BCR-ABL assoziiert sind. Die Experimente zeigten eindeutig, dass Antigene, die von der BCR-ABL Tyrosinkinase reguliert werden, einen wesentlichen Anteil haben an einer T-Zell-vermittelten anti-leukämischen Immunreaktion. Dies gilt für gesunde Spender und CML-Patienten. Im Gegensatz dazu zeigte das BCR-ABL Fusionsprotein selbst keine messbare Immunogenität. Auf ihre Validität überprüft wurden diese Ergebnisse mit Hilfe eines HLA-blockierenden Antikörpers und BCR-ABL exprimierenden Leukämiezelllinien.

Diese Ergebnisse haben entscheidenden Einfluss auf die zukünftige Entwicklung von Immuntherapien gegen CML, da sich diese Therapien bislang auf das BCR-ABL Protein als Zielstruktur konzentrierten. Denkbar ist hierbei der Einsatz einer Immuntherapie gegen BCR-ABL-regulierte Antigene in Kombination mit der derzeitigen Standardtherapie mit dem BCR-ABL Inhibitor Imatinib. Dies kann insbesondere im Hinblick auf die spezifische Bekämpfung Imatinib-resistenter Zellen oder Imatinib-insensitiver CML-Stammzellen von Bedeutung sein, da diese Zellen häufig für einen Krankheitsrückfall von Imatinib-behandelten CML-Patienten verantwortlich sind.

4.1 Summary

The initial event leading to the development of chronic myelogenous leukemia (CML) is the expression of the oncogenic fusionprotein BCR-ABL, a constitutively active tyrosine kinase. In order to develop alternative immunotherapies to treat CML, in this thesis the immunogenicity of BCR-ABL itself and of antigens regulated by the BCR-ABL tyrosine kinase was analyzed.

For a specific activation of CD8⁺ T cells, the physiologic interaction of antigen-presenting dendritic cells (DC) and T cells was imitated *in vitro*. First, a method to transfer the BCR-ABL gene into DCs was established. Electroporation of mRNA showed thereby the best results with high efficiency and cell viability, as determined by RT-PCR and FACS analysis. These BCR-ABL transgenic DCs were used for repetitive stimulations of autologous CD8⁺ T cells. The subsequent specificity analysis were performed with target cells expressing either BCR-ABL wild-type or a kinase-deficient mutant of BCR-ABL. The combination of those target cells allowed the differentiation of whether the stimulated T cells are predominantly directed against the BCR-ABL protein or against antigens upregulated by the BCR-ABL kinase activity. The experiments, performed with healthy donors and CML patients, showed that the immunogenicity of BCR-ABL expressing cells is dependent on the BCR-ABL kinase activity and dominated by BCR-ABL regulated antigens. In contrast to that, the BCR-ABL protein itself does not show any immunogenicity, confirming previous results obtained with peptide loaded DCs. The validity of these results was assured in experiments with HLA-blocking antibodies and BCR-ABL expressing cell lines.

These results have major implications on the future development of CML-directed immunotherapies, as those therapies so far concentrate on the BCR-ABL fusion protein as target structure. The combination of an immunotherapy against BCR-ABL-regulated antigens with the standardtherapy of CML patients with the BCR-ABL inhibitor Imatinib might also be a promising approach, as the outgrowth of Imatinib-resistant CML cells or the existence of Imatinib-insensitive CML stem cells is in most cases responsible for a relapse of the disease.

5. Material und Methoden

5.1 Geräte

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

Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge GS-6K	Beckman, Fullerton, USA

5.2 Material

5.2.1 Chemikalien und biogene Substanzen

2-Amino-9-Ethylcarbazol-(AEC-)Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamid/ Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aqua Spüllösung	Delta Select, Pfullingen
Bactoagar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Complete™Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Boehringer, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Deisenhofen
Hypaque Ficoll	Biochrom GmbH, Berlin
5-Fluorouracil (5-FU, Ribofluor®)	Ribosepharm GmbH, München
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Fluka, Deisenhofen

Glycerol-2-phosphat	Aldrich Chemical Company, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Heparin, Liquemin®	Roche, Grenzach-Whylen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumcarbonat	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumdextransulfat	Farmacia, Freiburg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trockenmilchpulver	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

5.2.2 Radioaktive Substanzen

Natriumchromat MP Biochemicals, Irvine, USA

5.2.3 Zellkulturmedien, Zusätze und Wachstumsfaktoren

AB-Serum	Valley Biomedical, Winchester, VA, USA
AIM-V	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Humanes β 2-Microglobulin	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Cyclosporin A, Sandimmun®	Novartis, Nürnberg
DMEM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Diphtherietoxin	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
G 418 (Neomycin)	PAA, Pasching, Österreich
Rekombinanter humaner Granulozyten- Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	CellGenix, Freiburg
Interleukin-1 β	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Proleukin (Interleukin-2)	Chiron, Emeryville, CA, USA
Interleukin-4	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-6	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-7	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-12	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-15	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
L-Glutamin, 200 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5%	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Opti-MEM®	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

5.2.4 Peptide

BCR-ABL _{p924-932} KQSSKALQR	Biosyntan, Berlin
HIV _{p476-484} ILKEPVHGV	"
MelanA _{p26-35} EAAGIGILTV	"
PR1 _{p169-177} VLQELNVN	"

5.2.5 Enzyme

Eco RI (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Hind III (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Kpn I (10 U/μl)	New England Biolabs, Schwalbach
Aat II (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Herculase [®] Enhanced DNA Polymerase	Stratagene, Austin, USA
Taq DNA Polymerase	Orbigen, Inc., San Diego, USA
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
CIAP, alkalische Posphatase(20-30 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.2.6 Antikörper

Anti-human CD8, FITC-konjugiert	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-human CD14, PE-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Anti-human CD80, PE-konjugiert	"
Anti-human CD83, PE-konjugiert	"
Anti-human CD86, PE-konjugiert	"
Anti-human CD71, PE-konjugiert	
Anti-human IgG, FITC-konjugiert	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-human IgG, PE-konjugiert	"
Anti-HLA-A2, FITC-konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Anti-HLA-A2, unkonjugiert	"
Anti-HLA-DR, PE-konjugiert	"
Anti-human Interferon-γ, mAb 1-D1K	Mabtech, Stockholm, Schweden
Anti-human Interferon-γ, mAb 7-B6-1-Biotin	Mabtech, Stockholm, Schweden
Anti-Abl, unkonjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Anti-phospho-Tyrosin, unkonjugiert	Biozol, Eching, Deutschland

5.2.7 Zelllinien

K562	Erythroblastäre Zelllinie, BCR-ABL ⁺ , HLA-Klasse I
K562tA2	Erythroblastäre Zelllinie, BCR-ABL ⁺ , stabil mit HLA-A2 transfiziert
BV-173	CML-Zelllinie, HLA-A2 ⁺ , HLA-A2 ⁺
SM-LCL	HLA-A2 ⁺ , EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinie
SMo-LCLtMIGR1	HLA-A2 ⁺ , EBV-transformierte, lymphoblastoide Zelllinie, MSCV-MIGR1 transduziert
SM-LCLtMIGR1-BCR-ABL WT	HLA-A2 ⁺ , EBV-transformierte, lymphoblastoide Zelllinie, MSCV-MIGR1-BCR-ABL WT transduziert
SM-LCLtMIGR1-BCR-ABL KD	HLA-A2 ⁺ , EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinie, MSCV-MIGR1-BCR-ABL KD transduziert
T2	HLA-A2 ⁺ , TB lymphoblastoide Hybridomzelllinie, TAP-defizient

5.2.8 Oligonukleotide

β-ACTIN	GGC ATC GTG ATG GAC TCC G
β-ACTINas	GCT GGA AGG TGG ACA GCG A
BCR-ABL	TCC GCT GAC CAT CAA TAA GGA
BCR-ABLas	CAC TCA GAC CCT GAG GCT CAA
WT1	TAA CCA CAC AAC GCC CAT C
WT1as	AAA ACC TTC GTT CAC AGT CC
Proteinase3	CGG CCA CAT AAC ATT TGC AC
Proteinase3as	TGG CAC ATC CCC AGA TCA C
HAGE	CCT TTC AAT GTT ATC CTG AG
HAGEas	CTT CGT CAA TCT GAA TA

5.2.9 DNA- und Protein Molekulargewichtsmarker

100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker (M1)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
1 kb Plus DNA-Molekulargewichtsmarker (M2)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rainbow Protein-Molekulargewichtsmarker	Amersham Biosciences, Braunschweig

5.2.10 DNA/RNA Aufreinigungssysteme

QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] Spin Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim
RNeasy	Qiagen, Hilden
mMESSAGE mMACHINE Kit	Ambion Ltd., Cambridgeshire, UK

5.2.11 Puffer und Standardlösungen

Ampicillin-Stammlösung:	50 mg/ml in ddH ₂ O
DNS-Probenpuffer (10-fach):	50% Glycerin 0,2% Bromphenolblau 0,5 M EDTA in ddH ₂ O
Erythrozyten-Lyse-Puffer	8,3 g Ammoniumchlorid 1,0 g Kaliumcarbonat 37 mg EDTA
Protein-Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 130 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH 7) 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM NaF 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml ddH ₂ O
Einfriermedium für Zellen:	80 % Albumin 10 % DMSO 10 % Glukose

Luria-Bertani (LB) Medium (flüssig):	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Hefeextrakt 1% NaCl in ddH ₂ O pH 7,0 ,autoklavieren
LB-Medium (fest):	1,5% Bacto-Agar in LB-Medium (flüssig)
FACS-Puffer:	1% BSA in PBS
MACS-Puffer:	1 x PBS (pH 7,2) 0,5% BSA 2 mM EDTA
Sammelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4% SDS in ddH ₂ O
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in ddH ₂ O
SDS-Probenpuffer (2-fach):	1 M Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM DTT 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 20% Glycin in ddH ₂ O
SOC-Medium:	2% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Hefeextrakt 0,5% 1M NaCl 0,5% 1M KCl in ddH ₂ O mit 1M NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren 1% 2M Glukose (frisch zugegeben) 1% 2M MgCl ₂ (frisch zugegeben) sterilfiltrieren (0,2µm Filter)
TAE-Puffer (10-fach):	0,4 M Tris 1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA (pH 8) in ddH ₂ O

Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in ddH ₂ O 20% Methanol in ddH ₂ O
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4% SDS in ddH ₂ O

5.3 Methoden

5.3.1 Molekulabiologische Methoden

5.3.1.1 Transformation von kompetenten Bakterien

Unter Transformation versteht man die genetische Veränderung eines Bakteriums nach der Aufnahme von DNA eines genetisch anderen Bakteriums.

Vorraussetzung für eine erfolgreiche Transformation ist die Kompetenz der zu transformierenden Bakterien, d.h. die Bakterien müssen zunächst zur Aufnahme von DNA aus dem Medium befähigt werden. Dies geschieht durch die Behandlung der Bakterien mit DMSO (Dimethylsulfoxid), was die Membranpermeabilität erhöht, und durch MgSO₄, welches in der Lage ist, Nukleinsäuren zu komplexieren. Die kompetenten Bakterien werden aliquotiert (je 100µl), schockgefroren in flüssigem Stickstoff und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation werden die Bakterien auf Eis aufgetaut und in gekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert. Je 1-5 µl des DNA-Reaktionsansatzes wurden zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgen 20-45 s Inkubation bei 37°C, der sogenannte Hitzeshock, der für eine effiziente Aufnahme der DNA essentiell ist. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurde das Volumen der Bakteriensuspensionen mit SOC-Medium auf 1 ml erhöht und 90 min bei 30°C in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 15 µl der Bakteriensuspension mit 85 µl SOC-Medium auf vorgewärmte Ampicillin-Platten ausplattiert.

5.3.1.2 Plasmid-DNA-Amplifikation in einer LB-Flüssigkultur

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

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

5.3.1.3 Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien

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

Zunächst werden die Bakterien aus der LB-Flüssigkultur durch 10minütiges zentrifugieren pelletiert. Das Pellet wird in einem RNase-haltigen Resuspensionspuffer resuspendiert. Dieser Abbau der RNA stellt sicher, dass tatsächlich nur Plasmid-DNA an die Silikamembran bindet. Nun folgt die Lyse der Bakterien mit Hilfe eines NaOH und SDS (Natriumdodecylsulfat) enthaltenden Lysispuffers. Das SDS löst die Phospholipid- und Proteinbestandteile der Zellmembran, während das NaOH Proteine, chromosomale und Plasmid-DNA denaturiert. Dies ist daher auch ein sehr zeitkritischer Schritt, der 5min nicht überschreiten sollte. Bei einer optimalen Lysisdauer wird die maximale Menge an Plasmid-DNA freigesetzt ohne die Freisetzung chromosomaler DNA und ohne die Plasmid-DNA allzu lange den denaturierenden Bedingungen auszusetzen.

