

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

**Generierung von zytotoxischen T-Zellen gegen das tumorassoziierte
Antigen HER2**

Heinke Conrad

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.med.vet., Dr.med.vet.habil., Dr.h.c. (Univ.
Kaposvári/Ungarn) Johann Bauer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Michael Schemann
2. Univ.-Prof. Dr.med. Christian Peschel

Die Dissertation wurde am 21.03.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 12.07.2006 angenommen.

Meiner Mutter
und Sven

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Zelluläre Tumormunität.....	1
1.1.1	T-Lymphozyten.....	1
1.1.1.1	Der T-Zell-Rezeptor-Komplex.....	1
1.1.1.2	Antigenerkennung.....	2
1.1.1.3	Entwicklung der T-Zellen.....	4
1.1.1.4	Aktivierung zytotoxischer T-Zellen.....	4
1.1.2	Dendritische Zellen und Kreuzpräsentation.....	6
1.1.3	MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung.....	7
1.1.4	Tumorantigene.....	9
1.1.4.1	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2).....	10
1.1.4.1.1	Epitope.....	12
1.2	Zelluläre Immuntherapie.....	12
1.2.1	Adoptiver T-Zelltransfer tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen.....	13
1.2.2	Immuntherapie gegen HER2-überexprimierende Tumoren.....	13
2	Ergebnisse.....	16
2.1	Verschiedene Ausreifungsmethoden führen bei von Monozyten abstammenden DCs nicht zu Unterschieden in der Zytokinproduktion.....	16
2.2	Nach retroviraler Transduktion verschiedener Zelllinien exprimieren diese HER2 bzw. HER2-ECD.....	17
2.3.1	Stimulation von PBMCs mit HER2 ₃₆₉₋₃₇₇ -beladenen autologen DCs.....	19
2.3.2	Mit peptidbeladenen DCs gezogene CTL-Klone sind tetramer-positiv und weisen eine mittlere Peptidaffinität auf.....	20
2.3.3	Einige Peptid-stimulierte HER2-reaktive Klone weisen eine Kreuzreaktivität mit HER4 auf.....	21
2.3.4	Die mit peptidbeladenen DCs gezogenen CTL-Klone lysieren keine Tumorzellen oder Transfektanten.....	22
2.4	Generierung von HER2-spezifischen CTLs mit HER2-mRNA-transfizierten DCs.....	23
2.4.1	Stimulation von CD8 ⁺ T-Zellen mit elektroporierten autologen DCs.....	23
2.4.2	Der mit elektroporierten DCs gezogene CTL-Klon ist tetramer-negativ und weist eine niedrige Peptidaffinität auf.....	24
2.4.3	Klon KW #63 weist eine Kreuzreaktivität mit HER3 auf.....	26
2.4.5	Klon KW #63 erkennt auch Zellen, die HER2 nicht überexprimieren.....	29
2.5	Generierung von allo-A2-restringierten, HER2-spezifischen CTLs mit peptidbeladenen, allogenen HLA-A2 ⁺ DCs.....	32
2.5.1	Stimulation von CD8 ⁺ HLA-A2 ⁺ T-Zellen mit peptidbeladenen allogenen HLA-A2 ⁺ DCs.....	32
2.5.3	Die alloreaktiven HER2-spezifischen CTLs weisen Kreuzreaktivitäten mit anderen HER-Peptiden auf.....	33
2.5.4	Der Allo-Klon und die Allo-Zelllinie erkennen und lysieren mit HER2-trans-	

duzierte und HER2-überexprimierende Tumorzelllinien.....	34
2.5.5 Die Alloklone erkennen auch nicht HER2-überexprimierende Zellen.....	36
2.6 Einfluss von Immune-Escape-Mechanismen auf die Antigenerkennung von CTLs.....	37
2.6.1 Die tumorlysierenden CTLs stimmen bei der Erkennung bzw. Nichterkennung der HER2-überexprimierenden Zelllinien überein.....	37
2.6.2 HLA-A2-Expression der HER2-überexprimierenden Zelllinien.....	39
2.6.3 IFN- γ -Vorbehandlung führt zu einer Erhöhung der mRNA-Konzentration von Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie.....	40
3 Diskussion.....	43
3.1 Generierung von HER2-reaktiven CTLs.....	43
3.2 Ausweichmechanismen der Tumorzellen.....	48
3.3 Ausblick.....	51
4 Zusammenfassung.....	52
5 Material und Methoden.....	53
5.1 Material.....	53
5.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen.....	53
5.1.2 Radioaktive Substanzen.....	54
5.1.3 Medien und Supplemente für die Zellkultur.....	55
5.1.4 Peptide.....	55
5.1.5 Enzyme.....	56
5.1.5.1 Restriktionsenzyme.....	56
5.1.5.2 Polymerasen.....	56
5.1.5.3 Alkalische Phosphatase.....	56
5.1.6 Antikörper.....	56
5.1.7 Zelllinien.....	57
5.1.7.1 Adhärente Zellen.....	57
5.1.7.2 Suspensionszellen.....	58
5.1.8 Oligonukleotide für das Einfügen von Restriktionsschnittstellen.....	58
5.1.9 Oligonukleotide zum Sequenzieren.....	58
5.1.10 Oligonukleotide für RT-PCR.....	59
5.1.11 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine.....	60
5.1.12 Molekularbiologische Kitsysteme.....	60
5.1.13 Sonstige Kitsysteme.....	60
5.1.14 Standardgeräte.....	61
5.1.15 Standardlösungen und -puffer.....	62
5.2 Methoden.....	64
5.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken.....	64
5.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	64
5.2.1.1.2 Generierung neuer Restriktionsschnittstellen mittels PCR.....	64
5.2.1.2 Restriktionsverdau.....	65
5.2.1.3 Dephosphorylierung.....	65
5.2.1.4 Agarosegelelektrophorese.....	66

5.2.1.4.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	66
5.2.1.5	Ligation von DNA.....	67
5.2.1.6	Transformation in E. coli Bakterien.....	67
5.2.1.7	Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep/Maxiprep)	68
5.2.1.8	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	68
5.2.1.9	Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien	68
5.2.1.10	RT-PCR	69
5.2.1.10.4	RT-PCR	69
5.2.2	Zellkultur.....	69
5.2.2.1	Allgemeine Zellkultur	69
5.2.2.1.5	Kultivierung verschiedener Zelllinien	70
5.2.2.1.6	Bestimmung der Zellzahl	70
5.2.2.1.7	Einfrieren und Auftauen von Zellen	70
5.2.2.2	EBV-Transformation.....	71
5.2.2.3	Retrovirale Transduktion	71
5.2.2.3.8	Transfektion von adhärennten Verpackungszellen zur Virusgewinnung	72
5.2.2.3.9	Transduktion von Suspensionszellen mit retroviralem Überstand.....	73
5.2.2.3.10	Sortierung der transduzierten Zellen.....	73
5.2.2.3.11	Bestimmung des Virustiters	73
5.2.2.4	Spezielle Zellkultur.....	73
5.2.2.4.12	Isolierung von PBMC	73
5.2.2.4.13	Generierung von Monozyten-derivierten DCs.....	74
5.2.2.4.14	Peptidbeladung von Zellen	75
5.2.2.4.15	Elektroporation von DCs mit mRNA.....	75
5.2.2.4.16	Priming und Restimulation von T-Zellen aus PBMCs	76
5.2.2.4.17	CD8-Isolierung	76
5.2.2.4.18	Priming und Restimulation von CD8 ⁺ T-Zellen.....	77
5.2.2.4.19	T-Zellklonierung	77
5.2.2.4.20	Expansion von T-Zellen	77
5.2.2.5	Funktionelle Tests	78
5.2.2.5.21	⁵¹ Cr-Freisetzungstest (Chromium release assay, CRA)	78
5.2.2.5.22	Zytokinsekretionstests	79
5.2.2.5.23	ELISpot-Test	79
5.2.2.5.24	Sandwich-ELISA	80
5.2.2.5.25	Durchflusszytometrische Messungen (FACS-Analyse).....	81
5.2.2.5.26	Färbung auf Oberflächenmarker	82
5.2.2.5.27	MHC/Peptid-Multimerfärbung	82
5.2.2.5.28	Sortierung im Durchflusszytometer	83
5.2.2.5.29	TCR-V β -Analyse	84
5.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	84
5.2.3.1	SDS-Gelelektrophorese.....	84
5.2.3.1.30	Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot).....	85
5.2.3.1.31	Immunchemische Färbung transferierter Proteine.....	85
6	Literatur.....	87

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	antigenpräsentierende Zelle („antigen presenting cell“)
APS	Ammoniumpersulfat
bcr	„breakpoint cluster region“
C	Celsius
CCL21	CC-Chemokin 21, 6CKine
CD	Differenzierungscluster („cluster of differentiation“)
cDNS	komplementäre DNS
CIAP	alkalische Phosphatase („calf intestinal alkaline phosphatase“)
CTL	zytotoxische T-Zelle („cytotoxic T cell“)
DC	dendritische Zellen („dendritic cell“)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECD	extrazellulären Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB	„erythroblastic leukemia viral oncogene homolog“
ERK	„extracellular regulated kinase“
ERp57	ER protein 57 kDa („protein disulfide isomerase-associated 3“)
FACS	„Fluorescence-Activated Cell Sorter“
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor („granulocyte macrophage colony stimulating factor“)
gp	Glykoprotein
h	Stunde

HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor („human epidermal growth factor receptor“)
HEV	postkapilläre Venole mit hohem Endothel („high endothelial venule“)
HLA	„human leukocyte antigen“
IFN- α	Interferon α
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Interferon γ
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
LAK	lymphokinaktivierte Killerzellen
LB	Luria-Bertani Medium
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LMP	„low molecular mass polypeptide“
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
min	Minute
mM	10^{-3} Mol
MOI	„Multiplicity of infection“
mRNA	messenger RNA
ng	10^{-9} Gramm
NY-ESO	New York esophageal squamous cell carcinoma
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
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
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetatpuffer
TAP	„transporter associated with antigen processing“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF- β	„transforming growth factor“ β
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor α („tumor necrosis factor α “)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP	„tyrosine related protein“
U	Einheit („unit“)
UV	Ultraviolett
VEGF	„vascular endothelial growth factor“

1 Einleitung

Die drei „klassischen“ Konzepte der Krebsbehandlung sind die chirurgische, die Strahlen- und die Chemotherapie. Therapien auf der Grundlage körpereigener Immunreaktionen sind dagegen noch im Entwicklungsstadium. Schon die Existenz einer Immunantwort gegen spontan entstandenen Krebs wurde lange angezweifelt (1). Seit Anfang der achtziger Jahre jedoch haben zunehmende Informationen über die molekularen Grundlagen der zellulären Immunologie und Fortschritte in der Biotechnologie zur Entwicklung immer effektiverer Immuntherapien gegen Krebs geführt (2, 3, zur Übersicht: 4). Besonders die Tumorspezifität, die sich im Idealfall ausschließlich gegen Tumorzellen richtet, und die Möglichkeit, eine „Erinnerung“ für den Fall eines Wiederauftretens der Erkrankung aufzubauen, machen die Immuntherapie zum potentiellen vierten Standbein der Krebstherapie (zur Übersicht: 5).

1.1 Zelluläre Tumormunität

Die Voraussetzungen für die Entwicklung von Immuntherapien wurden durch zahlreiche neue Erkenntnisse in der allgemeinen und Tumormunitologie geschaffen.

In vielen tierexperimentellen Studien zeigte sich, dass die Abstoßung transplantierte Tumoren vor allem ein Ergebnis der zellulären Immunantwort ist (4). Die zelluläre Immuntherapie zielt deshalb – *in vivo* oder *in vitro* - auf die Aktivierung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der *in-vitro*-Aktivierung autologer zytotoxischer T-Zellen für den adoptiven T-Zelltransfer.

1.1.1 T-Lymphozyten

Lymphozyten, die aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle hervorgehen, lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen, die B-Zellen, die für die humorale, also auf spezifischen Antikörpern beruhende Munität verantwortlich sind, und die T-Zellen. Diese lassen sich wiederum in zwei Klassen einteilen, die zytotoxischen T-Zellen (CTL), die spezifisch Zellen lysieren können, und die T-Helferzellen, die andere Immunzellen aktivieren. Diese beiden Untergruppen unterscheiden sich dadurch, dass zytotoxische T-Zellen CD8, T-Helferzellen dagegen CD4 als Korezeptor exprimieren.

1.1.1.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex

T-Lymphozyten besitzen membrangebundene, antigenspezifische Moleküle, die T-Zellrezeptoren (TCR), die der Erkennung von Haupthistokompatibilitäts-(MHC-)Peptid-Komplexen dienen (siehe 1.1.1.2). T-Zell-Rezeptoren sind Heterodimere aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, der T-Zell-Rezeptor- α - und - β -Kette. Beide Ketten sind über eine hydrophobe Transmembrandomäne in der Membran verankert und besitzen je eine aminoternale variable und eine carboxyterminale konstante Region (Abb. 1). Es gibt auch noch eine andere Gruppe

von T-Lymphozyten, deren TCR aus γ - und δ -Kette bestehen. Diese sogenannten $\gamma\delta$ -T-Zellen spielen im Rahmen dieser Arbeit aber keine Rolle.

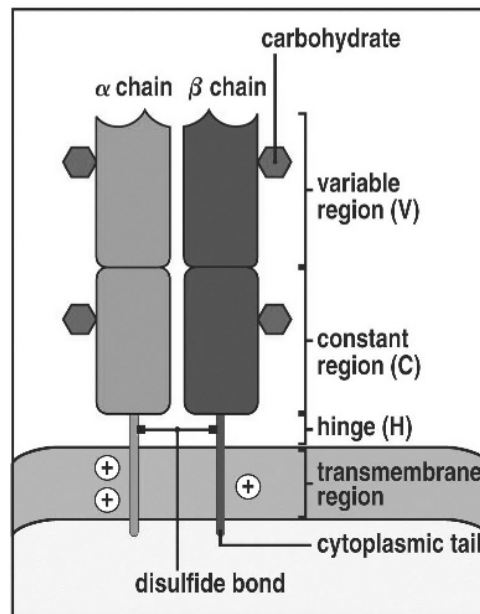


Abb. 1 Modell der Struktur eines T-Zell-Rezeptors (nach Janeway et al. 2005^[32])

Die Aufgaben des TCR bestehen darin, überlebenswichtige Signale für die T-Zell-Entwicklung im Thymus (s. 1.1.1.3) sowie für die Aktivierung und Differenzierung reifer T-Zellen in Effektor- und Gedächtniszellen zu übertragen. TCRs sind nur im Komplex mit CD3 funktionsfähig. Bei dem CD3-Komplex handelt es sich um vier verschiedene Polypeptide, die nichtkovalent mit dem TCR-Heterodimer verbunden sind. Es handelt sich dabei um die CD3 γ -, CD3 δ - und die CD3 ϵ -Kette sowie ein Homodimer der ζ -Kette (6). Der Komplex ist unter anderem für die Oberflächenexpression des T-Zell-Rezeptors unerlässlich (7, 8). Die genaue Stöchiometrie des TCR-CD3-Komplexes ist noch unsicher. Die Aktivierung einer T-Zelle wird durch Aggregation mit dem entsprechenden Korezeptor, im Falle der zytotoxischen T-Zellen CD8, bei T-Helferzellen CD4, unterstützt. CD8 bindet an MHC-I-, CD4 an MHC-II-Moleküle (s.1.1.1.2). Die Antigenerkennung führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit zur Synthese neuer Genprodukte.

1.1.1.2 Antigenerkennung

T-Zell-Rezeptoren erkennen bestimmte Peptidfragmente, sogenannte Epitope, aus immunogenen Antigenen, die von spezialisierten Glykoproteinen der Wirtszelle, den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Molekülen, auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Jeder TCR weist nur für einen oder wenige, sehr ähnliche Peptid-MHC-Komplexe eine starke Spezifität auf.

Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle, die sich strukturell voneinander unterscheiden und unterschiedlich auf den Körperzellen verteilt sind. Klasse-I-Moleküle bestehen aus der α -Kette, die aus drei Domänen besteht und die

Membran durchspannt, und dem kürzeren β_2 -Mikroglobulin. Die α_1 - und die α_2 -Domänen bilden zusammen einen peptidbindenden Spalt (Abb. 2 links). MHC-Klasse-II-Moleküle bestehen dagegen aus je einer gleich langen α - und β -Kette, die beide die Membran durchspannen und zwischen deren aminoterminalen Enden sich ein peptidbindender Spalt befindet (Abb. 2 rechts).

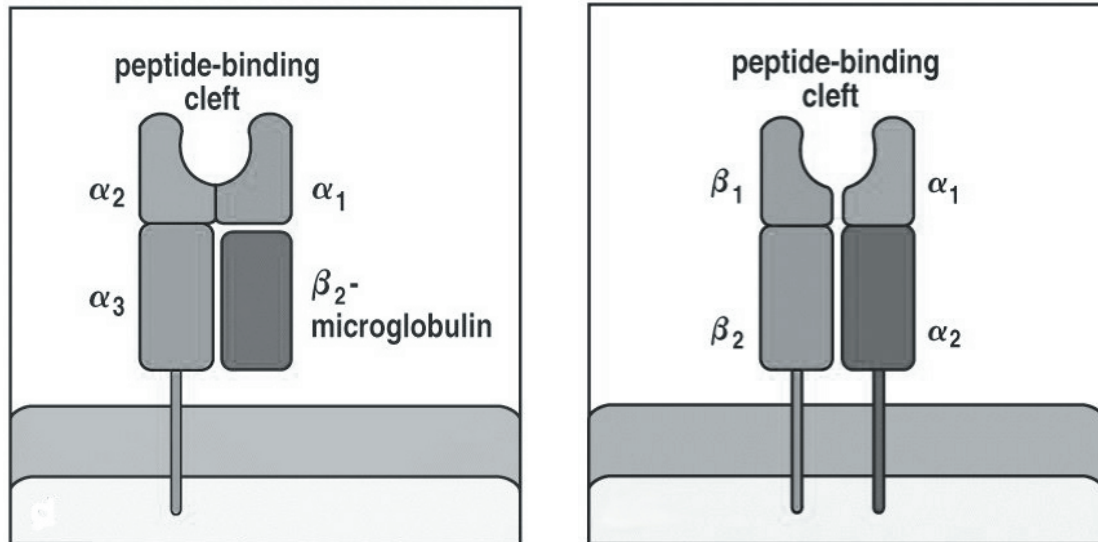


Abb. 2 Schematisierte Darstellungen eines MHC-Klasse-I-Moleküls (links) und eines MHC-Klasse-II-Moleküls (rechts) (nach Janeway et al. 2005¹³²). α_1 , α_2 und α_3 sind die drei bzw. zwei Domänen der Transmembranglykoproteinkette α , β_2 -Mikroglobulin bzw. β_1 und β_2 sind die Domänen der Transmembranglykoproteinkette β

Die vom MHC-Komplex präsentierten Peptide entstehen aus intakten Proteinen durch Prozessierung. Man kann hierbei zwei unterschiedliche Prozessierungs- und Präsentierungswege unterscheiden, je nachdem, ob es sich um Proteine aus dem Zytosol oder den vesikulären Komponenten der Zelle handelt. Antigene aus dem Zytosol, die z.B. aus Viren oder auch Tumorantigenen stammen können, werden hauptsächlich vom Proteasom, einem multikatalytischen Proteasekomplex, abgebaut und die entstandenen Peptide über die sogenannten Transporters associated with Antigen Processing-1 und -2 (TAP1, TAP2) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert (Abb. 5). Im ER werden sie über das TAP-assoziierte Protein Tapasin auf die Peptidbindungsfurche von MHC-Molekülen der Klasse I geladen. Der entstandene Peptid-MHC-I-Komplex wird dann zur Zelloberfläche transportiert, wo er von spezifischen $CD8^+$ T-Zellen erkannt werden kann. MHC-I-Moleküle binden okta- bis dekamere Peptide (9), die in ihre Peptidbindungsspalte passen.

$CD4^+$ T-Zellen erkennen dagegen Peptide im Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen. Peptide für MHC-II werden in angesäuerten Endosomen erzeugt, die dann mit Vesikeln fusionieren, die MHC-Klasse-II-Moleküle enthalten. Peptide, die an MHC-Klasse-II binden, sind in ihrer Länge weniger beschränkt als die an Klasse-I bindenden, da das Peptidrückgrat gebunden wird, und das Peptid an beiden Seiten der Bindungsfurche herausragen kann.

Die menschlichen Haupthistokompatibilitätskomplexe werden als Human Leukocyte Antigens (HLA) bezeichnet. Es gibt drei Klasse I Genloci, die als HLA-A, -B und -C gekennzeichnet

werden. Die unterschiedlichen Allele dieser Genloci werden mit Zahlen benannt. Auch für HLA-Klasse-II-Moleküle gibt es eine entsprechende Nomenklatur, die sich aus der Lage des jeweiligen Allels in den drei HLA-Klasse-II-Subregionen HLA-DR, -DP und -DQ ergibt. Da von jedem HLA-Allel Peptide mit unterschiedlichen sogenannten Ankermotiven präsentiert werden, ist die genaue Kenntnis derselben für die Immuntherapie mit spezifischen T-Zellen unerlässlich.

1.1.1.3 Entwicklung der T-Zellen

Die Vorläuferzellen der T-Zellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein. In diesem Stadium fehlen den sogenannten Thymozyten die meisten typischen Oberflächenmarker und die Rezeptorgene sind noch nicht umgeordnet. Zunächst entwickeln sich sogenannte doppelt negative Thymozyten, die weder CD3, CD4, CD8 noch α - und β -Kette des TCR besitzen. Dann kommt es zu einer Umlagerung der Gene der TCR-Ketten, der somatischen Rekombination, die zu einer Vervielfachung der TCR-Vielfalt führt. Zunächst wird das Gen für die β -Kette umgelagert. War die Umordnung erfolgreich, bilden die β -Ketten mit einer sogenannten Prä-T-Zell- α -Kette und dem CD3-Komplex einen Prä-T-Zell-CD3-Komplex, der auf der Oberfläche der Thymozyten exprimiert wird. Dies führt ohne Bindung eines extrazellulären Liganden an den Prä-TCR (10) dazu, dass die Thymozyten beginnen, sich zu vermehren. Nach Umlagerung der β -Ketten werden CD4 und CD8 exprimiert. Sobald die doppelt positiven Thymozyten aufhören, sich zu teilen, werden die Gene für die α -Kette umgelagert. Der Aufbau des α -Locus lässt dabei so viele verschiedene aufeinander folgende Umordnungsversuche zu, dass die Umordnung fast immer erfolgreich verläuft. Die doppelt positiven Thymozyten exprimieren zunächst nur wenige T-Zell-Rezeptoren und nur diejenigen, die Selbst-MHC-Moleküle erkennen, reifen weiter heran. Die anderen Thymozyten werden deletiert. Trotzdem erkennen später 1-10% der T-Zellen allogene MHC-Moleküle (11), was auf der Fähigkeit der TCRs zur Kreuzreaktivität beruht (12). Gleichzeitig läuft auch eine negative Selektion ab, bei der Thymozyten, die Autoantigene erkennen, die im Thymus exprimiert werden, herausselektiert werden. Nach neuen Erkenntnissen werden auch tumorassoziierte Antigene, von denen man annahm, dass sie nur in Hodengewebe und Tumoren vorkommen, im Thymus präsentiert (13). Je nach Affinität der TCR/Autoantigenbindung werden die Thymozyten apoptotisch oder anerg. Diese Erkenntnisse sind sehr wichtig für die Auswahl von tumorassoziierten Antigenen für die Immuntherapie. Nur etwa 2% der doppelt positiven Thymozyten überleben und reifen zu einfach CD8- oder CD4-positiven T-Zellen heran, die in die Peripherie geschleust werden.

1.1.1.4 Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Die im Thymus herangereiften T-Zellen gelangen ins Blut und werden im Kreislauf weiter transportiert. An peripheren Lymphorganen verlassen die T-Zellen das Blut und wandern durch Lymphgewebe, um dann wieder ins Blut zurückzukehren. Für eine Wanderung durch das

gesamte lymphatische System brauchen T-Zellen 24 h (14). Die noch nicht mit ihrem Antigen in Kontakt gekommenen T-Zellen bezeichnet man als naiv. Eine Aktivierung zu funktionsfähigen Effektorzellen setzt die Präsentation des für den jeweiligen T-Zellrezeptor spezifischen Peptid-MHC-Komplexes zusammen mit bestimmten kostimulatorischen Molekülen voraus. Dieses sogenannte Priming der T-Zellen findet nicht direkt am Infektionsort oder Tumor statt, sondern im nächstgelegenen Lymphknoten. Als aktivierende antigenpräsentierende Zellen (APC) dienen vermutlich immer dendritische Zellen (DC), die im unreifen Zustand Antigene an der Infektionsstelle bzw. am Tumor phagozytieren und damit zum nächsten Lymphknoten wandern. Durch die Aufnahme der Antigene reifen die DCs aus, was zur Erhöhung der Expression von MHC-Klasse-I und -II-Molekülen, der kostimulatorischen Faktoren CD80 und CD86 sowie des DC-Markers CD83 führt. Die reifen, antigenpräsentierenden DCs halten sich im Lymphknoten bevorzugt in der Nähe von postkapillären Venolen mit hohem Endothel (HEV) auf, durch die naive T-Zellen auf ihrer Wanderung vom Blut ins lymphatische Gewebe gelangen (15). Die hereinkommenden T-Zellen werden von DCs abgetastet und zurückgehalten, wenn ihre TCRs für die von den DCs präsentierten Peptid-MHC-Komplexe spezifisch sind (15). Durch Bindung des TCR an den Peptid-MHC-Komplex und des Oberflächenmoleküls CD28 an die kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 werden die T-Zellen aktiviert. Es folgt der Eintritt der T-Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus, gleichzeitig werden IL-2 und die hochaffine α -Kette des IL-2-Rezeptors synthetisiert, wodurch die Zelle auf sehr viel geringere Konzentrationen dieses Wachstumsfaktors reagieren kann. Es kommt nun zur klonalen Expansion der T-Zellen und zu ihrer Differenzierung in T-Effektorzellen.

Die T-Effektorzellen töten Zielzellen, indem sie zytoplasmatische Granula, die Perforin und Granzyme enthalten, ausschütten. Perforin bildet in der Zielzellmembran durch Polymerisierung Poren, die zum Einstrom von Wasser und Kalziumionen führen und so Apoptose auslösen. Granzyme wie Granzym B können durch proteolytische Spaltung von Caspasen zur Auslösung von Apoptose beitragen. Außerdem produzieren T-Effektorzellen Interferon γ (IFN- γ), das neben seiner virushemmenden Wirkung auch die Synthese von MHC-Molekülen und anderen Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie bei den Zielzellen fördert. Die T-Zellen werden entweder direkt oder über den Weg der T-Effektorzellen zu Gedächtniszellen, die im Gegensatz zu den T-Effektorzellen langlebig sind und bei Kontakt mit dem spezifischen Antigen zu einer schnellen sekundären Immunantwort fähig sind.

Die Fähigkeit der DCs zur Kreuzpräsentation (s. 1.1.2) führt dazu, dass nicht nur CD4⁺ T-Zellen, sondern auch CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden können. Kreuzpräsentation bedeutet, dass die DCs in Endosomen aufgenommene Antigene, deren Peptidfragmente ja eigentlich nur von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden dürften, auch in den MHC-Klasse-I-Weg einschleusen können.

1.1.2 Dendritische Zellen und Kreuzpräsentation

Dendritische Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) mit der Fähigkeit, naive T-Lymphozyten zu stimulieren und primäre Immunantworten auszulösen. Sie können auch die Qualität der T-Zellantwort beeinflussen, indem sie die Entwicklung der naiven T-Zellen in verschiedene Klassen von Effektorzellen lenken und sie spielen obendrein eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität (16).

DCs werden ständig aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet. Sie lassen sich in verschiedene Untergruppen und Linien unterteilen (17), deren Herkunft und Entwicklung teilweise noch unklar sind. Einerseits können sich DCs direkt aus gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen oder über Monozyten entwickeln (z.B. 17), andererseits gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte DC-Untergruppen von lymphoiden Vorläuferzellen abstammen (17). In Geweben befinden sich residente DCs z.B. die Langerhans-DCs in der Haut, die aus myeloiden Vorläuferzellen stammen (17). Bei Entzündungen werden Monozyten aus dem peripheren Blut rekrutiert, die in DCs differenzieren (18). Außerdem gibt es plasmazytoide DCs, die Interferon α produzieren (19). DCs existieren in zwei funktionell und phänotypisch unterschiedlichen Stadien, die man als unreif und reif bezeichnet. Unreife DCs nehmen in Geweben Antigene durch Endozytose auf. Durch Kontakt mit mikrobiellen Produkten oder proinflammatorischen Zytokinen verwandeln sich die dendritischen Zellen. Die Fähigkeit der DCs zur Antigenaufnahme nimmt ab, während gleichzeitig der Chemokinrezeptor CCR7 stark exprimiert wird. CCR7 veranlasst die Wanderung ins lymphatische System über den CCR7-Liganden 6CKine (CCL21, CC-Chemokin 21) und von da in die regionalen Lymphknoten über den Liganden MIP3 β (17). Durch Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, der MHC-Moleküle sowie des immunstimulierenden und regulatorischen Glykoproteins CD83 (20) bekommen die reifen DCs die Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren. Die Wirkungsweise von CD83 war lange unbekannt, eine neuere Arbeit zeigt, dass es die Antitumor-Immunantwort erhöht (21).

Wie oben erwähnt, besitzen DCs die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation. Das bedeutet, dass sie Antigene von infizierten Zellen oder Tumorzellen aufnehmen, prozessieren und präsentieren können. Da DCs in der Lage sind, Peptide dieser aufgenommenen Proteine nicht nur auf MHC-Klasse-II-, sondern auch auf MHC-Klasse-I zu präsentieren, sind sie in der Lage auch CD8⁺ T-Zellen zu primen (Abb. 3).

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass es sich bei der Kreuzpräsentierung um den wichtigsten Mechanismus der Regulation der CTL-Antwort handelt, wenn die Antigene nicht auf anderem Wege z.B. über direkte Infektion der DCs in den MHC-I-Weg gelangen (22). Die unreifen DCs sammeln Antigene für die Kreuzpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen, indem sie apoptotische und nekrotische Zellen phagozytieren (23,24), lösliche Proteine durch Makropinozytose aufnehmen (25) und Plasmamembranen und intrazelluläre Proteine von anderen lebenden APCs und Lymphozyten extrahieren (26). Erst nach dem Ausreifen sind DCs in der Lage, T-Zellen zu primen, da die T-Zellen ohne die Überlebenssignale und Kostimulation

reifer DCs sterben oder anerg werden (22). Dies zeigt die Bedeutung des Cross-Primings gerade für tumorreaktive CTLs, die vom Tumor selbst nicht stimuliert, sondern nur anerg gemacht werden können.

Man kann sogenannte DC Typ 1 und Typ 2 unterscheiden, die entweder durch IL-12-Produktion eine zytotoxische T-Zell- und T-Helferzell-Typ-1-Antwort oder eine T-Helferzell-Typ-2-Antwort bzw. die Generierung von IL-10-produzierenden Suppressorzellen auslösen (27, 28). Nur die Typ1-DCs besitzen die Fähigkeit zum Cross-Primen von CTLs.

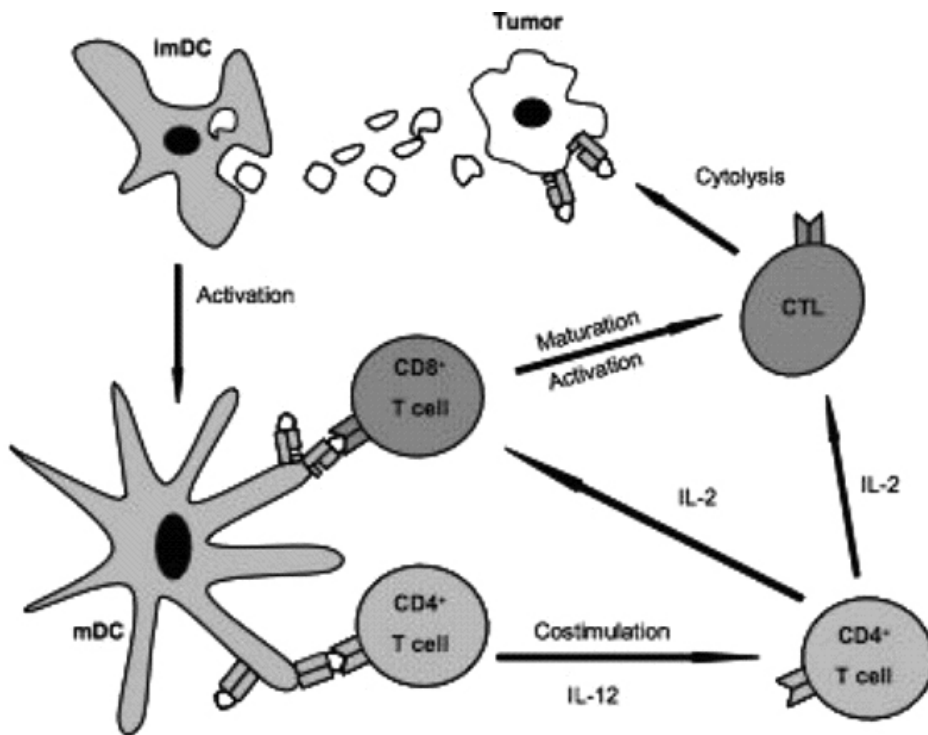


Abb. 3 Modell der adaptiven Immunantwort gegen Tumorzellen (nach Carlsson 2005¹³³).

Unreife DCs nehmen Tumorfragmente auf und prozessieren sie. Sie reifen aus und präsentieren Peptide, wodurch CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen aktiviert werden. Die CD8⁺ T-Zellen werden zu zytotoxischen T-Zellen, die Tumorzellen lysieren können, die CD4⁺ T-Zellen unterstützen sie durch Zytokinsekretion

1.1.3 MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung

Proteine aus dem Zytosol und teilweise auch von DCs aufgenommene Antigene (s. 1.1.2) werden über den MHC-Klasse-I-Weg abgebaut und T-Zell-Epitope auf MHC-I präsentiert.

Die meisten Peptide werden im Zytosol von dem Proteasom teilweise unter Beteiligung von Aminopeptidasen generiert. Es gibt auch Hinweise darauf, dass Aminopeptidasen allein Peptide erzeugen können (29). Die Hauptaufgabe des Proteasoms und der Aminopeptidasen ist der Abbau von Proteinen in einzelne Aminosäuren zur Neusynthese von Proteinen, aber ein kleiner Teil der proteasomal entstandenen Peptide wird zur Antigenpräsentierung verwendet (30).

Es existieren mehrere Isoformen des Proteasoms (Abb. 4), die alle eine Rolle bei der Antigenprozessierung spielen. Die wichtigste Form ist das Immunoproteasom (29). Das

Grundgerüst ist das 20S-Proteasom (Abb. 4 links), ein proteolytischer Komplex in Form eines Zylinders, der aus je zwei inneren β - und zwei äußeren α -Ring aus insgesamt 28 Untereinheiten besteht (31). Die Bildung des Immunoproteasoms wird durch das Zytokin IFN- γ ausgelöst, das zur Synthese der drei zusätzlichen β -Untereinheiten LMP-2, MECL-1 und LMP-7 (32, 33, 34) sowie des 11S-Regulators führt, der an beiden Enden des Immunoproteasoms gebunden wird (29). LMP-2, MECL-1 und LMP-7 werden bevorzugt an Stelle der konstitutiven β -Untereinheiten in das 20S-Proteasom eingebaut (Abb. 4 rechts).

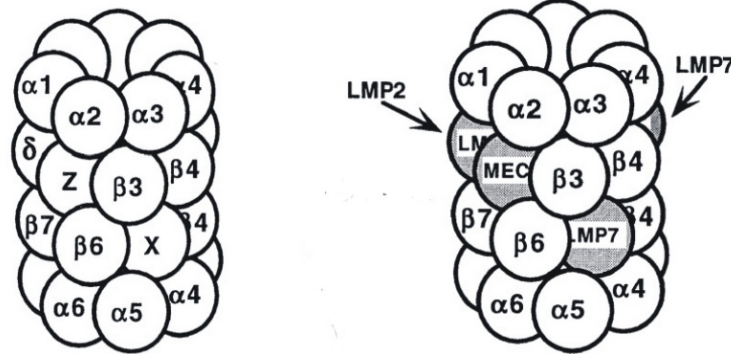


Abb. 4 Schematische Darstellung des 20S-Proteasoms und des Immunoproteasoms (modifiziert nach Griffin et al. 1998¹³⁴). Das Grundgerüst der Proteasome ist das 20S-Proteasom (links). Beim Immunoproteasom sind die β -Untereinheiten des 20S-Proteasoms unter IFN- γ -Einfluss durch LMP-2, MECL-1 und LMP-7 ersetzt worden (rechts).

Die Inkorporation von LMP-2 und LMP-7 führt zu einer Änderung der Aktivität des Proteasoms, das jetzt bevorzugt hydrophobe und basische Reste schneidet (35). Das Proteasom degradiert Proteine zu 2-25 Aminosäuren langen Peptiden (36). Nur ca. 15 % dieser Peptide sind 8-11 Aminosäuren lang, passen also in die Peptidbindungsspalte (36). Das Immunoproteasom schneidet im Allgemeinen längere Vorläufer von MHC-Klasse-I-Peptiden, die am N-Terminus ein bis zwei Aminosäuren überstehen (37) und von Aminopeptidasen aus dem Zytosol oder dem ER zurechtgeschnitten werden (29). Innerhalb der Zelle ist das Immunoproteasom vor allem in der Nähe des ER lokalisiert (38), in das TAP1 und 2 die Peptide transportieren. TAP-Proteine und MHC-Moleküle bevorzugen dabei Peptide mit hydrophoben oder basischen Resten am C-terminalen Ende (39, 36). Zur Antigenbeladung im ER binden neu synthetisierte MHC-I- α -Ketten zunächst an das Chaperon-Molekül Calnexin, bis β_2 -Mikroglobulin an die α -Kette bindet (Abb. 5). Nach der Dissoziation von Calnexin lagert sich das α - β_2 -Mikroglobulin-Heterodimer an einen Proteinkomplex aus den Chaperonmolekülen Calretikulin und Erp57 sowie dem TAP-assoziierten Protein Tapasin an. Nach der Beladung mit einem Peptid faltet sich das MHC-I-Molekül vollständig, löst sich vom Proteinkomplex und wird mit dem gebundenen Peptid über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Dort wird das Peptid durch das MHC-I-Molekül präsentiert. MHC-Moleküle können nicht nur unmodifizierte, sondern auch posttranslational glykosylierte zytosolische Peptide präsentieren (40). Das Zytokin IFN- γ spielt bei der Antigenprozessierung eine entscheidende Rolle. Es löst nicht nur die Umbildung des Proteasoms in das Immunoproteasom aus, sondern auch die Aminopeptidasen, die an der Peptidprozessierung beteiligt sind (36) sowie Komponenten des Antigenprozessierungsweges

wie TAP, Tapasin und MHC-Moleküle selbst sind IFN- γ -abhängig (41).

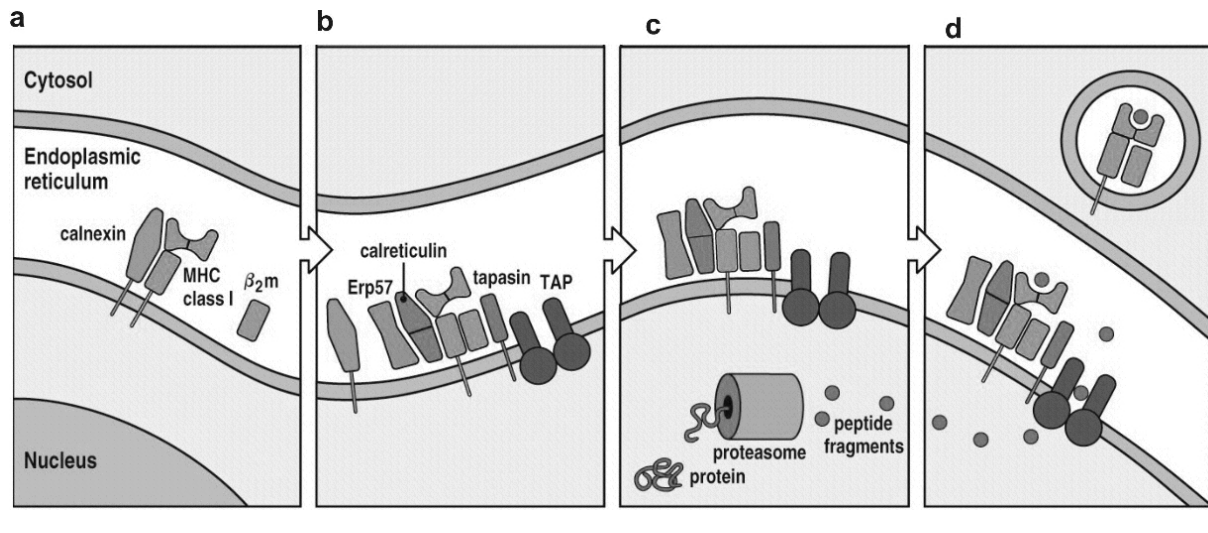


Abb. 5 Schema der MHC-Klasse-I-Synthese, der Antigenprozessierungsmaschinerie und der Antigenpräsentierung (nach Janeway et al. 2005¹³²). **a** Die partiell gefalteten MHC-I- α -Ketten binden an Calnexin bis β_2 -Mikroglobulin bindet **b** Der MHC-I- α / β_2 -Mikroglobulin-Komplex löst sich von Calnexin, bindet einen Komplex von Chaperonproteinen (Calreticulin) und über Tapasin an TAP **c** Zytosolische Proteine werden durch das Proteasom zu Peptidfragmenten abgebaut **d** TAP setzt ein Peptid frei, das an das MHC-I-Molekül bindet und dessen Faltung vervollständigt. Das fertig gefaltete MHC-I-Molekül löst sich vom TAP-Komplex und wird exportiert (nach Janeway 2005¹³²)

1.1.4 Tumorantigene

Seit der Entdeckung der ersten Tumorantigene Ende der achtziger Jahren wurden zahlreiche neue Antigene entdeckt. Diese lassen sich nach Ribas et al. (42) in sechs Kategorien einteilen:

1. Nicht-mutierte Antigene, die in immunologisch privilegierten Regionen der Keimbahn und in verschiedenen Tumoren vorkommen (cancer/germline antigens) wie z.B. NY-ESO, MAGE, BAGE
2. Linien-spezifische Tumorantigene z.B. aus der Melanozyten-Melanom-Linie wie Melan-A, gp 100, gp 75, mda-7, Tyrosinase und Tyrosinase related Protein (TRP), die von normalen und neoplastischen Zellen des gleichen Gewebes exprimiert werden.
3. Epitope aus im Tumor mutierten und überexprimierten Genen wie mutiertes ras, bcr/abl oder amplifiziertes HER2
4. Klonale Rearrangements von Immunglobulingenen bei Myelomen und B-Zelllymphomen
5. Epitope aus onkoviralen Prozessen wie die Proteine E6 und E7 aus dem humanen Papilloma-Virus
6. Nicht-mutierte onkofötale Proteine mit tumorselektiver Expression wie CEA

Ein Beispiel für ein Tumorantigen der Kategorie 3 ist die Rezeptortyrosinkinase Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2 (HER2/ErbB2), die in 20-30% der Fälle von Mammakarzinomen, bei Ovarialkarzinomen und verschiedenen anderen malignen Tumoren auf Grund einer

Genamplifikation überexprimiert wird. HER2-Überexpression ist u. a. auf Grund von verstärktem Auftreten von Metastasen und Mikrometastasierung im Knochenmark mit einer schlechten Prognose verbunden (43). Da HER2 eine kritische Rolle bei der Karzinogenese spielt, ist es ein bevorzugtes Ziel für Immuntherapien.

1.1.4.1 Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2)

HER2 (ErbB2/Neu) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-/ErbB-/HER-Familie), die aus vier bekannten Rezeptortyrosinkinasen besteht. Der Namensgeber ist der (humane) epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR/HER1), der bei Überexpression ebenfalls das Potential zur Transformation normaler in Krebszellen besitzt (44). Außerdem gibt es noch HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4). Die EGF-Rezeptortyrosinkinasen sind für die Entwicklung des kardiovaskulären Systems, des Nerven- und des Gastrointestinalsystems unerlässlich (45). Knockout-Mäuse für ErbB2 (46), ErbB3 (47) und ErbB4 (48) sterben während der Embryonalentwicklung auf Grund von Herzdefekten, ErbB1-defiziente Mäuse sterben wenige Tage nach der Geburt an Multiorganversagen (49). Konditionale Mutation von ErbB2 in Mäusen führt zu dilatativer Kardiomyopathie (50). ErbB2 spielt zudem eine Rolle bei der duktalem Morphogenese der Brustdrüse (51). ErbB2 wird also sowohl in der Embryonalentwicklung als auch postnatal benötigt. Im adulten Gewebe wird HER2 außerdem in epithelialen Zellen des Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitaltraktes, in der Haut und der Plazenta exprimiert (52). Alle vier EGF-Familienmitglieder bestehen aus einer extrazellulären, cysteinreichen, Liganden-bindenden Domäne, einer lipophilen, die Membran durchspannenden Region und einer zytoplasmatischen Proteintyrosinkinasedomäne (53) (Abb. 6).

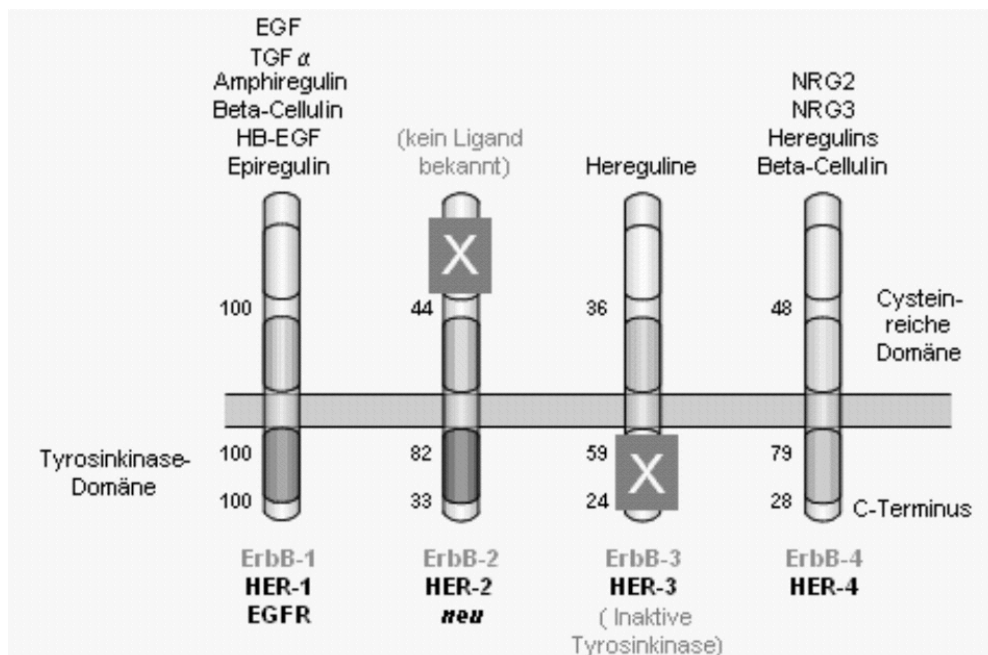


Abb.6 Schematisierte Darstellung der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen (modifiziert nach Harari 2004¹³⁵)

Über den Rezeptoren sind die bekannten Liganden dargestellt, das X bedeutet durch Mutation zerstört bzw. inaktiv, die Zahlen zeigen Homologie mit EGFR an

Die konventionellen HER-Agonisten besitzen eine Domäne aus 50 Aminosäuren, die mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) homolog ist. Verschiedene Liganden können an jeweils einen oder mehrere Rezeptoren binden, nur für HER2 konnte kein direkter oder spezifischer Ligand gefunden werden (54). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Ligandenbindungsstelle von HER2 mutiert und damit vermutlich funktionsunfähig geworden ist (55). Wie andere Rezeptortyrosinkinasen werden auch die epidermalen Wachstumsfaktoren durch die Liganden-abhängige Bildung von Homo- oder Heterodimeren aktiviert, in denen die Kinasedomänen sich gegenseitig kreuzphosphorylieren (56). Jeder der HER-Rezeptoren besitzt verschiedene Phosphorylierungsstellen und rekrutiert unterschiedliche Signalmoleküle (57, 58, 59). Die Signalkaskade, die von einem Liganden ausgeht, hängt davon ab, an welchen Rezeptor er bindet. Die Heterodimerisierung erfolgt nach einem streng hierarchischen Prinzip, bei dem HER2 der bevorzugte Dimerisierungspartner aller anderen HER-Rezeptoren ist (60). Die physiologische Rolle von HER2 in Bezug auf die Bindung von Liganden scheint also die eines Korezeptors zu sein (61). HER2-Überexpression fördert die Bildung von HER2-Heterodimeren. Diese Heterodimere zeichnen sich durch eine erhöhte Ligandenaffinität (62) und verlängerte Aktivierung der Signaltransduktion (63, 64) aus. HER2-Überexpression verstärkt zum Beispiel den Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)- und den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K)-Weg (62, 58, 65). Die verstärkte Signalgebung kann über die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (extracellular regulated kinase) zum erhöhten Metastasierungspotential HER2-überexprimierender Tumoren beitragen, da ERK sowohl die der Zellwanderung dienenden kontraktilen Aktin-Myosin-Filamente als auch die Proliferation migrierender Zellen regulieren kann (66, 67). Damit stimmen Hinweise überein, dass die Aktivierung von ErbB2 durch Dimerisierung mit anderen ErbB-Rezeptoren und ihren Liganden ein grundlegendes Ereignis für die Invasion der extrazellulären Matrix durch Krebszellen ist (68). Besonders wichtig für die intrazellulären Signalwege sind ErbB2/ErbB3-Heterodimere (69). Die Heterodimerisierung führt über die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von ErbB3 zur Aktivierung des für das Zellüberleben wichtigen PI3K-Signalweges (70), der u.a. einerseits durch Aktivierung der Proteinkinase Akt zu EGF-unabhängiger Zellproliferation führt und durch PKC δ -Aktivierung zur Invasionsfähigkeit transformierter Zellen beiträgt (71). HER2 soll außerdem an der Regulation des Gefäßwachstumsfaktors VEGF-C und damit der Vaskulogenese von Tumoren beteiligt sein (72). Bei Überexpression von HER2 kommt es aber auch zur Bildung von Homodimeren, die konstitutiv phosphoryliert sind (73).

Die Rezeptortyrosinkinase HER2 ist momentan eines der am besten definierten Ziele für spezifische Therapien. Neben der Behandlung von Patienten mit HER2-überexprimierenden Tumoren mit dem monoklonalen α HER2-Antikörper Trastuzumab in Kombination mit zytotoxischer Chemotherapie gibt es auch Versuche adjuvant mit zellulärer Immuntherapie zu behandeln.

1.1.4.1.1 Epitope

Die Immunogenität von HER2 wurde durch Nachweis von HER2-reaktiven Antikörpern und T-Zellen bei Patientinnen mit HER2-überexprimierendem Mammakarzinom gezeigt (74). Die Spezifität tumorassoziierter Lymphozyten gegen HER2 wurde mit synthetischen Peptiden, die typische MHC-I-Ankermotive aufweisen, nachgewiesen. Dabei wurde das Nonamer HER2₃₆₉₋₃₇₇ (KIFGSLAFL) von verschiedenen CTL-Linien erkannt (75). Dieses HLA-A0201 restringierte immundominante Peptid wurde seitdem häufig zur peptid- und auf DCs basierenden Immunisierung von Patienten mit HER2-überexprimierenden Tumoren eingesetzt (76, 77). Es gibt jedoch widersprüchliche Aussagen dazu, ob das synthetische Peptid dazu in der Lage ist, wirklich tumorspezifische und nicht nur peptidspezifische CTLs zu stimulieren. Während z.B. Lustgarten et al. (78) nach Priming von CTLs mit synthetischem HER2₃₆₉₋₃₇₇ Lyse von Tumorzellen zeigen konnten, erhielten z.B. Zaks & Rosenberg (76) nach Vakzinierung CTLs, die das endogen prozessierte Peptid nicht erkennen konnten.

1.2 Zelluläre Immuntherapie

Die ersten Erfolge immunologischer Manipulationen beim Menschen, nämlich Regressionen etablierter, invasiver Tumoren, wurden nach Verabreichung von autologen lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK) und des Zytokins Interleukin 2 (IL-2) an Patienten mit metastasierenden Nierentumoren oder Melanomen beobachtet (79). Es wurde gezeigt, dass es sich bei IL-2 um einen T-Zellwachstumsfaktor handelt, der eine *in-vitro*-Expansion von T-Zellen ermöglicht (80). Während vor diesen Entdeckungen das Hauptaugenmerk auf den angeborenen Ast der zellulären Immunantwort gerichtet war (81), führten verbesserte Zellkulturtechniken, Identifizierung und Massenproduktion von Zytokinen in Richtung der spezifischen, zellulären Immunantwort. Erste Untersuchungen wurden mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) durchgeführt, die besonders beim Melanom auch nach adoptivem Transfer *in vivo* eine partielle Wirksamkeit zeigten (82, 83). Die Entdeckung, dass T-Zellen von Patienten mit definiertem HLA-Typ HLA-gematchte Melanomzelllinien lysieren, führte zur Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigenen mit immunogenen Aminosäuresequenzen, den Epitopen, die von den MHC-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden (84). Inzwischen sind zahlreiche Tumorantigene mit ihren für verschiedene HLA-Subtypen spezifischen Epitopen bekannt. Die Daten zu den Tumorzellepitopen und den zugehörigen HLA-Typen sind im Internet verfügbar (z.B. www.syfpeithi.de) Diese neuen Erkenntnisse ermöglichen einerseits eine Reihe unterschiedlicher aktiver Vakzinierungsstrategien, die auf die *in-vivo*-Stimulierung von tumorantigenspezifischen T-Zellen zielen, und andererseits die *in-vitro*-Stimulation und -Expansion tumorantigenspezifischer T-Zellen mit dem Ziel eines adoptiven T-Zelltransfers.

1.2.1 Adoptiver T-Zelltransfer tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen

Beim adoptiven T-Zelltransfer Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen (CTL) werden bereits tumorreaktive Zellen transferiert. Es werden entweder tumorinfiltrierende Lymphozyten *in vitro* unspezifisch expandiert (85) oder PBMC oder isolierte T-Zellen *in vitro* stimuliert und expandiert (Abb.7).

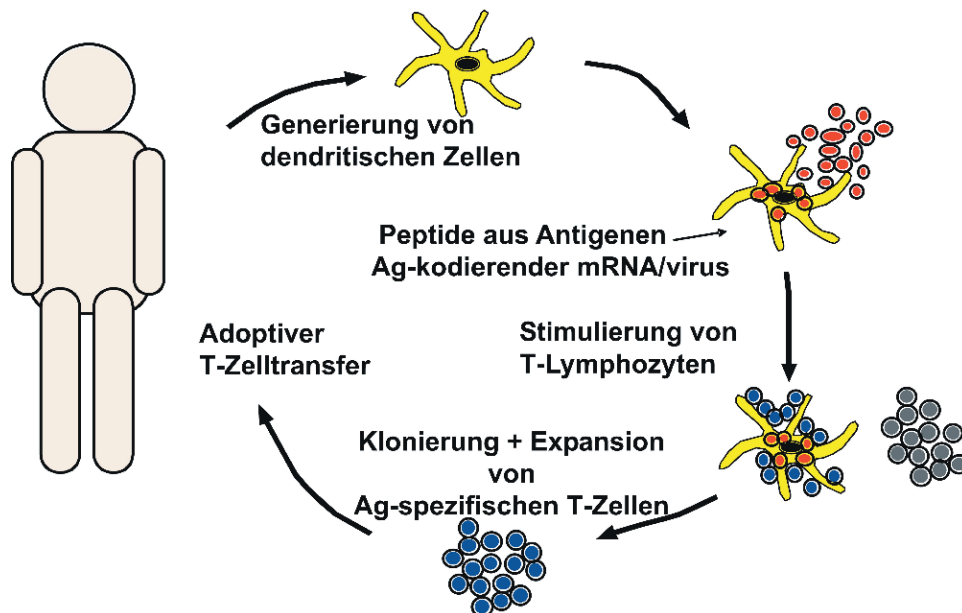


Abb. 7 Schema des adoptiven T-Zelltransfers autologer tumorspezifischer CTLs

Die Stimulierung der CTLs findet *in vitro* durch tumorantigenpräsentierende dendritische Zellen (DC) statt. Die antigenpräsentierenden Zellen (APC) können dabei mit einem spezifischen Peptid beladen, mit der cDNA des jeweiligen Tumorantigens transfiziert, viral transduziert oder mit mRNA eines Tumorantigens transfiziert worden sein. Für die häufig angewandte Methode der Peptidbeladung muss die genaue Sequenz und HLA-Restriktion immundominanter Epitope des jeweiligen Tumorantigens bekannt sein. Der Transfer von T-Zellrezeptorgenen in Empfängerzellen stellt eine erfolgversprechende Strategie für den passiven Transfer von T-Zellimmunität dar (86). So kann der zeitaufwändige Schritt der Generierung antigenspezifischer CTLs bei Patienten mit dem HLA-Typ gegen den der TCR gerichtet ist, übergangen werden.

1.2.2 Immuntherapie gegen HER2-überexprimierende Tumoren

Erste Hinweise auf die Immunogenität von HER2 wurden durch Nachweis von Antikörpern und spezifischen CD4⁺ Zellen bei Patientinnen mit HER2-überexprimierendem Mammakarzinom gewonnen (74). Die Spezifität tumorassoziierter Lymphozyten gegen HER2 wurde mit synthetischen Peptiden, die typische MHC-I-Ankermotive aufweisen, nachgewiesen (75).

ErbB2 ist wegen seines häufigen Vorkommens in Tumoren und seiner kritischen Rolle bei der Karzinogenese ein häufiges Ziel von Immuntherapien. 1998 wurde der humanisierte monoklonale Maus-Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®], Genentech, Inc., South San Francisco, California), der gegen die extrazelluläre Domäne von HER2 gerichtet ist, in den USA für die Behandlung von HER2-überexprimierenden Mammakarzinomen zugelassen (87). Trastuzumab wird allein oder in Kombination mit Chemotherapeutika verabreicht (87). Es konnte gezeigt werden, dass Trastuzumab die zytolytische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen gegen HER2-überexprimierende Tumorzellen erhöhen kann (88).

Die Entwicklung erfolgreicher zellulärer Immuntherapien gegen HER2-überexprimierende Tumoren ist mit zahlreichen Problemen verbunden. Ein Hauptproblem stellt die Expression von HER2 in normalen Geweben (s.o.) u.a. im Herzen dar. Bei der Behandlung mit dem HER2-Antikörper Trastuzumab konnte besonders bei Kombinationstherapien mit Anthracyclin und Cyclophosphamid teilweise eine kardiotoxische Wirkung gezeigt werden (89). Die Problematik der zellulären Immuntherapie liegt eher darin, dass hochavide T-Zellen gegen HER2-Epitope bereits im Thymus vernichtet oder anerg werden. Man benötigt also Methoden, um möglichst hochavide, anerge T-Zellen wieder zu aktivieren. Ein weiteres Problem ist, dass Tumore dem Immunsystem ausweichen oder die Entwicklung einer Antitumor-Immunantwort direkt oder indirekt unterdrücken können (90). So kann es einerseits zu Veränderungen kommen, die die Tumorerkennung durch Effektorzellen betreffen. Es kann z.B. zum Verlust von Antigenexpression, Verlust von Komponenten der Antigenprozessierung und -präsentierung (91) und der Entwicklung einer Insensitivität gegenüber IFN- γ kommen (92). Andererseits können Defekte in Todesrezeptor-Signalwegen (93) oder die Expression antiapoptotischer Signale (94) dazu führen, dass die Tumorzellen nicht zerstört werden können. Außerdem können Tumore direkt durch immunsuppressive Zytokine wie TGF- β und IL-10 oder durch Mechanismen die z.B. immunsuppressive regulatorische T-Zellen involvieren, die Entwicklung einer Antitumorantwort unterdrücken (90). Die Entwicklung von Ausweich- und Unterdrückungsmechanismen von Tumorzellen wird durch den Druck des Immunsystems bewirkt, was dazu führte, dass man die „Cancer Surveillance“-Hypothese, also die Annahme, dass das Immunsystem die Entwicklung von Tumoren überwacht, erweitern musste und sie nun als „Cancer Immunoediting“-Hypothese bezeichnet (95). Es wird auch vermutet, dass eine negative Korrelation zwischen HER2-Überexpression und der Expression von Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie besteht (96). Ein weiteres Problem ist die optimale Beladungsmethode der zum Priming benötigten dendritischen Zellen mit dem Antigen. So ist zwar schon erfolgreiches Priming von T-Zellen mit retroviral mit HER2 transduzierten DCs durchgeführt worden (97, 98), doch ist diese Methode für die spätere klinische Verwendung der T-Zellen wegen der retroviralen Transduktion nicht zugelassen.

1.3 Ziele

Die Rezeptortyrosinkinase HER2 wird in etwa 30% der Mammakarzinomfälle überexprimiert und gilt als schlechter prognostischer Faktor (43). Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Generierung und Charakterisierung HER2369-377-spezifischer, tumorlytischer zytotoxischer T-Zellklone. Es handelt sich dabei um Vorarbeiten für den adoptiven T-Zelltransfer von HER2369-377-spezifischen zytotoxischen T-Zellen in Patientinnen mit fortgeschrittenem, HER2-überexprimierenden Mammakarzinom im Rahmen einer klinischen Studie.

Die Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Generierung tumorlytischer zytotoxischer T-Zellen ist die Entwicklung optimaler Stimulationsmethoden mit voll ausgereiften und funktionsfähigen dendritischen Zellen (DC).

Folgende Stimulationsmethoden wurden angewandt:

- Stimulierung von HLA-A2⁺ peripheren mononukleären Zellen mit autologen DCs, die mit dem immunodominanten Peptid HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladen wurden.
- Stimulierung von HLA-A2⁺ CD8⁺ T-Zellen mit autologen DCs, die mit mRNA von HER2 transfiziert wurden. Dieser Ansatz sollte die endogene Prozessierung von HER2 aus dem Zytoplasma simulieren.
- Stimulierung von HLA-A2⁻ CD8⁺ T-Zellen mit allogenen HLA-A2⁺ DCs, die mit dem immunodominanten Peptid HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladen wurden. Dieser Ansatz sollte der Generierung möglichst hoch-avider T-Zellen dienen.

Zur Charakterisierung der generierten zytotoxischen T-Zellklone im Hinblick auf ihre tumorlytischen Fähigkeiten wurden verschiedene Zelllinien verwendet:

- HER2-überexprimierende Tumorzelllinien
- Mit HER2 transduzierte Zelllinien. Durch die Verwendung dieser Zelllinien sollte eine Verfälschung der Lyseergebnisse durch HER2-unabhängige Tumorzelleigenschaften wie z.B. Prozessierungsdefekte verhindert werden

Sowohl die Tumor- als auch die transduzierten Zelllinien wurden im Hinblick auf mögliche Prozessierungsdefekte untersucht.

2 Ergebnisse

2.1 Verschiedene Ausreifungsmethoden führen bei von Monozyten abstammenden DCs nicht zu Unterschieden in der Zytokinproduktion

Eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen ist das Vorhandensein kostimulatorischer Moleküle auf den antigenpräsentierenden Zellen (s. 1.1.2). Ohne kostimulierende Faktoren werden die T-Zellen nicht aktiviert, sondern anerg oder sterben. Da nur reife DC genügend kostimulatorische Faktoren exprimieren, muss bei *in vitro* generierten DC überprüft werden, ob diese die typischen Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86 hoch reguliert und den Monozytenmarker CD14 herunter reguliert haben. Besonders CD83 wird nur von reifen DC stark exprimiert. Die Ausreifung der DC kann durch unterschiedliche Stimuli erreicht werden. Im Labor werden zur Ausreifung üblicherweise die Zytokine IL-6, IL-1 β und TNF- α sowie PGE-2 eingesetzt, aber andere Methoden, wie die Ausreifung mit solublen CD40-Ligand, der natürlicherweise von T-Helferzellen exprimiert wird, sollen besonders erfolgreich bei der Stimulation von $CD8^+$ T-Zellen sein. Zum Ermitteln der besten Ausreifungsmethode wurden DCs von einem Spender entweder mit TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE-2, mit solublen CD40L und TNF- α oder nur mit CD40L ausgereift. Ein Vergleich der CD83-Expression zeigt, dass die Ausreifung mit TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE-2 zur höchsten Expression führt (Abb. 8a-d).