Der Neutralisierungspuffer, der die Lysisreaktion abstoppt, enthält KAc (pH 5,5), was zum einen dazu führt, dass das SDS ausfällt und die denaturierten Proteine, die chromosomale DNA und die weiteren Zelltrümmer in Salz-Detergenz-Komplexen gebunden werden, zum anderen befähigt es die Plasmid-DNA, an die Silikamembran zu binden. Die Plasmid-DNA ist aufgrund der geringeren Größe im Vergleich zur chromosomalen DNA in der Lage, vollständig zu renaturieren und in Lösung zu gehen. Nach Zentrifugation verbleibt sie daher im Überstand. Dieses klare (da frei von Proteinen) Lysat wird auf eine Säule geladen. Die hohen Salzkonzentrationen und pH-Bedingungen des Lysates sorgen nun dafür, dass lediglich Plasmid-DNA an die Silica-Membran bindet. Es folgt ein Waschschriff bei dem mit Hilfe eines Waschpuffers Nukleinsäure-bindende Proteine, Salze und RNA-Spuren entfernt werden. Abschließend wird die DNA mit einem geeigneten Volumen an autoklaviertem ddH₂O oder Elutionspuffer eluiert. Gelagert werden kann die in Wasser gelöste DNA bei -20°C. Zur Isolierung von hochreiner DNA mit Hilfe von Säulen stehen, je nach erwünschter Ausbeute an DNA, verschiedene Kit-Systeme zur Verfügung (5.2.10).

5.3.1.4 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Auch bei der Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen macht man sich die selektiven Bindungseigenschaften einer Silikamembran zur nutze, die überwiegend RNA und nicht DNA bindet. Zusätzlich wird vorher das Zelllysat homogenisiert um die genomische DNA zu scheren. Zur RNA-Isolation stehen ebenfalls Kit-Systeme zur Verfügung (siehe 5.2.10)

5.3.1.5 *in vitro* Transkription (IVT) von mRNA

Bei einer *in vitro* Transkription wird doppelsträngige Plasmid-DNA durch Einsatz einer RNA-Poymerase in RNA umgeschrieben. Die Initiation bzw. Effektivität der Translation dieser mRNA wird entscheidend beeinflusst von der Anwesenheit einer Cap-Struktur aus 7-Methylguanylat am 5'-Ende der mRNA und von einer Folge von Adenosinresten(A), dem sogenannten Poly(A)-Schwanz, am 3'-Ende. Um solch eine RNA *in vitro* zu generieren wurde in dieser Arbeit ein BCR-ABL Konstrukt in einen Vektor umkloniert, der durch die Anwesenheit eines SP6 Promotors und eines Poly(A)-Schwanzes eine effektive Transkription von Poly(A)-stabilisierter RNA ermöglicht. Die Zugabe eines 7-Methylguanylat Cap-Analogs in den Reaktionsansatz führt zum Einbau des für die Translationsinitiation notwendigen 5'-Caps.

Vor der Durchführung der IVT wird das Plasmid mit dem zu transkribierenden Konstrukt am 3'-Ende des Poly(A)-Schwanzes zunächst linearisiert um bei der IVT RNA Stücke gleicher Länge zu erhalten. Dies geschah durch Restriktionsverdau mit dem Enzym EcoRI (siehe 5.3.1.8). Für die IVT wurde das mMESSAGE mMACHINE Kit verwendet.

20µl Reaktionsansatz zur IVT:

10µl	2x NTPs/Cap Analog
2µl	10x Reaktionspuffer
1µg	linearisierte Template-DNA
2µl	Enzym Mix
ad 20µl	Endvolumen nukleasefreies ddH ₂ O

Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C folgt eine 15 minütige Inkubation mit 1µl DNase I bei 37°C um die eingesetzte Template-DNA zu degradieren. Abschließend folgt die Aufreinigung der RNA mit Hilfe des schon zur Isolation von RNA eingesetzten RNEasy Kit-Systems.

5.3.1.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA

Die Konzentrationen der isolierten Nukleinsäuren wurden photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Um Kontaminationen mit Proteinen auszuschließen, wurde jeweils das Verhältnis der Extinktionen E_{260}/E_{280} bestimmt. In proteinfreien Proben sollte es im Fall der RNA bei ca. 1,6 liegen, bei DNA um 1,8.

Berechnung der Konzentration nach erhaltener Extinktion:

- DNA: $c = 50 \times E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ [$\mu\text{g/ml}$]
- RNA: $c = 40 \times E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ [$\mu\text{g/ml}$]

5.3.1.7 DNA-Gelelektrophorese

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

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

Um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen wird 0,0001% Ethidiumbromid in die noch flüssige Agarose gegeben. Ethidiumbromid ist in der Lage in Nukleinsäuren zu interkalieren und es fluoresziert rosafarben bei Anregung mit UV-Licht.

Herstellung eines 1%igen Agarosegels

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

Durchführung der Gelelektrophorese

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

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

5.3.1.8 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind spezifische Endonukleasen, die an spezifischen, meist palindromartigen Sequenzen doppelsträngige DNA spalten, indem sie in jedem Strang eine Phosphodiesterbindung lösen.¹³⁷ Sogenannte „*blunt ends*“ (=stumpfe Enden) entstehen, wenn die Schnittstellen auf dem DNA-Doppelstrang genau einander gegenüber liegen. Sind die Schnittstellen auf den DNA-Strängen gegeneinander versetzt, so entstehen überhängende „*sticky ends*“, die zueinander komplementär sind

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

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

Ablauf eines Restriktionsverdaus

- 20µl Restriktionsansatz:
 - 2-3µl (~1µg) DNA
 - 2µl 10x Puffer für Restriktionsenzym
 - 2µl Restriktionsenzym (10 U/µl)
 - ad 20µl Endvolumen steriles ddH₂O

Dieser Ansatz wird für 1h bei 37°C inkubiert

Zur Kontrolle, ob der Restriktionsverdau erfolgreich verlaufen ist, wird anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt

5.3.1.9 Ligation von DNA

Zur Herstellung eines rekombinanten DNA-Moleküls wird der linearisierte Vektor mit dem zu klonierenden DNA-Stück verknüpft. Katalysiert wird die ATP-abhängige Reaktion durch die T4-Ligase, welche 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphat-Enden verknüpft. Idealerweise beträgt das

Mengenverhältnis von Vektor zu inserierendem DNA-Fragment 1:3. Für die Ligation wird das "*Rapid DNA Ligation Kit*" (Roche, Mannheim) verwendet. Als Kontrolle dient ein Ansatz ohne DNA-Fragment mit gleicher Menge an linearisiertem Vektor. Die Ligation kann direkt durch anschließende Transformation in *E. coli* Bakterien amplifiziert oder aber bei -20° C gelagert werden.

5.3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht eine vielfache Amplifikation von geringsten Mengen DNA aus einem bestimmten Abschnitt des Genoms.¹³⁸ Kary B. Mullis bekam 1993 den Nobelpreis für Chemie für die Entwicklung dieser Technik. Voraussetzung ist, dass bestimmte Randsequenzen, die den Abschnitt flankieren, bekannt sind. Diese Sequenzen werden benötigt um dazu komplementäre Oligonukleotide zu synthetisieren, wobei deren Basensequenz jeweils zu einem der beiden Stränge komplementär ist.

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

Ablauf eines PCR-Reaktionszyklus:

- **Trennung** der DNA-Doppelhelix durch kurzes Erhitzen auf 96°C.
- **Primerannealing:** Die Primer binden beim Abkühlen an die komplementären DNA-Einzelstränge (50-60°C).
- **Replikation** der beiden DNA-Stränge durch die Polymerase: Die downstream (in 3' Richtung) von den Primern gelegenen DNA-Abschnitte werden selektiv neu synthetisiert (72°C), wobei etwa 100 Basen in 10s synthetisiert werden

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

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

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

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

Die PCR bietet zudem die Möglichkeit, entweder an den Rand des PCR-Produktes Restriktionsschnittstellen einzubauen oder DNA gezielt zu mutieren („*site-directed mutagenesis*“). Die Sequenz der Schnittstellen muß dazu lediglich als Überhang an die beiden Primer angefügt werden bzw. Primer konstruiert werden, die die einzufügende Mutation tragen. Die in dieser Arbeit durchgeführte *site-directed mutagenesis* des BCR-ABL Protein wird aufgrund seiner Komplexität im Ergebnisteil ausführlich erläutert.

Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR):

Unter RT-PCR versteht man die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA mit Hilfe der sog. Reversen Transkriptase und anschließender PCR. In der vorliegenden Arbeit wurde, ausgehend von 1µg Gesamt-RNA mit Hilfe der sogenannten M-MLV-Reversen Transkriptase mit einem Oligo-(dT)₁₅ Primer vom 3'-Ende der poly(A)-mRNA her einzelsträngige cDNA synthetisiert.

5.3.1.11 Gelextraktion

In einer Gelextraktion wird die in einer Gelelektrophorese aufgetrennte DNA wieder aus dem Gel gewonnen und für spätere Arbeitsschritte aufgereinigt und dabei von Ethidiumbromid- und Gelrückständen und Probenpuffer befreit. Dabei wird die DNA wiederum über eine spezielle Silika-Membran, aufgereinigt, die bei hohen Salzkonzentrationen spezifisch DNA bindet, während andere kontaminierende Substanzen hindurchfließen.

5.3.2 Zellkultur

5.3.2.1 Kultivierung von Zelllinien

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

Sämtliche Zelllinien wuchsen in Suspension, d.h. nicht adhärent, und wurden in RPMI-Medium (10%FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Mit HLA-A2 transfizierte K562-A2 Zellen wurden durch Zusatz von G418 zum Medium selektioniert.

5.3.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Reichert, New York, USA). Dazu wurden 50 µl einer Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit einer 0,5%-igen Trypanblaulösung versetzt und im Mikroskop im von der Zählkammer vorgegebenen Raster gezählt. Da Trypanblau nur tote Zellen und Zelltrümmer anfärbt, können diese von intakten, vitalen Zellen unterschieden werden. Die Zellen in den vier vorgegebenen Quadranten wurden ausgezählt und die Zellkonzentration pro Milliliter wurde ermittelt, indem die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10⁴ multipliziert wurde.

5.3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden gezählt und abzentrifugiert. Je nach Zelltyp wurden bis zu 1 x 10⁷ Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden sofort in eine stufenweise abkühlende Einfrierbox gestellt und bei -80°C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

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

5.3.2.4 Generierung von immortalisierten B-Zelllinien

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

Zur EBV-Transformation wurden 1 x 10⁷ PBMC in 2,5 ml RPMI-Medium im Verhältnis 1:1 mit EBV-Überstand für 2 h im 37°C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 5 ml RPMI-Medium mit 1 µg/ml Cyclosporin A, das die Proliferation von T-Zellen verhindert, dazugegeben und die Suspension in 25 cm²-Flaschen überführt. Es folgte eine dreiwöchige

Inkubation im Brutschrank. Nach dieser Zeit können erste LCL-typische Zellaggregate in den Kulturflaschen nachgewiesen werden

5.3.2.5 Retrovirale Transduktion

BCR-ABL in seiner Wildtyp oder Kinase defizienten Variante, wurde in der vorliegenden Arbeit mittels retroviraler Transduktion stabil in LCLs eingeschleust.

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

Virusgewinnung nach Transfektion von Verpackungszellen

Zur Virusgewinnung wurden amphotrope Phoenix-Zellen als Verpackungszelllinie verwendet. Phoenix-Zellen stammen von der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T ab, die mit dem Adenovirus E1a transformiert wurde und ein temperatursensitives T-Antigen trägt, das mit Neomycin koselektiert wird. Durch das Einfügen eines Hüllprotein- sowie eines Gag-Pol-Konstrukts entstand die Verpackungszelllinie. Als Transfektionsreagenz wurde das auf Lipiden basierende FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim) eingesetzt, das mit der DNA Komplexe eingeht die in die Zelle transportiert werden können.

Zur Transfektion wurden pro konfluent mit Phoenix-Zellen bewachsener Transfektionsplatte ein Gemisch aus 94 µl serumfreiem DMEM, 6 µl FuGENE und 2µg DNA angesetzt und 20 min bei RT inkubiert. Das Medium auf den Phoenix-Zellen wurde durch 3 ml serumfreies DMEM ersetzt, dann folgte die Zugabe des Transfektionsgemisches. Nach 5-8 Stunden im Brutschrank wurden FCS und Penicillin/Streptomycin zugegeben. Alle 12 h wurde das Virus-enthaltende Medium gesammelt bzw. gewechselt, wobei wegen der amphotropen Viren unter S2-Bedingungen gearbeitet wurde. Nach 48 h erfolgte die Transduktion.

Transduktion mit retroviralem Überstand

Zur Transduktion wurde der gesammelte Medienüberstand durch einen 0,45 µm Filter filtriert, um eventuell vorhandene Zellen zu entfernen. Ein Pellet von 1×10^6 Suspensionszellen (hier: LCLs) wurde in 200 µl RPMI-Medium resuspendiert und in ein Schraubdeckelröhrchen überführt. 200 µl des filtrierten Überstandes wurden hinzugefügt und die Mischung für 90 min bei 1258 x g bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl Medium aus dem Röhrchen entfernt und durch 200 µl retroviralen Überstand ersetzt. Das Pellet wurde resuspendiert und in ein Loch einer 24-Well-Platte überführt.