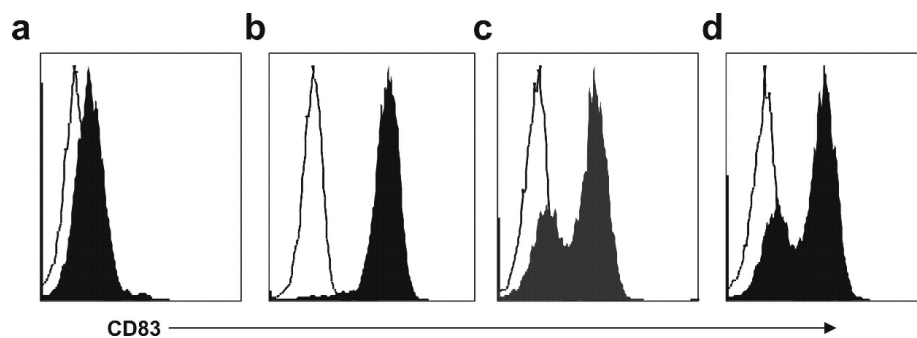


Abb. 8 Expression von CD83 auf unreifen und nach verschiedenen Methoden ausgereiften DCs. **a** Unreife DCs. **b** Ausreifung durch TNF- α , IL-6, IL-1 β + PGE-2. **c** Ausreifung durch CD40L **d** Ausreifung durch CD40L + TNF- α .

Ein wichtiges Merkmal reifer DCs ist die Sekretion von IL-12p70, einem Zytokin, das für die Auslösung einer zytotoxischen Immunantwort unerlässlich ist. IL-12, das ein Heterodimer aus IL-12p40 und IL-12p70 ist, wird deshalb bei der Stimulation der $CD8^+$ T-Zellen mit in die Kulturen gegeben. Im IL-12p70-ELISA konnte unabhängig von der Ausreifungsmethode keine IL-12-Sekretion nachgewiesen werden (Abb. 9).

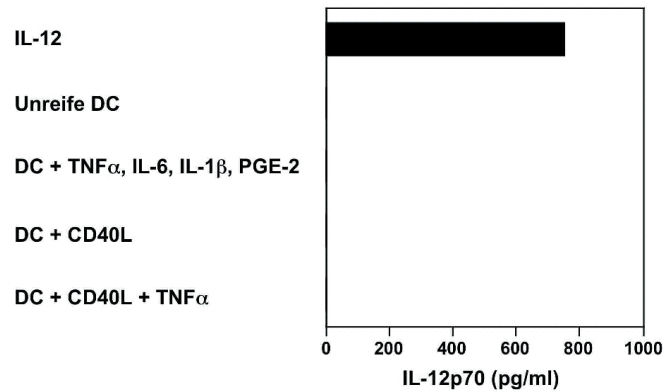


Abb. 9 Keine IL-12p70-Sekretion bei nach unterschiedlichen Protokollen ausgereiften DCs. IL-12p70-ELISA mit Überständen von unreifen und unterschiedlich ausgereiften DCs.

2.2 Verschiedene Zelllinien exprimieren nach retroviraler Transduktion HER2 bzw. HER2-ECD

Tumorzellen entwickeln Mechanismen, mit denen sie einer Immunantwort ausweichen können (99). Um zu verhindern, dass Ausweichmechanismen der Tumorzellen die Funktionstests der generierten zytotoxischen T-Zellen verfälschen konnten, wurden durch retrovirale Transduktion HER2-bzw. HER2-ECD-überexprimierende Zelllinien generiert.

Zunächst wurden mittels PCR Restriktionsschnittstellen an die 3'- und 5'-Enden der HER2- bzw. HER2-ECD-cDNS fusioniert. Als Matrize diente der Vektor pGS30. Über die anfusionierten Schnittstellen wurden die cDNS-Stücke dann in den retroviralen Vektor MSCV-MIGR1 kloniert (Abb. 10a). Ein Restriktionsverdau von potentiellen Klonen mit den verwendeten Restriktionsenzymen zeigte bei der Gelelektrophorese die erwarteten Fragmente (Abb. 10b + c).

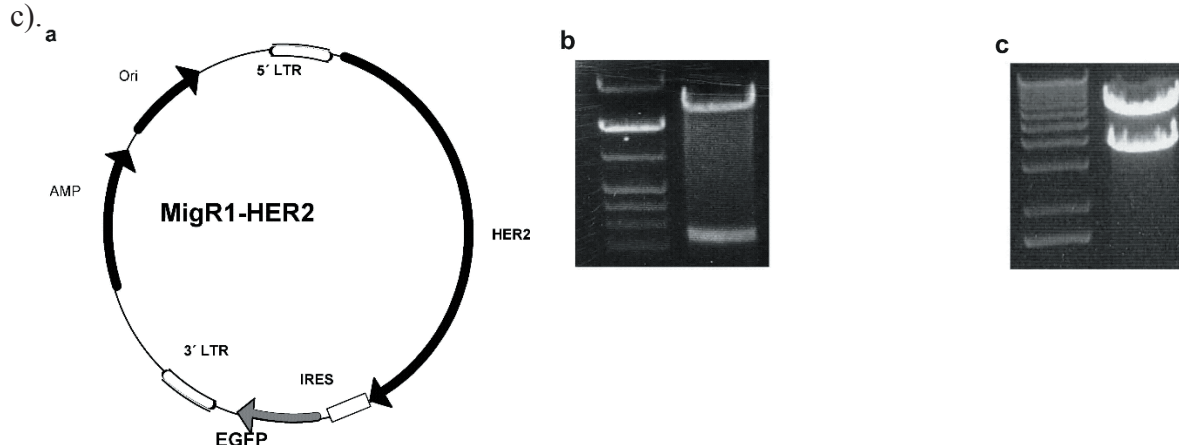


Abb. 10 Klonierung von HER2-ECD und HER2 in den retroviralen Vektor MSCV-MIGR1. a Schema des retroviralen Vektors MSCV-MIGR1. b MSCV-MIGR1 und HER2-ECD nach Restriktionsverdau mit XhoI. c MSCV-MIGR1 und HER2 nach Restriktionsverdau mit HpaI und XhoI.

Zur genauen Überprüfung der korrekten Aminosäurenabfolge wurde jeweils ein Klon sequenziert. Es wurden lymphoblastoide Zelllinien verschiedener Spender mit EBV

transformiert und ebenso wie die erythroblastäre, mit HLA-A2 transfizierte Zelllinie K562tA2 zur retroviralen Transduktion ausgewählt. Das jeweilige Konstrukt und der Leervektor wurden in die Verpackungszelllinie Phoenix A transfiziert, wobei sehr hohe Transfektionsraten erreicht wurden (Abb. 11a). Der Virustiter wurde durch Infektion von NIH3T3-Zellen und anschließende Messung im Durchflusszytometer bestimmt. In dem in Abb. 11b dargestellten Beispiel, bei dem die Transduktionsrate bei einer 1:1 Verdünnung des Virusüberstandes 20 % und bei einer 1:100 Verdünnung 1,5 % beträgt, liegt der Virustiter bei 1×10^4 /ml.

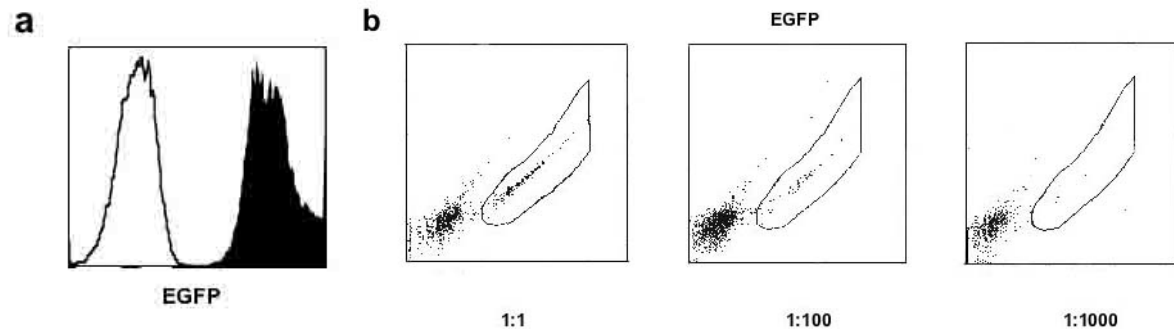


Abb. 11 Die Transfektion der Verpackungszelllinie und die Virusproduktion waren erfolgreich. a Durchflusszytometrische Messung der Phoenix-Zellen auf eGFP. b Durchflusszytometrische Messung mit verschiedenen Verdünnungen des Virus transduzierter NIH3T3-Zellen auf eGFP.

Anschließend wurden die Zielzellen transduziert, expandiert und auf das mit dem Zielantigen koexprimierte eGFP gefacst. Dabei wurden bei K562tA2-Zellen mit bis zu 11,6 % transduzierten Zellen die höchsten Transduktionsraten erreicht, bei EBV-transformierten LCL lag die Effizienz mit Werten von 1-2 % deutlich niedriger (Abb. 12a + b). Eindeutig transduzierte Ansätze wurden mit dem Zellsorter nach ihrer eGFP-Färbung sortiert. Nach der Sortierung waren jeweils zwischen 70 und 90% der Zellen eGFP-positiv (Abb. 12c). Bei späteren FACS-Messungen wurden die Zelllinien indirekt mit einem HER2-Antikörper gefärbt.

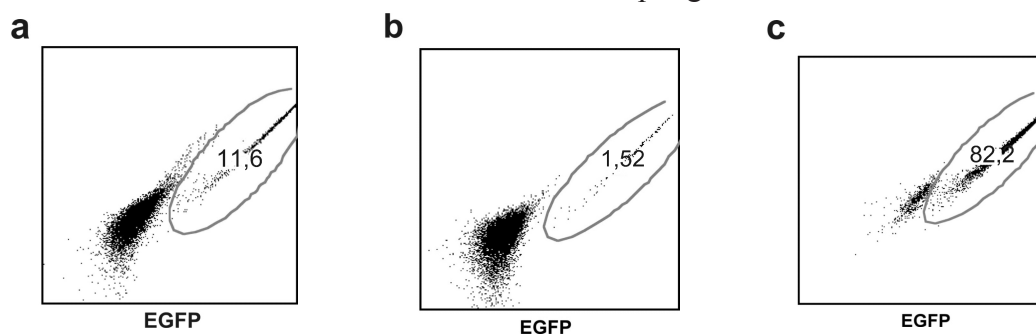


Abb. 12 Mit MSCV-MIGR1-HER2 transduzierte Zelllinien weisen eine eGFP-Expression auf
Durchflusszytometrische Messung der eGFP-Expression. a von K562tA2tMIGR1-HER2 wenige Tage nach der Transduktion. b von SMO-LCLtMIGR1-HER2 wenige Tage nach der Transduktion c von K562tA2tMIGR1-HER2 nach der Sortierung.

Diese Messungen ergaben z. B. bei den K562tA2tMIGR1-HER2 den eGFP-Messungen entsprechende Daten (Abb. 13a). Da eine HER2-Färbung bei den mit HER2-ECD-transduzierten Zelllinien wegen des Fehlens der Transmembran- und intrazellulären Domäne nicht möglich war, wurde mit diesen ein Western Blot durchgeführt. Die HER2-ECD-Bande, die bei 105 kD

liegt, ist deutlich zu erkennen (13b).

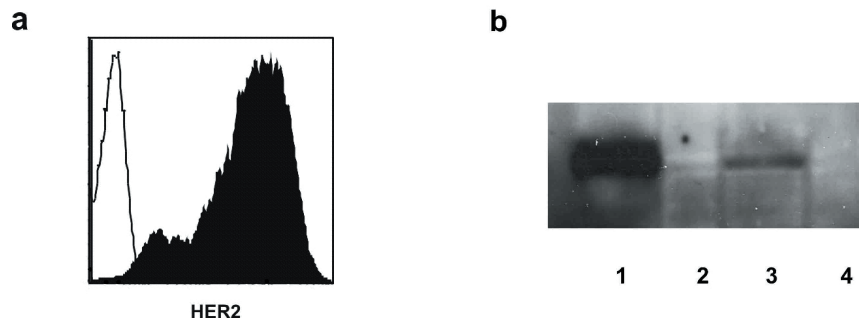


Abb. 13 Die Transduktion mit MSCV-MIGR1-HER2 bzw. MSCV-MIGR1-HER2-ECD war erfolgreich. a Durchflusszytometrischer Nachweis der HER2-Expression von K562tA2tMIGR1-HER2. **b** Immunhistochemischer Nachweis von HER2-ECD **1** K562tA2tMIGR1-HER2-ECD **2** K562tA2tMIGR1 **3** MS-LCLtMIGR1-HER2-ECD **4** MS-LCLtMIGR1.

2.3 Generierung von HER2-spezifischen CTLs mit peptidbeladenen DCs

Es gibt verschiedene Methoden zur Generierung tumorspezifischer CTLs. Eine weit verbreitete Methode zur *in-vitro*-Generierung tumorspezifischer CTLs ist die Stimulation mit peptidbeladenen DCs. Durch Beladung von DCs mit bekannten T-Zellepitopen ist es möglich auch T-Zellen zu isolieren, die subdominante Epitope erkennen (100). Die Stimulation mit peptidbeladenen DCs kombiniert mit der Sortierung spezifischer CTLs nach Anfärbung mit fluoreszierenden HLA/Peptid-Tetrameren wurde z.B. bei der Generierung hoch avider Melanom-reaktiver CTLs erfolgreich angewendet (101). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das erstmals 1995 von Fisk (75) beschriebene dominante T-Zellepitop $\text{HER2}_{369-377}$ zum Beladen von autologen DCs verwendet.

2.3.1 Stimulation von PBMCs mit $\text{HER2}_{369-377}$ -beladenen autologen DCs

PBMCs wurden dreimal mit $\text{HER2}_{369-377}$ -peptidbeladenen DCs stimuliert, dann vermischt, mit HLA-A0201/ $\text{HER2}_{369-377}$ -Multimer gefärbt und sortiert (Abb. 14a + b). In einem Ansatz der Spenderin SuHi befanden sich z. B. vor der Sortierung 0,36 % positive CD8^+ T-Zellen. Nach dem Sortieren wurden die CTLs mittels einer Verdünnungsreihe kloniert. 14 Tage später konnten 30 potentielle Klone in einem ^{51}Cr -Freisetzungstest auf ihre Lyse von peptidbeladenen T2-Zellen getestet werden (Abb. 14c). Vier der 26 lysierenden Klone wurden expandiert.

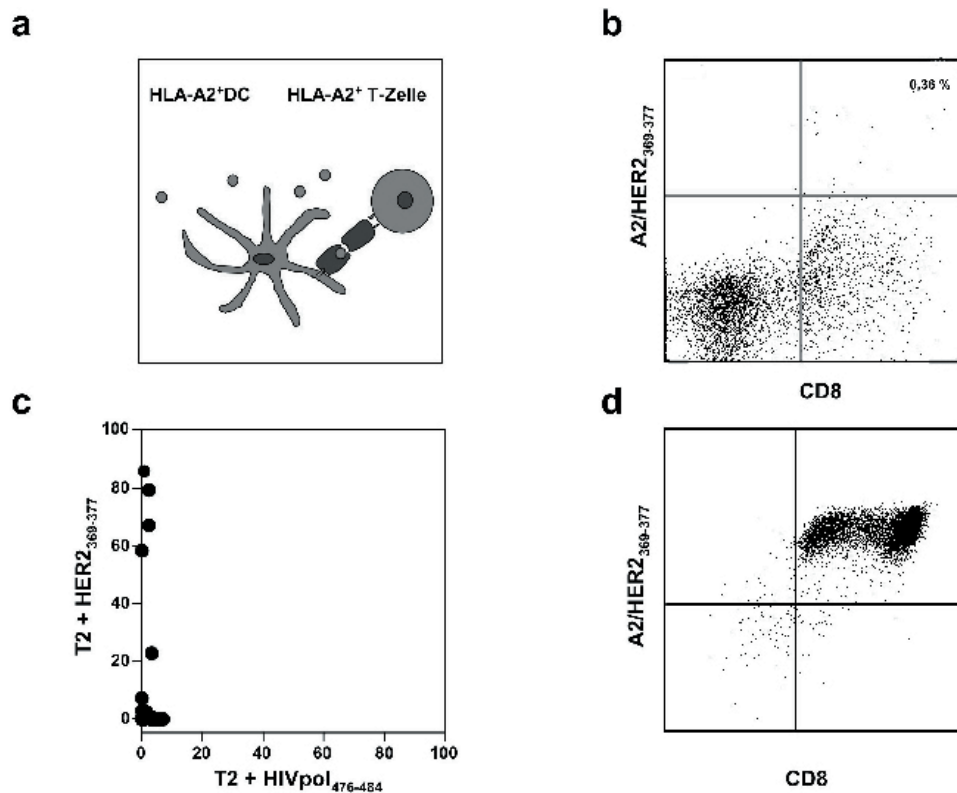


Abb. 14 Generierung des HER2₃₆₉₋₃₇₇ spezifischen CTL-Klons SuHi #16/12. **a** Vereinfachtes Modell der Stimulierung von HLA-A2⁺ T-Zellen mit autologen HER2₃₆₉₋₃₇₇-gepulsten DCs. **b** Tetramerfärbung eines Primingansatzes der Spenderin SuHi nach drei Stimulationen mit HER2₃₆₉₋₃₇₇-gepulsten DCs. **c** Spezifische Lyse von mit relevantem (HER2₃₆₉₋₃₇₇) und irrelevantem Peptid (HIVpol₄₇₆₋₄₈₄) beladenen T2-Zellen durch potentielle Klone der Spenderin SuHi in einem ⁵¹Cr-Freisetzungstest **d** Tetramerfärbung des Klons #16/12.

2.3.2 Mit peptidbeladenen DCs gezogene CTL-Klone sind tetramer-positiv und weisen eine mittlere Peptidaffinität auf

Die expandierten CTLs konnten mit dem HLA-A0201/HER2₃₆₉₋₃₇₇-Multimer gefärbt werden (Abb. 14d). Um möglicherweise von der Lyse peptidbeladener Zielzellen auf die Fähigkeit zur Lyse von endogen HER2-prozessierenden Zelllinien schließen zu können, wurde die Affinität der Klone für das HER2₃₆₉₋₃₇₇-Peptid durch Titration in ⁵¹Cr-Freisetzungstests bestimmt. Je höher die Affinität, umso besser sollten die Erkennung und Lyse HER2-überexprimierender Tumorzellen sein (z.B. 102). Die getesteten Klone NvB #2/12 und SuHi #16/12 weisen mit einer halbmaximalen Lyse von 10⁻⁸ -10⁻⁹ M bzw. 10⁻¹⁰ mittlere bis relativ hohe Peptidaffinitäten auf (Abb. 15).

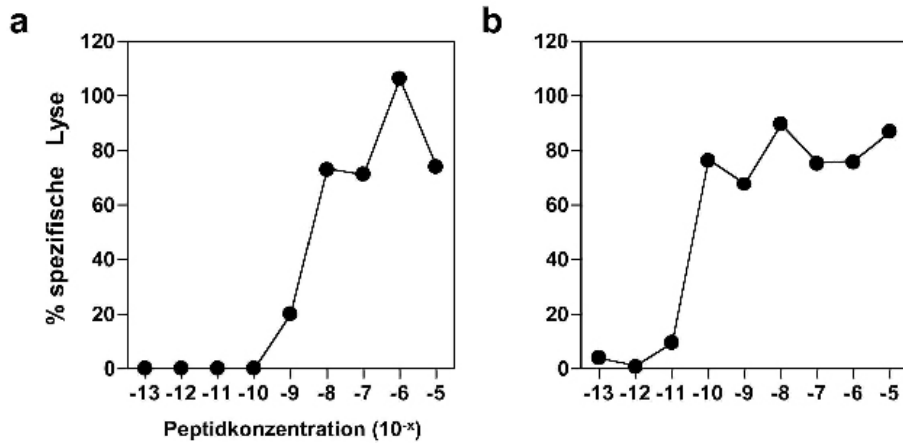


Abb. 15 CTL-Klone weisen mittlere bis hohe Peptidspezifitäten für HER2₃₆₉₋₃₇₇ auf. a Peptidtitration des Klonen NvB #2/12 mit HER2₃₆₉₋₃₇₇-gepulsten T2-Zellen. **b** Peptidtitration des Klonen SuHi #16/12 mit HER2₃₆₉₋₃₇₇-beladenen T2-Zellen.

2.3.3 Einige peptidstimulierte HER2-reaktive Klone weisen eine Kreuzreaktivität mit HER4 auf

Da die HER-Familie große Homologien aufweist, wurde getestet, ob die HER2₃₆₉₋₃₇₇-spezifischen Klone auch die entsprechenden Peptide HER1₃₆₄₋₃₇₂, HER3₃₅₆₋₃₆₄ und HER4₃₆₁₋₃₆₉ erkennen können (Abb. 16a). Dazu wurden ⁵¹Cr-Freisetzungstests mit Peptidtitrationen der jeweiligen Peptide durchgeführt.

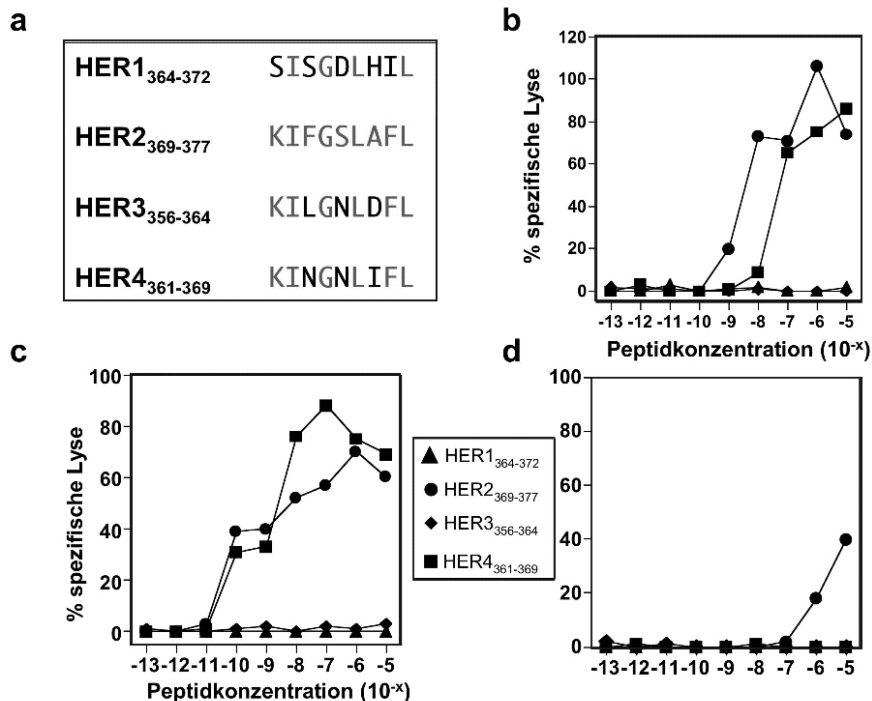


Abb. 16 Einige mit peptidbeladenen DCs stimulierte CTL-Klone kreuzreagieren mit HER4₃₆₁₋₃₆₉. a Die Aminosäuresequenz von HER2₃₆₉₋₃₇₇ und den entsprechenden Peptiden von HER1, HER3 und HER4. **b** Peptidtitration des CTL-Klonen NvB #2/12 mit den vier analogen HER-Peptiden. **c** Peptidtitration des CTL-Klonen SuHi #16/12 mit den vier analogen HER-Peptiden. **d** Peptidtitration des CTL-Klonen SuHi #7 mit den vier analogen HER-Peptiden.

So konnten gleichzeitig mögliche Kreuzreaktionen mit den anderen Peptiden erkannt und die Affinität des jeweiligen TCR für diese Peptide bestimmt werden.

Mehrere Klone wie z.B. Klon SuHi #30/12 (nicht gezeigt), Klon SuHi #16/12 und Klon NvB #2/12 kreuzreagierten mit HER4₃₆₁₋₃₆₉ (Abb. 16b). Klon SuHi #16/12 zeigte sogar die gleiche Affinität für das HER4-Peptid wie für HER2₃₆₉₋₃₇₇. Die von den gleichen Spendern stammenden Klone SuHi #7 und NvB #41 erkannten weder HER4₃₆₁₋₃₆₉ noch eines der anderen HER-Peptide außer HER2₃₆₉₋₃₇₇ (Abb. 16c).

2.3.4 Die mit peptidbeladenen DCs gezogenen CTL-Klone lysieren keine Tumorzellen oder Transfektanten

Die Fähigkeit der CTL-Klone natürlich prozessiertes HER2₃₆₉₋₃₇₇ zu erkennen, wurde durch ⁵¹Cr-Freisetzungstests und ELISA bestimmt. Als Zielzellen dienten neben HER2-überexprimierenden Mamma- und Ovarialkarzinomlinien auch die mit MSCV-MIGR1-HER2- und MSCV-MIGR1-HER2-ECD- und als Negativkontrolle mit MSCV-MIGR1-transduzierten Zelllinien. Zur Steigerung der Lysierbarkeit wurden neben unbehandelten auch mit IFN- γ -vorbehandelte Zelllinien getestet.

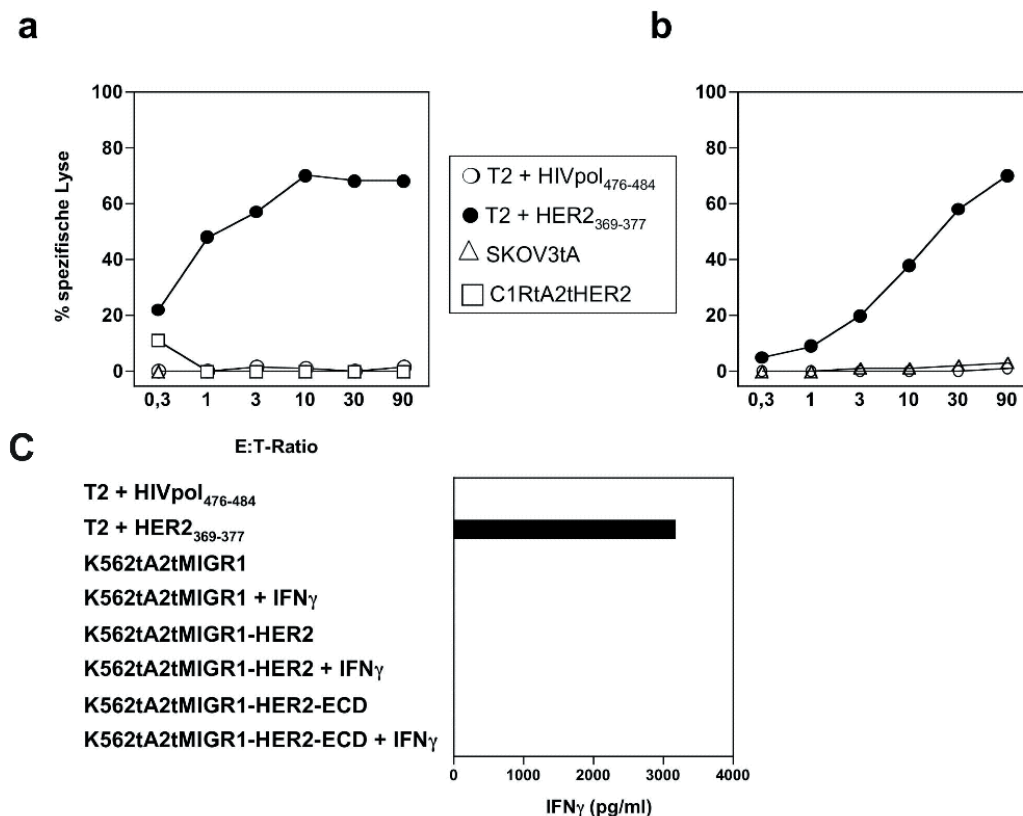


Abb. 17 Einige der mit peptidbeladenen DCs stimulierten CTL-Klone erkennen in Ausnahmefällen die mit IFN- γ vorbehandelten HER2 überexprimieren SKOV3tA2. **a** ⁵¹Cr-Freisetzungstest von CTL-Klon SuHi #16/12 mit peptidbeladenen T2-Zellen, SKOV3tA2 und C1RtA2tHER2 als Zielzellen. **b** ⁵¹Cr-Freisetzungstest von CTL-Klon NvB #2/12 mit peptidbeladenen T2-Zellen, SKOV3tA2 und C1RtA2tHER2 als Zielzellen. **c** IFN- γ -ELISA von Überstand aus Koinkubationen von CTL-Klon NvB #2/12 mit peptidbeladenen T2 und transduzierten K562tA2.

Einige Klone wie z.B. SuHi #16/12 waren in der Lage die mit IFN- γ -vorbehandelte Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3tA2 zu lysieren (Abb. 17a), die transduzierten und andere Tumorzelllinien wurden nicht erkannt (Abb. 17a). Andere Klone wie z.B. NvB #2/12 und GO #45 lysierten keine HER2-überexprimierenden Zelllinien (Abb.17b + Tab. 1)

Im IFN- γ -ELISA löste z.B. die Inkubation des mit peptidbeladenen DC stimulierten HER2₃₆₉₋₃₇₇-spezifischen Klons NvB #2/12 mit mit HER2- bzw. HER2-ECD-transduzierten K562tA2-Zellen keine IFN- γ -Sekretion aus (Abb. 17c).

2.4 Generierung von HER2-spezifischen CTLs mit HER2-mRNA-transfizierten DCs

Da die Peptid-stimulierten CTLs nur in Ausnahmefällen endogen prozessiertes HER2 erkennen konnten, wurde eine alternative Stimulationsmethode gesucht, bei der die APCs endogen prozessierten HER2 präsentieren. Die bereits erfolgreich durchgeführte retrovirale Transduktion von DCs (97), ist für GMP-gerechte Studien nicht zugelassen, deshalb bietet sich hier die Transfektion von DC mit HER2-mRNA an. Erfolgreiche Stimulation von CTLs mit transfizierten DCs wurde z.B. für das Carcinoembryonic Antigen (CEA) beschrieben (103).

2.4.1 Stimulation von CD8⁺ T-Zellen mit elektroporierten autologen DCs

Über eine MACS-Säule isolierte CD8⁺ T-Zellen der Spenderin KW wurden zweimal mit autologen DC, die mit HER2-mRNA elektroporiert worden waren, stimuliert (Abb. 18a). Zellen aus jedem einzelnen Loch aus den Stimulierungsplatten wurden in einem IFN- γ -ELISpot mit HER2₃₆₉₋₃₇₇-Peptid- und HIVpol₄₇₆₋₄₈₄-beladenen T2-Zellen sowie mit HER2-transduzierten Zelllinien auf ihre Spezifität untersucht. Aus Abb. 18b wird ersichtlich, dass einige CTL-Linien sowohl HER2₃₆₉₋₃₇₇-peptidbeladene als auch HER2 endogen prozessierende Zelllinien erkannten. Die Zellen aus einem Loch mit eindeutig spezifischen T-Zellen wurden kloniert (Abb. 18b).

Nach zwei Wochen wurden 54 potentielle Klone wiederum in einem IFN- γ -ELISpot getestet (Abb. 18c). Vier Klone, die sowohl synthetisches Peptid als auch endogen prozessiertes HER2 erkannt hatten, wurden expandiert. Nach der 1. Expansion lysierten aber nur noch die Klone KW #41 und KW #63 HER2-überexprimierende K562tA2tMIGR1-HER2 zu mehr als 20% (Abb. 18d).

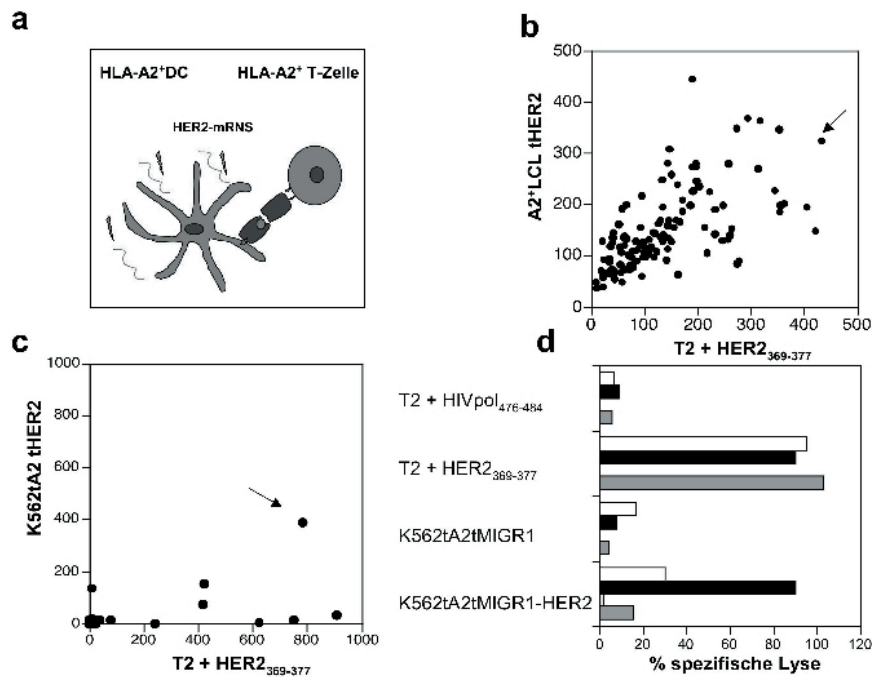


Abb. 18 Generierung von HER2₃₆₉₋₃₇₇-spezifischen, tumorlytischen Klonen durch Stimulation mit HER2-mRNA-transfizierten DCs. **a** Vereinfachtes Modell der Stimulierung von HLA-A2⁺ T-Zellen mit autologen, HER2-mRNA transfizierten DCs. **b** IFN- γ -ELISpot von Mikroturen aus 96-Loch-Platten mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladenen T2-Zellen und endogen HER2-prozessierenden transduzierten LCLs. Der Pfeil deutet auf eine Mikrokultur, die beide Zielzellen gut erkannte und kloniert wurde. **c** IFN- γ -ELISpot von potentiellen Klonen mit peptidbeladenen T2 und K562tA2tMIGR1-HER2. Der Pfeil zeigt auf Klon 63. **d** ⁵¹Cr-Freisetzungstest von vier potentiellen CTL-Klonen mit peptidbeladenen und transduzierten Zelllinien als Zielzellen □ „Klon KW #40“, ■ „Klon KW #63“, ▒ „Klon KW #77“, ▓ „Klon KW #96“.

2.4.2 Der mit elektroporierten DCs gezogene CTL-Klon ist tetramer-negativ und weist eine niedrige Peptidaffinität auf

Der CTL-Klon KW #63 erwies sich sowohl in der Färbung mit dem nichtablösbaren als auch mit dem stabileren ablösbaren HLA-A0201/HER2₃₆₉₋₃₇₇-Multimer als negativ (Abb. 19a + b). Fehler beim Färben bzw. der Funktionsfähigkeit der Multimere konnten ausgeschlossen werden.

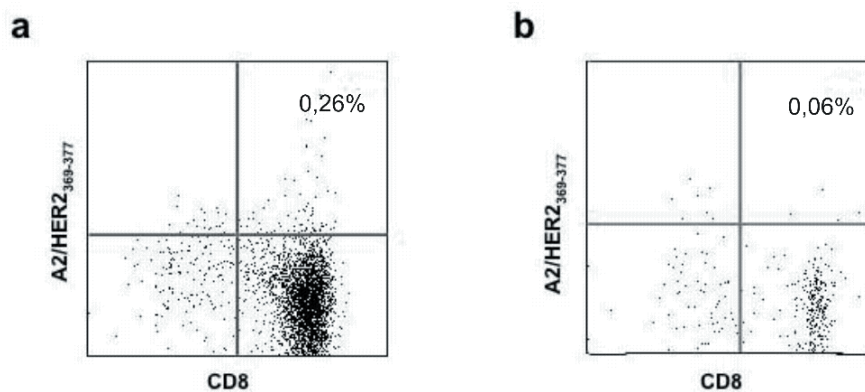


Abb. 19 Klon KW #63 ist mit HER2₃₆₉₋₃₇₇-Multimeren nicht anfärbbar. **a** Tetramerfärbung von CTL-Klon KW #63. **b** Streptamerfärbung von CTL-Klon KW #63.

Da die T-Zellrezeptoren bei bestimmten Temperaturen internalisiert werden und bei dieser Internalisierung gebundene Multimere mit in die Zelle gelangen können, wodurch sie auch bei schwacher Affinität nachgewiesen werden können, wurden mit Klon KW #63 Multimerfärbungen bei 4°C, RT und 37°C durchgeführt. Während unspezifische Bindungen bei steigender Temperatur deutlich zunahm, blieb der Klon HLA-A0201/HER2₃₆₉₋₃₇₇-Multimer negativ (Abb. 20).

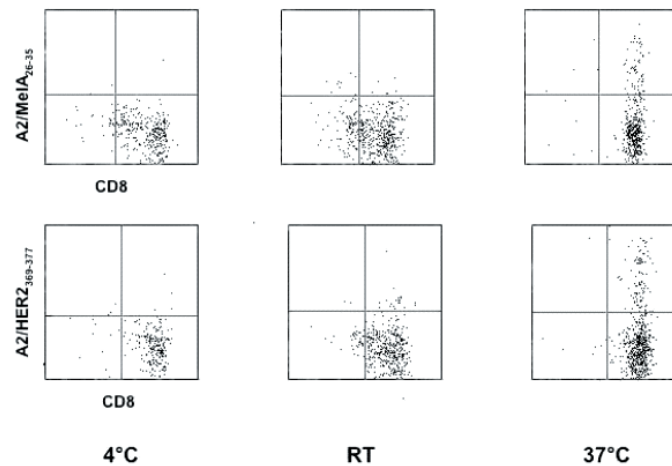


Abb. 20 Auch bei steigender Temperatur lasst sich Klon KW #63 nicht spezifisch anfärben. Tetramerfärbung von Klon KW #63 mit Kontrolltetramer HLA-A0201/HIVpol₄₇₆₋₄₈₄ (oben) und relevantem Tetramer HLA-A2/HER2₃₆₉₋₃₇₇ (unten).

Auch bei Klon KW #63 wurde eine V β -Färbung durchgeführt, um Hinweise auf die Klonalität zu bekommen. Dabei zeigte sich, dass der Klon KW #63 ein mit dem verwendeten TCR V β Repertoire nicht zu bestimmendes V β -Motiv besitzt. Um sicherzustellen, dass es sich trotz der negativen Multimerfärbung und des nicht bestimmbareren V β -Motivs um einen T-Zellklon handelt, wurde eine Färbung mit einem anti-TCR-Antikörper durchgeführt. Im Vergleich mit dem peptidspezifischen Klon NvB #2/12 ergeben sich keine Unterschiede (Abb. 21a). Bei der Peptidtitration zeigt Klon KW #63 mit einer halbmaximalen Lyse von etwa 10⁻⁶ M eine niedrige Peptidaffinität (Abb. 21b).

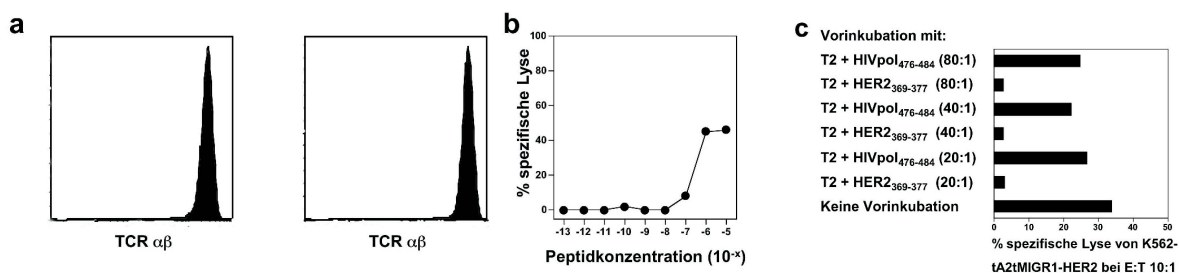


Abb. 21 Der mit HER2-mRNA-transfizierten DCs stimulierte CTL-Klon KW #63 ist HER2₃₆₉₋₃₇₇-spezifisch. **a** Durchflusszytometrische Messung auf die α - und β -Kette des T-Zellrezeptors von NvB #2/12 (links) und Klon KW #63 (rechts). **b** Peptidtitration von Klon KW #63 mit HER2₃₆₉₋₃₇₇-beladenen T2-Zellen. **c** 51Cr-Freisetzungstest mit Klon KW #63 und K562tA2tMIGR1-HER2 als Zielzellen nach Vorinkubation mit HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- bzw. HER2₃₆₉₋₃₇₇-beladenen unmarkierten T2-Zellen im Verhältnis 80:1, 40:1 und 20:1.

Um nachzuweisen, dass Klon KW #63 trotz der negativen Multimerfärbungen und der niedrigen

Peptidaffinität spezifisch für HER2₃₆₉₋₃₇₇ ist, wurde ein spezieller Test durchgeführt. In diesem Versuch konnte eine Präinkubation des CTL-Klons mit T2-Zellen, die mit dem relevanten HER2-Peptid, nicht aber mit einem irrelevanten HIV-Peptid beladen worden waren, die Lyse von K562tA2tMIGR1-HER2 im ⁵¹Cr-Freisetzungstest hemmen (Abb.21c). Dies kann als starker Hinweis auf die Spezifität des Klones KW #63 gewertet werden.

2.4.3 Klon KW #63 weist eine Kreuzreaktivität mit HER3 auf

Es wurden ein ⁵¹Cr-Freisetzungstest und ein IFN- γ -ELISA mit peptidbeladenen T2-Zellen durchgeführt, um zu überprüfen, ob Klon KW #63 auch die dem HER2₃₆₉₋₃₇₇ entsprechenden Peptide HER1₃₆₄₋₃₇₂, HER3₃₅₆₋₃₆₄ und HER4₃₆₁₋₃₆₉ erkennt (Abb. 16a). Nur nach Inkubation mit HER3₃₅₆₋₃₆₄ konnte eine Lyse, die etwa ein Drittel der Lyse der mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladenen T2-Zellen betrug, und eine im Vergleich zu HER2₃₆₉₋₃₇₇ viel geringere, aber eindeutige IFN- γ -Sekretion nachgewiesen werden (Abb. 22a + b). Ein IFN- γ -ELISA nach Stimulation mit K562tA2, die mit die HER-Proteine enthaltenen Plasmiden elektroporiert worden waren, zeigt Erkennung sowohl von HER2, HER3 und HER4 (Abb. 22d). Die unterschiedlich hohe IFN- γ -Sekretion ist dabei vermutlich auf die ungleiche Transfektionseffizienz der einzelnen Plasmide zurückzuführen. Die Erkennung von endogen prozessiertem HER4 steht im Gegensatz zum Nichterkennen des HER4-Peptids. Um die Affinität von Klon KW #63 zu HER3₃₅₆₋₃₆₄ im Vergleich zu HER2₃₆₉₋₃₇₇ zu ermitteln, wurde ein ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit Peptidtitration dieser beiden Peptide durchgeführt. Wie in Abb. 22c gezeigt, liegt die mittlere Peptidaffinität von HER3₃₅₆₋₃₆₄ zwar auch bei 10⁻⁶, M die Lyse übersteigt aber nicht 20%.

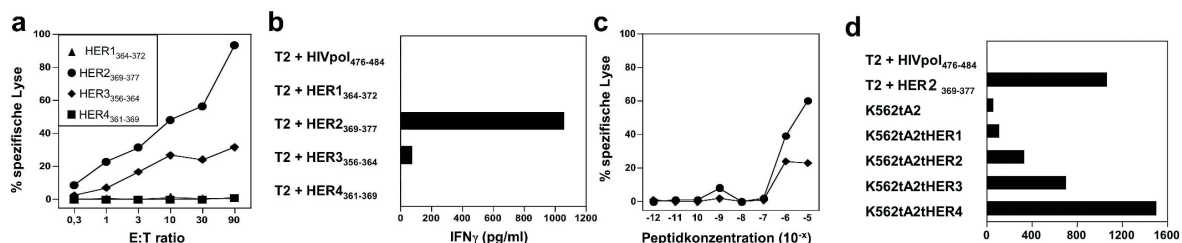


Abb. 22 Klon KW #63 kreuzreagiert mit HER3₃₅₆₋₃₆₄. **a** ⁵¹Cr-Freisetzungstest von Klon #63 mit HER-Peptid-beladenen T2-Zellen. **b** IFN- γ -ELISA von Überstand aus einer Koinkubation von Klon #63 mit HER-Peptid-beladenen T2-Zellen. **c** Peptidtitration von Klon KW #63 mit HER2₃₆₉₋₃₇₇- bzw. HER3₃₅₆₋₃₆₄-beladenen T2-Zellen. **d** IFN- γ -ELISA von Überstand aus einer Koinkubation von Klon #63 mit HER-transfizierten K562tA2.

Auf Grund der Beobachtung, dass der Klon KW #63 auch endogen prozessiertes HER3 und HER4 erkennt, wurden alle HER2-überexprimierenden Zelllinien durchflusszytometrisch auf ihre HER3- und HER4-Expression untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass alle Tumorzelllinien HER3 exprimieren, die SKOV3tA2 allerdings nur niedrig, während bei den mit HER2-transduzierten Zelllinien kein HER3 nachgewiesen werden konnte (Tab. 2). HER4 wird mit einer MFI von 134 nur von den KS24.22 deutlich exprimiert (Tab. 2).

2.4.4 Klon KW #63 erkennt und lysiert mit HER2-transduzierte und HER2-überexprimierende Tumorzelllinien

Die Fähigkeit der mit HER2-mRNA-transfizierten DCs stimulierten CTL-Klone natürlich prozessiertes HER2₃₆₉₋₃₇₇ zu erkennen, wurde ebenfalls durch ⁵¹Cr-Freisetzungstests und ELISA bestimmt. Als Zielzellen dienten auch hier sowohl die mit MSCV-MIGR1-HER2- und MSCV-MIGR1-HER2-ECD- und als Negativkontrolle mit MSCV-MIGR1-transduzierten Zelllinien als auch HER2-überexprimierende Mamma- und Ovarialkarzinomlinien. Alle Zelllinien wurden sowohl ohne als auch mit IFN- γ -Vorbehandlung getestet. Da die Klone KW #77 und KW #96 schon nach der 1. Expansion nicht mehr in der Lage waren, HER2-überexprimierende Zelllinien zu erkennen, wurden nur noch die Klone KW #41 und KW #63 weitergeführt. Klon KW #41 konnte nach der 2. Expansion weder im ⁵¹Cr-Freisetzungstest noch im IFN- γ -ELISA peptidbeladene oder mit HER2-transduzierten Zelllinien erkennen (nicht gezeigt), so dass nur noch Klon KW #63 weiter untersucht wurde.

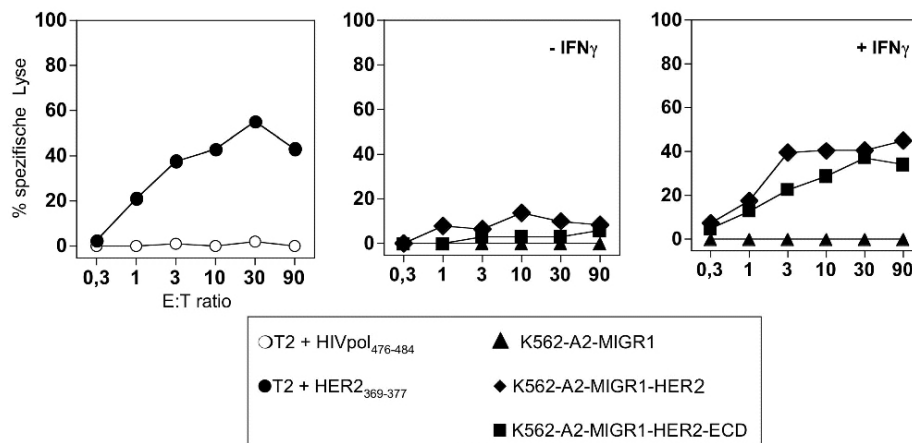


Abb. 23 Klon KW #63 lysiert mit IFN- γ vorbehandelte HER2-exprimierende K562tA2.

⁵¹Cr-Freisetzungstest mit peptidbeladenen T2 und transduzierten K562tA2 mit und ohne IFN- γ -Vorbehandlung.

Klon KW #63 war in der Lage mit IFN- γ -vorbehandelte K562tA2tMIGR1-HER2 und -HER2-ECD in ⁵¹Cr-Freisetzungstests zu lysieren (Abb. 23). Dabei erreichte der Klon bei mit IFN- γ -vorbehandelten K562tA2tMIGR1-HER2 etwa die gleiche Lyse wie bei peptidbeladenen T2-Zellen. Die nur mit dem leeren MSCV-MIGR1 transduzierten K562tA2 wurden dagegen nicht erkannt. Im IFN- γ - und TNF- α -ELISA konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (Abb. 24a). Die Inkubation mit K562tA2tMIGR1-HER2 ohne Vorbehandlung induzierte eine geringe IFN- γ -Sekretion. Die beim Screening und nach der 1. Expansion (Abb. 18) beobachtete Lyse unbehandelter K562tA2tMIGR1-HER2 trat nach weiteren Expansionen nicht mehr auf. Die ebenfalls transduzierten SMO-LCL wurden im ⁵¹Cr-Freisetzungstest und TNF- α -ELISA nicht erkannt und lösten auch im IFN- γ -ELISA nur eine minimale IFN- γ -Produktion aus (Tab. 1 + Abb. 24a), obwohl sie im IFN- γ -Screening-ELISpot des Klons KW #63 erfolgreich als Targets eingesetzt worden waren.

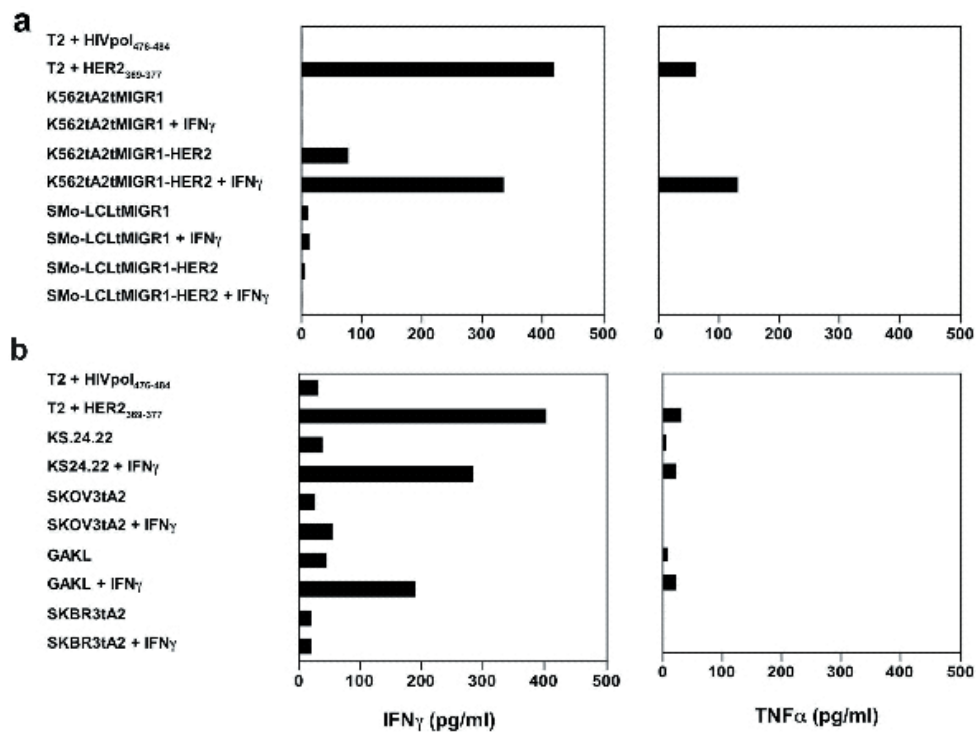


Abb. 24 Klon KW #63 sezerniert IFN- γ und TNF- α bei Inkubation mit einigen HER2-überexprimierenden Zelllinien. IFN- γ - (links) und TNF- α -ELISA (rechts) nach Inkubation von Klon KW #63 mit peptidbeladenen T2 und **a** transduzierten K562tA2 und SMO-LCLs **b** Tumorzelllinien.

Von den HER2-überexprimierenden Mamma- und Ovarialkarzinomzelllinien wurden nur KS24.22- und SKOV3tA2-Zellen nach IFN- γ -Behandlung von Klon KW #63 lysiert, GAKL und SKBR3tA2 dagegen nicht (Abb. 25b, c). Im IFN- γ -ELISA konnte gezeigt werden, dass auch mit IFN- γ vorbehandelte GAKL den Klon zur Zytokinsekretion anregten (Abb. 24b). SKBR3tA2 lösten überhaupt keine Reaktion aus. Nur die vorbehandelten KS24.22 und GAKL lösten eine TNF- α -Sekretion aus. Ohne Vorbehandlung mit IFN- γ wurde außer in einem von drei ^{51}Cr -Freisetzungstests die SKOV3tA2-Zellen keine der Mamma- und Ovarialkarzinomlinien erkannt.

Die Melanomzelllinien SK-MEL-29 und SK-MEL-37 sollten eigentlich als Negativkontrolle dienen, die kein HER2 exprimieren und deshalb auch nicht lysiert werden sollten. Im ^{51}Cr -Freisetzungstest zeigte sich jedoch, dass sie unabhängig von einer IFN- γ -Vorbehandlung erkannt wurden (Abb. 25a). In Tab.1 ist die Erkennung der SK-MEL-37 im IFN- γ - und TNF- α -ELISA aufgeführt. Durchflusszytometrische Messungen mit einem HER2-spezifischen Antikörper zeigten, dass beide Melanomzelllinien HER2 exprimieren (Tab. 2). Auch in der Literatur wurde kürzlich das Vorkommen von ErbB-Rezeptoren in Melanomzelllinien beschrieben (104).

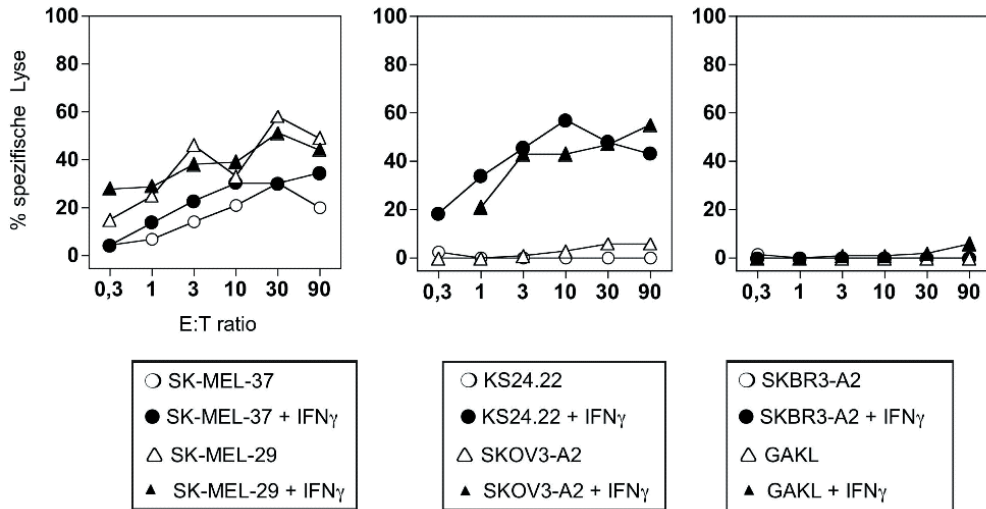


Abb. 25 Klon KW #63 lysiert manche HER2-überexprimierenden Zelllinien nur nach IFN-γ-Vorbehandlung oder gar nicht. ⁵¹Cr-Freisetzungstest von Klon KW #63 mit. a SK-MEL-37 und SK-MEL-29 +/- IFN-γ. b KS24.22 und SKOV3tA2 +/- IFN-γ. c SKBR3tA2 und GAKL +/- IFN-γ.

2.4.5 Klon KW #63 erkennt auch Zellen, die HER2 nicht überexprimieren

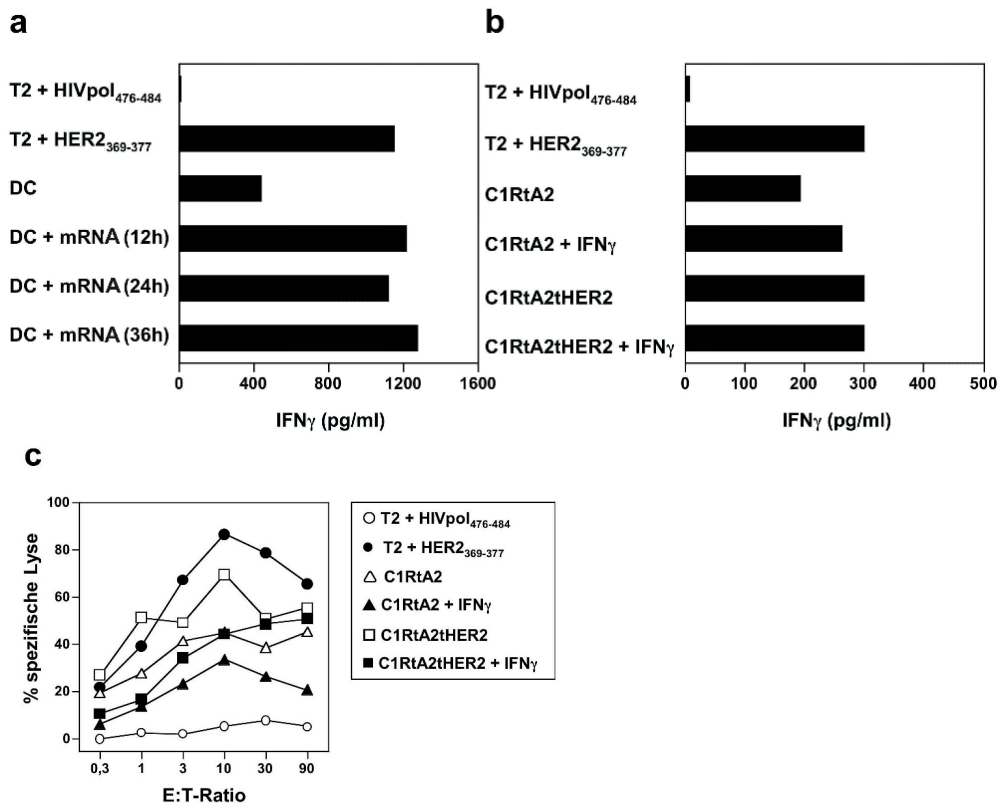


Abb. 26 Klon KW #63 erkennt DCs und C1RtA2, die nicht mit HER2 transfiziert sind. a IFN-γ-ELISA nach Inkubation von Klon KW #63 mit peptidbeladenen T2-Zellen sowie HER2-mRNA-transfizierten DCs. b IFN-γ-ELISA nach Inkubation von Klon KW #63 mit peptidbeladenen T2-Zellen und C1RtA2 sowie C1RtA2tHER2 +/- IFN-γ. c ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit Klon KW 63 und peptidbeladenen T2, sowie C1RtA2 und C1RtA2tHER2 +/- IFN-γ als Zielzellen.

Die Erkennung von mit HER2-mRNA transfizierten DCs durch Klon #63 konnte mittels eines IFN γ -ELISAs nachgewiesen werden. Mit etwa 1200 pg/ml wurde eine dreimal höhere IFN γ -Sekretion bei Inkubation mit HER2-mRNA-transfizierten DCs als mit 400 pg/ml bei untransfizierten DCs beobachtet (Abb. 26a).

Ob die Elektroporation 12 h, 24 h oder 36 h vor dem Test stattgefunden hatte, spielt bei den ermittelten Daten keine Rolle. Wegen der hohen IFN γ -Sekretion bei Inkubation mit untransfizierten DCs wurde die Expression von HER2, HER3 und HER4 auf DCs durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 27a). Es konnte eine niedrige HER2-Expression bei einem Teil der Zellen festgestellt werden. Zusätzlich wurden das Vorkommen von HER3- und HER4-mRNA in DCs durch RT-PCRs nachgewiesen (Abb. 27b).

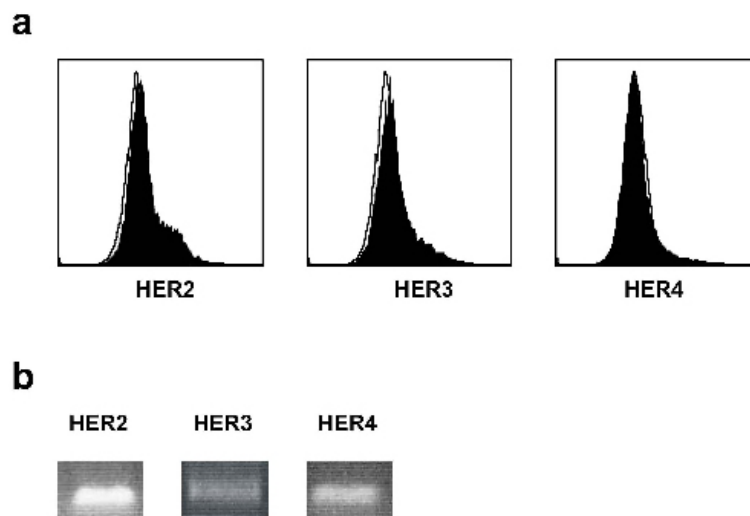


Abb. 27 Reife DCs exprimieren teilweise etwas HER2, in der RT-PCR sind auch HER3 und HER4 nachweisbar. a Durchflusszytometrische Messung von reifen DC auf HER2, HER2 und HER4, weiß Isotypenkontrolle IgG. **b** RT-PCR von reifen DC auf HER2, HER3 und HER4

Eine Zelllinie, die sowohl ohne als auch mit HER2-Überexpression im erkannt wurde, sind die C1RtA2 (Abb. 26 b,c). Die C1RtA2 stammen von einer normalen EBV-transformierten B-Zelllinie ab, die durch drei Runden Bestrahlung mit γ -Strahlen und Immunoselektion mit anti-HLA-Antikörpern (105) HLA-A, B negativ geworden ist. Nur die Expression von HLA-Cw4 blieb erhalten. Später konnte allerdings gezeigt werden, dass auch noch geringe Mengen HLA-B35 auf den Zellen exprimiert werden (106). Um dieses Ergebnis für die verwendeten Zellen zu überprüfen, wurde die Zelllinie vom Labor für Immungenetik (Kinder- und Kinderpoliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Leiter: Prof. Dr. med. E. Albert, Dr. med. habil. S. Scholz) HLA-typisiert. Die Expression von HLA-B35 und Cw4 bestätigte sich (nicht gezeigt). Da die Spenderin von Klon KW #63 aber ebenfalls HLA-B35 positiv war, schied dieses MHC-Molekül als Ursache für eine Kreuzreaktivität aus. Die Möglichkeit, dass der Klon mit HLA-Cw4 kreuzreagiert, wurde in einem ^{51}Cr -Freisetzungstest und einem IFN γ -ELISA mit zwei HLA-Cw4-exprimierenden lymphoblastoiden Zelllinien überprüft und ausgeschlossen (Abb. 28a). Die Lyse der C1RtA2 konnte durch Vorinkubation mit unmarkierten, HER2₃₆₉₋₃₇₇-beladenen T2-Zellen vor dem ^{51}Cr -Freisetzungstest verhindert werden (Abb. 28b).

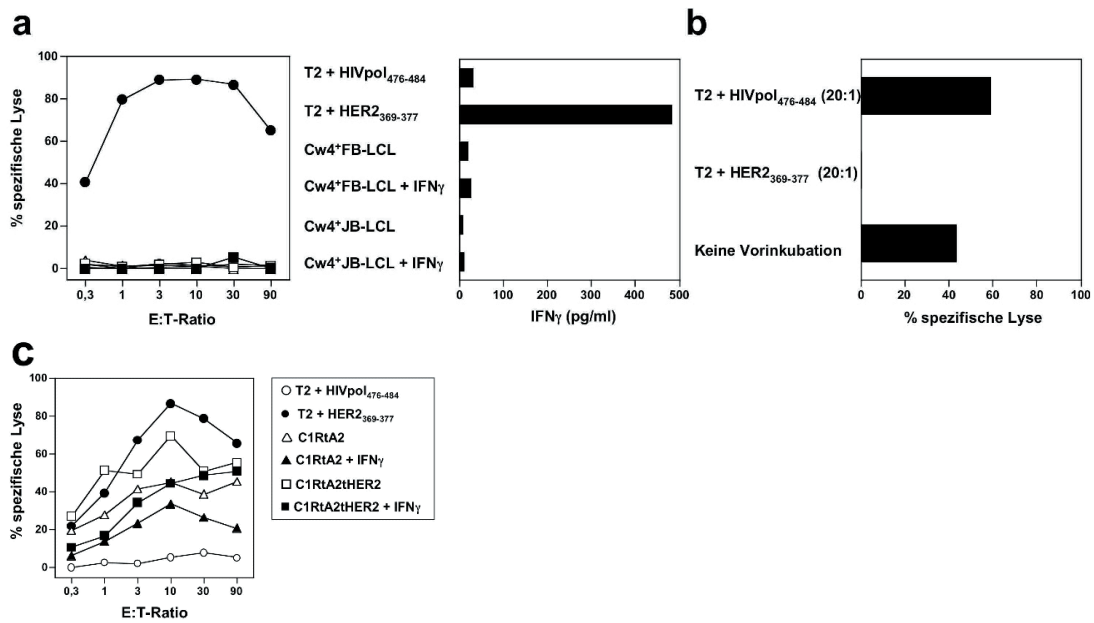


Abb. 28 CTL-Klon KW #63 erkennt Cw4 nicht und die Lyse ist HLA-A2-restringiert. **a** ⁵¹Cr-Freisetzungstest von Klon KW#63 mit HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- (○) und HER2₃₆₉₋₃₇₇-beladenen T2-Zellen (●), Cw4+ -/+ IFN-γ (△, ▲) sowie Cw4+ JB-LCL -/+ IFN-γ (□, ■). **b** IFN-γ-ELISA nach Inkubation von CTL-Klon KW 63 mit peptidbeladenen T2 und Cw4+ LCL. **c** ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit Klon KW 63 und C1RtA2 als Zielzellen nach Vorinkubation mit HIVpol₄₇₆₋₄₈₄- bzw. HER2₃₆₉₋₃₇₇-beladenen unmarkierten T2-Zellen im Verhältnis 20:1.