Die transduzierten Zellen wurden hochgezogen, wobei bis zur 6. Passage noch unter S2-Bedingungen gearbeitet wurde.

Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer auf das im retroviralen Vektor (siehe Abbildung 11) enthaltene eGFP untersucht und dann in einem FACS-Zellsorter sortiert.

5.3.2.6 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

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

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

5.3.2.7 Differenzierung und Ausreifung von DCs aus Monozyten

Durch ihre Eigenschaft, an eine Plastikoberfläche zu adhären, können Monozyten aus einer PBMC-Präparation von den übrigen mononukleären Zellen getrennt werden.¹³⁹ Die Differenzierung der Monozyten in unreife dendritische Zellen erfolgt durch Kultivierung mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF. Durch Zugabe weiterer, proinflammatorischer Zytokine reifen die DC aus. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete „Ausreifungscocktail“ wurde von Jonuleit et al.¹⁴⁰ entwickelt.

PBMC (1×10^7 /Loch) wurden in jeweils 3ml RPMI-Medium in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurden die nicht-adhärenenten Zellen zweimal mit Medium abgespült und zur späteren Gewinnung von CD8^+ T-Zellen eingefroren. Auf die adhärenenten Zellen wurde wieder RPMI-Medium gegeben. Es folgte eine mindestens zweistündige Inkubation. Nach nochmaligem Abspülen wurde X-VIVO, ein spezielles Lymphozyten-Medium, mit den Zytokinen GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (1000 U/ml) hinzugefügt. In der nun folgenden, einwöchigen Differenzierungsphase wurden die Zellen alle zwei Tage mit 1 ml X-VIVO-Medium plus 1600 U GM-CSF und 1000 U IL-4 gefüttert. Die Differenzierung der Monozyten in unreife DC wurde durch FACS-Messungen auf die typischen Oberflächenmarker und die Abwesenheit des Monozytenmarkers CD14 bestimmt und war auch morphologisch durch ein Lösen von der Plastikoberfläche und ein sich veränderndes Erscheinungsbild mit dendritischen Ausläufern erkennbar. Am 7. Tag wurden die unreifen DC geerntet und in einer Zelldichte von 5×10^5 /Loch mit 4 ml X-VIVO-Medium mit 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 in neue 6-Loch-Platten ausgesät zusammen mit den Reifungszytokine IL- 1β (10ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-6 (1000 U/ml) und PGE-2 (1 μg /ml). Nach 2 Tagen Inkubation ist die Ausreifung erfolgt, wie die Expression von Oberflächenmolekülen wie CD80, CD86, HLA-DR und besonders CD83 zeigt.

5.3.2.8 Exogene Peptidbeladung von Zellen

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

5.3.2.9 Gentransfer in DC mittels mRNA-Elektroporation

Der Transfer von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) in Zellen mittels der Methode der Elektroporation beruht darauf, dass in der Zytoplasmamembran nach einem extrem kurzen Stromstoß Poren erzeugt werden, durch die die Nukleinsäuren durch Diffusion und elektrophoretisch in die Zellen gelangen.¹⁴¹

Zur Elektroporation werden DC 24 Stunden nach Beginn der Ausreifung abgeerntet, in PBS gewaschen und nach Zählung pro 5×10^6 in 200 μl Opti-Mem aufgenommen. Nach Transfer in eine 4 mm Elektroporations-Küvette werden 25 μg mRNA zugegeben. Die Elektroporation erfolgte nach dem Square Wave Protokoll bei 500 V für 0,5 ms. Unmittelbar anschließend

wurden die Zellen in X-VIVO-Medium mit 10% AB-Serum, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 und Reifungszytokinen aufgenommen und zu 1×10^6 Zellen/Loch in einer 6-Loch-Platte ausgesät.

Für Zeitkinetiken wurden elektroporierte DC nach unterschiedlich langen Zeiträumen mittels RT-PCR, durchflußzytometrischen Analysen und ^{51}Cr -Freisetzungstests untersucht. Nach diesen Tests (siehe Abb.15) wurde der ideale Zeitpunkt für ein T-Zellpriming auf etwa 24 Stunden nach der Elektroporation festgelegt.

5.3.2.10 Isolierung von CD8^+ T-Zellen

Unmittelbar vor dem Priming von CD8^+ T-Zellen werden diese aus PBMC durch magnetische Selektion über eine MACS-Säule (Miltenyi) isoliert. Die PBMC werden hierzu gezählt und nach waschen mit PBS in 40 μl MACS-Puffer und 10 μl Biotin-Antibody Cocktail pro 10^7 Zellen aufgenommen. Nach 10 min Inkubation auf Eis werden 30 μl MACS-Puffer und 20 μl Anti-Biotin Micro Beads pro 10^7 Zellen zugegeben. Nach wiederum 15 min Inkubation auf Eis werde die Zellen in 500 μl MACS-Puffer/ 10^8 Zellen aufgenommen und auf die zuvor mit MACS-Puffer aquilibrierten MACS-Säulen gegeben. Nach dreimaligem Nachspülen der Säulen mit 3 ml MACS-Puffer werden die ausgewaschenen CD8^+ T-Zellen gezählt, abzentrifugiert und in dem für das Priming notwendigen entsprechenden Volumen an AIM V-Medium aufgenommen.

5.3.2.11 Priming von CD8^+ T-Zellen

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

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

5.3.2.12 Klonierung von T-Zellen

T-Zellpopulationen die in den Spezifitätsanalysen ein positives Reaktivitätsmuster zeigten wurden kloniert, um monoklonale T-Zellpopulationen mit definierter Spezifität zu erhalten. Klonierungen wurden nach dem Prinzip der „*limiting dilution*“ (limitierende Verdünnung)

durchgeführt, das darauf beruht, dass die zu klonierenden Zellen in so großen Volumina an T-Zellmedium aufgenommen werden, dass theoretisch nur noch eine statistische Zellkonzentration von z.B. 1 Zelle pro 200 µl bzw. Loch vorliegt. Es wurden Verdünnungen mit 1, 3, 5 oder 10 Zellen pro Loch eingesetzt. Als sogenannte Feeder-Zellen wurden zusätzlich 5×10^4 allogene, mit 3000 rad bestrahlte PBMC und 1×10^5 mit 10000 rad bestrahlte LCL in jedes Loch pipettiert. Dem Medium wurden 30 ng/ml des Antikörpers OKT-3 zugegeben, der in der Lage ist, durch Bindung an die Fc-Rezeptoren der PBMC eine unspezifische Proliferation der T-Zellen auszulösen, indem es den mit dem T-Zellrezeptor assoziierten CD3-Komplex aktiviert. Die Proliferation wird weiterhin durch die von den LCL produzierten Zytokine unterstützt. Zusätzlich zu den Feeder-Zellen werden 50 U/ml IL-2 und 2 ng/ml IL-15 zugegeben. Am 7. Tag erfolgte die erneute Zugabe dieser Zytokine. Die Proliferation potentieller Klone kann ab dem 11. Tag mikroskopisch überprüft werden. Ab Tag 14 folgte ein Klon-Screening mittels ^{51}Cr -Freisetzungstest oder IFN- γ --ELISpot.

Expansion positiv getesteter T-Zellklone

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

5.3.3 T-Zellspezifitätstests und Analysen

5.3.3.1 ^{51}Cr -Freisetzungstest

Zur Bestimmung der spezifischen zytotoxischen Aktivität der CD8^+ T-Zellen diente der ^{51}Cr -Freisetzungstest.¹⁴² Dieser Test beruht darauf, dass Zellen die mit radioaktiv markiertem Natriumchromat ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) enthaltendem Medium inkubiert werden, dieses Natriumchromat aktiv aufnehmen. Werden diese Zielzellen nun mit zytotoxischen T-Zellen koinkubiert, welche von den HLA-Molekülen der Zellen präsentiertes Peptid erkennen, kommt es zur Lyse der erkannten Zielzellen und damit zur Freisetzung des Natriumchromat. Die vom ^{51}Cr emittierte γ -Strahlung kann nun in einem γ -Strahlungsmessgerät gemessen und daraus die Lyse bestimmt werden.

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

5×10^5 der jeweiligen Zielzellen wurden in RPMI gewaschen und trocken dekantiert. Das Pellet wurde in 100 μl warmem FCS resuspendiert, dann wurden 100 μCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ hinzugefügt und das Ganze 60-90 min bei 37°C inkubiert. Alle 20 min wurde die Zellsuspension vorsichtig aufgeschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Zielzellen zweimal gewaschen, 1 h mit einem relevanten bzw. irrelevanten Peptid und β_2 -Mikroglobulin bei RT inkubiert und dann noch einmal gewaschen. Für die Peptidtitration zur Bestimmung der Affinität der Klone, wurden die Zielzellen mit verschiedenen Mengen an Peptid gepulst, sonst waren es 10 $\mu\text{g/ml}$. Während der Inkubation der Zielzellen wurden je 50 μl der zu testenden Klone bzw. $1,35 \times 10^5$ expandierte CTL-Klone in eine 96-Loch-V-Bodenplatte pipettiert. Im Fall der expandierten CTL-Klone wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei die Zellen in 5 Schritten jeweils 1:3 verdünnt wurden. Die CTL befanden sich jeweils in 100 μl Medium. Zur Feststellung der spontanen Freisetzung von ^{51}Cr wurden pro Zelllinie 6 Löcher als Mediumkontrollen mit 100 μl Medium vorbereitet. Zur Kontrolle der maximalen Lysierbarkeit wurden 100 μl eines Detergenz (1% NP40) pipettiert, das zum Platzen aller Zielzellen und damit zur Freisetzung des gesamten aufgenommenen ^{51}Cr führen sollte. Pro Loch wurden nun 1×10^3 Zielzellen in 100 μl Medium eingesetzt.

Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurden je 100 μl Überstand pro Loch abgenommen und in Zählröhrchen pipettiert. Die freigesetzte Aktivität wurde dann im γ -Counter gemessen.

Die Formel für die spezifische Lyse lautet folgendermaßen:

(Probenlyse – Lyse der Mediumkontrolle) : (Maximallyse – Lyse der Mediumkontrolle) x 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.

„hot-cold-target“ Assay

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

5.3.3.2 ELISpot-Zytokinsekretionstest

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

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

Nach der Inkubation wurden die Platten sechsmal in PBS + 0,05% Tween gewaschen und anschließend auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Dann werden 2 μ g/ml eines Biotin-gekoppelten Sekundäantikörpers in 100 μ l PBS + 0,5% BSA in jedes Loch pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C werden die Platten wiederum sechsmal mit PBS + 0,05% Tween gewaschen. Auf die Platten werden dann je 100 μ l PBS + 0,5% FCS + 1% Streptavidin-Peroxidase gegeben. Durch die Bindung von Streptavidin an das Biotin des $IFN-\gamma$ Sekundäantikörpers erhält dieser eine Peroxidase-Funktion (ALP). Nach 2 Stunden Inkubation bei RT werden die Platten sechsmal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von je 100 μ l H_2O_2 -aktivierter AEC-Lösung erfolgt eine Farbreaktion, die nach fünf Minuten durch gründliches Abspülen unter fließendem Wasser gestoppt wird. Nach dem Trocknen der Platten können die Spots mit einem ELISpot-Mikroskop und der zugehörigen Software elektronisch ausgezählt und ausgewertet werden.