Dies deutet auf eine spezifische Lyse hin. HER2 konnte im Durchflusszytometer jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 29a). Auch die Expression von HER3 und HER4 konnte mit spezifischen Antikörpern im Durchflusszytometer nicht nachgewiesen werden (Abb. 29a). Zusätzlich wurde mit RT-PCR das Vorhandensein von HER2-, HER3- und HER4-mRNA überprüft. Während die durchflusszytometrischen Messungen negativ blieben (Abb. 29a), konnten HER4- und in sehr geringer Menge HER3-mRNA in den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 29b). Ob diese Entdeckung allerdings als einzige Erklärung für die unabhängig von IFN-γ hohe Lyse der C1RtA2 ausreicht, muss offen bleiben.

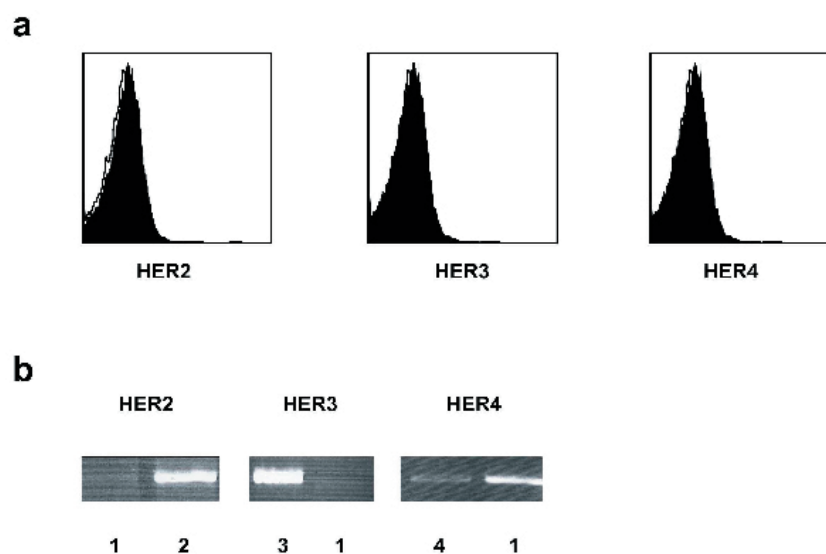


Abb. 29 C1RtA2 exprimieren nur in der RT-PCR nachweisbar Mengen an HER2 und HER3. **a** Durchflusszytometrische Messung von C1RtA2 auf HER2, HER3 und HER4. **b** RT-PCR auf HER2, HER3 und HER4 1 C1RtA2, 2 C1RtA2tHER2, 3 KS24.22, 4 reife DC.

2.5 Generierung von allo-A2-restringierten, HER2-spezifischen CTLs mit peptidbeladenen, allogenen HLA-A2⁺ DCs

Ein großes Problem bei der Generierung von CTL gegen auch auf normalen Geweben exprimierte Antigene wie HER2 ist, dass hochaffine T-Zellen schon im Thymus vernichtet oder anerg gemacht werden. Dieses Hindernis kann umgangen werden, wenn man auf T-Zellen eines Spenders mit einem anderen HLA-Typ zurückgreift, 1-10% der T-Zellen erkennen durch Kreuzreaktivität nämlich auch allogene HLA-Moleküle (11, 12). Dabei gibt es einerseits die Möglichkeit, dass der T-Zellrezeptor unabhängig vom Peptid an ein allogenes HLA-Molekül bindet und andererseits die, dass die Peptidbindung so stark ist, dass die HLA-Bindung unwichtig wird (Abb. 30).

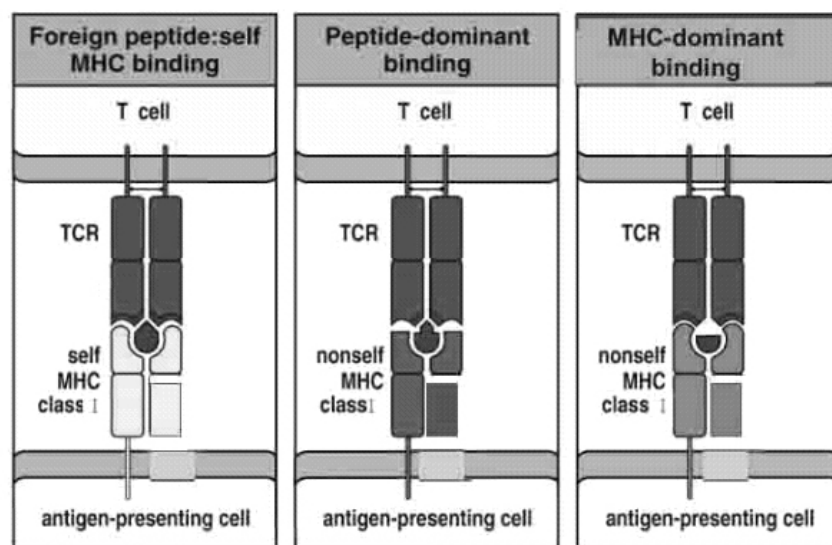


Abb. 30 Kreuzreaktive Erkennung kann Alloreaktivität bei T-Zellen erklären (nach Janeway et al. 2005¹³²). Eine T-Zelle, die spezifisch für eine MHC-Peptid-Kombination ist (links) kann auch Peptide erkennen, die so gut zum TCR passen, dass das allogene MHC-Molekül bei der Bindung keine große Rolle spielt (Mitte). Es ist auch möglich, dass ein TCR so gut an ein allogenes MHC-Molekül passt, dass die Bindung peptidunabhängig wird.

2.5.1 Stimulation von CD8⁺ HLA-A2⁻ T-Zellen mit peptidbeladenen allogenen HLA-A2⁺ DCs

HLA-A2⁻-T-Zellen wurden mit HLA-A2⁺-DC stimuliert, die zuvor mit HER2₃₆₉₋₃₇₇-Peptid beladen worden waren. Dabei wurde darauf geachtet, dass die übrigen HLA-Allele möglichst gut übereinstimmten, um weitere Kreuzreaktionen zu vermeiden. HLA-A3⁺ CD8⁺ T-Zellen wurden dreimal mit peptidbeladenen HLA-A2⁺-DCs stimuliert (Abb. 31a).

Anschließend wurden die Zellen vermischt, mit dem HLA-A0201/HER2₃₆₉₋₃₇₇-Multimer gefärbt und sortiert. Vor der Sortierung befanden sich etwa 0,26% positive CD8⁺ T-Zellen in der Kultur (Abb. 31b). Nach dem Sortieren wurden die CTLs mittels einer Verdünnungsreihe kloniert. 14 Tage später konnten 60 potentielle Klone in einem ⁵¹CR-Freisetzungstest auf ihre Lyse von peptidbeladenen T2-Zellen getestet werden (Abb.31c). Die T-Zelllinien, die sowohl mit dem

HER2- als auch mit dem HIV-Peptid beladene T2-Zellen erkennen, sind peptidunabhängig HLA-A2-spezifisch und wurden aussortiert. Zwei der 10 lysierenden Klone, KU #1 und KU #40, wurden expandiert.

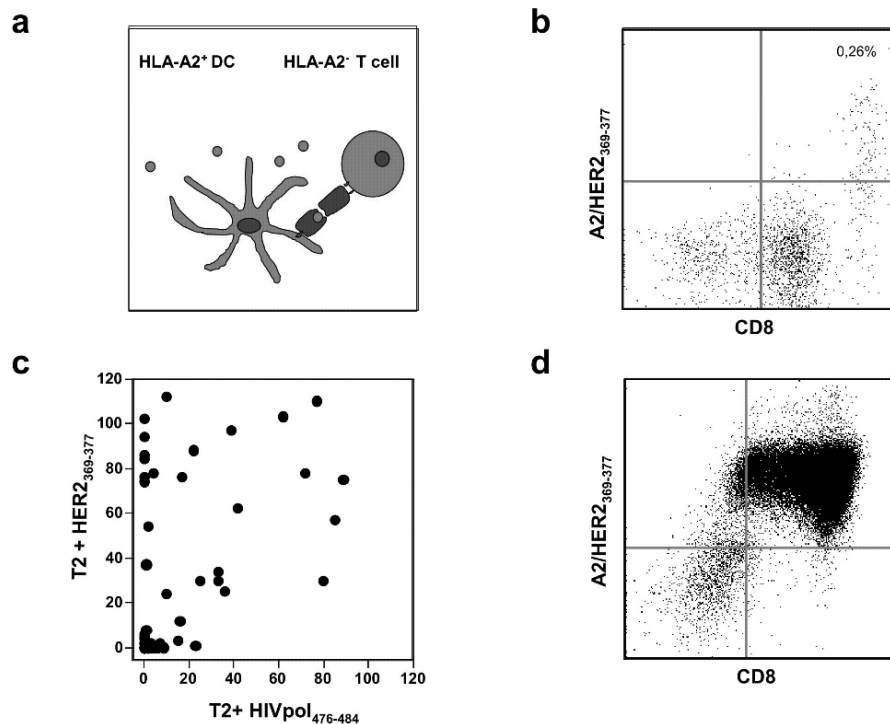


Abb. 31 Generierung von HER2₃₆₉₋₃₇₇-spezifischen HLA-A2- CTL-Klonen durch Stimulation mit HER2₂₃₆₉₋₃₇₇-beladenen HLA-A2⁺ DCs. **a** Vereinfachtes Modell der Stimulierung von HLA-A2- T-Zellen mit allogenen HLA-A2⁺ HER2₃₆₉₋₃₇₇-beladenen DCs. **b** Tetramerfärbung eines Primingansatzes der Spenderin KU nach drei Stimulationen mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladenen DCs. **c** Spezifische Lyse von mit relevantem und irrelevantem Peptid beladenen T2-Zellen durch potentielle Klone der Spenderin KU in einem ⁵¹Cr-Freisetzungstest **d** Tetramerfärbung des Klons KU #40.

2.5.2 Mit peptidbeladenen HLA-A2⁺-DCs stimulierte HLA-A3⁺-CTL-Klone sind tetramer-positiv und weisen eine niedrige Peptidaffinität auf

Sowohl Klon KU #1 (nicht gezeigt) als auch Klon KU #40 ließen sich, mit dem HLA-A0201/HER2₃₆₉₋₃₇₇-Multimer anfärben (Abb. 31d). Das V β -Motiv von Klon KU #1 ist unbekannt (nicht gezeigt). Klon KU #40 weist zu 40 % das V β -Motiv 4 auf und ist damit kein Klon, sondern eine Zelllinie. Da das oder die anderen V β -Motive der Zelllinie KU #40 unbekannt sind, ist unklar, ob es sich um eine Linie aus zwei oder mehr Klonen handelt. Für beide Klone bzw. Zelllinien wurde auch die Affinität für das HER2₃₆₉₋₃₇₇-Peptid durch Titration in ⁵¹CR-Freisetzungstests bestimmt. Beide zeigten mit 10⁻⁶ M nur eine geringe halbmaximale Peptidaffinität (Abb.32b).

2.5.3 Die alloreaktiven HER2-spezifischen CTLs weisen Kreuzreaktivitäten mit anderen HER-Peptiden auf

Bei Inkubation mit T2-Zellen, die jeweils mit dem HER2₃₆₉₋₃₇₇ analogen Peptid von HER1, HER3 und HER4 beladen waren, sezernierte CTL-Linie KU #40 nur in Anwesenheit des

HER2-Peptids IFN- γ , während Klon KU #1 sowohl mit HER2-,HER3- und HER4-Peptid-beladene T2-Zellen erkennt. Bei Inkubation mit dem HER4-Peptid wird von Klon KU #1 nur etwa halb soviel IFN- γ sezerniert wie mit den HER2- bzw. HER3-Peptiden. Bei Klon KU #1 gibt es außerdem keinen Unterschied zwischen der Lyse von mit HER2- oder HER3-Peptid beladenen T2-Zellen (Abb. 32b). Das HER1-Peptid wurde von beiden Klonen nicht erkannt. Klon KU #1 weist also eine Kreuzreaktivität für das HER3- und HER4-Peptid auf.

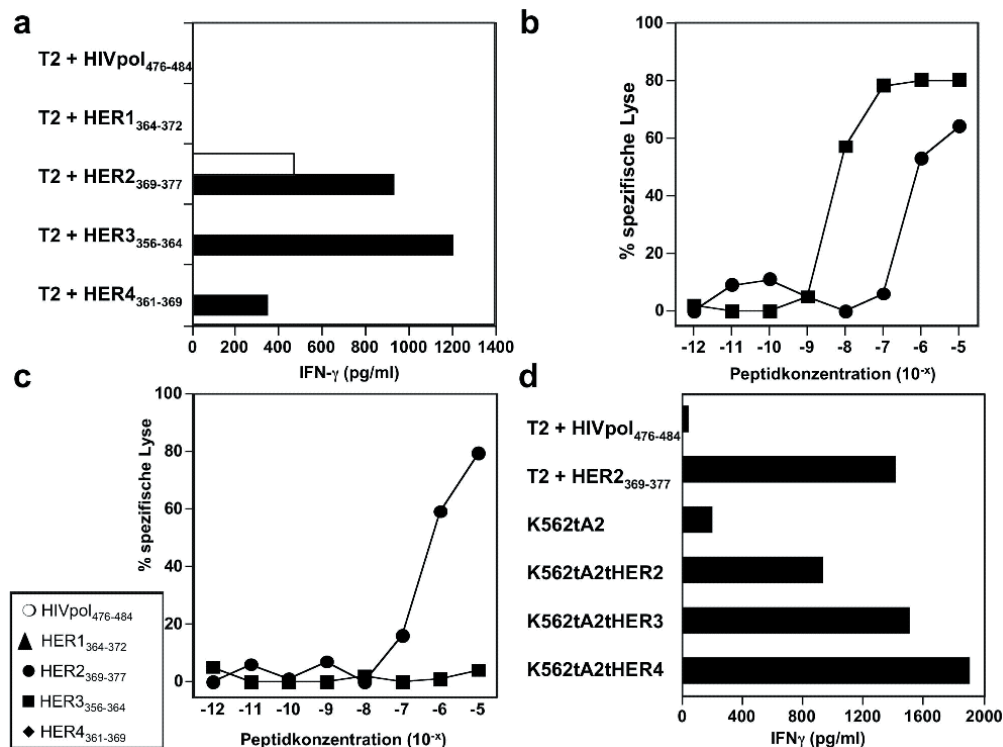


Abb. 32 Der Alloklon KU #1 besitzt eine höhere Affinität zu HER3₃₅₆₋₃₆₄ als zu HER2₃₆₉₋₃₇₇.
a IFN- γ -ELISA nach Inkubation von Klon KU #1 (schwarz) und CTL-Linie KU #40 (weiß) mit peptidbeladenen T2-Zellen. Peptidtitration von CTL-Klon KU #1 (**b**) und CTL-Linie KU #40 (**c**) mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ bzw. HER3₃₅₆₋₃₆₄-beladenen T2-Zellen bei einer E:T-Ratio von 30:1. **d** IFN- γ -ELISA nach Inkubation von Klon KU #1 mit HER-transfizierten K562tA2.

Die Affinitäten der Allo-CTLs für HER2₃₆₉₋₃₇₇ und HER3₃₅₆₋₃₆₄ wurden in einem ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit Peptidtitration bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Klon KU #1 mit 10⁻⁸ M eine zwei log-Stufen höhere Affinität für HER3₃₅₆₋₃₆₄ als für HER2₃₆₉₋₃₇₇, mit dem er ursprünglich stimuliert wurde, besitzt (Abb. 32b). CTL-Linie KU #40 erkannte in diesem Test dagegen nur HER2₃₆₉₋₃₇₇ (Abb. 32c). In einem IFN- γ -ELISA mit K562tA2, die mit HER2, HER3 bzw. HER4 transfiziert worden waren, erkannte Klon KU #1 auch die endogen prozessierten HER-Peptide (Abb. 32d).

2.5.4 Der Allo-Klon und die Allo-Zelllinie erkennen und lysieren mit HER2-transduzierte und HER2-überexprimierende Tumorzelllinien

Auch der allogene Klon KU #1 und die CTL-Linie KU #40 wurden in ⁵¹Cr-Freisetzungstests und ELISA auf ihre lytische Aktivität sowie auf Zytokinsekretion im Hinblick auf mit HER2- bzw.

HER2-ECD-transduzierte sowie Mammakarzinom-, Ovarialkarzinom- und Melanomzelllinien untersucht. Alle Zelllinien wurden wiederum sowohl ohne als auch mit IFN- γ -Vorbehandlung getestet. Auf die Durchführung von TNF- α -ELISA wurde weitgehend verzichtet, da diese bei Klon KW #63 keinen Erkenntnisgewinn brachten. CTL-Linie KU #40 sezerniert sowieso kein TNF- α .

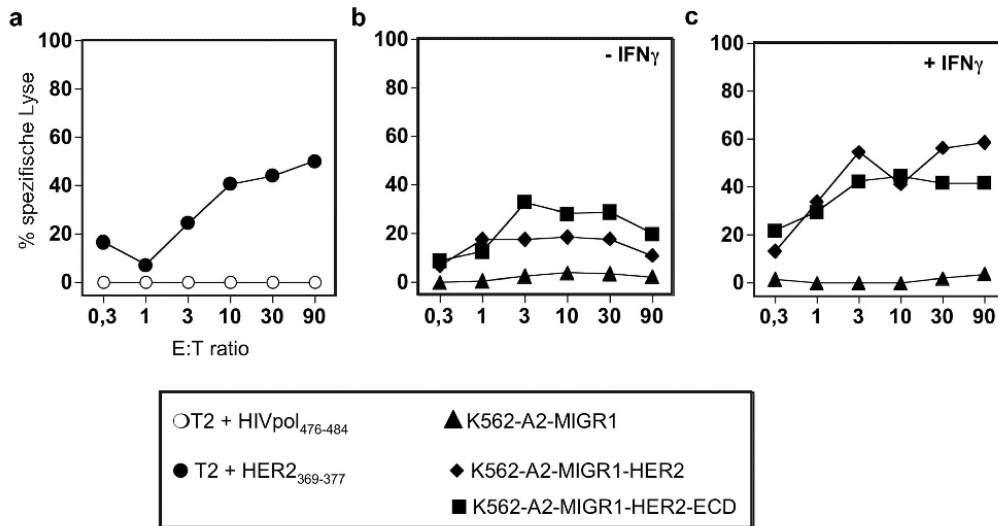


Abb. 33 Allo-Klon KU #1 lysiert mit IFN- γ vorbehandelte HER2-exprimierende K562tA2.

⁵¹Cr-Freisetzungstest mit peptidbeladenen T2 und transduzierten K562tA2 mit und ohne IFN- γ -Vorbehandlung.

Klon KU #1 lysierte K562tA2tMIGR1-HER2- und - ECD nach IFN- γ -Vorbehandlung ebenso gut wie die mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladenen T2-Zellen (Abb. 33). Die K562tA2tMIGR1-HER2-ECD wurden auch unbehandelt zu bis zu 30% lysiert. Im IFN- γ - und TNF- α -ELISA sezernierte Klon KU #1 bei Inkubation mit vorbehandelten K562tA2MIGR1-HER2 mehr Zytokine als mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladenen T2-Zellen (Abb.34).

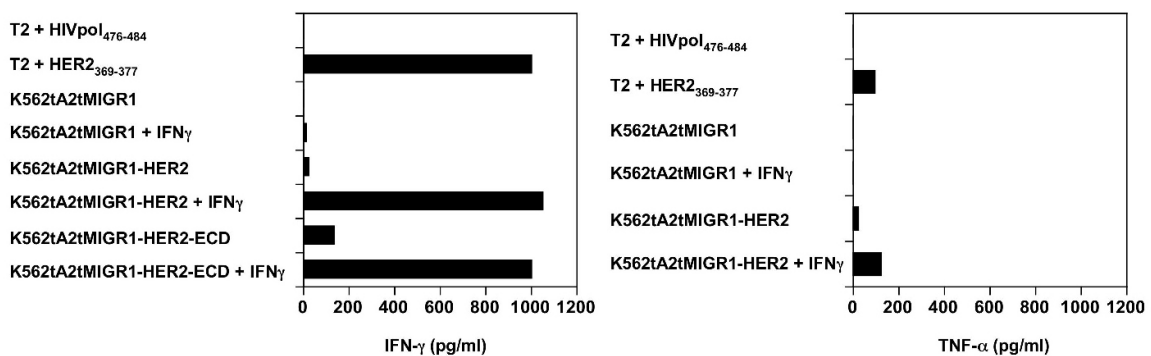


Abb. 34 Allo-Klon KU #1 sezerniert bei Inkubation mit HER2-überexprimierenden Zelllinien sowohl IFN- γ als auch TNF- α . IFN- γ - (links) und TNF- α -ELISA (rechts) nach Inkubation von Klon KU #1 mit peptidbeladenen T2 und transduzierten K562tA2.

CTL-Linie KU #40 zeigte ähnliche Lysedaten und lysierte auch unbehandelte K562tA2tMIGR1-HER2-ECD (Tab. 1). Die Linie sezernierte allerdings insgesamt sehr wenig IFN- γ . Die mit dem leeren MSCV-MIGR1-Vektor transduzierten Negativkontrollen wurden von Klon und CTL-

Linie nicht erkannt. Beide lysierten die mit MIGR1-HER2 transduzierten SMO-LCL nicht (Tab. 1). Sie erkannten aber die mit MIGR1-HER2-ECD transduzierten SuHi-LCL mit und ohne IFN- γ -Vorbehandlung sowohl im ^{51}Cr -Freisetzungstest als auch im IFN- γ -ELISA (Tab. 1). Von den HER2-überexprimierenden Mamma- und Ovarialkarzinomzelllinien wurden nur KS24.22 und SKOV3tA2-Zellen nach IFN- γ -Vorbehandlung von Klon KU #1 lysiert, SKBR3tA2 dagegen nicht (Abb. 35b,c). CTL-Linie KU #40 lysierte vorbehandelte KS24.22 genauso gut wie peptidbeladene T2-Zellen, SKOV3tA2 aber viel schlechter (Tab.1) GAKL und SKBR3tA2 wurden nicht erkannt. Die im ^{51}Cr -Freisetzungstest mit Klon KW #63 als HER2-überexprimierende Zelllinie erkannten SK-MEL-29 wurden ohne IFN- γ -Vorbehandlung von beiden Klonen bis zu 40% lysiert (Abb. 35a). Klon KU #1 lysierte SK-MEL-37 unabhängig von einer IFN- γ -Vorbehandlung, sezernierte bei Inkubation mit dieser Zelllinie bei den unbehandelten Zellen aber nur etwa halb so viel IFN- γ wie bei den vorbehandelten Zellen (Tab. 1). CTL-Linie KU #40 lysierte nur vorbehandelte SK-MEL-37 und auch diese nur bis zu 20% (Tab.1). Im IFN- γ -ELISA konnte keine über dem Hintergrund liegende IFN- γ -Sekretion nachgewiesen werden (Tab. 1).

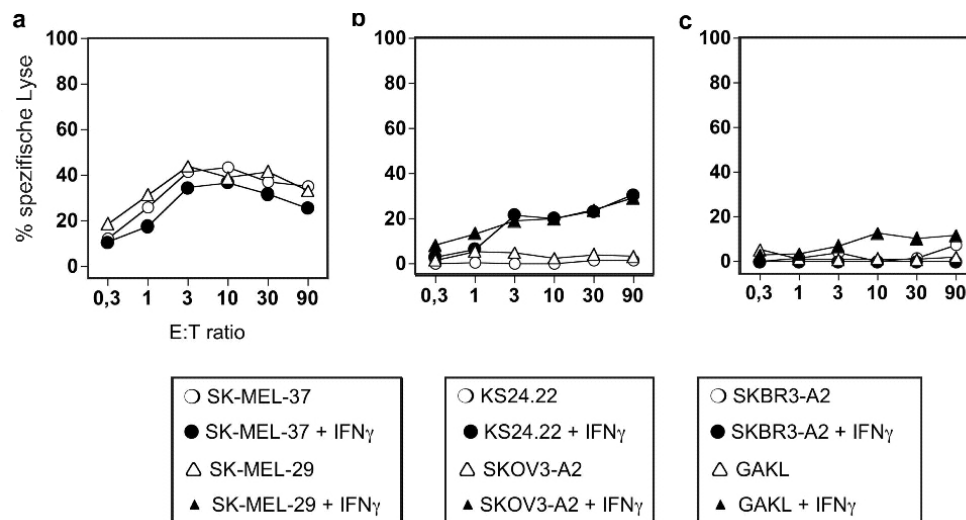


Abb. 35 Allo-Klon KU #1 lysiert manche HER2-überexprimierenden Zelllinien nur nach IFN- γ -Vorbehandlung oder gar nicht ^{51}Cr -Freisetzungstest von Klon KU #1 mit **a** SK-MEL-37 und SK-MEL-29 -/+ IFN- γ . **b** KS24.22 und SKOV3tA2 -/+ IFN- γ **c** SKBR3tA2 und GAKL -/+ IFN- γ .

2.5.5 Die Alloklone erkennen auch nicht HER2-überexprimierende Zellen

In einem IFN- γ -ELISA von CTL-Linie KU #40 mit HER2-mRNA-transfizierten und untransfizierten A2⁺ DCs gibt es keinen Unterschied in der Erkennung von transfizierten und untransfizierten DCs (Abb. 36a) In wegen der hohen Spontanlyse elektroporierter DCs nicht auswertbaren ^{51}Cr -Freisetzungstests zeigte sich für die Klone KU #1 und #40 das gleiche Bild. Das Vorhandensein von HER2, HER3 und HER4 in den DCs wurde mittels Durchflusszytometrie und RT-PCR bestimmt (s. Abb. 28)

Sowohl Klon KU #1 als auch CTL-Linie #40 lysierten nicht mit HER2 transfizierte C1RtA2 unabhängig von einer IFN- γ -Vorbehandlung. Die Expressionsraten von HER2, HER3 und

HER4 wurden durchflusszytometrisch untersucht (s. Abb. 29a), es konnte aber keine Expression nachgewiesen werden. Dafür zeigte sich in einer RT-PCR auf HER2, HER3 und HER4 das Vorhandensein von HER4-mRNA (s. Abb.29b).

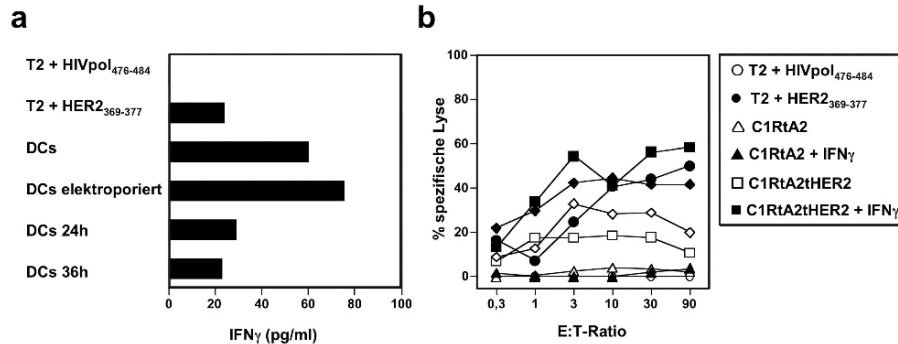


Abb.36 Die Allo-CTL-Linie erkennt DCs und C1RtA2, die nicht mit HER2 transfiziert sind. a) IFN- γ -ELISA nach Inkubation von CTL-Linie KU #40 mit peptidbeladenen T2-Zellen sowie HER2-mRNA-transfizierten DCs. b) ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit CTL-Linie KU #40 und peptidbeladenen T2, sowie C1RtA2 und C1RtA2tHER2 +/- IFN- γ als Zielzellen.

2.6 Einfluss von Immune-Escape-Mechanismen auf die Antigenerkennung von CTLs

Eine erfolgreiche Erkennung von Tumorzellen hängt nicht nur von den CTLs, sondern auch von den Tumorzellen selbst ab. Diese entwickeln nämlich sogenannte Immune-Escape-Mechanismen, um der Lyse auszuweichen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Überexpression von HER2 selbst einen negativen Einfluss auf die Antigenprozessierung hat (96). Die Lyse der untransduzierten C1RtA2 muss auf der Erkennung eines anderen Antigen beruhen, dessen Identität zu ermitteln ist.

2.6.1 Die tumorlysierenden CTLs stimmen bei der Erkennung bzw. Nichterkennung der HER2-überexprimierenden Zelllinien überein

Einen Hinweis auf die Ursache für fehlende Lyse HER2-überexprimierender Zelllinien kann ein Vergleich der Lysierungsmuster der mit unterschiedlichen Methoden generierten CTL-Klone bzw. -Linie geben. In Tabelle 1 sind die jeweils besten Lyseergebnisse der Zelllinien bei einem Effektor:Zielzell-Verhältnis von 30:1 durch die Klone KU #1 und KW #63 und die CTL-Linie KU #40 dargestellt. Es zeigen sich eindeutige Muster. Betrachtet man zunächst einmal unabhängig von der IFN- γ -Vorbehandlung, welche Zelllinien von welchen CTLs lysiert werden, so fällt auf, dass die Ergebnisse fast immer übereinstimmen. Die einzige Ausnahme sind die GAKL, die nicht reproduzierbar in einem ⁵¹Cr-Freisetzungstest von CTL-Linie KU #40 zu 19 % lysiert wurden. Allerdings ist das erstens keine hohe Lyse und zweitens konnte auch im IFN- γ -ELISA nach Inkubation von GAKL mit Klon KW #63 eine geringe IFN- γ -Sekretion nachgewiesen werden (Tab. 1).

Tab. 1 Lyse- und ELISA-Daten der unterschiedlich generierten CTL-Klone

	Lysis (%)*				IFN γ -ELISA**			TNF α -ELISA**
	GO 45	1	40	63	1	40	63	63
A2+T2 + HER1pp364-372	n.u.	5	11	1	n.u.	n.u.	-	n.u.
A2+T2 + HER2p369-377	89	50	60	56	+++	+++	+++	+++
A2+T2 + HER3p356-364	n.u.	80	0	24	n.u.	n.u.	(+)	n.u.
A2+T2 + HER4p361-369	n.u.	64	0	1	+++	n.u.	-	n.u.
A2+HER2+SK-MEL-29	0	43	32	58	+	-	(+)	(+)
A2+HER2+SK-MEL-29 + IFN γ	0	14	24	51	(+)	-	++	+
A2+HER2+SK-MEL-37	1	37	6	30	+	-	+++	++
A2+HER2+SK-MEL-37 + IFN γ	0	32	26	30	++	-	+++	++
A2+SuHi-LCL-MIGR1-HER2-ECD	n.u.	61	53	3	+++	+	+	n.u.
A2+SuHi-LCL-MIGR1-HER2-ECD + IFN γ	n.u.	41	57	1	++	+	(+)	n.u.
A2+HER2+BC-KS	0	1	4	8	-	-	-	(+)
A2+HER2+BC-KS + IFN γ	0	38	38	48	-	(+)	++	++
HER2+SKOV3tA2	0	4	0	(27)	-	-	-	(+)
HER2+SKOV3tA2 + IFN γ	0	29	21	47	-		(+)	+
K562tA2tMIGR1	12	4	1	0	-	-	-	-
K562tA2tMIGR1 + IFN γ	5	2	2	0	-	-	-	-
K562tA2tMIGR1-HER2	5	18	7	16	(+)	+++	-	+++
K562tA2tMIGR1-HER2 + IFN γ	4	62	39	77	+++	+++	+++	+++
K562tA2tMIGR1-HER2-ECD	12	29	23	3	(+)	+++	-	n.u.
K562tA2tMIGR1-HER2-ECD + IFN γ	11	42	55	37	+++	++	+++	n.u.
A2+HER2+BC-GAKL	0	1	0	0	-	-	(+)	(+)
A2+HER2+BC-GAKL + IFN γ	0	10	19	2	-	-	+	(+)
HER2+SKBR-3tA2	n.u.	2	2	0	-	-	-	-
HER2+SKBR-3tA2 + IFN γ	n.u.	0	0	0	-	-	-	-
A2+SMo-LCL-MIGR1	n.u.	0	0	1	-	-	-	-
A2+SMo-LCL-MIGR1 + IFN γ	n.u.	2	0	2	-	-	-	-
A2+SMo-LCL-MIGR1-HER2	n.u.	4	0	0	-	-	-	-
A2+SMoLCL-MIGR1-HER2 + IFN γ	n.u.	0	0	0	-	+	-	-
C1RtA2	n.u.	46	44	39	n.u.	n.u.	++	(+)
C1RtA2 + IFN γ	n.u.	35	41	26	n.u.	n.u.	++	++
C1RtA2tHER2	n.u.	52	51	51	n.u.	n.u.	+++	+++
C1RtA2tHER2 + IFN γ	n.u.	67	64	49	n.u.	n.u.	+++	+++

* ^{51}Cr -Freisetzungstest bei E:T-Verhältnis von 30:1

**ELISA

- keine Sekretion

(+) Sekretion niedriger als 1/4 der Kontrolle (T2 + HER2₃₆₉₋₃₇₇)
etwa 1/4 der Kontrolle

++ Sekretion etwa 1/2 der Kontrolle

+++ Sekretion mindestens wie bei Kontrolle

□

n.u. nicht untersucht

Außerdem wurden die SuHi-LCL nur von den Allo-CTLs und die SK-MEL-37 ohne IFN- γ nur von den Klonen KU #1 und KW #63 erkannt. Man kann die HER2-überexprimierenden Tumor- und transduzierten Zelllinien in drei Gruppen einteilen. In der ersten Gruppe befinden sich die Zelllinien, die von allen Klonen IFN- γ unabhängig lysiert werden wie die SK-MEL-29. Die zweite Gruppe besteht aus den Zelllinien, die nur mit IFN- γ -Vorbehandlung lysiert wurden. Zu dieser Gruppe gehören die KS24.22, die SKOV3tA2 sowie die K562tA2tMIGR1-HER2. Die HER2-überexprimierenden Zelllinien, die wie die SKBR3tA2 und die SMO-LCLtMIGR1-HER2 auch nach IFN- γ -Vorbehandlung nicht erkannt wurden, werden in die dritte Gruppe eingeteilt. Es gibt auch Zelllinien, die zwischen den Gruppen steht, das heißt, dass sie z.B. nur von zwei statt drei der tumorlytischen CTL lysiert wurden. Die gute Übereinstimmung der Lysemuster legt nahe, dass die drei Klone prinzipiell endogen prozessiertes HER2 erkennen und das fehlende Erkennen durch Immunoediting der HER2-überexprimierenden Zielzellen bedingt ist.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie das Ausweichen der Lyse zu erklären ist. Eine schlechte Antigenpräsentierung ist bei Tumorzellen weit verbreitet. Eine Hypothese besagt auch, dass HER2-Überexpression zu einer durch IFN- γ -Behandlung reversiblen Herunterregulation der Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie (APM) führt (96). Von vielen Tumorzelllinien ist überdies bekannt, dass sie ihre Fähigkeit, auf IFN- γ zu reagieren, verloren haben (90). Es besteht zudem die Möglichkeit, dass das Peptid HER2₃₆₉₋₃₇₇ nur vom IFN- γ -abhängigen Immunoproteasom geschnitten wird.

2.6.2 HLA-A2-Expression der HER2-überexprimierenden Zelllinien

Eine sehr einfach zu überprüfende Erklärung für fehlende Lysierbarkeit ohne IFN- γ -Vorbehandlung ist die mangelhafte oder fehlende Expression von HLA-A2-Molekülen auf der Zelloberfläche der Zielzellen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass 40-90% der menschlichen Tumoren einen totalen oder selektiven Verlust von HLA-Klasse-I-Molekülen aufweisen (91, 107). Die HLA-A2-Expression kann im Durchflusszytometer nach Färbung mit einem HLA-A2-spezifischen Antikörper bestimmt werden. Fast alle verwendeten Zelllinien exprimierten immer HLA-A2. Nur bei den SKBR3tA2 konnte ohne IFN- γ -Vorbehandlung überhaupt keine HLA-A2-Expression nachgewiesen werden (Abb. 37a). Bei anderen Zelllinien wie bei den SK-MEL-37 kommt es durch IFN- γ -Gabe zu einer deutlichen Hochregulierung von HLA-A2 (Abb. 37b). Diese Zelllinie wird aber trotzdem von den Klonen KU #1 und KW #63 IFN- γ -unabhängig lysiert (Tab. 1). Als Beispiele für Zelllinien, bei denen auch ohne IFN- γ -Vorbehandlung eine hohe HLA-A2-Expression vorhanden ist, sind in Abb. 37c SMO-LCLtMIGR1-HER2, SKOV3tA2 sowie SK-MEL-29 aufgeführt. Es handelt sich dabei um je eine Zelllinie, die nie, eine die nach IFN- γ -Vorbehandlung und eine, die IFN- γ -unabhängig lysiert wird. Die Ursache für die fehlende Lyse vieler HER2-überexprimierender Zelllinien ohne IFN- γ -Vorbehandlung kann also nicht nur in der HLA-Expression liegen.

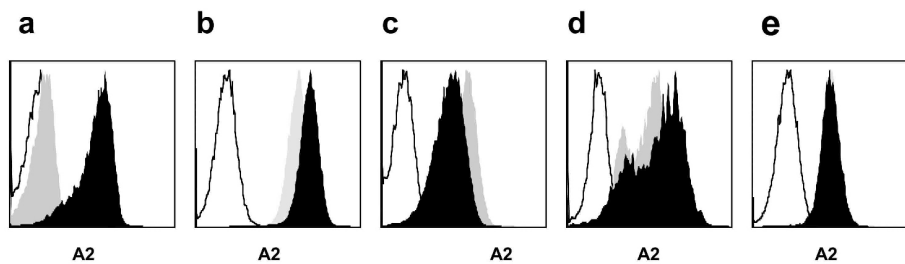


Abb. 37 Fehlende HLA-A2-Expression lässt sich durch IFN- γ -Behandlung erhöhen.

Durchflusszytometrische Messung der HLA-A2-Expression von **a** SKBR3tA2. **b** SK-MEL-37. **c** SMo-LCLtMIGR-HER2. **d** SKOV3tA2. **e** SK-MEL-29, weiß=IgG-Kontrolle, grau=HLA-A2 ohne IFN- γ -, schwarz=HLA-A2 nach IFN- γ -Behandlung.

2.6.3 IFN- γ -Vorbehandlung führt zu einer Erhöhung der mRNA-Konzentration von Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie

Es ist bekannt, dass die Expression vieler Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie durch IFN- γ hochreguliert bzw. initiiert wird. Neben der Expression der MHC-Moleküle sind z.B. das Immunoproteasom, TAP1 und 2 sowie Tapasin IFN- γ -abhängig. Diese Komponenten fehlen ebenfalls häufig in menschlichen Tumoren (108).

Um den Einfluss von IFN- γ auf die Antigenprozessierungsmaschinerie auf molekularer Ebene sichtbar zu machen, wurden die mRNA-Konzentrationen von Tapasin, TAP1 und LMP-2 bei allen im ^{51}Cr -Freisetzungstest getesteten Zelllinien in einer semiquantitativen PCR bestimmt. Wie sich in Abb. 38 und Tabelle 2 zeigt, führt eine Vorbehandlung mit IFN- γ in vielen Fällen tatsächlich dazu, dass sich mRNA-Mengen erhöhen.

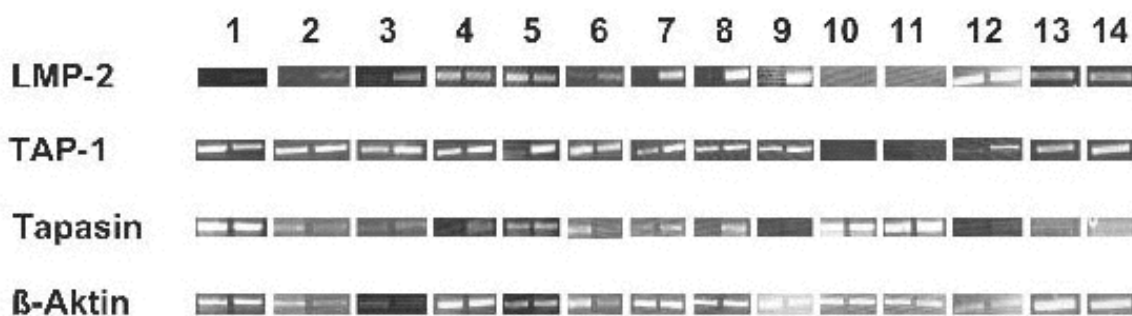


Abb. 38 Die mRNA-Konzentration der untersuchten Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie ist bei den einzelnen Zelllinien unterschiedlich.

RT-PCR auf die Antigenprozessierungskomponenten LMP-2, TAP-1 und Tapasin sowie β -Aktin **1** GAKL, **2** KS24.22., **3** SKBR3tA2, **4** SKOV3tA2, **5** SK-MEL-29, **6** SK-MEL-37, **7** K562tA2tMIGR1, **8** K562tA2tMIGR1-HER2, **9** K562tA2tMIGR1-HER2-ECD, **10** SMo-LCLtMIGR1, **11** SMo-LCLtMIGR1-HER2, **12** SuHitMIGR1-HER2-ECD jeweils ohne und mit IFN- γ -Vorbehandlung sowie **13** C1RtA2 und **14** C1RtA2tHER2.

Bei den K562tA2tMIGR1-HER2 und den SKOVtA2 ist es sogar so, dass ohne IFN- γ überhaupt keine mRNA von Tapasin und/oder LMP2 nachweisbar ist, während die Levels nach Vorbehandlung denen von β -Aktin entsprechen. Bei den SMo-LCLs konnten dagegen

weder mit noch ohne IFN- γ -Vorbehandlung LMP-2 und TAP1 nachgewiesen werden, was die fehlende Lysierbarkeit dieser Zelllinie erklärt. Bei den unabhängig von IFN- γ lysierbaren SK-MEL-29 und -37 zeigt die RT-PCR, dass die mRNA der drei Prozessierungskomponenten immer vorhanden ist, bis auf die von TAP1 bei den SK-MEL-29 sogar immer in gleich hoher Konzentration (Abb. 38, Tab. 1). Auch bei den von den Allo-CTLs ohne IFN- γ -Vorbehandlung lysierten SuHi-LCLtMIGR1-HER2-ECD sind die drei Prozessierungskomponenten immer vorhanden, im Fall von Tapasin und LMP2 immer in gleich hoher Konzentration (Abb. 38). In einem bereits erwähnten Artikel (96) wird ein Zusammenhang zwischen HER2-Überexpression und Herunterregulation bestimmter Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie hergestellt. Durch Inkubation mit IFN- γ soll diese Herunterregulation umkehrbar sein. Einen Hinweis auf einen solchen Zusammenhang ergibt die Beobachtung, dass die unabhängig von IFN- γ lysierbaren Melanomzelllinien HER2 mit einer Δ MFI von 240 deutlich niedriger exprimieren als z.B. die mit HER2 transduzierten K562tA2 mit einer Δ MFI von 569 (Tab. 2). Eine Überprüfung der im Artikel aufgestellten Hypothese ist zum Einen an Hand von Tabelle 2 möglich. Wenn ein Zusammenhang zwischen HER2-Überexpression und mangelhafter Expression von Antigenprozessierungskomponenten bestehen sollte, müssten in der Tabelle 2 bei den überexprimierenden Zelllinien ohne IFN- γ übereinstimmende Expressionsmuster nachzuweisen sein. Das Fehlen eindeutiger Expressionsmuster zeigt sich besonders deutlich im Vergleich von K562tA2tMIGR1-HER2 und KS24.22. Während bei der unbehandelten K562-Linie weder Tapasin noch LMP-2 nachweisbar sind, sind die mRNA-Levels bei den KS24.22 in unbehandeltem und behandeltem Zustand gleich. Auch sonst ergibt sich kein eindeutiges Muster.

Da es sich bei der Bestimmung der mRNA-Levels durch RT-PCR um eine nur semiquantitative und somit nicht genügend sensitive Methode handelt, wurde ein Versuch durchgeführt, der sich auf die sehr viel größere Sensitivität spezifischer CTL stützte. Wenn eine Überexpression von HER2 tatsächlich die Erkennung durch spezifische zytotoxische T-Zellen verhindern sollte, dürfte dies nicht auf Zelllinien zutreffen, die nur die extrazelluläre Domäne von HER2 exprimieren, denn die ECD allein ist zu keiner Signalgebung fähig. Zelllinien, die nur die ECD von HER2 exprimieren, sollten deshalb unabhängig von einer IFN- γ -Vorbehandlung erkannt werden. Es wurden also ^{51}Cr -Freisetzungstests mit Klon KW #63, dem allogenen Klon KU #1 und der CTL-Linie KU #40 mit unbehandelten und mit IFN- γ vorbehandelten K562tA2tMIGR1-HER2 und -ECD als Zielzellen durchgeführt. Klon KW #63 wurde zusätzlich in einem IFN- γ -ELISA getestet.

Die unbehandelten K562tA2tMIGR1-HER2-ECD wurden von Klon KW #63 nicht lysiert (Abb. 23) und riefen auch keine IFN- γ -Sekretion hervor (Abb. 24a). Der Klon KU #1 und die CTL-Linie KU #40 lysierten auch die unbehandelten Zellen (Abb. 33 und Tab. 1), während alle drei Klone bzw. CTL-Linien vorbehandelte Zelllinien lysierten.

Während der Test mit Klon KW #63 gegen eine Herunterregulierung der Antigenprozessierungsmaschinerie durch HER2 spricht, können Klon KU #1 und CTL-Linie KU #40 für eine solche sprechen. Es kann also keine klare Aussage gemacht werden.

Tab. 2 Antigenprozessierungskomponenten und HLA-A2-, HER2-, HER3- und HER4-Expression sowie Lyse der untersuchten Zelllinien

				Expression (Δ MF1)				Lyse
	LMP2	TAP1	Tapasin	A2	HER2	HER3	HER4	1/40/63
A2+HER2+SK-MEL-29	+++	+	+++	284	240	229	47	+/ +/ +
A2+HER2+SK-MEL-29 + IFN γ	+++	+++	+++	258				+/+/+
A2+HER2+SK-MEL-37	+++	+++	+++	450	172	162	32	+/-/+
A2+HER2+SK-MEL-37 + IFN γ	+++	+++	+++	532				+/ +/ +
A2+SuHi-LCL-MIGR1-HER2-ECD	+++	+	+++	289	n.m.	14,8	0	+/+/-
A2+SuHi-LCL-MIGR1-HER2-ECD + IFN γ	+++	+++	+++	173				+/+/-
A2+HER2+KS24.22	+++	+++	+++	389	486	230	134	-/-/-
A2+HER2+KS24.22 + IFN γ	+++	+++	+++					+/ +/ +
HER2+SKOV3tA2	+	+++	-	259	326	63	31	-/-/(+)
HER2+SKOV3tA2 + IFN γ	+++	+++	+++	269				+/ +/ +
K562tA2tMIGR1	(+)	+	+		0	0	24	-/-/-
K562tA2tMIGR1 + IFN γ	+++	+++	+++					-/-/-
K562tA2tMIGR1-HER2	-	+++	-	115	569	0	22	-/-/-
K562tA2tMIGR1-HER2 + IFN γ	+++	+++	+++	283				+/ +/ +
K562tA2tMIGR1-HER2-ECD	(+)	++	(+)	117	n.m.	0	26	+/+/-
K562tA2tMIGR1-HER2-ECD + IFN γ	+++	+++	+	249				+/ +/ +
A2+HER2+GAKL	+	+++	+++	263	405	271	0	-/-/-
A2+HER2+GAKL + IFN γ	+++	++	+++					-/-/-
HER2+SKBR-3tA2	+	++	+	53	531	280	0	-/-/-
HER2+SKBR-3tA2 + IFN γ	+++	+++	+++	332				-/-/-
A2+SMo-LCL-MIGR1	-	-	+++	457	0	45	9	-/-/-
A2+SMo-LCL-MIGR1 + IFN γ	-	-	+++	346				-/-/-
A2+SMo-LCL-MIGR1-HER2	-	-	+++	163	385	45	8	-/-/-
A2+SMoLCL-MIGR1-HER2 + IFN γ	-	-	+++	174				-/-/-
C1RtA2	+++	+++	(+)		25	0	0	+/ +/ +
C1RtA2 + IFN γ	+++	+++	+++					+/ +/ +
C1RtA2tHER2	+++	+++	(+)		492	0	0	+/ +/ +
C1RtA2tHER2 + IFN γ	+++	+++	+++					+/ +/ +

- keine Bande, (+) Bande weniger als 1/4 von β -Aktin, + Bande etwa 1/4 von β -Aktin, ++ Bande 1/2 bis 1/1 von β -Aktin, +++ Bande mindestens wie β -Aktin

3 Diskussion

3.1 Generierung von HER2-reaktiven CTLs

Die Rezeptortyrosinkinase HER2 wird von zahlreichen Tumoren überexprimiert und ist wegen ihrer Immunogenität ein häufiges Ziel für Immuntherapien. Da verschiedene T-Zellepitope bekannt sind, ist es möglich, HER2-reaktive T-Zellen zu generieren. Zur Stimulierung von HER2-spezifischen CD8⁺ T-Zellen werden meist DCs verwendet, die mit unterschiedlichen Methoden so vorbehandelt wurden, dass sie HER2-Epitope präsentieren können. DCs für das Priming naiver T-Zellen können *in vitro* entweder aus CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder aus CD14⁺ Monozyten aus peripherem Blut generiert werden. Dabei werden die Vorläuferzellen bzw. Monozyten zuerst in unreife DCs differenziert und dann ausgereift. Die Ausreifung scheint dabei der kritische Schritt zur Entwicklung einer potenten Th1-Antwort zu sein (5), die zur Stimulation zytotoxischer T-Zellen führt. Wichtige Charakteristika solcher DCs sind die Expression hoher Level kostimulatorischer Moleküle und die Sekretion von großen Mengen IL-12 (109). IL-12 spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion der zellvermittelten Immunität (110). Gerade weil es sich bei HER2 um ein Selbstantigen handelt, das auch auf normalem Gewebe exprimiert wird, ist die korrekte Ausreifung der DCs unerlässlich, da sie nur dann in der Lage sein sollen, die Toleranz gegenüber einem Tumor zu brechen (111). Bei der Differenzierung von DCs aus Monozyten, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit praktiziert wurde, werden zurückgehend auf eine Veröffentlichung von Sallusto & Lanzavecchia (112) IL-4 und GM-CSF verwendet. Die Ausreifungsmethoden sind nicht so einheitlich, häufig werden die unreifen DCs mit IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE-2 (113) oder mit CD40L ausgereift (109). CD40L wird natürlicherweise von B-Zellen und aktivierten T-Helferzellen exprimiert und soll die DCs in Richtung Th1-Antwort lenken und diese daher zu besonders hoher IL-12p70-Produktion anregen (110). Die Ausreifung von DCs mit IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE-2 (113) soll dagegen zur Generierung von DC2 führen, die kein IL-12 sezernieren und keine zytotoxische T-Zellantwort auslösen können (114). Das Fehlen von sezerniertem IL-12 kann allerdings durch Zugabe von IL-12 in die Priming-Kulturen ausgeglichen werden (114). Diese IL-12-Supplementierung erfolgte auch bei den T-Zellaktivierungen im Rahmen dieser Dissertation. Als Vorarbeit zur Optimierung des Priming-Prozesses, wurden DCs, die mit CD40L, CD40L und TNF- α oder IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE-2 (113) ausgereift worden waren, im Hinblick auf ihre Oberflächenmarker und eine potentielle IL-12p70-Sekretion verglichen. Die mit CD40L ausgereiften DCs wiesen aber eine schlechtere Expression der kostimulatorischen Faktoren und von CD83 auf als die nach der im Labor üblichen Methode maturierten. IL-12p70-Produktion konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Für die in dieser Arbeit beschriebenen T-Stimulation wurden deshalb mit IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE-2 ausgereifte DCs verwendet, und es wurde IL-12 zur T-Zellstimulation hinzugefügt. Die fehlende IL-12-Sekretion der im

Rahmen dieser Arbeit mit CD40L maturierten DCs steht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die mit CD40L erfolgreich IL-12 sezernierende DCs generierten (z.B. 115). Eine mögliche Erklärung ist, dass es sich bei dem hier verwendeten CD40L nicht um das von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich verwendete soluble CD40L-Trimer (115), sondern nur um die soluble extrazelluläre Domäne des humanen CD40L mit einem verknüpfenden Enhancer handelte, dessen Funktionalität anscheinend nicht der des CD40L-Trimers entsprach. Es ist auf jeden Fall zu empfehlen, den Vergleich mit von anderen Gruppen erfolgreich verwendeten CD40L zu wiederholen.

Die Generierung von CTLs gegen HER2 wird dadurch erschwert, dass diese Rezeptortyrosinkinase von zahlreichen gesunden Geweben exprimiert wird (52). Zur Vermeidung von Autoimmunreaktionen werden gegen körpereigene Antigene gerichtete T-Zellen aber schon während ihrer Entwicklung im Thymus aussortiert. Es muss also davon ausgegangen werden, dass gegen HER2-Epitope hochaffine T-Zellen schon im Thymus deletiert oder bei schwächerer Affinität anergisiert werden. Diese Problematik betrifft anscheinend auch die sogenannten Cancer/Testis-Antigene, von denen ursprünglich angenommen wurde, dass sie außer auf Tumoren nur im Keimgewebe vorkommen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch diese Antigene im Thymus präsentiert werden (13).

Ziel dieser Arbeit war es nun, durch Stimulationen mit peptidbeladenen bzw. HER2-mRNA transfizierten DCs anerge CD8⁺ T-Zellen wieder zu aktivieren. Da die T-Zellen mit wirklich hochaffinen T-Zellrezeptoren mit hoher Wahrscheinlichkeit im Thymus deletiert worden waren, wurde nur die Aktivierung relativ niedrig affiner Zellen erwartet. Als Peptid für den Ansatz mit beladenen DCs wurde das immunodominante Epitop HER2₃₆₉₋₃₇₇ ausgewählt, das erstmals von Fisk beschrieben wurde (75) und schon häufig erfolgreich zur Stimulierung von CTLs sowohl *in vivo* im Rahmen von Vakzinierungen als auch *in vitro* eingesetzt wurde (z.B. 116, 78, 117). Im Rahmen dieser Arbeit gelang es von mehreren gesunden Spendern und auch von Patienten, tetramerpositive CTL-Klone zu generieren, die mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladene T2-Zellen lysieren konnten. Allerdings erkannten nur wenige dieser Klone in einigen ⁵¹Cr-Freisetzungstests die HER2-überexprimierende Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3tA2 und zwar fast ausnahmslos nur nach IFN- γ -Vorbehandlung. Andere HER2-überexprimierende Tumor- und mit HER2 transduzierte Zelllinien wurden nicht erkannt. Die SKOV3tA2 sind nach eigenen Beobachtungen besonders sensibel gegenüber CTL-induzierter Lyse und werden manchmal auch AG-unabhängig von Melan-A-spezifischen CTL-Klonen lysiert. Die mit peptidbeladenen DCs stimulierten CTLs sind also wahrscheinlich nicht in der Lage endogen-prozessiertes HER2₃₆₉₋₃₇₇ zu erkennen, sondern sind nur für das synthetische Peptid spezifisch. Diese Beobachtung geht konform mit Beobachtungen von Rosenberg, der in Vakzinierungsstudien, in deren Verlauf HLA-A2⁺ Patienten mit HER2-überexprimierenden Adenokarzinomen mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ immunisiert wurden, zeigen konnte, dass nach der Vakzinierung bei drei von vier Patienten spezifische CTLs detektiert werden konnten, die in der Lage waren, mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladene Zellen zu lysieren, aber keine HLA-A2-positiven, HER2-überexprimierenden Zelllinien erkannten (76). Als mögliche Ursachen für dieses Phänomen werden eine unterschiedliche Peptidkonformation des Peptids in Lösung im

Vergleich zu dem endogen prozessierten Peptid sowie eine unzureichende Avidität oder Affinität der CTLs durch die angewandten Immunisierungs- und Restimulierungsmethoden aufgeführt. Die Problematik der unterschiedlichen Peptidkonformationen kann durch Transfektion von dendritischen Zellen mit HER2 umgangen werden. HER2 wird dann von den DCs selbst prozessiert und präsentiert, so dass nur T-Zellen stimuliert werden, die Epitope des endogen prozessierten HER2 erkennen. Es wurde die Transfektion von DCs mit mRNA ausgewählt, die für definierte Tumorantigene kodiert, da sie sich als eine einfache und effektive Methode erwiesen hat (118). Der Vorteil der mRNA ist, dass sie nur das Zytoplasma erreichen muss, um translatiert zu werden, während Plasmid-DNA in den Zellkern der DCs gelangen muss (111). Da die Elektroporation von reifen DCs zu besonders hohen Transfektionsraten führt (119), wurde diese Methode angewendet. Obwohl im Durchflusszytometer keine HER2-Expression der elektroporierten DCs nachgewiesen werden konnte, wurden CTLs erfolgreich stimuliert. Dies zeigt, dass sehr geringe Peptidmengen zur Stimulation von CD8⁺ T-Zellen ausreichen, was sich durch die starke Bindung von CD8 an den Peptid-MHC-Komplex erklären lässt (120). Von zunächst vier Klonen erwies sich nach der 2. Expansion nur einer als wirklich HER2₃₆₉₋₃₇₇-spezifisch und tumorlytisch. Ungewöhnlich ist, dass dieser CTL-Klon, obwohl seine Erkennung von HLA-A2/HER2-überexprimierenden und mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladenen Zellen sowohl in ⁵¹Cr-Freisetzungstests als auch in IFN- γ - und TNF- α -ELISA gezeigt werden konnte, sich nicht mit HLA-A2/HER2₃₆₉₋₃₇₇-Multimeren anfärben lässt. Dieses Phänomen ist nicht unbekannt und es gibt verschiedene Hypothesen zu seiner Ursache. Spencer & Braciale (121) konnten zeigen, dass CTLs gegen ein subdominantes Influenzaantigen bei Mäusen nicht mit Tetrameren gefärbt werden konnten und auch nur eine schwache zytolytische Aktivität aufwiesen. Nach mehrmaliger Antigen-spezifischer Stimulation wurden die CTLs tetramerpositiv und lysierten Zielzellen sehr viel besser. Die Autoren erklären dies mit einer zunächst ungenügenden Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen in Effektorzellen. Eine Diskrepanz zwischen der IFN- γ -Produktion und der Anfärbbarkeit mit Multimeren konnten auch Rubio-Godoy et al. (122) bei einem Teil der Tyrosinase₃₆₈₋₃₇₆-spezifischen CTL aus Tumorinfiltrat eines Melanompatienten beobachten. Durch Untersuchungen des Färbungsmusters bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und Temperaturen konnte gezeigt werden, dass die einzelnen CTL-Klone verschiedene TCR/Peptid:MHC-Komplexdissoziationsraten aufwiesen (122). Um zu überprüfen, ob diese Beobachtung auch auf Klon KW #63 zutrifft, wurde der CTL-Klon bei verschiedenen Temperaturen mit dem HLA-A2/HER2₃₆₉₋₃₇₇-Tetramer inkubiert und dann in dem Durchflusszytometer gemessen. Da die TCR bei steigender Temperatur mit dem gebundenen Multimer internalisiert werden (123), müsste z. B. bei 37° C eine Färbung sichtbar werden, dies war aber nicht der Fall.

Das Vorhandensein von *in vitro* Lyse und Zytokinsekretion ohne Anfärbbarkeit mit spezifischem Tetramer kann nach Drake & Braciale (124) möglicherweise auch durch Einflüsse der sogenannten „lipid rafts“ bedingt sein. Bei den „lipid rafts“ handelt es sich um Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Plasmamembranmikrodomänen, die eine Rolle bei der T-Zellanordnung spielen und durch T-Zell-Stimulierung induziert werden (124). Im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen ist die Polarisierung von „lipid rafts“ für die frühe Signaltransduktion und Proliferation

bei CD8⁺ T-Zellen nicht notwendig (125). Hierbei spielt sicher die leichtere Aktivierbarkeit der CD8⁺ T-Zellen eine Rolle, die dadurch zu Stande kommt, dass CD8 sehr viel stärker an den Peptid-MHC-Komplex bindet als CD4 (120), so dass wenige MHC-I-Moleküle zu ihrer Aktivierung ausreichen. Die Bindung von Peptid/MHC-Multimeren ist dagegen davon abhängig, dass sich die TCR in „lipid rafts“ befinden (124). Eventuell liegt also bei Klon KW #63 eine Störung bei der „lipid raft“-Bildung vor, so dass kein Tetramer binden kann, eine Bindung an endogene HLA-A2-Moleküle mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ aber trotzdem möglich ist.

Bei HER2 handelt es sich um ein Antigen, das auch von bestimmten gesunden Zellen exprimiert wird, allerdings nicht so hoch wie auf Tumorzellen. Um Toleranz zu umgehen, wurde in dieser Arbeit ein weiterer Weg zur Generierung tumorlytischer CTL-Klone eingeschlagen. Dieser Ansatz macht sich die Tatsache zu Nutze, dass etwa 1-10 % der T-Zellen allogene MHC-Moleküle erkennen (11) und dass Toleranz gegenüber Selbstantigenen MHC-restringiert ist (126). Es ist also möglich, allogene CTLs gegen Selbstpeptid/MHC-Komplexe zur Umgehung von Toleranz gegenüber nicht nur tumorassoziierten Antigenen einzusetzen (127). Kritisch ist in diesem Zusammenhang, dass CTL-Populationen selektiert werden konnten, die nur Tumorzellen und keine das jeweilige Antigen niedriger exprimierenden normalen Zellen lysierten (128). Im Rahmen dieser Dissertation wurden HLA-A2⁻-CD8⁺ T-Zellen mit HER2₃₆₉₋₃₇₇-beladenen HLA-A2⁺-DCs stimuliert. Neben zahlreichen HLA-A2-spezifischen CTL-Klonen konnten so auch ein HLA-A2/HER2₃₆₉₋₃₇₇-spezifischer Klon und eine HLA-A2/HER2₃₆₉₋₃₇₇-spezifische CTL-Linie generiert werden. Diese CTLs sind HLA-A2/HER2₃₆₉₋₃₇₇-Multimer positiv und lysieren sowohl mit HER2₃₆₉₋₃₇₇-Peptid-beladene T2-Zellen als auch HLA-A2⁺HER2-überexprimierende Zelllinien.