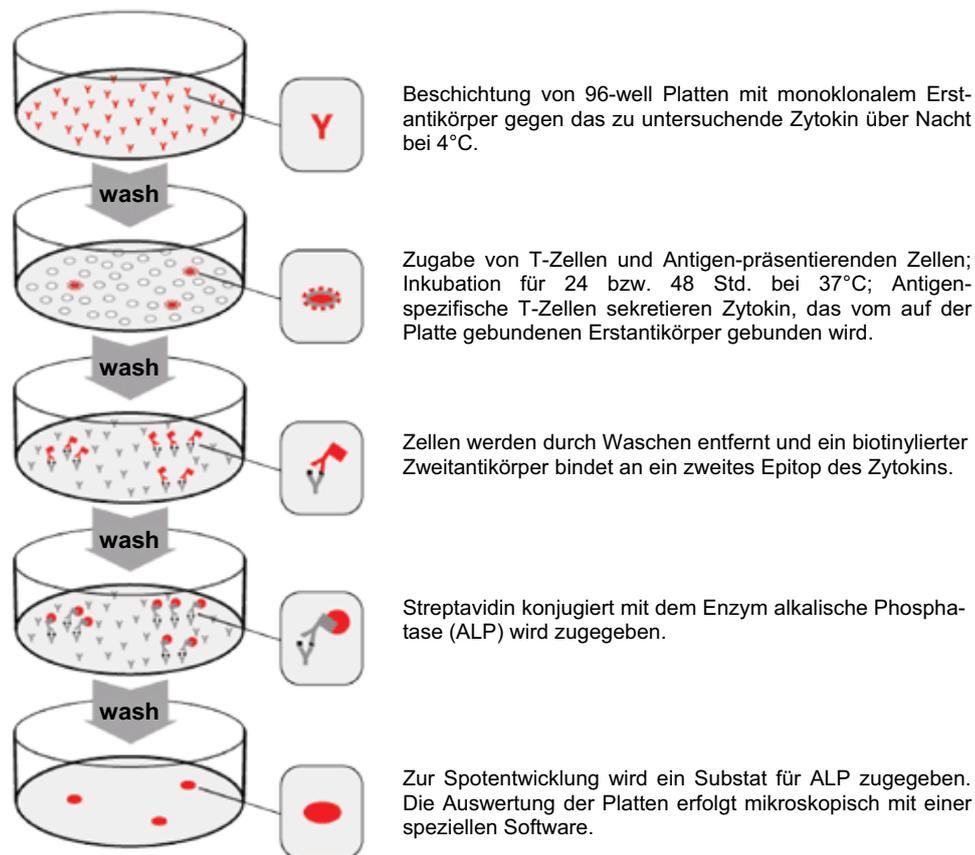


Abb. 32: Experimenteller Ablauf eines ELISpot-Zytokinsekretionstests

5.3.3.3 Durchflusszytometrische Zellanalysen („FACS-Analyse“)

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

Zur FACS-Analyse werden Oberflächenantigene entweder direkt mit an entsprechende Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (direkte Immunfluoreszenz) oder ein erster wird von einem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper gebunden (indirekte Immunfluoreszenz). Bei Verwendung von in verschiedenen Wellenlängen fluoreszierenden

Farbstoffen können deshalb je nach Zytometer mehrere verschiedene Oberflächenmarker parallel analysiert werden. Die von den Detektoren erfasste Fluoreszenzintensität der analysierten Zelle korreliert mit der Menge des gebundenen Fluorochroms, daher sind auch Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des zu untersuchenden Antigens möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden FACS-Messungen auf verschiedene Oberflächenantigene sowie Analysen mit Multimeren („Tetramere“) zur Bestimmung der Spezifität von CD8⁺ T-Zellen durchgeführt.

Bestimmte Durchflusszytometer bieten auch die Möglichkeit, Zellpopulationen nach ihren (Floureszenz-)Eigenschaften zu sortieren. In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen Zellen, die mit dem MSCV-MIGR1-Vektor + BCR-ABL WT bzw. KD transduziert worden waren, auf das im Vektor kodierte eGFP sortiert (siehe Abbildung 11), zum anderen wurden mit diesem Verfahren spezifisch mit Multimeren angefärbte CD8⁺ T-Zellen sortiert (siehe z.B. Abb.8)

Durchflusszytometrischer Nachweis von Oberflächenmolekülen

Für direkte FACS-Messungen werden die zu analysierenden Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, gezählt und in einer Menge von 100µl FACS-Puffer pro 5×10^6 Zellen aufgenommen. Nach Zugabe von 2,5 – 5µl Flourochrom-gekoppeltem Antikörper folgen 30 min Inkubation bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer konnten die direkt markierten Zelllinien nun gemessen werden. Mit dem retroviralen Vektor MSCV-MIGR1 transduzierte Zelllinien konnten ohne Färbung im FACS gemessen werden, weil der Vektor ein eGFP-Gen enthält.

Durchflusszytometrischer Nachweis von MHC:Peptid Multimerkomplexen

Die FACS-Analyse der Spezifität von T-Zellen auf Grund der Struktur ihres T-Zellrezeptors ist möglich durch den Einsatz von multimeren MHC:Peptid-Komplexen, die aus je vier Einheiten von löslichen, Flourochrom-gerkoppelten MHC-Komplexen bestehen, an die jeweils ein immunogenes Peptid gebunden ist. T-Zellen lassen sich mit solchen Multimeren anfärben wenn deren T-Zellrezeptor spezifisch gegen die Multimer-gebundenen Peptide gerichtet ist.

Zur Tetramerfärbung werden 5×10^5 T-Zellen mit einem relevanten bzw. einem irrelevanten Phycoerythrin(PE)-markierten MHC:Peptid-Tetramer im Verhältnis 1:40 in 50 µl FACS-Puffer für 45 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde für eine spezifische Analyse von CD8⁺ T-Zellen ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelter αCD8 Antikörper im Verhältnis 1:100 zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen in FACS-Puffer in 500 µl FACS-Puffer plus 2 µg/ml Propidiumjodid

aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Die Färbung mit dem rot-fluoreszierenden Propidiumjodid dient der Markierung toter Zellen, da es durch deren defekte Zellmembranen eindringt und sich in die DNA einlagert.

5.3.4 Proteinbiologische Methoden

5.3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen ermöglicht es die SDS-PAGE diese in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) entsprechend ihres Molekulargewichtes in einem Polyacrylamid-Gelsystem elektrophoretisch aufzutrennen. SDS ist ein stark negativ geladenes Detergens, das fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in Proteinen zerstört. Zur zusätzlichen Reduktion von Disulfidbrücken enthält der SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) β -Mercaptoethanol. Nach Anlagerung der SDS-Anionen an die Hauptkette der Proteine (ca. ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste), entsteht ein SDS-Protein-Komplex dessen stark negative Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins wird durch die erworbene stark negative Ladung des SDS vernachlässigbar. Anschließend können die Proteine entweder mit bestimmten Farbstoffen (z.B. Coomassie-Blau) direkt im SDS-Gel angefärbt werden oder aber, wie in dieser Arbeit, für weitere Analysen vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden („Western Blotting“). Zur Durchführung der SDS-PAGE werden die denaturierten und mit SDS-Probenpuffer versetzten Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert und anschließend in einem Trenngel aufgetrennt bei 180V für zwei Stunden.

Gelzusammensetzung eines 10% Acrylamid-Gels:

	Sammelgel	Trenngel
1,5 M Tris, pH8.8; 0,4%SDS	-	3ml
1,5 M Tris, pH 6.8; 0,4% SDS	1ml	-
AA/ Bis-AA(30 :0.8)	500 μ l	4ml
ddH ₂ O	2,5ml	5ml
40% APS	8 μ l	20 μ l
TEMED	8 μ l	20 μ l

Das relevante Protein wird von einem spezifischen Antikörper gebunden, den wiederum ein radioaktiv oder wie unten beschrieben ein Enzym-markierter Sekundärantikörper erkennt. Das hierbei entstehende Signal kann auf einem Film nachgewiesen werden.

5.3.4.2 Western Blotting und immunchemischer Proteinnachweis

Western Blotting

Beim Western-Blotting werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus der Gelmatrix auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierzu wird die Membran wurde mit Methanol benetzt und in eine mit Transferpuffer gefüllte Schale überführt. Anschließend wird das Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt und zwischen je zwei Lagen Whatman-Papier und einem Schwamm in eine Kassette eingespannt. Der Aufbau wird in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer gehängt und unter ständiger Wasserkühlung erfolgt der Transfer bei 100V für 80 min.

Immunchemischer Proteinnachweis

Bei der dem Western Blot nachfolgenden immunchemischen Färbung werden Proteine, in dieser Arbeit BCR-ABL, mit spezifischen Antikörpern markiert und anschließend mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Systems nachgewiesen.

Um eine Hintergrundfärbung durch unspezifische Proteinbindungsstellen zu vermeiden wird die Membran unmittelbar nach dem Transfer für 1 h in Blockierungspuffer bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Membran wieder mit PBS + 0,1% Tween gewaschen und der Primärantikörper α Abl nach Herstellerangaben verdünnt in Blockierungspuffer zugegeben. Zur Bindung des ersten Antikörpers erfolgte eine mindestens zweistündige Inkubation bei RT auf einem Schüttler. Danach wird ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS + 0,1% Tween entfernt und der Sekundärantikörper, der gegen den F_C-Teil des Primärantikörpers gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, gelöst in Blockierungspuffer zugegeben. Daraufhin folgt eine 60 minütige Inkubation von bei RT auf einem Schüttler und anschließend drei zehnminütige Inkubationen mit PBS + 0,1% Tween bei RT. Zur Detektion des Proteins wurde die Membran mit einer Chemilumineszenz-Substrat-Lösung inkubiert, deren Substrate von der Peroxidase am Sekundärantikörper in ein lumineszierendes Produkt umgewandelt wurden. Die Dokumentation des erzeugten Signals erfolgte auf Hyperfilm (Amersham, Braunschweig).

5.3.5 Statistische Datenanalyse

Die Medianwerte und der interquartile Bereich der jeweils in den ELISpot-Experimenten erhaltenen IFN- γ Spotmengen wurden für jede T-Zellpopulation mit Hilfe der Software Delta Graph (Delta Graph 5.5.1, Red Rock Software, Salt Lake City, UT) berechnet. Zum Vergleich der Reaktivität unterschiedlicher Populationen wurden p-Werte in einem Mann-Whitney Test berechnet (siehe <http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html>). Werte größer als 0,05 wurden hierbei als nicht signifikant, unterhalb von 0,05 und größer als 0,01 als marginal signifikant und unterhalb von 0,01 als hochsignifikant erachtet.

6. Literatur

1. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*. 1995;81:935-946.
2. Janeway CA, Travers PJ, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology*. 2005;6th edition
3. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunological Reviews*. 2006;212:60-73.
4. Read S, Greenwald R, Izcue A, et al. Blockade of CTLA-4 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *Journal of Immunology*. 2006;177:4376-4383.
5. Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126:15-24.
6. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;201:233-240.
7. Matuszewski D, Kivisakk P, He B, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 1999;5:101-104.
8. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene.[see comment]. *Science*. 2006;314:1461-1463.
9. Reid SD, Penna G, Adorini L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets.[see comment]. *Current Opinion in Immunology*. 2000;12:114-121.
10. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature Immunology*. 2001;2:585-589.
11. Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity.[see comment]. *Cell*. 2001;106:259-262.
12. Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*. 2001;106:263-266.
13. Melief CJ. Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *European Journal of Immunology*. 2003;33:2645-2654.
14. Cunliffe V, Trowsdale J. The molecular genetics of human chromosome 6. *Journal of Medical Genetics*. 1987;24:649-658.
15. Falk K, Rotzschke O, Stevanovi S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 1991;351:290-296.
16. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 1987;329:506-512.
17. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1.[see comment]. *Nature*. 1993;364:33-39.
18. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *New England Journal of Medicine*. 2000;343:702-709.
19. Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature*. 1992;357:375-379.
20. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry*. 1996;65:801-847.
21. Groettrup M, Kraft R, Kostka S, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *European Journal of Immunology*. 1996;26:863-869.
22. Gaczynska M, Rock KL, Spies T, Goldberg AL. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91:9213-9217.
23. Yewdell JW, Anton LC, Bennink JR. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *Journal of Immunology*. 1996;157:1823-1826.
24. Reits EA, Vos JC, Gromme M, Neeffjes J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins.[see comment]. *Nature*. 2000;404:774-778.
25. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes.[see comment]. *Nature*. 2000;404:770-774.
26. Shepherd JC, Schumacher TN, Ashton-Rickardt PG, et al. TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective.[erratum appears in *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):613; PMID: 8242737]. *Cell*. 1993;74:577-584.
27. Hammond C, Helenius A. Quality control in the secretory pathway. *Current Opinion in Cell Biology*. 1995;7:523-529.
28. Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*. 1996;5:103-114.
29. Marrack P, Kappler J. Positive selection of thymocytes bearing alpha beta T cell receptors. *Current Opinion in Immunology*. 1997;9:250-255.
30. Sprent J, Webb SR. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Current Opinion in Immunology*. 1995;7:196-205.

31. Young AJ. The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node in vivo. *Seminars in Immunology*. 1999;11:73-83.
32. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annual Review of Immunology*. 1994;12:735-773.
33. Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *Journal of Clinical Immunology*. 2002;22:1-7.
34. Buslepp J, Wang H, Biddison WE, Appella E, Collins EJ. A correlation between TCR Valpha docking on MHC and CD8 dependence: implications for T cell selection.[see comment]. *Immunity*. 2003;19:595-606.
35. Weber J. Peptide vaccines for cancer. *Cancer Investigation*. 2002;20:208-221.
36. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annual Review of Immunology*. 1994;12:337-365.
37. Sahin U, Tureci O, Pfreundschuh M. Serological identification of human tumor antigens. *Current Opinion in Immunology*. 1997;9:709-716.
38. Schirle M, Keilholz W, Weber B, et al. Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *European Journal of Immunology*. 2000;30:2216-2225.
39. Schultze JL, Vonderheide RH. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens.[see comment][erratum appears in *Trends Immunol* 2001 Oct;22(10):581]. *Trends in Immunology*. 2001;22:516-523.
40. Ribas A, Butterfield LH, Glaspy JA, Economou JS. Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21:2415-2432.
41. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94:1914-1918.
42. Wolfel T, Van Pel A, Brichard V, et al. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *European Journal of Immunology*. 1994;24:759-764.
43. Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, et al. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *Journal of Immunology*. 1995;154:3961-3968.
44. Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, et al. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;183:1185-1192.
45. Fisk B, Savary C, Hudson JM, et al. Changes in an HER-2 peptide upregulating HLA-A2 expression affect both conformational epitopes and CTL recognition: implications for optimization of antigen presentation and tumor-specific CTL induction. *Journal of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunology*. 1995;18:197-209.
46. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*. 1994;54:4855-4878.
47. Rensing ME, Sette A, Brandt RM, et al. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *Journal of Immunology*. 1995;154:5934-5943.
48. Zarling AL, Ficarro SB, White FM, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH. Phosphorylated peptides are naturally processed and presented by major histocompatibility complex class I molecules in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 2000;192:1755-1762.
49. Haurum JS, Hoier IB, Arsequell G, et al. Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 1999;190:145-150.
50. Hanada K, Yewdell JW, Yang JC. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing.[see comment]. *Nature*. 2004;427:252-256.
51. Warren EH, Vigneron NJ, Gavin MA, et al. An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order.[see comment]. *Science*. 2006;313:1444-1447.
52. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Advances in Immunology*. 2000;74:181-273.
53. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;195:161-169.
54. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*. 1999;10:105-115.
55. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *American Journal of Medicine*. 1977;63:125-130.
56. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute*. 1960;25:85-109.

57. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1999;341:164-172.
58. Sillaber C, Mayerhofer M, Agis H, et al. Chronic myeloid leukemia: pathophysiology, diagnostic parameters, and current treatment concepts. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 2003;115:485-504.
59. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph¹ translocation. *Nature*. 1985;315:758-761.
60. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*. 1986;233:212-214.
61. Bernards A, Rubin CM, Westbrook CA, Paskind M, Baltimore D. The first intron in the human c-abl gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukemia. *Molecular & Cellular Biology*. 1987;7:3231-3236.
62. Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *New England Journal of Medicine*. 1988;319:990-998.
63. Shah NP, Witte ON, Denny CT. Characterization of the BCR promoter in Philadelphia chromosome-positive and -negative cell lines. *Molecular & Cellular Biology*. 1991;11:1854-1860.
64. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*. 1984;37:1035-1042.
65. Muller AJ, Young JC, Pendergast AM, et al. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Molecular & Cellular Biology*. 1991;11:1785-1792.
66. Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Research*. 1970;30:2213-2222.
67. Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell*. 1989;58:669-678.
68. Van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends in Cell Biology*. 1999;9:179-186.
69. McWhirter JR, Wang JY. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Embo J*. 1993;12:1533-1546.
70. Kipreos ET, Wang JY. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science*. 1992;256:382-385.
71. Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell*. 1994;77:121-131.
72. Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, et al. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage.[see comment][erratum appears in *Nature* 1999 Aug 19;400(6746):792]. *Nature*. 1999;399:814-817.
73. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Molecular & Cellular Biology*. 1993;13:7587-7595.
74. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:3343-3356.
75. Pendergast AM, Gishizky ML, Havlik MH, Witte ON. SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Mol Cell Biol*. 1993;13:1728-1736.
76. Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem*. 1994;269:22925-22928.
77. Li S, Couvillon AD, Brasher BB, Van Etten RA. Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *Embo J*. 2001;20:6793-6804.
78. Bhat A, Kolibaba K, Oda T, Ohno-Jones S, Heaney C, Druker BJ. Interactions of CBL with BCR-ABL and CRKL in BCR-ABL-transformed myeloid cells. *J Biol Chem*. 1997;272:16170-16175.
79. Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Molecular & Cellular Biology*. 1995;15:5531-5541.
80. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, et al. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood*. 1995;86:726-736.
81. Frank DA, Varticovski L. BCR/abl leads to the constitutive activation of Stat proteins, and shares an epitope with tyrosine phosphorylated Stats. *Leukemia*. 1996;10:1724-1730.
82. Hakansson P, Segal D, Lassen C, et al. Identification of genes differentially regulated by the P210 BCR/ABL1 fusion oncogene using cDNA microarrays. *Experimental Hematology*. 2004;32:476-482.
83. Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie K, Trujillo JM, Keating MJ, Gutterman JU. Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha A in chronic myelogenous leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1986;314:1065-1069.

84. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annual Review of Biochemistry*. 1998;67:227-264.
85. Druker BJ, Sawyers CL, Capdeville R, Ford JM, Baccarani M, Goldman JM. Chronic myelogenous leukemia. *Hematology*. 2001;87-112.
86. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res*. 1996;56:100-104.
87. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2:561-566.
88. Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. Chronic myeloid leukemia. *Hematology*. 2003;132-152.
89. Jones RJ, Matsui WH, Smith BD. Cancer stem cells: are we missing the target? *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96:583-585.
90. von Bubnoff N, Peschel C, Duyster J. Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia*. 2003;17:829-838.
91. von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study.[see comment]. *Lancet*. 2002;359:487-491.
92. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*. 2006;107:4532-4539.
93. Gratwohl A, Hermans J, Apperley J, et al. Acute graft-versus-host disease: grade and outcome in patients with chronic myelogenous leukemia. Working Party Chronic Leukemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 1995;86:813-818.
94. Storek J, Gooley T, Siadak M, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation may be associated with a high risk of chronic graft-versus-host disease.[see comment]. *Blood*. 1997;90:4705-4709.
95. Antin JH. Graft-versus-leukemia: no longer an epiphenomenon. *Blood*. 1993;82:2273-2277.
96. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990;76:2462-2465.
97. Jones RJ, Bedi A. Biology of chronic myeloid leukemia and its relevance to autologous bone marrow transplantation. *Current Opinion in Oncology*. 1994;6:122-126.
98. Clark RE, Dodi IA, Hill SC, et al. Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein. *Blood*. 2001;98:2887-2893.
99. Bocchia M, Wentworth PA, Southwood S, et al. Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules. *Blood*. 1995;85:2680-2684.
100. Chen W, Peace DJ, Rovira DK, You SG, Cheever MA. T-cell immunity to the joining region of p210BCR-ABL protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89:1468-1472.
101. Norbury LC, Clark RE, Christmas SE. b3a2 BCR-ABL fusion peptides as targets for cytotoxic T cells in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2000;109:616-621.
102. Knights AJ, Weinzierl A.O., Guinn B., Mueller L., Mufti G.J., Stevanovic S., Pawelec G. A novel MHC-associated Proteinase 3 peptide isolated from primary chronic myeloid leukaemia cells further supports the significance of this antigen for the immunotherapy of myeloid leukaemias. *Leukemia*. 2006;20:1067-1072.
103. Posthuma EF, van Bergen CA, Kester MG, et al. Proteosomal degradation of BCR/ABL protein can generate an HLA-A*0301-restricted peptide, but high-avidity T cells recognizing this leukemia-specific antigen were not demonstrated. *Haematologica*. 2004;89:1062-1071.
104. Chen W, Qin H, Reese VA, Cheever MA. CTLs specific for bcr-abl joining region segment peptides fail to lyse leukemia cells expressing p210 bcr-abl protein. *J Immunother*. 1998;21:257-268.
105. Bocchia M, Gentili S, Abruzzese E, et al. Effect of a p210 multipeptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial.[see comment]. *Lancet*. 2005;365:657-662.
106. Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T, et al. Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood*. 2000;95:1781-1787.
107. Dengler R, Munstermann U, al-Batran S, et al. Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells. *Br J Haematol*. 1995;89:250-257.
108. Rao NV, Wehner NG, Marshall BC, Gray WR, Gray BH, Hoidal JR. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266:9540-9548.

109. Bories D, Raynal MC, Solomon DH, Darzynkiewicz Z, Cayre YE. Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cell*. 1989;59:959-968.
110. Goldschmeding R, van der Schoot CE, ten Bokkel Huinink D, et al. Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*. 1989;84:1577-1587.
111. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Champlin RE, Davis MM. A PR1-human leukocyte antigen-A2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic T lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukemia. *Cancer Research*. 1999;59:2675-2681.
112. Buzyn A, Ostankovitch M, Zerbib A, et al. Peptides derived from the whole sequence of BCR-ABL bind to several class I molecules allowing specific induction of human cytotoxic T lymphocytes. *European Journal of Immunology*. 1997;27:2066-2072.
113. Yotnda P, Firat H, Garcia-Pons F, et al. Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;101:2290-2296.
114. Nieda M, Nicol A, Kikuchi A, et al. Dendritic cells stimulate the expansion of bcr-abl specific CD8+ T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1998;91:977-983.
115. Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksa OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood*. 1996;88:3522-3527.
116. Yasukawa M, Ohminami H, Kojima K, et al. HLA class II-restricted antigen presentation of endogenous bcr-abl fusion protein by chronic myelogenous leukemia-derived dendritic cells to CD4(+) T lymphocytes. *Blood*. 2001;98:1498-1505.
117. Sun JY, Krouse RS, Forman SJ, et al. Immunogenicity of a p210(BCR-ABL) fusion domain candidate DNA vaccine targeted to dendritic cells by a recombinant adeno-associated virus vector in vitro. *Cancer Research*. 2002;62:3175-3183.
118. Mannering SI, McKenzie JL, Fearnley DB, Hart DN. HLA-DR1-restricted bcr-abl (b3a2)-specific CD4+ T lymphocytes respond to dendritic cells pulsed with b3a2 peptide and antigen-presenting cells exposed to b3a2 containing cell lysates. *Blood*. 1997;90:290-297.
119. Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood*. 2001;98:49-56.
120. Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:237-246.
121. Watari K, Tojo A, Nagamura-Inoue T, et al. Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. *FEBS Lett*. 2000;466:367-371.
122. Adams SP, Sahota SS, Mijovic A, et al. Frequent expression of HAGE in presentation chronic myeloid leukaemias. *Leukemia*. 2002;16:2238-2242.
123. Boissel N, Rea D, Tieng V, et al. BCR/ABL Oncogene Directly Controls MHC Class I Chain-Related Molecule A Expression in Chronic Myelogenous Leukemia. *J Immunol*. 2006;176:5108-5116.
124. Wu J, Song Y, Bakker AB, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10.[comment]. *Science*. 1999;285:730-732.
125. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285:727-729.
126. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, et al. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell*. 1978;14:9-20.
127. Appel S, Rupf A, Weck MM, et al. Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1928-1940.
128. Smyth MJ, Kelly JM, Sutton VR, et al. Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001;70:18-29.
129. Mocellin S, Semenzato G, Mandruzzato S, Riccardo Rossi C. Part II: Vaccines for haematological malignant disorders. *Lancet Oncology*. 2004;5:727-737.
130. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2000;6:1018-1023.
131. Neudorfer J, Schmidt B, Huster K, et al. Reversible HLA multimers (Streptamers) for the isolation of human cytotoxic T lymphocytes functionally active against tumor- and virus-derived antigens. *J Immunol Methods*. 2007;320(1-2):119-131.
132. Meyer zum Büschenfelde C, Nicklisch N, Rose-John S, Peschel C, Bernhard H. Generation of tumor-reactive CTL against the tumor-associated antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells derived from CD34+ hemopoietic progenitor cells. *Journal of Immunology*. 2000;165:4133-4140.

133. Cebo C, Da Rocha S, Wittnebel S, et al. The decreased susceptibility of Bcr/Abl targets to NK cell-mediated lysis in response to imatinib mesylate involves modulation of NKG2D ligands, GM1 expression, and synapse formation. *Journal of Immunology*. 2006;176:864-872.
134. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002;99:319-325.
135. Yoshino I, Peoples GE, Goedegebuure PS, Maziarz R, Eberlein TJ. Association of HER2/neu expression with sensitivity to tumor-specific CTL in human ovarian cancer. *Journal of Immunology*. 1994;152:2393-2400.
136. Paschka P, Muller MC, Merx K, et al. Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission. *Leukemia*. 2003;17:1687-1694.
137. Arber W. Restriction endonucleases. *Angewandte Chemie International Ed in English*. 1978;17:73-79.
138. Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique*. 1990;48:579-582.
139. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Immunology*. 1995;154:3821-3835.
140. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*. 1997;27:3135-3142.
141. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal*. 1982;1:841-845.
142. 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;14:181-196.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Dirk Haller danke ich für die Übernahme dieser Dissertation an der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technische Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Frau apl. Prof. Dr. Helga Bernhard, in deren Arbeitsgruppe diese Arbeit angefertigt wurde, für das interessante Projekt, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die Unterstützung bei der Verfassung dieser Arbeit.

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

Herrn Prof. Dr. Justus Duyster danke ich für seine Unterstützung bei allen Fragestellungen rund um BCR-ABL und chronisch myeloischer Leukämie und die zur Verfügung gestellten DNA-Konstrukte.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Heinke Conrad, Frau Julia Müller, Frau Barbara Kast, Frau Kathrin Hofer und Frau Kerstin Gebhard für die tatkräftige Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Duyster bedanke ich mich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, insbesondere bei Herrn Dr. Cornelius Miething und Frau Jana Sänger, die mir bei allen Fragen und Problemen rund um BCR-ABL hilfreich zur Seite standen.

Meinen Eltern danke ich für Ihre Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich auch noch bei Regina bedanken, die mir mit viel Geduld bei allen Fragen und Problemen hilfreich zur Seite stand.

Appendix:

Zur Publikation im Fachmagazin *Blood* eingereichtes Manuskript:

The immunogenicity of Bcr-Abl expressing dendritic cells is dependent on the Bcr-Abl kinase activity and dominated by Bcr-Abl regulated antigens

Florian Scheich, Justus Duyster, Christian Peschel and Helga Bernhard

Department of Hematology/Oncology, Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich, Munich, Germany

Short title: Immunogenicity of Bcr-Abl⁺ cells

Scientific category: Immunobiology

Word counts abstract: 140

Word counts manuscript: 2.295

Correspondence:

Helga Bernhard, MD

3rd Department of Internal Medicine, Hematology/Oncology

Klinikum rechts der Isar

Technical University of Munich

Ismaninger Straße 22

81675 Munich, Germany

e-mail: helga.bernhard@lrz.tum.de

Abstract

In Ph⁺ chronic myeloid leukemia (CML), the constitutively active Bcr-Abl kinase leads to the upregulation and activation of multiple genes, which may subsequently result in the expression of leukemia-associated antigens. In this study, we investigated the immunogenicity of Bcr-Abl regulated antigens by stimulating CD8⁺ T lymphocytes with autologous dendritic cells transfected with RNA coding for Bcr-Abl wild type or a kinase deficient mutant. Significant HLA class I-restricted T-cell responses were detected against antigens regulated by the Bcr-Abl kinase, but not towards the Bcr-Abl protein itself. The T-cell repertoire of a patient with CML in major molecular remission due to imatinib mesylate was also dominated by T cells directed against Bcr-Abl regulated antigens. These results encourage the development of immunotherapeutical approaches against Bcr-Abl regulated antigens for the treatment of CML patients with residual disease following therapy with Bcr-Abl kinase inhibitors.

Introduction

The initiating oncogenic event leading to the development of Philadelphia chromosome-positive (Ph⁺) chronic myeloid leukemia (CML) is the t(9;22) translocation, in which c-ABL gene sequences from chromosome 9 are fused to breakpoint-cluster-region (BCR) gene sequences on chromosome 22. The product of this chimeric gene is the constitutively active tyrosine kinase Bcr-Abl, which leads to the activation and enhanced expression of multiple genes and consecutively results in the malignant phenotype of a Ph⁺ cell. The gene expression pattern of the CML bone marrow is not static, but constantly undergoes changes according to the phase of disease.¹

Hence, the leukemia-specific Bcr-Abl oncogenic protein is a favored target for the development of new therapeutics for the treatment of CML, including the small molecule kinase inhibitors. Impressive response rates are achieved treating chronic myeloid leukemia in chronic phase with the Bcr-Abl kinase inhibitor imatinib mesylate (IM, Gleevec; Novartis, Basel, Switzerland).² However, resistance to IM frequently evolves in advanced-phase CML due to Bcr-Abl gene amplification and mutations.³ The second generation kinase inhibitors may be also associated with clinical resistance due to a spectrum of point mutations.⁴ In addition, the kinase inhibitors may have differential effects on CML cells depending on their state of differentiation. It has been shown that IM is highly toxic to differentiated CML progenitors, but CML stem cells are relatively or even completely resistant to the drug.⁵ The insensitivity of quiescent leukemic stem cells towards kinase inhibitors may lead to the selective outgrowth of these cells and finally to disease relapse even after years of continuous treatment.

Cytotoxic T lymphocytes have the potential to eliminate CML stem cells. Proof of principle has been demonstrated in an exceptional clinical situation where donor lymphocyte infusions can induce complete cytogenetic remissions of CML relapsed after allogeneic stem cell

transplantation.⁶ The donor's T lymphocytes include allorestricted T cells, which may ideally combine antigen specificity, high avidity, and a superior leukemia-lytic function. However, most of the allorestricted T cells display broad peptide specificity or even a peptide-independent HLA-dominant binding, both characteristics leading to a wide reactivity and potentially to graft-versus-host disease. Therefore, the current immunotherapeutical concepts focus on targeting those antigens that are preferentially or even exclusively expressed by CML cells, including the CML stem cell.

The research on developing CML-directed immunotherapies has focused on the Bcr-Abl protein, because firstly, Bcr-Abl contributes to the malignant phenotype and, therefore, is exclusively expressed by the malignant cells and secondly, the joining region segment of p210 Bcr-Abl may serve as a neoantigen being recognized by high avidity cytolytic T cells with an excellent tumor recognition efficiency.⁷ In humans, it has been demonstrated that a nonapeptide derived from the Bcr-Abl b3a2 fusion region is naturally presented in context with HLA-A*0301 and can be recognized by pre-existing T cells.⁸ However, the most recent research on immunogenic peptides spanning the fusion region uncovered some limitations of this approach: firstly, the number of break point peptides potentially being presented in context with HLA class I molecules is limited;⁹ secondly, cytotoxic T cell responses against junctional peptides were rarely detected and, in particular, the presence of high avidity T cells could not to be demonstrated in CML patients with or without immunotherapy.^{10,11} These observations indicate that the Bcr-Abl break point peptides may not be highly immunogenic and that other antigens than Bcr-Abl seem to be responsible for the immunogenicity of CML cells. This leads to the hypothesis that not Bcr-Abl itself, but genes that are upregulated by the Bcr-Abl kinase activity may represent the crucial antigens for the induction of a cytotoxic T-cell response against Ph⁺ CML cells.^{12,13} For example, the tumor-associated antigens PRAME and PCNA have been identified as Bcr-Abl inducible genes, which are further expressed as proteins and presented as peptides with HLA class I.^{14,15} However, the

dominance of these Bcr-Abl regulated antigens in a CML-directed T-cell response remains unclear.

In this study, we demonstrate that the constitutively active kinase domain of Bcr-Abl has a key role in enhancing the immunogenicity of Bcr-Abl⁺ cells as the HLA class I-restricted T-cell responses were dominated by Bcr-Abl regulated antigens, and not by Bcr-Abl itself. The inhibition of Bcr-Abl kinase activity by IM significantly diminished the immunogenicity of Bcr-Abl⁺ cells. These results will contribute to the design of immunotherapeutical approaches for the treatment of CML patients with minimal residual disease, in particular following successful induction therapy with Bcr-Abl kinase inhibitors.

Materials and methods

Site-directed mutagenesis of Bcr-Abl

In order to knock down the Bcr-Abl kinase domain, the lysine of codon 1172 of the p210 Bcr-Abl wild type (WT) was changed to an arginine by an adenine-to-guanine mutation (AAG to AGG). The introduction of the mutation was performed in a two-step PCR approach using mutated primers. The resultant construct Bcr-Abl kinase deficient (KD) variant carried the previously described mutation K1172R.¹⁶ Inactivation of the kinase domain in the new construct Bcr-Abl KD was confirmed in western blot analysis (Figure S1A).

Production of in vitro transcribed mRNA

The in vitro transcription reaction to create mRNA of the Bcr-Abl WT and KD constructs was performed at CureVac GmbH (Tuebingen, Germany). The constructs were cloned into a T7 vector containing a poly-A sequence and a stabilizing sequence derived from the untranslated region of the *Xenopus laevis* β -globin gene¹⁷ between the Bcr-Abl gene and the poly-A tail.

Stimulation of T cells towards Bcr-Abl regulated antigens

The study was approved by the Institutional Ethics Committee. The PBMCs were derived from healthy donors and CML patients, and the CD8⁺ T cells were isolated using MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) after indirect antibody staining. The isolated CD8⁺ T cells were stimulated with DCs that had been transfected with the mRNA coding for Bcr-Abl WT and KD, respectively. 1×10^5 CD8⁺ T cells and 5×10^3 transfected DCs were co-cultured in 200 μ l AIM-V medium /well (Gibco, BRL) of a 96-well round bottom plate with 5% human AB-Serum (Milan Analytica AG), 1000U/ml IL6 and 10ng/ml IL12. Secondary and third stimulations were set up as described above, except that the T-cell cultures were

split 1:2 and 50U/ml IL2 and 5ng/ml IL7 were added instead of IL6 and IL12. The term “T-cell population” refers to the CD8⁺ T cells that had been stimulated with autologous DCs together in one well of a 96-well-plate.

Specificity analysis of stimulated T cells

Following three stimulations of CD8⁺ T cells with autologous Bcr-Abl WT and Bcr-Abl KD expressing DCs, the production of IFN- γ or granzyme B by the stimulated T cells was determined in an ELISpot assay (for details, see supplemental Materials). Median spot values and their interquartile range were calculated for each set of T-cell populations using Delta Graph software (Delta Graph 5.5.1, Red Rock Software, Salt Lake City, UT). For the comparison of different groups the P value was calculated in a Mann-Whitney test. IFN- γ spot indices (SI) were calculated to compare the responses in the healthy donors and the CML patient as follows: mean spot value against Bcr-Abl WT⁺ DCs / mean spot value against control DCs.

Results and Discussion

Leukemia associated antigens can be upregulated in DCs expressing kinase active Bcr-Abl.

In this study, we have imitated the physiological interaction of Bcr-Abl⁺ DCs and autologous CD8⁺ T lymphocytes in an *in vitro* priming model in order to analyze the T-cell repertoire towards Bcr-Abl expressing cells. For this purpose we generated DCs expressing Bcr-Abl as a WT or KD variant following transfection with the respective RNA (Figure S1A). To confirm the tyrosine kinase activity of Bcr-Abl WT in the RNA-transfected DCs, we documented the enhanced expression of PRAME, an antigenic protein that is known to be upregulated by Bcr-Abl (Figure S1B).¹⁴ Vice versa, the expression of PRAME was unchanged in DCs that had been transfected with the inactive KD variant of Bcr-Abl. Using this experimental setting, we could identify two additional antigens that are induced by the Bcr-Abl kinase activity: First, the upregulation of PR3 - an antigen known to be overexpressed in CML cells and to be immunogenic in CML patients;^{18,19} second, the *de novo* expression of HAGE - a cancer-testis antigen frequently expressed in CML.²⁰ The close relationship between Bcr-Abl activity and expression of PR3 and HAGE further supports the significance of these CML associated antigens for the development of immunotherapeutical approaches against CML.

Stimulation of CD8⁺ T lymphocytes with Bcr-Abl WT⁺ DCs results in T-cell activation towards Bcr-Abl regulated antigens.

Based on our findings that Bcr-Abl expressing DCs were able to upregulate potentially immunogenic antigens, we were led to question whether these Bcr-Abl⁺ DCs were also capable of inducing a primary CTL response against the Bcr-Abl regulated antigens. To answer this question CD8⁺ T lymphocytes from healthy donors were stimulated with

autologous DCs that had been transfected with Bcr-Abl WT. Specificity and functionality of the proliferating T-cell populations were documented by analyzing their IFN- γ release in the presence of autologous DCs that had been transfected either with the functionally active Bcr-Abl WT or the kinase inactive variant Bcr-Abl KD (Figure 1A). Using this experimental setting we were able to compare the immunogenic potential of those antigens, which had been upregulated by Bcr-Abl, with the immunogenicity of the Bcr-Abl protein itself. The pattern of T cell-derived IFN- γ release strongly suggests that the Bcr-Abl molecule is not an immunodominant antigen, but that the enhanced immunogenicity of Bcr-Abl WT⁺ DCs is due to antigens upregulated by Bcr-Abl. This hypothesis was confirmed by the fact that DCs transfected with Bcr-Abl KD were unable to generate T-cell populations with superior activity towards dendritic cells expressing the wild type of Bcr-Abl (Figure 1B). The cytolytic potential of these T cells was documented by measuring their release of granzyme B (Figure 1C). Of note, the pattern of granzyme B (grzB) release upon stimulation with Bcr-Abl WT⁺ DCs and Bcr-Abl KD⁺ DCs, respectively, was identical to the results obtained by measuring IFN- γ production confirming the immunogenicity of Bcr-Abl WT⁺ DCs. In order to validate the significance of Bcr-Abl regulated antigens for the immunogenicity of Ph⁺ leukemic cells we performed T-cell stimulations with Bcr-Abl WT⁺ DCs respective Bcr-Abl KD⁺ DCs derived from an HLA-A2⁺ donor and screened the responding autologous T cells for their reactivity against T2 cells loaded with the PRAME-derived peptide p300-309 known to be naturally presented with HLA-A2.²¹ Indeed, the T cells stimulated with Bcr-Abl WT⁺ DCs, but not with Bcr-Abl KD⁺ DCs, released specifically IFN- γ against the PRAME-derived peptide p300-309, but not against the HLA-A2-binding irrelevant peptide p476-484 derived from HIVpol (data not shown).

IM reduces the immunogenicity of Bcr-Abl WT⁺ DCs.

We next addressed the question of whether the use of Bcr-Abl WT⁺ DCs pre-treated with 3 μ M of the tyrosine kinase inhibitor IM results in a reduced T-cell activation pattern as found after stimulation with Bcr-Abl KD⁺ DCs. The concentration of 3 μ M IM corresponds to the average serum level of patients on the standard therapeutic dose of 400 mg p.o. /d and was shown to inhibit completely the Bcr-Abl kinase activity in Ph⁺ cell lines (data not shown). The treatment of Bcr-Abl WT⁺ DCs with IM resulted in significantly decreased T-cell responses confirming that the active kinase domain of Bcr-Abl is a pivotal element for the immunogenicity of Bcr-Abl⁺ DCs (Figure 1D). Of note, a suppressive effect of IM itself on DC maturation and function, which had been previously observed in a different model²², was not apparent in our experimental setting (Figure S2).