Beim Vergleich der mit den drei unterschiedlichen Stimulationsmethoden generierten CTL fällt auf, dass die nicht-tumorlytischen CTLs z. B. Klon NvB #2/12 mit 10⁻⁸ M eine höhere Affinität für mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladene T2-Zellen besitzt als die tumorlytischen Klone mit einer Affinität von 10⁻⁶ M. Es ist überraschend, dass die alloreaktiven CTLs so eine niedrige Affinität aufweisen, da sie ja im Thymus keiner Selektion unterworfen gewesen sein sollten. Es ist möglich, dass durch eine zu hohe Peptidkonzentration bei der Stimulation nur niedrig affine CD8⁺ T-Zellen aktiviert wurden, während die höher affinen CD8⁺ T-Zellen durch Überstimulation in Apoptose gingen (129). Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang, dass der Allo-Klon KU #1 eine höhere Affinität für HER3₃₅₆₋₃₆₄ als für das HER2-Peptid besitzt, eine Eigenschaft, die seine Überstimulation durch die hohe HER2-Peptidmenge bei der Stimulation verhindern könnte. Bei dem mit HER2-mRNA-transfizierten DCs stimulierten Klon KW #63 ist die niedrige Affinität nicht verwunderlich, da bei T-Zellen für Selbstantigene wie HER2 nur relativ niedrig affine T-Zellen nicht im Thymus deletiert werden (130), die aber trotzdem tumorlytisch sein können (80). Erstaunlicherweise sind nur die niedriger affinen CTL-Klone tumorlytisch. Das widerspricht früheren Beobachtungen, bei denen tumorlytische CTLs beladene Zielzellen bei niedrigerer Peptidkonzentration lysierten als nur peptidspezifische CTL (z.B.102). Es ist außerdem auffällig, dass manche Targetzellen von den Klonen KU #1 und KW #63 genauso gut lysiert werden wie peptidbeladene T2-Zellen. Es handelt sich dabei zumindest bei der Lyse

von K562tA2tMIGR1-HER2 nicht um eine HER3-spezifische Lyse von Klon KU #1, da diese Zelllinie kein HER3 exprimiert. Als Erklärung bietet sich einerseits die von Zaks & Rosenberg (76) vermutete unterschiedliche Konformation von endogen prozessiertem HER2₃₆₉₋₃₇₇ und dem in Lösung befindlichen Peptid an. Die Konformationen wären dann zwar ähnlich genug, dass sie beide erkannt würden, aber die Erkennung des endogen prozessierten HER2 wäre besser. Für Klon KW #63, der mit endogen prozessiertem HER2 stimuliert wurde, ist das leicht vorstellbar, bei den allogenen CTLs könnte wieder die durch eine sehr hohe Peptidkonzentration bei der Stimulation bedingte Generierung von für das synthetische Peptid nur niedrig aviden Klonen, die aber das endogen prozessierte Peptid besser erkennen, verantwortlich sein. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist die, dass das endogen prozessierte HER2₃₆₉₋₃₇₇ glykosyliert ist. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass MHC-Klasse-I-Moleküle auch glykosylierte Peptide präsentieren können (40). Apostolopoulos und Mitarbeiter (131) konnten sogar zeigen, dass ein glykosyliertes Peptid nicht nur kreuzreaktiv war, sondern von den T-Zellen mit höherer Affinität gebunden wurde als das unglykosylierte Peptid. HER2₃₆₉₋₃₇₇ besitzt mit einem Serin an Position 373 eine mögliche Glykosylierungsstelle (132). Da Klon KW #63 mit endogen prozessiertem HER2₃₆₉₋₃₇₇ stimuliert wurde, besteht bei ihm die Möglichkeit, dass er für das glykosylierte Peptid spezifisch ist. Im Rahmen einer Kooperation sollen weitere Versuche mit glykosyliertem Peptid durchgeführt werden.

Eine überraschende Gemeinsamkeit der generierten CTL-Klone und der CTL-Linie ist die Lyse autologer sowie allogener HLA-A2 positiver dendritischer Zellen. Diese Beobachtung ist sehr wichtig, da sie einen Gentransfer der T-Zellrezeptoren der im Rahmen dieser Dissertation generierten CTL-Klone in Patienten-CTLs und einen adoptiven T-Zelltransfer ebenfalls betroffener CTLs bedenklich macht. Da die generierten CTL-Klone nicht nur HER2₃₆₉₋₃₇₇, sondern auch die entsprechenden Peptide bei HER3 und/oder HER4 erkannten, wurden reife DCs verschiedener Spender sowie C1RtA2, die ebenfalls ohne bekannte HER2-Expression lysiert wurden, im Durchflusszytometer auf HER2, HER3 und HER4 untersucht. Bei den DC konnte eine geringe HER2-Expression festgestellt werden, während von HER3 und HER4 keine Expression nachweisbar war. Bei einer RT-PCR auf die drei Rezeptortyrosinkinasen konnten allerdings die Expression sowohl von HER3 als auch von HER4 in C1RtA2 und DCs nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass aktivierte CTL nur wenige MHC-I-Moleküle benötigen, um antigenbeladene DCs zu töten (133). Daher ist es also durchaus vorstellbar, dass die geringe HER2-Expression allein oder zusammen mit der nur als mRNA nachweisbaren Expression von HER3 oder HER4 zur Lyse von DCs führen könnte. Das Gleiche könnte auch für die sehr gut lysierbaren C1RtA2 gelten. Um zu zeigen, dass es sich wirklich um eine spezifische Erkennung von HER3₃₅₆₋₃₆₄ und HER4₃₆₁₋₃₆₉ handelt, musste zunächst festgestellt werden, ob die CTLs diese Peptide auch erkennen, wenn sie endogen prozessiert wurden, und anschließend, ob die Peptide wirklich für die Lyse der DCs und C1RtA2 verantwortlich sind. Die Erkennung von endogen prozessiertem HER3 und/ oder HER4 wurde durch Transfektionsexperimente überprüft. Durch Inkubation von transient mit HER2, HER3 oder HER4 transfizierten K562tA2-Zellen mit den Klonen KU #1 und KW #63 wurden die CTL-

Klone zur Sekretion von IFN- γ angeregt. Damit konnte gezeigt werden, dass die CTL-Klone auch endogen prozessiertes HER3 und HER4 erkennen. Im Gegensatz zu dem synthetischen Peptid HER4₃₆₁₋₃₆₉ erkennt Klon KW #63 auch endogen prozessiertes HER4. Diese Beobachtung kann wieder als Hinweis darauf gewertet werden, dass sich die synthetischen und endogen prozessierten Peptide so unterscheiden können, dass nur eines von beiden von spezifischen CTL-Klonen erkannt werden kann. Die Lyse nicht HER2-exprimierender Zelllinien zeigt, wie wichtig es ist, potentiell für den adoptiven T-Zelltransfer oder den TCR-Transfer vorgesehene CTLs sehr genau auf ihre Spezifität und mögliche Kreuzreaktivitäten zu überprüfen. Natürlich ist es unmöglich alle Eventualitäten auszuschließen, aber die Überprüfung der Lyse möglichst vieler unterschiedlicher Zelllinien und eine sorgfältige Recherche der normalen Expression der Familien überexprimierter Tumorantigene sind unerlässlich.

Auch auf Grund der unerwarteten Lyse von DCs und C1RtA2 war es wichtig nachzuweisen, dass es sich bei den generierten Klonen und der Linie wirklich um CTLs handelt. Die Möglichkeit, dass es sich bei den zwei CTL-Klonen und der CTL-Linie um NK-Zellen handelt, konnte durch die ⁵¹Cr-Freisetzungstests mit den K562tA2 ausgeschlossen werden. Durch das Fehlen von HLA-B und HLA-C-Molekülen sind K562tA2-Zellen geeignete Zielzellen für NK-Zellen. Diese töten Zellen, die kein oder nur sehr wenig MHC-I exprimieren, da sie inhibitorische Rezeptoren besitzen, die KIR (Killing Inhibitory Receptor), die an bestimmte HLA-Moleküle binden und dadurch verhindern, dass die NK-Zellen die entsprechenden Zellen töten (z.B. 134). Können die KIR nicht binden, wird die Zelle lysiert. Bei den generierten Klonen bzw. der CTL-Linie handelt es sich also nicht um NK-Zellen.

3.2 Ausweichmechanismen der Tumorzellen

Die drei Klone zeigen Übereinstimmung darin, welche der HER2-überexprimierenden Zelllinien lysiert werden. Diese Beobachtung kann als starker Hinweis auf ein Ausweichen der Tumorzellen vor der Antitumorimmunantwort durch zytotoxische T-Zellen gewertet werden, also ein „Immune Escape“. Die Beobachtung, dass Tumorzellen die Fähigkeit besitzen können, der gegen sie gerichteten Immunantwort auszuweichen oder diese sogar zu unterdrücken, wurde bereits in den 80er Jahren beschrieben (s. 99). Da die Entwicklung von Ausweich- und Unterdrückungsmechanismen von Tumorzellen durch den Druck des Immunsystems bewirkt wird, bezeichnet man dieses Phänomen als „Cancer Immunoediting“ (95).

Bei allen untersuchten Zelllinien wurden die Expression von HLA-A2 und HER2, HER3 und HER4 im Durchflusszytometer und die mRNA-Konzentration bestimmter Antigenprozessierungsmaschinerie (APM)-Komponenten (TAP1, Tapasin, LMP-2) durch semiquantitative RT-PCRs vor und nach IFN- γ -Behandlung bestimmt, um mögliche Ursachen für fehlende Lysierbarkeit ohne IFN- γ -Vorbehandlung zu finden. Die Untersuchung der HLA-A2-Expression ergab, dass außer den transduzierten K562tA2, bei denen die Δ MFI der A2-Expression nach IFN- γ -Vorbehandlung zunahm, alle untersuchten, lysierbaren Zelllinien auch ohne IFN- γ -Vorbehandlung eine hohe HLA-A2-Expression aufwiesen. Bei allen Zelllinien bis auf die

S_{Mo}-LCL erhöht sich die Expression der untersuchten APM-Komponenten nach Behandlung mit IFN- γ , wenn sie nicht vorher schon sehr stark exprimiert waren. Ein Zusammenhang zwischen APM-Expression und Lysierbarkeit konnte aber nicht immer beobachtet werden. Die SK-MEL-37 exprimieren alle Komponenten und werden von den Klonen KU #1 und KW #63 immer lysiert. Die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3tA2 exprimiert ohne Vorbehandlung kein Tapasin und wird dann auch nicht lysiert, nach Vorbehandlung mit IFN- γ reguliert sie Tapasin hoch und wird lysiert. Die Mammakarzinomzelllinie KS24.22 dagegen wird auch nur nach IFN- γ -Vorbehandlung erkannt, obwohl TAP1, Tapasin und LMP2 immer vorhanden sind. Kayser et al. (135), der auch die Expression von TAP2, LMP-7 und MECL-1 untersuchte, konnte zeigen, dass die KS24.22 ohne IFN- γ kein MECL-1 exprimieren, eine mögliche Erklärung für ihre fehlende Lysierbarkeit. Hier zeigt sich, dass eine Untersuchung aller von IFN- γ abhängigen APM-Komponenten und die Supplementierung fehlender Komponenten durch Transfektion des jeweiligen Gens erforderlich sind, um klare Aussagen zur Ursache für eine fehlende Erkennung durch APM-Herunterregulation machen zu können.

Ein Verlust oder eine Herunterregulierung von APM -Komponenten ist typisch für den „Immune Escape“ von Tumorzellen (91), es gibt aber auch die Hypothese, dass die Rezeptortyrosinkinase HER2 direkt dafür verantwortlich sein könnte (96). So wurde HER2 quantitativ am wenigsten von den SK-MEL-37 und SK-MEL-29 exprimiert, die aber gleichzeitig zu den wenigen Zelllinien gehören, die ohne IFN- γ -Vorbehandlung lysiert werden. Dieses könnte ein Hinweis auf die unten diskutierte APM -Herunterregulation durch HER2 sein. Ansonsten konnte in der Expression der untersuchten APM-Komponenten allerdings kein Zusammenhang zwischen HER2-Expression und der Herunterregulierung von TAP1, Tapasin oder LMP-2 nachgewiesen werden. Hier bleibt aber wieder anzumerken, dass in dieser Promotionsarbeit nur ein Teil der Antigenprozessierungsmaschinerie untersucht wurde. Doch auch Kayser et al. (135) konnten z.B. für die HER2-überexprimierenden GAKL, die nicht lysiert werden, keinen Verlust in den von ihm untersuchten drei zusätzlichen APM-Komponenten zeigen.

Da es sich bei der semiquantitativen RT-PCR um keine besonders sensitive Methode handelt, wurde die sehr viel größere Sensitivität von antigenspezifischen CTL für einen Nachweis HER2-bedingter Herunterregulation der APM genutzt. Die Transduktion von K562tA2 mit HER2 bzw. HER2-ECD erwies sich in diesem Zusammenhang als sehr nützlich. Bei den K562 handelt es sich um eine lymphoblastäre Zelllinie, die keine HLA-Klasse-I-Moleküle exprimiert. Die K562tA2 wurden mit HLA-A0201 transfiziert, besitzen aber keine HLA-B- und -C-Moleküle. Der Vorteil der transduzierten K562tA2 ist, dass sie sowohl mit dem gesamten HER2 als auch mit seiner extrazellulären Domäne transduziert wurde. Die HER2-Expression war dabei besonders hoch. Wenn es also zutreffen sollte, dass es durch HER2-Überexpression zu einer Herunterregulation der APM kommt wie in Herrmann et al. (96) behauptet, müsste dies auf die K562tA2tHER2 in besonderem Maße zutreffen. Die nur mit der extrazellulären Domäne transduzierten K562tA2 sollten dagegen keine Herunterregulation zeigen, da bei ihnen die signalgebende intrazelluläre Domäne fehlt. Es werden aber beide Zelllinien von Klon KW #63 nur nach IFN- γ -Vorbehandlung lysiert, während Klon KU #1 und CTL-Linie KU #40 K562tA2tMIGR1-HER2-ECD auch ohne

IFN- γ -Vorbehandlung lysieren. Dieses Ergebnis kann man so interpretieren, dass die APM unabhängig von HER2 reguliert werden kann. Möglicherweise wird der Einfluss von HER2 auf die APM aber von anderen Faktoren überlagert. Für diese Theorie spricht, dass Klon KU #1 und CTL-Linie KU #40 K562tA2tMIGR1-HER2-ECD ohne IFN- γ schlechter erkennen als nach IFN- γ -Vorbehandlung.

Eine weiterer Ausweichmechanismus von Tumorzellen ist der Verlust der IFN- γ -Sensitivität durch Dysfunktion der IFN- γ -Rezeptor-Signalgebung (90). So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass 25% der untersuchten Lungenadenokarzinom-Zelllinien völlig insensitiv gegenüber IFN- γ geworden waren (92). Einen potentiellen Kandidaten für diesen Ausweichmechanismus könnten die SKBR3tA2 darstellen, die nie lysiert wurden oder Zytokinsekretion auslösten. Es zeigte sich aber, dass diese Zelllinie bei IFN- γ -Behandlung die HLA-A2-Expression hochreguliert. Sie ist also durchaus IFN- γ -sensitiv. Es gibt allerdings mit den SMO-LCL eine Zelllinie, bei der keine Hochregulation von Antigenprozessierungskomponenten zu beobachten ist. Bei dieser Zelllinie handelt es sich aber um keine Tumorzelllinie, sondern um eine durch EBV-Infektion immortalisierte B-Zelllinie eines gesunden Spenders. Weder nur mit Leervektor noch mit MSCV-MIGR1-HER2-transduzierte SMO-LCL zeigen eine Reaktion auf IFN- γ . Die mit HER2-transduzierten SMO-LCL werden zudem von keinem der drei tumorlysierenden Klone erkannt. Es handelt sich dabei nicht um ein für LCL typisches Phänomen, da SuHi-LCLtMIGR1-HER2-ECD von den Klonen KU #1 und KU #40 erkannt werden. Möglicherweise haben die SMO-LCL die Fähigkeit, auf IFN- γ zu reagieren, im Laufe ihrer Kultivierung eingeübt. Lange in Kultur gehaltene Zelllinien zeigen häufig Eigenschaften, die die ursprüngliche Zelllinie nicht besaß (z.B. 136).

Auch Defekte bei den Todesrezeptor-Signalwegen (93) oder die Expression antiapoptischer Signale (94) können dazu führen, dass Tumorzellen nicht lysiert werden können. In einem solchen Fall dürften die jeweiligen Zellen nicht lysiert werden, müssten aber trotzdem von spezifischen CTLs erkannt werden und diese zur Sezernierung von Zytokinen animieren. Auf die SKBR3tA2 trifft auch dies nicht zu, da sie bei den CTL-Klonen keine IFN- γ - oder TNF- α -Sekretion auslösten. Tumore können auch direkt durch immunsuppressive Zytokine wie TGF- β und IL-10 eine Immunantwort unterdrücken (90), ein vierstündiger ^{51}Cr -Freisetzungstest ist dafür aber kaum ausreichend, die 24 h Inkubation beim ELISA wären aber möglicherweise genug. Es ist vorstellbar, dass bei den SKBR3tA2 eine Kombination aus fehlender Lysierbarkeit und Sekretion immunsuppressiver Zytokine vorliegt. TGF- β - und IL-10-ELISA könnten hierüber Klarheit verschaffen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ursache für die fehlende Lyse unbehandelter HER2-überexprimierender Zelllinien auf unterschiedliche Ausweichmechanismen der jeweiligen Zellen zurückzuführen ist, ohne dass diese Mechanismen wegen ihrer Komplexität in jedem Fall aufgeklärt werden konnten.

3.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, tumorlytische HER2₃₆₉₋₃₇₇-spezifische zytotoxische T-Zellen zu generieren. Zum Einen gelang es, einen tumorlytischen, HER2₃₆₉₋₃₇₇-spezifischen CTL-Klon aus einem HLA-A2⁺ Spender durch Stimulierung mit HER2-mRNA-transfizierten DC zu aktivieren. Zweitens konnten ein allogener HLA-A2⁻ CTL-Klon sowie eine HLA-A2⁻ CTL-Linie gegen den HLA-A2/HER2₃₆₉₋₃₇₇-Komplex generiert werden. Mit Hilfe dieser spezifischen CTLs wurde eine bisher unbekannte HER2-Expression bei zwei Melanomzelllinien nachgewiesen. Es zeigte sich zudem, dass viele Tumorzelllinien Ausweichmechanismen gegen Angriffe durch das Immunsystem entwickelt haben. Die Kreuzreaktivität der CTLs gegen die dem HER2₃₆₉₋₃₇₇ entsprechenden Peptide bei HER3 und HER4 erfordert weitere Untersuchungen.

Weiterführende Experimente zur fehlenden Lyse bestimmter HER2-überexprimierender Zelllinien, zur Lyse von DCs und anderen nicht HER2-exprimierenden Zelllinien sowie zur Generierung von CTL-Klonen für den T-Zellrezeptortransfer oder direkt aus Patienten laufen bereits bzw. befinden sich in der Planung. Bei Zelllinien, die nur nach IFN- γ -Vorbehandlung oder überhaupt nicht lysiert werden, ist die Untersuchung der Expression weiterer APM-Komponenten wie LMP-7 und -10, MECL-1, TAP2 und β 2-Mikroglobulin geplant. Durch Transfektion von Zellen mit den ihnen fehlenden APM-Komponenten, soll überprüft werden, ob diese tatsächlich für die fehlende Lyse verantwortlich sind. So soll z.B. überprüft werden, ob bei den SKOV3tA2 ein isolierter Tapasin-Defekt vorliegt. Bei den SKBR3tA2 sollen außerdem ELISA auf die immunsuppressiven Zytokine TGF- β - und IL-10 durchgeführt und ihre Lysierbarkeit nach Pulsen mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ untersucht werden.

Die Generierung und Überprüfung weiterer CTL-Klone aus gesunden Spendern und Patienten ist geplant. Sollten diese auch alle kreuzreaktiv sein und DC erkennen, muss eventuell auf ein anderes HER2-Epitop oder ein andere tumorassoziiertes Antigen zurückgegriffen werden. Eine Möglichkeit stellt hier das HLA-B4402 restringierte Epitop HER2₁₀₂₁₋₁₀₃₀ dar, das zumindest zu HER3 keinerlei Entsprechung aufweist. Die Spezifität und Avidität allorestingierter tumorlytischer CTLs soll mittels retroviralem Gentransfer ihrer jeweiligen T-Zellrezeptoren auf T-Zellen anderer Spender oder Patienten übertragen werden (137). Die Vorteile dieser Methode neben dem sehr viel geringeren Arbeitsaufwand sind, dass sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen transfiziert werden und diese sich auch in Memory-T-Zellen entwickeln können (138). Wenn diesem TCR-Transfer ein adoptiver T-Zelltransfer folgen soll, ist es zur Vermeidung von Autoimmunität günstig, CTLs mit bekannter Spezifität mit dem zusätzlichen TCR zu transfizieren. Die Proliferation der transfizierten T-Zellen soll durch Gabe von IL-2 angeregt werden. Auch eine lymphodepletierende Behandlung vor dem T-Zelltransfer könnte zur Verbesserung der *in vivo* Expansion der transferierten CTLs führen, wie von Dudley et al. (139) gezeigt. Zudem empfiehlt sich eine Kombinationstherapie von Trastuzumab und adoptivem T-Zelltransfer, da gezeigt werden konnte, dass der anti-HER2 monoklonale Antikörper Trastuzumab die zytolytische Aktivität humaner HER2-spezifischer CTLs erhöht (88).

4 Zusammenfassung

Der adoptive T-Zelltransfer tumorantigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen ist ein Beispiel für eine therapeutische Strategie gegen Tumoren. Die Rezeptortyrosinkinase Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor 2 (HER2), ein bei Mammakarzinomen und bei anderen Tumoren überexprimiertes tumorassoziiertes Antigen bietet sich als Ziel zytotoxischer T-Zellen an. Ein Problem ist allerdings, dass HER2 auch in gesunden Geweben exprimiert wird, was zur Deletion oder Anergisierung HER2-spezifischer T-Zellen führt. Deshalb müssen geeignete Wege zur Generierung möglichst reaktiver, tumorlytischer T-Zellen gefunden werden.

Der Versuch, tumorlytische CD8⁺ T-Zellen durch Stimulation mit dendritischen Zellen zu aktivieren, die mit dem immunodominanten HER2₃₆₉₋₃₇₇-Peptid beladen worden waren, scheiterte an der Unfähigkeit der generierten T-Zellen, endogen prozessiertes HER2₃₆₉₋₃₇₇ zu erkennen. Die Aktivierung mit endogen prozessiertem HER2₃₆₉₋₃₇₇ durch Transfektion von dendritischen Zellen mit HER2-mRNA führte zur Generierung eines T-Zellklons, der viele HER2-überexprimierende Zelllinien lysieren konnte. Alternativ wurden zur Umgehung von Toleranz HLA-A2⁻ T-Zellen von peptidbeladenen, HLA-A2⁺ dendritischen Zellen stimuliert, da HLA-A2⁻ T-Zellen gegen den HLA-A2/HER2₃₆₉₋₃₇₇-Komplex im Thymus nicht deletiert oder anerg gemacht werden. Mit Hilfe dieser Stimulationsmethode konnten ein zytotoxischer T-Zellklon und eine zytotoxische T-Zelllinie generiert werden, die endogen prozessiertes HER2 erkennen.

Eine unerwartete Entdeckung war, dass dendritische Zellen und eine HER2-negative Zelllinie ebenfalls lysiert wurden. Da eine Kreuzreaktivität mit HER3 und/oder HER4 gezeigt werden konnte, wurden die dendritischen Zellen und die-HER2-negative Zelllinie auf diese Rezeptortyrosinkinasen hin untersucht. In einer RT-PCR konnten geringe Mengen von HER2, HER3 und HER4 nachgewiesen werden. Die Kreuzreaktivität der generierten zytotoxischen T-Zellklone macht deutlich, wie wichtig die genaue Charakterisierung von T-Zellklonen für den adoptiven T-Zelltransfer ist, und lässt eine Verwendung anderer Epitope mit möglichst geringen Homologien in der HER-Familie als sinnvoll erscheinen. Da die Lysierungsmuster der generierten T-Zellen übereinstimmten und viele HER2-überexprimierende Zelllinien nur nach Vorbehandlung mit IFN- γ lysiert wurden, lag nahe, dass die fehlende Lyse durch Ausweichmechanismen der Tumorzellen bedingt sein könnte. Eine Untersuchung der mRNA-Expression einzelner Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie ergab, dass diese ohne IFN- γ -Vorbehandlung oft nur in geringer Menge oder überhaupt nicht vorlagen, dass hier allerdings kein Muster erkennbar war. Die HER2-Überexpression stellt offenbar einen Teilaspekt der Herunterregulation dar.

Die erfolgreich durchgeführte Stimulationsmethode mit Hilfe HER2-transfizierter dendritischer Zellen kann direkt für die Generierung tumorlytischer zytotoxischer T-Zellen zum adoptiven T-Zelltransfer bei Patienten angewandt werden. Zudem bietet sich ein retroviraler Gentransfer eines geeigneten T-Zellrezeptors in T-Zellen von Patienten an. Dadurch würde die aufwändige und oft erfolglose, individuelle T-Zellklonierung überflüssig.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 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 ad iniectabilia, steril	Braun, Melsungen
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
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
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
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
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
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
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Fluka-Chemie, Deisenhofen
SuperSignal® Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trockenmilchpulver	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

5.1.2 Radioaktive Substanzen

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

5.1.3 Medien und Supplemente für die Zellkultur

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	PAA, Pasching, Österreich
Rekombinanter humaner Granulozyten- Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	Cell Genix, Freiburg
Hygromycin B, 50 mg/ml in PBS	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Interleukin-1 β	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Proleukin (Interleukin-2)	Chiron, Emeryville, CA, USA
Interleukin-4	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-6	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-7	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-12	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
Interleukin-15	R & D Systems, Minneapolis, Min, USA
IMDM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin, 200 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 7,5%	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Opti-MEM®I, Serum-reduziertes Medium	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
Zeozin, 100 mg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.1.4 Peptide

HER2_{p369-377} KIFGSLAFL

Biosyntan, Berlin

HIV _{p476-484} ILKEPVHGV	„
MelanA _{p26-35} EAAGIGILTV	„
MelanAmod _{p26-35} A27L ELAGIGILTV	„

5.1.5 Enzyme

5.1.5.1 Restriktionsenzyme

Bam HI (20 U/μl)	New England Biolabs, Schwalbach
Bgl I (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Eco RI (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Eco RV (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Hind III (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Hpa I (5 U/μl)	New England Biolabs, Schwalbach
Nae I (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Nco I (10 U/μl)	New England Biolabs, Schwalbach
Nde I (20 U/μl)	New England Biolabs, Schwalbach
Nhe I (10 U/μl)	New England Biolabs, Schwalbach
Pvu II (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Sac I (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Sph I (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Xba I (20 U/μl)	New England Biolabs, Schwalbach
Xma I (10 U/μl)	New England Biolabs, Schwalbach
Xho I (10 U/μl)	Roche, Mannheim

5.1.5.2 Polymerasen

Herculase® Enhanced DNA Polymerase	Stratagene, Austin, USA
Taq DNA Polymerase	Orbigen, Inc., San Diego, USA
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

5.1.5.3 Alkalische Phosphatase

CIAP, 20-30 U/μl	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
------------------	----------------------------

5.1.6 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, FITC-konjugiert	„
Anti-human CD86, PE-konjugiert	„
Anti-human c-Erb B2/c-Neu (Ab 5), unkonjugiert	Calbiochem, Merck Biosciences, Darmstadt
Anti-human c-erbB-2/HER-2/neu Ab-20 (L87 + 2ERB19) unkonjugiert	„
Anti-human c-Erb B3 (Ab-4), unkonjugiert	„
Anti-human c-Erb B4 (Ab-1), unkonjugiert	„
Anti-human IgG, 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, Nacka Strand, Schweden
Antihuman Interferon- γ , mAb 7-B6-1-Biotin	Mabtech Nacka Strand, Schweden
Anti-mouse Fab, FITC-konjugiert	Zymed, San Francisco, USA
F(ab)2 Fragment Anti-mouse IgG (H ⁺ L), PE-konjugiert	Immunotech, Marseille, Frankreich
HER2p368-377-Streptamer	IBA GmbH, Göttingen
HER2p369-377-Tetramer	
MelanAp26-35-Tetramer	
MelanAp26-35-A27L-Tetramer	

5.1.7 Zelllinien

5.1.7.1 Adhärente Zellen

BM	HLA-A2-, HER2-positive Mammakarzinomzelllinie
GAKL	HLA-A2-, HER2-positive Mammakarzinomzelllinie
KS24.22	HLA-A2-, HER2-positive Mammakarzinomzelllinie
NIH3T3	murine Fibroblasten
Φ NX-ampho (Phoenix A)	humane embryonalen Nierenzelllinie 293T, mit Adenovirus E1a transformiert
SKBR3tA2	HER2-positive Mammakarzinomzelllinie, mit HLA-A2 transfiziert
SK-MEL-29	HLA-A2-, HER2-positive Melanomzelllinie
SK-MEL-37	HLA-A2-, HER2-positive Melanomzelllinie
SKOV3tA2	HER2-positive Ovarialkarzinomzelllinie, mit HLA-A2 transfiziert

5.1.7.2 Suspensionszellen

C1RtA2	EBV-transformierte lymphoblastäre Zelllinie ohne HLA-I, HLA-A2 transfiziert
C1RtA2tHER2	EBV-transformierte lymphoblastäre Zelllinie ohne HLA-I, HLA-A2 und HER2 transfiziert
K562tA2	Lymphoblastäre Zelllinie ohne HLA-I, mit HLA-A2 transfiziert
K562tA2tMIGR1-HER2-ECD	Lymphoblastäre Zelllinie ohne HLA-I, mit HLA-A2 transfiziert, MSCV-MIGR1-HER2-ECD transduziert
K562tA2tMIGR1-HER2	Lymphoblastäre Zelllinie ohne HLA-I, mit HLA-A2 transfiziert, MSCV-MIGR1-HER2 transduziert
K562tA2tMIGR1	Lymphoblastäre Zelllinie ohne HLA-I, mit HLA-A2 transfiziert, MSCV-MIGR1 transduziert
SuHi-LCLtMIGR1-HER2-ECD	HLA-A2-positive, EBV-transformierte lymphoblastäre Zelllinie, MSCV-MIGR1-HER2-ECD transduziert
SMo-LCL	HLA-A2-positive, EBV-transformierte lymphoblastäre Zelllinie
SMo-LCLtMIGR1-HER2	HLA-A2-positive, EBV-transformierte lymphoblastäre Zelllinie, MSCV-MIGR1-HER2 transduziert
SMo-LCLtMIGR1	HLA-A2-positive, EBV-transformierte lymphoblastäre Zelllinie, MSCV-MIGR1 transduziert
T2	HLA-A2-positive, TB lymphoblastäre Hybridzelllinie, TAP-defizient

5.1.8 Oligonukleotide für das Einfügen von Restriktionsschnittstellen

HECDfor	TACTCACTCGAGAGCACCATGGAGCTGGCGGC
ECD/TM-rev2	GACTGACTCGAGTCAGGACGTCAGAGGGCTGGCTCTCTGCTCG
HER2revMIGR1	GACTGAGTAACTCACACTGGCACGTCCAGACCCAG

5.1.9 Oligonukleotide zum Sequenzieren

HER2for1	ATGGAGCTGGCGGCCTTGTGCC
----------	------------------------

HER2for534	GCTGGCTCTCACACTGATAGACACC
HER2for1076	CCAATATCCAGGAGTTTGCTGG
HER2for1631	GCCGAGTACTGCAGGGGCTC
HER2for2162	GGAAGGTGAAGGTGCTTGGATC
HER2for2662	GGATGGCGCTGGAGTCCATTC
HER2for3202	GAGGAGGCCCCCAGGTCTCCAC
HER2rev250	CACTTGGTTGTGAGCGATGAG
HER2rev778	GCAGCTCACAGATGCCACTGTG
HER2rev1308	CAGCGAGTAGGCGCCATTGTGC
HER2rev1821	CCAGATGGGCATGTAGGAGAGG
HER2rev2305	CAGCCATCACGTATGCTTCGTC
HER2rev2728	GTCATCAGCTCCCACACAGTCAC
HER2rev3361	GAGGCTTTGCAGCCCCTTGGCTG

5.1.10 Oligonukleotide für RT-PCR

β -ACTIN	GGCATCGTGATGGACTCCG
β -ACTINas	GCTGGAAGGTGGACAGCGA
HER2for1651	GCCGAGTACTGCAGGGGCTC
HER2rev2305	CAGCCATCACGTATGCTTCGTC
HER3for	GAGAAGTGACAGGCTATGTC
HER3REV	CTTCTGATCCAGGACCCAG

HER4for1392	CAGCGCAGGAAACATCTAT
HER4rev1880	GGGTGGCACTCCCGATCTGG
LMP2sense	CACGAGCGCATCTACTGTGC
LMP2antisense	CAGCTGTAATAGTGACCAGG
Tapasense	CTTGGGATGATGATGAGCCATGG
Tapaantisense	CTGGGCCACCCCGGAGTTCCC
TAP1sense	GGACCGGGACGGCGTCCGAG
TAP1antisense	CTCCCGAGTTTGTGCCACAGG

5.1.11 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

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

5.1.12 Molekularbiologische Kitsysteme

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, Penzberg
RNeasy	Qiagen, Hilden
QIAshredder® Spin Columns	Qiagen, Hilden

5.1.13 Sonstige Kitsysteme

BD OptEIA™ Human IFN- γ ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, USA
BD OptEIA™ Human IL-12 (p70) ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, USA
BD OptEIA™ Human TNF- α ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, Franklin Lakes, USA

CD8 ⁺ T Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD40L, soluble (human) (recombinant) Set	Alexis, Lausen, Schweiz
Streptavidin-HRP-PQ	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
IOTest [®] Beta Mark TCR V β Repertoire Kit	Immunotech, Marseille, Frankreich

5.1.14 Standardgeräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	Kodak, New Haven, USA
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
Caesium 137-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
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter Φ 32	Beckman, Fullerton, USA
Refrigerated Incubator-Shaker Innova	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8 Holten,	Gydewang, Dänemark
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Transphor Electrophoresis Unit	Hofer, San Fransisco, USA
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen
Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg

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

5.1.15 Standardlösungen und -puffer

Ampicillin-Stammlösung:	50 mg/ml in A.d.
Amidoschwarz-Entfärbelösung:	10% Methanol 10% Essigsäure in A.d.
Coating-Puffer (ELISA)	8,4 g NaHCO ₃ 3,56 g Na ₂ CO ₃ ad 1 l A.d.
DNS-Probenpuffer (10-fach):	50% Glycerin 0,2% Bromphenolblau 0,5 M EDTA in A.d.
Erythrozyten-Lyse-Puffer	8,3 g Ammoniumchlorid 1,0 g Kaliumcarbonat 37 mg EDTA
FACS-Puffer:	1% BSA in PBS
Luria-Bertani (LB) Medium (flüssig):	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Hefeextrakt 1% NaCl in A.d. mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt autoklaviert
LB-Medium (fest):	1,5% Bacto-Agar in LB-Medium (flüssig)
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 A.d.
MACS-Puffer:	1 x PBS (pH 7,2) 0,5% BSA 2 mM EDTA

Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4% SDS in A.d.
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (2-fach):	1 M Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM DTT 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 20% Glycin in A.d.
SSC-Puffer (20-fach): (Standard Saline Citrat)	0,3 M Natriumcitrat/HCl (pH 7,0) 3 M NaCl
SOC-Medium:	2% Bacto-Trypton 0,55% Bacto-Hefeextrakt 0,5% 1M NaCl 0,5% 1M KCl in A.d. mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt autoklaviert 1% 2M Glukose (frisch zugegeben) 1% 2M MgCl ₂ (frisch zugegeben) sterilfiltriert (0,2µm Filter)
Stopp-Lösung (ELISA)	2 N H ₂ SO ₄
TAE-Puffer (10-fach):	0,4 M Tris 1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA (pH 8) in A.d.
Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d. 20% Methanol in A.d.
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4% SDS in A.d.