T cells stimulated with Bcr-Abl WT⁺ DCs recognize Ph⁺ leukemia cells in an HLA-dependent manner.

It has been shown that the Bcr-Abl oncogene controls the expression of MHC class I chain-related molecule A (MICA), one of the ligands for the NK cell-activating receptor NKG2D.²³ As not only NK cells, but also CD8⁺ T cells can express NKG2D²⁴, the herein shown T-cell activation via Bcr-Abl WT⁺ DCs could potentially be independent of the antigen/TCR interaction. We excluded this possibility by showing that the CD8⁺ T cells recognized the Bcr-Abl related antigens in an HLA-dependent manner, because the blockade with an inhibiting antibody against HLA class I abrogated the IFN- γ release (Figure 2A). In addition, the CD8⁺ T-cell populations generated with Bcr-Abl WT⁺ DCs recognized the Bcr-Abl regulated antigens also on HLA-A2 matched Ph⁺ leukemia cell lines (Figure 2B) as well as Ph⁺ primary leukemic PBMCs derived from a patient in chronic phase CML (Figure 2C).

These results confirm firstly, the HLA-dependent antigen recognition and secondly, the relevance of the T cell-defined antigens as CML antigens.

Bcr-Abl⁺ DCs from a CML patient induce T-cell activity against Bcr-Abl regulated antigens.

The clinical goal of our studies is the immunotherapy of CML patients. Therefore, we addressed the question of whether the T-cell response of a CML patient is also predominantly directed against Bcr-Abl regulated antigens rather than against Bcr-Abl itself. As CML patients with stable residual disease seem to be the most promising patient population for successful immunological therapies¹¹, we determined the immune response of a CML patient in major molecular remission under IM treatment. The patient's T-cell repertoire was comparable to those of healthy donors and was also dominated by T cells directed against Bcr-Abl regulated antigens and not against Bcr-Abl itself (Figure 2D). The comparison of IFN- γ spot indices detected in healthy donors and the above described CML patient confirmed these results (Figure 2E).

Our findings suggest that immunotherapeutical interventions directed against multiple immunogenic Bcr-Abl associated antigens may be superior to vaccinations solely based on Bcr-Abl break point peptides.^{11,25} Targeting Bcr-Abl directly by small inhibitors and indirectly by vaccine- or T cell-based immunotherapies combines two different treatment modalities with a potentially synergistic effect: Firstly, Bcr-Abl kinase inhibitors induce major molecular remissions in a high percentage of CML patients, a situation that is favorable for the success of immunotherapeutical approaches; secondly, immunotherapies have the potential to overcome resistance towards kinase inhibitors by eliminating the Ph⁺ CML stem cell.

Acknowledgments

We thank Julia Neudorfer for excellent technical assistance and Dirk H. Busch for HLA/peptide multimer production. We also thank Alois Wölpl (Laboratory for Immunogenetics, Ludwig Maximilian University, Munich) for HLA typing.

This work was supported in part by grants from the German José Carreras Leukemia Foundation and the German Research Council (SFB 456).

Authorship

F.S. performed research, collected and analyzed data, and wrote the manuscript; J.D. provided vital tools and designed research; C.P. supervised research; H.B. designed and supervised research, reviewed the data, and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Radich JP, Dai H, Mao M, et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006.
2. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355:2408-2417.
3. von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet*. 2002;359:487-491.
4. von Bubnoff N, Manley PW, Mestan J, Sanger J, Peschel C, Duyster J. Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107). *Blood*. 2006;108:1328-1333.
5. Bhatia R, Holtz M, Niu N, et al. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood*. 2003;101:4701-4707.
6. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990;76:2462-2465.
7. Chen W, Peace DJ, Rovira DK, You S-G, Cheever MA. T-cell immunity to the joining region of p210 Bcr-Abl protein. *PNAS*. 1992;89:1468-1472.
8. Clark RE, Dodi IA, Hill SC, et al. Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein. *Blood*. 2001;98:2887-2893.
9. Bocchia M, Wentworth PA, Southwood S, et al. Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules. *Blood*. 1995;85:2680-2684.

10. Posthuma EF, van Bergen CA, Kester MG, et al. Proteosomal degradation of BCR/ABL protein can generate an HLA-A*0301-restricted peptide, but high-avidity T cells recognizing this leukemia-specific antigen were not demonstrated. *Haematologica*. 2004;89:1062-1071.
11. Bocchia M, Gentili S, Abruzzese E, et al. Effect of a p210 multi-peptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *Lancet*. 2005;365:657-662.
12. Deininger MWN, Vieira S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2000;60:2049-2055.
13. Grünebach F, Mirakaj, V., Mirakaj, V., Müller, M.R., Brummendorf, T., Brossart, P. BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 2006;66:5892-5900.
14. Watari K, Tojo A, Nagamura-Inoue T, et al. Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. *FEBS Lett*. 2000;466:367-371.
15. Hakansson P, Segal D, Lassen C, et al. Identification of genes differentially regulated by the P210 BCR/ABL1 fusion oncogene using cDNA microarrays. *Experimental Hematology*. 2004;32:476-482.
16. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Wlodarski P, et al. The SH3 domain contributes to BCR/ABL-dependent leukemogenesis in vivo: role in adhesion, invasion, and homing. *Blood*. 1998;91:406-418.
17. Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*. 2006;15:4009-4017.

18. Dengler R, Munstermann U, al-Batran S, et al. Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells. *Br J Haematol.* 1995;89:250-257.
19. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med.* 2000;6:1018-1023.
20. Adams SP, Sahota SS, Mijovic A, et al. Frequent expression of HAGE in presentation chronic myeloid leukaemias. *Leukemia.* 2002;16:2238-2242.
21. Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity.* 1997;6:199-208.
22. Appel S, Rupf A, Weck MM, et al. Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clin Cancer Res.* 2005;11:1928-1940.
23. Cebo C, DaRocha S, Wittnebel S, et al. The decreased susceptibility of Bcr/Abl targets to NK cell-mediated lysis in response to imatinib mesylate involves modulation of NKG2D ligands, GM1 expression, and synapse formation. *J Immunol.* 2006;176:864-872.
24. Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285:727-729.
25. Cathcart K, Pinilla-Ibarz J, Korontsvit T, et al. A multivalent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2004;103:1037-1042.

Figure Legends**Figure 1. The immunogenicity of Bcr-Abl expressing dendritic cells is dependent on the Bcr-Abl kinase activity.**

(A) CD8⁺ T-cell populations from a healthy donor (HD#1, Table S2) were primed with autologous Bcr-Abl WT⁺ DCs. IFN- γ production was tested one week after the third stimulation in an ELISpot assay. Every single T-cell population was divided into three aliquots and co-incubated with autologous Bcr-Abl WT⁺ DCs, Bcr-Abl KD⁺ DCs or mock-transfected DCs to provoke IFN- γ release by the T cells. The scatter plots show the number of IFN- γ spots produced by every T-cell population (n = 60) after incubation with the respective DCs (left and middle). Incubation with Bcr-Abl WT⁺ DCs resulted in higher IFN- γ production compared to Bcr-Abl KD⁺ DCs or mock transfected DCs. The magnitudes of responses against Bcr-Abl WT⁺ (grey box) or -KD⁺ DCs (white box) were compared in a box plot showing the median distribution of IFN- γ -producing T-cell populations (right). Black lines in boxes indicate median spot value; boxes represent interquartile range; whiskers extend from the 10th percentile at the bottom and the 90th percentile at the top. (B) CD8⁺ T-cell populations from the same donor were primed with autologous Bcr-Abl KD⁺ DCs. IFN- γ production of T cells was assessed one week after the third stimulation in an ELISpot assay (left and middle). Incubation with Bcr-Abl WT⁺ or Bcr-Abl KD⁺ DCs as stimulator cells did not result in an increased IFN- γ production compared to the mock control. Statistical evaluation of the magnitudes of responses against Bcr-Abl WT⁺ DCs (grey box) or Bcr-Abl KD⁺ DCs (white box) (right). (A,B) Similar results have been obtained from additional two healthy donors (HD#2 and HD#4). (C) GrzB release by CD8⁺ T cells after three stimulations with Bcr-Abl WT⁺ DC (left) or Bcr-Abl KD⁺ DC (right) derived from HD#3 in the presence of autologous Bcr-Abl WT⁺ DCs (grey boxes) and Bcr-Abl KD⁺ DCs (white boxes) (*P<.001; **P n.s.; Mann-Whitney test). (D) IFN- γ release of CD8⁺ T-cell populations (n = 60) that had

been generated by repetitive stimulation with Bcr-Abl WT⁺ DCs derived from HD#5, either untreated (left) or IM-treated (right). To provoke IFN- γ release the autologous Bcr-Abl WT⁺ DCs were pre-treated with IM or left untreated prior to co-culture with the established T-cell populations. The box plot shows the median distribution of IFN- γ producing T-cell populations after incubation with untreated (grey box) or IM pre-treated Bcr-Abl WT⁺ DCs (white box) (*P<.001; **P n.s.; Mann-Whitney test).

Figure 2. The T-cell response towards Bcr-Abl⁺ leukemia cells is HLA-dependent and detectable in a CML patient.

CD8⁺ T cells from HD#3 were stimulated with autologous Bcr-Abl WT⁺ DCs and the IFN- γ production by the activated T-cell populations (n = 96) was measured by ELISpot after the third stimulation. (A) Box plot of the IFN- γ spots in the presence of following DCs: Bcr-Abl WT⁺ DCs (grey boxes) or mock transfected DCs (white boxes) treated either with mAb W6/32, IgG control antibody or without antibody. (B) CD8⁺ T lymphocytes derived from the same HLA-A2⁺ healthy donor were stimulated three times with autologous Bcr-Abl WT⁺ DCs (grey boxes) or Bcr-Abl KD⁺ DCs (white boxes). IFN- γ release of the activated T-cell populations (n=60) was measured in the presence of Bcr-Abl⁺ leukemia cell lines. The box plots show the number of IFN- γ releasing T cells upon restimulation with the HLA-A2⁺, Bcr-Abl⁺ cell lines K562-A2 and BV-173, and the HLA-A2⁻, Bcr-Abl⁺ cell line K562. (C) CD8⁺ T lymphocytes derived from an HLA-A2⁺ healthy donor (HD#3) were stimulated three times with the autologous Bcr-Abl WT⁺ DCs (grey box) or Bcr-Abl KD⁺ DCs (white box). The IFN- γ release by the activated T-cell populations (n=96) was measured in the presence of HLA-A2-matched, allogeneic PBMCs derived from an HLA-A2⁺ CML patient in chronic phase (CML patient #1). (D) IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes derived from a CML patient (CML patient #2) that had been stimulated three times with autologous DCs

transfected with Bcr-Abl WT or Bcr-Abl KD. Incubation of these pre-activated T-cell populations (n = 120) with Bcr-Abl WT transfected DCs resulted in a higher amount of IFN- γ spots than the co-culture with mock transfected DCs (left). Incubation with Bcr-Abl KD⁺ DCs did not result in a specific IFN- γ production compared to the mock control (middle). The magnitudes of responses against Bcr-Abl WT⁺ DCs (grey box) or Bcr-Abl KD⁺ DCs (white box) were statistically evaluated in a box plot showing the median distribution of IFN- γ -producing T-cell populations (right) (*P<.001; **P n.s.; Mann-Whitney test). (E) Bar graph comparing IFN- γ spot indices between three healthy donors (HD#1, HD#2, HD#4) and CML patient #2.

Figure 1

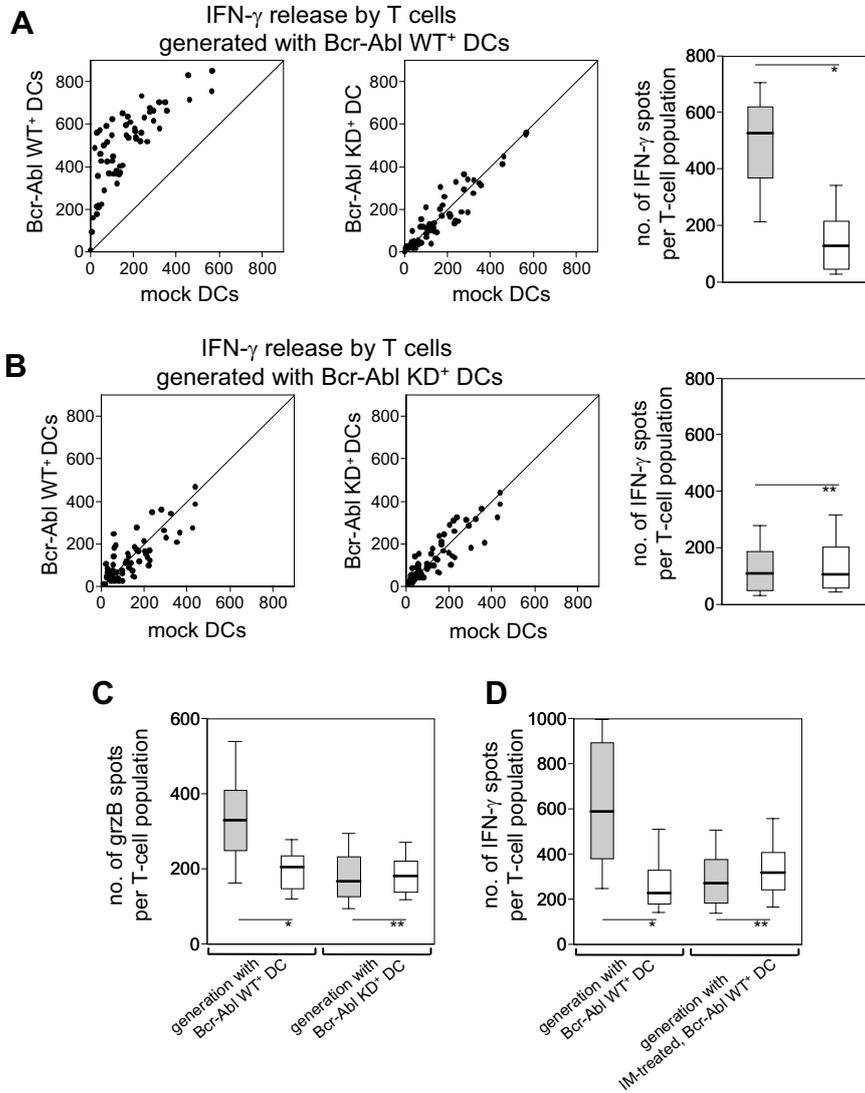


Figure 2

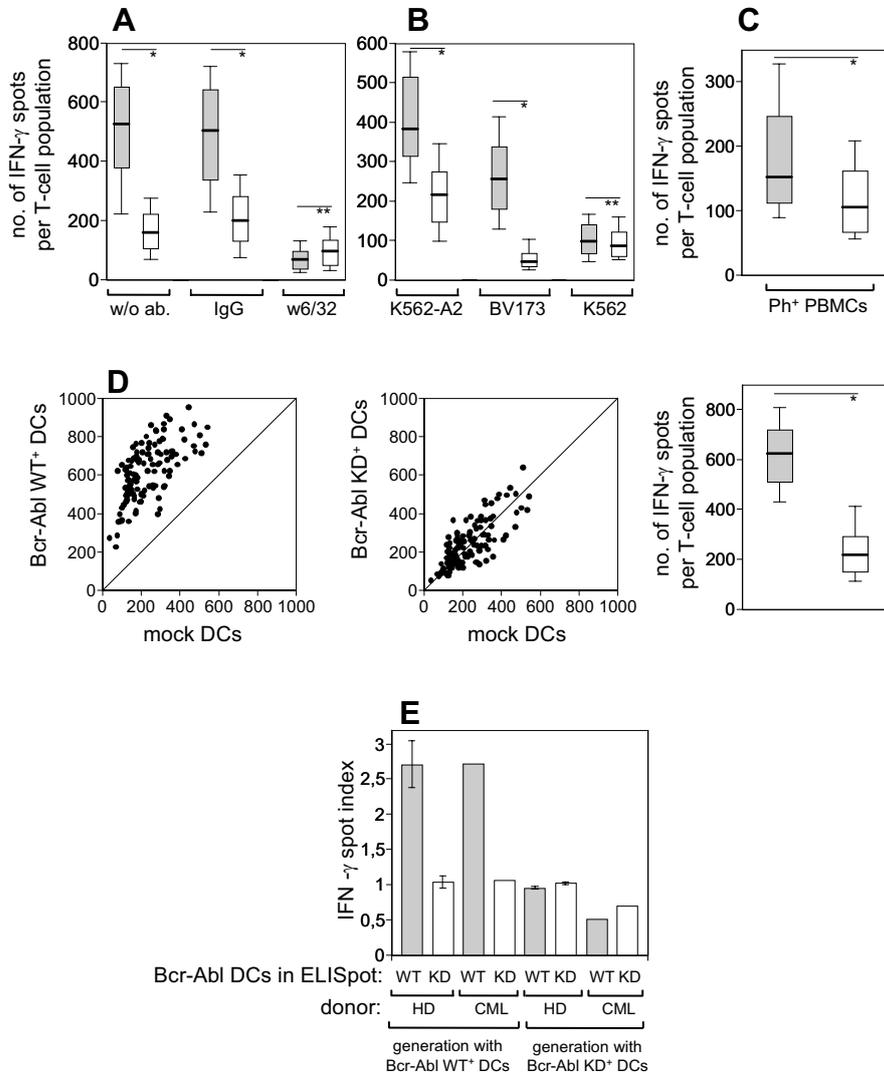


Figure S1

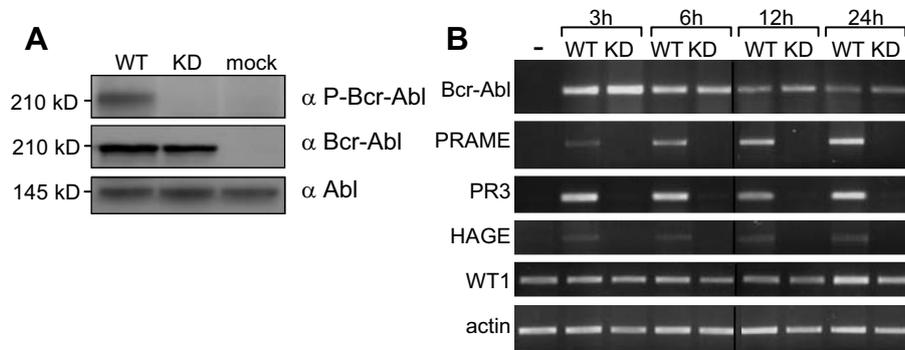


Figure S1: Regulation of leukemia-associated antigens in Bcr-Abl expressing DCs. (A) Kinase activity of the Bcr-Abl WT respective lack of kinase activity by the Bcr-Abl KD construct was documented by transducing LCLs with the appropriate retroviral construct. Mock transfected DCs were used as negative control. Protein expression was performed for phospho-Bcr-Abl, Bcr-Abl and Abl by Western blot analysis. (B) DCs were transfected with mRNA coding for Bcr-Abl WT respective -KD and the expression of the leukemia-associated antigens PRAME, PR3, HAGE, and WT1 was documented at different time points after transfection.

Figure S2

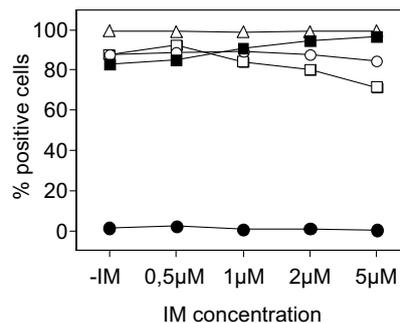


Figure S2: Influence of IM on maturation and priming capacities of DCs. Phenotype of IM pre-treated mature DCs as determined by FACS analysis with mAb against CD86 (Δ), CD83 (O), HLA-DR (\square), CD71 (\blacksquare), and CD14 (\bullet).

Table S1: HLA class I types of healthy donors and CML patients

	HLA-A	HLA-B	HLA-C
HD			
1	01/26	08/44	05/07
2	01/32	18/35	04/07
3	02	0702/1501	0304/1203
4	03/23	07/49	07
5	01/03	07/51	07/12
CML patients			
1	02	27/51	01/02
2	26/29	37/44	06/16

Supplemental Materials and methods

Primary cells and cell lines

PBMCs were harvested from buffy coats by centrifugation (880g, 17 min, RT) over a Ficoll-Hypaque solution (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) and stored in liquid nitrogen. Table S2 shows the HLA typing of the healthy donors and CML patients. The cell lines K562 and BV173 were purchased from the German Resource Center for Biological Material (Braunschweig, Germany). The K562-A2 cell line transfected with HLA-A2 was kindly provided by Thomas Wölfel (University of Mainz, Germany). The B lymphoblastoid cell lines (LCLs) were generated by EBV transformation of peripheral blood B cells from a healthy donor. Tumor cell lines and LCLs were cultured in RPMI 1640 (RP10, GIBCO, BRL) supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine.

Flow cytometry

The following PE-conjugated mAbs were used for phenotypic analyses: HLA-DR, CD86 (both from BD Biosciences, Mountain View, CA); CD83, CD14 and CD71 (all from BD Pharmingen, San Diego, CA). Conjugated isotype-matched mAbs (all from BD Biosciences) were used as controls. For A2/peptide multimer analysis the PBMCs or the cultured T-cell populations (1×10^6) were stained with 40 µg/ml of PE-conjugated A2/MelanA₂₆₋₃₅ multimer (kindly provided by Dirk H. Busch, Technical University of Munich, Germany) and FITC-conjugated CD8 antibody (CALTAG Laboratories, Burlingame, CA). Dead cells were excluded by propidium iodide staining. Fluorescence analyses were performed on a Coulter Epics XL flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL) and documented with FlowJo software (Treestar, San Carlos, CA).

Western blotting

LCLs were retrovirally transduced with the Bcr-Abl WT or KD construct using a helper virus-free amphotropic Phoenix-Moloney Murine Leukemia Virus (MMULV) vector system (G. Nolan, Stanford, CA) as previously described (R. Grudler et al. *Blood*. 2005;105:4792-4799). After two weeks of culture in RP10 (GIBCO, BRL) the LCLs were harvested. Cell lysis, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and immunoblotting were done as described previously (N. von Bubnoff et al. *Blood*.

2005;105:1652-1659). Abl antibodies were obtained from Pharmingen (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Antibodies to phosphotyrosine were purchased from Upstate Biotechnology (Biozol, Eching, Germany). Bands were visualized using an enhanced chemoluminescence (ECL) system (Amersham, Braunschweig, Germany). Western blot analyses detecting phospho-Bcr-Abl confirmed the efficient knock out of the kinase domain (Figure S1A).

RNA isolation and reverse transcription-PCR

Total RNA from DCs was isolated with RNeasy spin columns according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA was then quantified, and equal amounts were reverse transcribed into cDNA. PCR was performed with the use of 100 ng cDNA. Primers that were used included: β -actin, forward: 5'-GGC ATC GTG ATG GAC TCC-3' and reverse: 5'-GCT GGA AGG TGG ACA GCG-3'; bcr-abl, for.: 5'-TCC GCT GAC CAT CAA TAA GGA-3' and rev.: 5'-CAC TCA GAC CCT GAG GCT CAA-3'; WT1, for.: 5'-TAA CCA CAC AAC GCC CAT C-3' and rev.: 5'-AAA ACC TTC GTT CAC AGT CC-3'; proteinase3, for.: 5'-CGG CCA CAT AAC ATT TGC AC-3' and rev.: 5'-TGG CAC ATC CCC AGA TCA C-3'; HAGE, for.: 5'-CCT TTC AAT GTT ATC CTG AG-3' and rev.: 5'-CTT CGT CAA TCT GAA TA-3'. The PCR-products were electrophoresed on a 2% agarose gel. Gels were stained with ethidium bromide and then photographed.

Generation and transfection of mature DCs

Mature monocyte-derived DCs were generated as previously described (Jonuleit et al., Eur J Immunol 27:3135-3142, 1997). Prior to electroporation, mature DCs were washed once with phosphate buffered saline (PBS) and resuspended to a final concentration of 1.5×10^7 cells / ml Opti-MEM (Gibco, BRL). For electroporation 300 μ l of the cell suspension were mixed with 25 μ g of IVT mRNA and electroporated in a 0.4cm cuvette using a BioRad X-cell electroporator and a square wave protocol with 500V for 0.5ms. Afterwards the DCs were immediately placed in six well plates with 2×10^5 cells/ml in X-VIVO medium (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgium) containing 2.5% human AB-Serum (Milan Analytica, La Roche, Switzerland), 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin. The DCs were used as stimulator respective target cells 24 hours after transfection. The transfection method was validated firstly, by FACS analysis of DCs after eGFP-mRNA electroporation and secondly,

by recognition of DCs that had been electroporated with CMV-pp65-mRNA by pp65-specific CTL clones (data not shown).

Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot) assay

ELISPOT membrane plates (Millipore, Bedford, Mass.) were coated overnight with an IFN- γ or granzyme B specific antibody (Mabtech AB, Stockholm, Sweden). Autologous mature DCs electroporated with Bcr-Abl WT, -KD or an irrelevant mRNA were used as stimulator cells (2×10^4 cells/well). CTLs were washed twice in RPMI medium (Gibco, BRL) before seeding them out onto the ELISpot plates (5×10^3 cells/well). For inhibition experiments, target cells were pre-incubated at RT for 1h with 10 μ g/ml mAb W6/32 (IgG2a, Biozol, Eching, Germany) prior to the coculture. After 24h incubation at 37°C the spots were assessed using antibodies against IFN- γ and granzyme B (Mabtech), respectively, and then stained with AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) staining solution. The number of spots was counted by using an automated ELISpot reader system (KS ELISPOT, Carl Zeiss, Jena, Germany).