5.2 Methoden

5.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

5.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) handelt es sich um ein *in vitro*-Amplifikationsverfahren definierter DNA-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (140, 141, 142). Die PCR ist ein zyklischer Prozess, der auf der Wiederholung dreier aufeinanderfolgender Reaktionsschritte beruht:

Denaturierung (denaturation): Trennung des DNA-Doppelstranges bei 94°C

Primeranlagerung (annealing): spezifische Bindung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer an den kodierenden (sense primer) bzw. den nicht-kodierenden Strang (antisense primer) bei 45-65°C

Polymerisation (elongation): Synthese des jeweils fehlenden, komplementären Einzelstranges durch eine hitzestabile DNA-Polymerase bei 72°C

Bei optimalem Verlauf kommt es in jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der durch die Primer flankierten DNA-Abschnitte und damit zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung dieser Sequenz (bei n Zyklen 2^{n-1}).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für die Anlagerung neuer Sequenzen an ein DNA-Molekül zur Generierung neuer Restriktionsschnittstellen sowie zur Expressionsanalyse auf RNA-Ebene verwendet.

5.2.1.1.2 Generierung neuer Restriktionsschnittstellen mittels PCR

Wenn für eine Umklonierung von cDNA aus einem Vektor in einen anderen keine geeigneten Restriktionsschnittstellen vorhanden sind, kann man diese durch eine PCR mit entsprechenden Primern einfügen. Diese Methode musste für die Klonierung von HER2 und HER2-ECD in den retroviralen Vektor MSCV-MIGR1 angewendet werden.

Die mit den DNA-Strängen komplementären Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass sie die jeweiligen Sequenzen der Restriktionsschnittstellen sowie zusätzliche Nucleotide zum besseren Schneiden der Restriktionsenzyme am 5'-Ende enthalten. Da HER2-ECD nur einen Teil der gesamten HER2-cDNA ausmacht, fehlt am Ende der Sequenz ein Stoppkodon, das in den entsprechenden Antisense-Primer ebenso eingefügt wurde wie in alle Sense-Primer eine Kozak-Sequenz, die der Erhöhung der Proteinexpression dienen soll.

Die folgenden Restriktionsschnittstellen wurden generiert:

Für HER2: HpaI und XhoI

Für HER2-ECD: 2 x XhoI

Komponenten der PCR-Reaktion:

Plasmid (ca. 100 ng)

Primer (10 pmol/ml)

Primer (10 pmol/ml)

dNTPs (0,4 mM)

10x Herculase-Puffer

Herculase (1U)

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

Standardbedingungen für die Amplifikation:

	94°C, 2 min
	94°C, 30 s
20 - 35 x	55°C, 30 s
	72°C, 1 min/kb DNA
	72°C, 10 min

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

5.2.1.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen werden für das gezielte Schneiden doppelsträngiger DNA eingesetzt (142). Während dieses sogenannten Verdau entstehen je nach Enzym komplementäre, überhängende Enden (sticky ends) oder stumpfe Enden (blunt ends). Zum Schneiden wird die DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und den zugehörigen Restriktionspuffern inkubiert. Eine Inkubation von einigen Stunden bis zu einer Nacht meist bei 37°C folgt. Die enzymatische Reaktion wird durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 10 min gestoppt, wenn keine anderen Angaben vom Hersteller vorliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die PCR-Produkte und der retrovirale Vektor MSCV-MIGR1 3 h bei 37°C mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut.

5.2.1.3 Dephosphorylierung

Wenn nur ein einziges Restriktionsenzym verwendet wird, kann es bei der Ligation vom Insert in den Klonierungsvektor zu einer Rezirkularisierung des Vektors kommen. Bei der Dephosphorylierung wird eine alkalische Phosphatase eingesetzt, die die freien 5'-

Phosphatgruppen der linearen DNA abbaut. Die Ligation ist dadurch nur noch zwischen den freien 5'-Phosphat-Enden der Fremd-DNA und den 3'-OH-Enden des Vektors möglich. Die Dephosphorylierung kann direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau im Restriktionsansatz durchgeführt werden.

Da bei der Klonierung von HER2-ECD in den retroviralen Vektor MSCV-MIGR1 nur das Enzym XhoI verwendet wurde, erfolgte eine Dephosphorylierung des Vektors.

5.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer: 0,4 M Tris, 1,1% Essigsäure, 2% 0,5 M EDTA in A.d.

DNA-Ladepuffer: 50% (M/V) Glycerin, 0,5% (M/V) Bromphenolblau, 0,5 M EDTA in A.d.

Die Standardmethode zum Auftrennen, Charakterisieren und Aufreinigen von DNA-Fragmenten ist die Agarosegelelektrophorese.

Nukleinsäuren sind negativ geladen und wandern in einem Feld konstanter, elektrischer Spannung, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur angelegten Spannung ist. Agarose, ein aus Algen gewonnenes Polysaccharid, bildet eine Trägermatrix, die kleinere DNA-Fragmente leichter und schneller hindurchwandern lässt als größere. Zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente (< 500bp) werden hochprozentige Agarosegele (1,5%-2%) verwendet. Größere DNA-Fragmente (>1000bp) werden mit niedrigprozentigen Agarosegelen (0,5%-1%) separiert. Die Anfärbung der DNA im Gel erfolgt durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. Ethidiumbromid. Der Farbstoff wird durch UV-Licht der Wellenlänge 320 nm angeregt, so dass die DNA-Banden im Gel sichtbar werden.

Agarose wurde mit TAE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlen auf „Handwärme“ mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger gegossen. Nach der Auspolymerisierung des Gels erfolgte die Auftrennung der DNA-Proben in einer DNA-Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 60-90 V.

Sowohl Insert als auch Vektor wurden nach dem Restriktionsverdau und der Dephosphorylierung durch Agarosegelelektrophorese aufgereinigt.

5.2.1.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen können diese aus dem Agarosegel herausgeschnitten werden, wobei eine UV-Quelle mit niedriger Bestrahlungsstärke zur Sichtbarmachung der Banden verwendet wird, um DNA-Strangbrüche zu vermeiden.

Die DNA wurde mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction-Kits® (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus der Agarose isoliert.

Die DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten, in einem Eppendorfgefäß gewogen und in einem dreifachen Volumen „QG-Puffer“ bei 50°C aufgelöst. Es folgte die Zugabe von 200 µl 100% Isopropanol. Nach Durchmischung der Lösungen wurde jede Probe in eine „Qiaquick spin column“ (Säule) in einem 2 ml „collection tube“

(Auffangröhrchen) überführt und 1 min bei 12000 g und RT zentrifugiert. Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wurde dann zweimal mit 0,75 ml „PE-Puffer“ gewaschen (1 min bei 12000 g zentrifugiert) und anschließend noch einmal „trocken“ zentrifugiert. Zur Eluierung wurde die Säule in ein sauberes Eppendorfgefäß gestellt, 30-50 µl „EB-Puffer“ wurden zugegeben und nach einminütiger Inkubation erfolgte ein Zentrifugationsschritt (12000 g, RT, 1 min). Die DNA befand sich dann im Eluat und konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

5.2.1.5 Ligation von DNA

Die Herstellung eines rekombinanten DNA-Moleküls erfolgt durch Verknüpfung des linearisierten Vektors mit dem zu klonierenden DNA-Stück (142). Als Katalysator der ATP-abhängigen Reaktion dient die T4-Ligase, welche 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphat-Enden verknüpft.

In der vorliegenden Arbeit wurde das „Rapid DNA Ligation Kit“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet.

Zum Nachweis von Rezirkularisationen des Vektors diente ein Ansatz mit Vektor und H₂O an Stelle des DNA-Fragmentes.

Zur Ligation wurden jeweils 1 µl des linearisierten Vektors und 7 µl des geschnittenen DNA-Fragments bzw. H₂O als Kontrolle zusammen in ein Eppendorfröhrchen pipettiert. Dann wurden noch 2 µl DNA Dilution Buffer, 10 µl T4 DNA Ligase Buffer und 1 µl T4 Ligase zugegeben und die Mischung nach jedem Schritt gemischt und herunterzentrifugiert. Es folgte eine fünf- bis zehnminütige Inkubation bei RT.

Anschließend wurde das Ligationsprodukt auf Eis gestellt und in Bakterien transformiert.

5.2.1.6 Transformation in *E. coli* Bakterien

LB-Agarplatten: 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 15 g Agar ad 1 l A.d., autoklaviert

SOC-Medium: 2% Bacto-Trypton, 0,55% Bacto-Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 0,5% 1 M KCl in A.d., pH 7,0, Autoklavierung, 1% 2 M Glukose, 1% 2 M MgCl₂, Sterilfiltration

Zur Transformation wurde ein chemo-kompetenter *E. coli*-Stamm verwendet. Der retrovirale Vektor MSCV-MIGR1 wurde in die speziell für Vektoren mit retroviralen Sequenzen geeigneten MAX EFFICIENCY STBL 2 Competent Cells transformiert.

Die kompetenten Bakterien wurden dazu auf Eis aufgetaut und in gekühlte Eppendorfröhrchen aliquotiert. Je 1-5 µl der Ligationsreaktion wurden dazupipettiert und das Ganze wurde dann vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 20-45 s Inkubation bei 37°C in einem Thermoblock abgestoppt. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakteriensuspensionen mit SOC-Medium auf 1 ml Volumen gebracht und 90 min bei 30°C in einem Bakterienschüttler inkubiert. Anschließend wurden 15 µl der Bakteriensuspension mit 85 µl SOC-Medium auf vorgewärmten Ampicillin-Platten ausplattiert.

5.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep/Maxiprep)

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien wurden je nach DNA-Menge zwei Kits von Qiagen verwendet. Nach der Transformation wurden aus den gewachsenen Klonen zunächst nur kleine Bakterienkulturen angesetzt, die zum Überprüfen des Plasmids dienen. Anschließend fand eine DNA-Amplifikation in einem größeren Volumen statt.

Am Tag nach der Transformation in die Bakterien wurden Bakterienklone in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin geimpft und über Nacht bei 30°C in einem Schüttler inkubiert. Die dabei entstehende DNA wurde mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert und in einem Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese auf ihre Richtigkeit überprüft. Hatten die Fragmente die richtige Größe, wurden 200 µl aus der Minikultur in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und wiederum über Nacht bei 30°C in einem Bakterien-Schüttler inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte in diesem Fall mit dem „Plasmid Maxi-Kit“.

Im Anschluss an die Maxiprep wurde ein Aliquot des Plasmids mit geeigneten Primern zur Sequenzierung zu GATC(Konstanz) geschickt.

5.2.1.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

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

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

5.2.1.9 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen (Hilden) verwendet.

Suspensionzellen wurden gezählt und 5 min bei 340 x g zentrifugiert. Adhärente Zellen wurden zuerst mit Trypsin/EDTA abgelöst, dann gezählt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet zur Lyse in 350 µl RLT resuspendiert. Zur Homogenisierung wurde das jeweilige Lysat dann direkt auf eine QIAshredder Spin Column in einem

Sammelröhrchen gegeben und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. 350 µl 70% Ethanol wurden zum homogenisierten Lysat addiert und gut mit diesem vermischt. Die 700 µl wurden auf eine RNeasy Mini Column (Säule) in einem Sammelröhrchen überführt und 1 min bei 9300 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen der Flüssigkeit wurden 750 µl Buffer RW1 auf die Säule pipettiert und zentrifugiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit je 500 µl Buffer RPE. Anschließend erfolgte noch eine „trockene“ Zentrifugation zum Entfernen verbleibender Flüssigkeit. Dann wurde die Säule in ein Eppendorfröhrchen gestellt und 30 µl RNase freies Wasser zur Eluierung zugegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT, folgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 9300 x g.

5.2.1.10 RT-PCR

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) können aus mRNA spezifische Sequenzen amplifiziert werden. Die RT-PCR besteht aus zwei Reaktionen. Zuerst wird durch die Reverse Transkriptase ein zur als Matrize dienenden RNA komplementärer DNA-Erststrang synthetisiert, dann wird die neu gebildete c-DNA als Matrize in einer PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. Wenn die Erststrangsynthese nicht gleich mit spezifischen Primern stattfindet, kann sie mit Oligo(dT)- oder sogenannten Random-Primern durchgeführt werden. Oligo(dT)-Primer paaren mit der Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende der mRNA, während die hexameren Random-Primer an unterschiedlichen Bereichen eines mRNA-Moleküls hybridisieren und so die cDNA-Synthese ermöglichen.

5.2.1.10.4 RT-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurden RT-PCRs zum Nachweis der Transkription HER2, HER3 und HER4 sowie von Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie durchgeführt.

Zu 2 µg der jeweiligen RNA wurden 1 µl Oligo(dT)-Primer und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) gegeben. Das Gemisch wurde dann auf 12 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden auf Eis 4 µl 5x First Strand Buffer und 2 µl 0,1M DTT als Reduktionsmittel addiert und vermischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reverse Transkriptase M-MLV RT dazugegeben und durch vorsichtiges Pipettieren untergemischt. Es folgte eine fünfzigminütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde die Reaktion 15 min bei 70°C inaktiviert.

Die cDNA wurde in PCRs auf β-Actin, HER2, HER3 und HER4, Tapasin, Tap1 und LMP-2 eingesetzt. β-Actin wird in allen Zellen exprimiert und diente deshalb als Kontrolle für die eingesetzte cDNA-Menge.

5.2.2 Zellkultur

5.2.2.1 Allgemeine Zellkultur

5.2.2.1.5 Kultivierung verschiedener Zelllinien

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

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

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

Die adhärennten Zelllinien wurden bis auf zwei Ausnahmen in DMEM-Medium gehalten. Nur SKOV3tA2 und SKBR3tA2 wurden in RPMI-Medium kultiviert. Bei einer Konfluenz von etwa 90% erfolgte die Ablösung der Zellen durch enzymatischen Abbau mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung. Dazu wurden die Zellen erst mit warmem, sterilen 1x PBS gewaschen und dann 5-20 min mit 3-5 ml 1x Trypsin/EDTA inkubiert. Dabei musste kontrolliert werden, wann die Zellen abgelöst waren, da bei einer zu langen Inkubation die Zellmembran angedaut wird. Die Reaktion wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt, dann folgte eine 5 min Zentrifugation bei 340 x g. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in gewünschter Zahl in neuen Kulturflaschen ausgesät.

Die Suspensionszellen, EBV-transformierte B-Zellen, T2-Zellen und K562-Zellen, wurden bis auf eine Ausnahme in RPMI-Medium kultiviert. Nur die C1RtA2 und C1RtA2tHER2-Zelllinien benötigten IMDM-Medium. Mit HLA-A2 transfizierte K562 bzw. C1R wurden durch Zusatz von G418 bzw. Hygromycin zum Medium selektiert.

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

5.2.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl

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

5.2.2.1.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieremedium: 90% Albumin; 10% DMSO

Die einzufrierenden Zellen wurden gezählt und abzentrifugiert. Je nach Zelltyp wurden bis zu 1 x 10⁷ Zellen in 1 ml Einfrieremedium 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 entweder im 37°C-Wasserbad oder in der Hand. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

5.2.2.2 EBV-Transformation

Die Immortalisierung von B-Zellen und damit die Generierung von lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) wurde durch Infektion mit Epstein-Barr-Viren erreicht.

Zur EBV-Transformation wurden 1×10^7 PBMC in 2,5 ml RPMI-Medium im Verhältnis 1:1 mit EBV-Überstand für 2 h im 37°C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 5 ml RPMI-Medium mit 1 µg/ml Cyclosporin A, das das Hochwachsen der T-Zellen verhindern sollte, dazugegeben und die Suspension wurde in 25 cm²-Flaschen überführt.

Die Flaschen wurden nun für 3 Wochen im Brutschrank inkubiert und nur bei Farbumschlag des Mediums erfolgte ein teilweiser Mediumwechsel. Nach 3 Wochen wurde der Erfolg der Transformation am Vorhandensein der LCL-typischen Zellaggregate überprüft. Die Transformation gelang nicht immer.

Lymphoblastoide Zelllinien wurden von möglichst vielen Spendern hergestellt und dann retroviral transduziert, um geeignete Targetzellen für Spezifitätsprüfungen von CTL dieser Spender zu erhalten.

5.2.2.3 Retrovirale Transduktion

Es gibt verschiedene Möglichkeiten DNA in eukaryotische Zellen transient oder stabil einzuschleusen. Beispiele sind die Elektroporation (s.unten), Mikroinjektion, Lipofektion oder die retrovirale Transduktion.

Im Verlauf einer retroviralen Infektion wird die einsträngige RNA aus dem Retrovirus durch die retrovirale reverse Transkriptase in komplementäre doppelsträngige DNA umgeschrieben und stabil ins Erbgut der Empfängerzelle integriert (Abb. 39). Dieses Prinzip macht man sich zu Nutze, indem man das zu transduzierende Gen zunächst in einen retroviralen Vektor kloniert. Dieser Vektor wird in eine sogenannte Verpackungszelllinie transfiziert, die ein Provirus enthält, welches für die Produktion der für die Viruspartikel notwendigen Proteine kodiert. Von der Verpackungszelllinie können jetzt Viren freigesetzt werden, die über das Oberflächenprotein ihrer Hüllmembran mit geeigneten Rezeptoren auf der Oberfläche der Empfängerzellen interagieren und diese so infizieren können. Eine Transduktion mit Retroviren ist nur in sich teilende Zellen möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden A2⁺-Suspensionszellen mit HER2- und HER2-ECD-kodierenden Retroviren infiziert. Dazu war zunächst die Transfektion der Plasmide in eine Verpackungszelllinie nötig. Anschließend wurden die Zielzellen mit den entstandenen Viren infiziert.

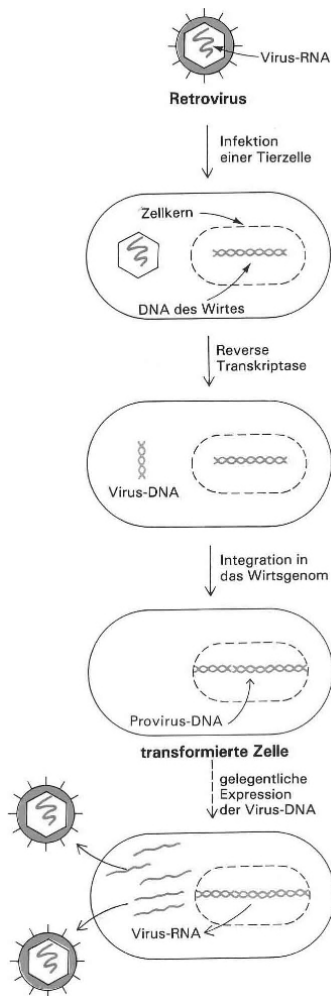


Abb. 39 Retrovirale Infektion (nach Stryer 1999¹³⁶)

5.2.2.3.8 Transfektion von adhärennten Verpackungszellen zur Virusgewinnung

Zur Virusgewinnung wurden amphotrope Phoenix-Zellen als Verpackungszelllinie verwendet. Phoenix-Zellen stammen von der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T ab, die mit dem Adenovirus Ela 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 FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim), ein auf Lipiden basierendes, Multikomponenten-Transfektionsreagenz eingesetzt, das mit der DNA Komplexe bildet und diese in die Zelle transportiert.

Zur Vorbereitung auf die Transfektion wurden etwa $1,2-1,5 \times 10^6$ Phoenix-Zellen pro Ansatz in 4 ml DMEM über Nacht in Transfektionsplatten ausgesät. Zur Transfektion wurde pro Transfektionsplatte ein Gemisch aus 94 μ l serumfreiem DMEM, 6 μ l FuGENE und 2 μ g DNA angesetzt und 15-45 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 h im Brutschrank wurden FCS und Penicillin/Streptomycin zugegeben. Alle 12 h wurde das Medium gewechselt, wobei wegen der amphotropen Viren unter S2-Bedingungen gearbeitet

wurde. Nach 48 h erfolgte die Transduktion.

5.2.2.3.9 Transduktion von Suspensionszellen mit retroviralem Überstand

Zur Transduktion wurde der Überstand von den Transfektionsplatten abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter filtriert, um eventuell vorhandene Zellen zu entfernen. Ein Pellet von 1×10^6 Suspensionszellen wurde in 200 µl RPMI-Medium resuspendiert und in ein Schraubdeckelröhrchen überführt. 200 µl des filtrierten Überstandes wurden hinzugefügt und das Ganze wurde dann für 90 min bei $1258 \times g$ 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 enthaltene eGFP untersucht und dann in einem Zellsorter sortiert.

5.2.2.3.10 Sortierung der transduzierten Zellen

Die transduzierten Zellen wurden in einem MoFlo Zellsortierer (Cytomation, Fort Collins, CO, USA) mit 25000 Ereignissen/s und maximal 1psi auf EGFP gefacst und sortiert. Anschließend wurden sie in RPMI mit 20% FCS aufgenommen und hochgezogen.

5.2.2.3.11 Bestimmung des Virustiters

Der Virustiter im Überstand der Phoenix-Zellen kann durch Infektion der adhärenen Mausfibroblastenzelllinie NIH 3T3 bestimmt werden.

Dazu wurden etwa 14 h vor der Infektion $2,5 \times 10^4$ NIH 3T3/Loch in 4 Löcher einer 6-Well-Platte ausgesät. Vor der Transduktion wurden die Zellen mit $1 \times$ PBS gewaschen, dann wurde 1 ml DMEM zugegeben. 2 µl Polybren (4 mg/ml) und entweder 1 ml DMEM, 1 ml Virusüberstand, 200 µl Virusüberstand + 800 µl DMEM oder 20 µl Virusüberstand + 980 µl DMEM wurden hinzugefügt.

Nach 48 h konnte der Prozentsatz der infizierten Zellen im Durchflusszytometer durch das eGFP im retroviralen Vektor bestimmt werden. Bei einer Verdoppelungszeit von etwa 14 h kann der Prozentsatz auf die Zahl infizierter Zellen umgerechnet werden. Da man davon ausgeht, dass ein Viruspartikel eine Zelle infiziert, kann man die MOI pro ml bestimmen.

5.2.2.4 Spezielle Zellkultur

5.2.2.4.12 Isolierung von PBMC

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

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

Dazu wurden jeweils 15 ml heparinisieretes Spenderblut in einem 50 ml Röhrchen 1:1 mit 1x PBS verdünnt und mit 15 ml Ficoll unterschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 887 x g (15 min, RT), die ungebremst auslief. Die Monozyten befanden sich mit den Lymphozyten in einem Interphasering zwischen den sedimentierten dichteren Zellen und einem Gemisch aus Plasma und PBS. Sie wurden vorsichtig abpipettiert und anschließend zweimal mit 1x PBS gewaschen (Zentrifugationen: 515 x g, 15 min; 340 x g, 10 min), nach der ersten Zentrifugation wurden die Zellen gepoolt. Zum Entfernen eventuell noch vorhandener Erythrozyten wurde eine fünf- bis zehnminütige Inkubation in 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer durchgeführt. Dann wurden die Zellen noch einmal in 1x PBS aufgenommen und 5 min bei 340 x g zentrifugiert.

5.2.2.4.13 Generierung von Monozyten-derivierten DC

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

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

Durch ihre Eigenschaft, an eine Plastikoberfläche zu adhären, können Monozyten aus einer PBMC-Präparation von den übrigen mononukleären Zellen getrennt werden (143). 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 (113) entwickelt.

PBMC wurden in einer Zelldichte von 1×10^7 /Loch in jeweils 3ml Mo-RPMI-Medium in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurden die nicht-adhären Zellen zweimal mit Medium abgespült und zur späteren Gewinnung von CD8⁺ T-Zellen eingefroren. Auf die adhären Zellen wurde wieder Mo-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 konnte durch FACS-Messungen auf die typischen Oberflächenmarker und das Fehlen des Monozytenmarkers CD14 bestimmt werden und war auch rein äußerlich durch die Lösung von der Plastikfläche 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. Etwa 4 h später wurden die Reifungszytokine IL-1 β (10ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-6 (1000 U/ml) und PGE-2 (1 μ g/ml) addiert. Nach 2 Tagen ist die Ausreifung erfolgt, wie die Expression von Oberflächenmolekülen

wie CD80, CD86, HLA-DR und besonders CD83 zeigt.

Zwei Ausreifungsvarianten bei denen statt der üblichen Reifungszytokine löslicher CD40L allein oder in Kombination mit TNF- α zugegeben wurden, wurden ausgetestet. CD40L wird auf Th1-Zellen exprimiert und generiert DC der DC1-Linie.

5.2.2.4.14 Peptidbeladung von Zellen

DC wurden beladen, indem sie 2 h bei RT in 1 ml RPMI plus 10 μ g Peptid bzw. 4 h in 250 μ l AIM V plus 5 μ l β 2-Microglobulin sowie 50 μ l Peptid (2 mg/ml) bei 37°C inkubiert wurden. Dabei wurden die Zellen alle 20 min aufgeschüttelt. Anschließend wurden die DC entweder sofort 3 x gewaschen oder mit 3500 rad bestrahlt und dann 1 x gewaschen. Es wurden nur ausgereifte DC beladen und zum Priming von T-Zellen eingesetzt. Das Waschen ist wichtig, damit überschüssiges Peptid entfernt wird, das sich sonst die T-Zellen gegenseitig präsentieren, was zum „Brudermord“ dieser Zellen führt (z.B. 144).

T2-Zellen wurden 1 h bei RT in 1 ml RPMI plus 10 μ g Peptid und 10 μ g/ml β 2-Microglobulin inkubiert und anschließend 3 x gewaschen.

5.2.2.4.15 Elektroporation von DC mit mRNA

Bei der Elektroporation werden in der Zytoplasmamembran einer Zelle, die sich in einer DNA- oder RNA-haltigen Lösung befindet, durch einen kurzen Stromstoß temporäre Poren erzeugt, durch die die Nukleinsäuren durch Diffusion und elektrophoretisch in die Zellen gelangen (145, 146).

Durch die Elektroporation von mRNA in DC soll die natürliche Prozessierung endogener Antigene simuliert werden. Die mRNA wird im Zytoplasma translatiert. Das entstehende Protein wird teilweise vom Proteasom in Peptide zerschnitten, diese werden ins ER transportiert und dort auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen, an die Zelloberfläche gebracht und präsentiert.

Einen Tag lang ausgereifte DC wurden abgenommen, gezählt und abzentrifugiert. Nach der vollständigen Entfernung des Überstandes wurden die APC pro 5×10^6 in 200 μ l Optimem aufgenommen und in eine 2 mm Küvette pipettiert. In jede Küvette wurden 20-40 μ g mRNA gegeben. Die Elektroporation erfolgte nach dem Square Wave Protokoll bei 500 V, 0,25 ms und 1 Pulse. Anschließend wurden die DC schnell in X-VIVO-Medium mit 10% AB-Serum, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 aufgenommen und zu 1×10^6 Zellen/Loch in einer 6-Loch-Platte verteilt. Nach einigen Stunden wurden die oben genannten Reifungszytokine wieder zugegeben. Das Priming von CD8⁺ T-Zellen erfolgte etwa 24 h nach der Elektroporation.

Für Zeitkinetiken wurden elektroporierte DC nach unterschiedlich langen Zeiträumen in ⁵¹Cr-Freisetzungstests getestet.

5.2.2.4.16 Priming und Restimulation von T-Zellen aus PBMC

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

Für die Stimulation von T-Zellen wurden 96-Loch-Rundbodenplatten verwendet, da diese durch ihre geringe Größe einerseits eine optimale Interaktion zwischen DC und T-Zelle ermöglichen. Andererseits brauchen nur relativ wenig T-Zellen eingesetzt werden, so dass die Gefahr der Überwucherung spezifischer durch unspezifische T-Zellen verringert ist.

Pro Loch wurden 1×10^5 frisch isolierte PBMC in 75 μ l T-Zellmedium mit 2 ng/ml IL-12 eingesetzt. Anschließend wurden 5×10^3 peptidbeladene autologe DC im gleichen Volumen T-Zellmedium plus 2 ng/ml IL-12 addiert. IL-12 wird auch von reifen DC sezerniert und wird u.a. für das Priming von CD8⁺ T-Zellen benötigt. Am folgenden Tag wurden zur Apoptoseinhibierung 5ng/ml IL-7 in 50 μ l T-Zellmedium hinzugefügt. Am 4. Tag erfolgte die Zugabe von 20 U/ml IL-2 in 25 μ l T-Zellmedium.

Es wurde wöchentlich restimuliert und zwar pro Ansatz mindestens zweimal., Bei der 1. Restimulation wurde noch 1 ng/ml IL-12 zugegeben, in den folgenden Restimulationen keines mehr.

Spezifitätsanalysen wurden jeweils sieben Tage nach einer Restimulation durchgeführt. Diese Methode ist von Bernhard et al 2005 (147) beschrieben worden.

5.2.2.4.17 CD8-Isolierung

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

Nach einem anderen Protokoll werden vor dem Priming CD8⁺ T-Zellen aus PBMC über eine MACS-Säule (Miltenyi) „untouched“ isoliert. Dazu können sowohl frische als auch eingefrorene PBMC verwendet werden.

Die PBMC wurden gezählt und in MACS-Puffer 10 min bei 340 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pipette komplett entfernt und 40 μ l MACS-Puffer und 10 μ l Biotin-Antibody Cocktail wurden pro 10^7 Zellen zugegeben. Das Ganze wurde gut gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 30 μ l MACS-Puffer und 20 μ l Anti-Biotin Micro Beads pro 10^7 Zellen addiert. Es folgte eine fünfzehnminütige Inkubation auf Eis. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 20 ml MACS-Puffer aufgefüllt und 10 min bei 340 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder komplett entfernt und das Pellet dann in 500 μ l MACS-Puffer/ 10^8 Zellen aufgenommen. Ein Auffangröhrchen und eine gekühlte MACS-Säule wurden in die MACS-Apparatur eingespannt und die Säule mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Je 500 μ l Zellsuspension wurden pro Säule aufgegeben und dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Die ausgewaschenen CD8-Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert und in der entsprechenden Menge AIM V-Medium für das Priming aufgenommen.

5.2.2.4.18 Priming und Restimulation von CD8⁺ T-Zellen

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

Die über die MACS-Säule isolierten CD8⁺-Zellen wurden zu 1×10^5 Zellen pro Loch in 100 μ l AIM V-T-Zellmedium mit 10 ng/ml IL-12 und 1000 U/ml IL-6 aufgenommen und in die Löcher einer 96-Loch-Rundbodenplatte ausgesät. Dazu wurden im gleichen Volumen Kulturmedium plus Zytokine 5×10^3 peptidbeladene oder mit mRNA-transfizierte DC addiert.

Zur Restimulation wurden 5 ng/ml IL-7 sowie 100 U/ml IL-2 an Stelle der beim Priming eingesetzten Zytokine verwendet.

7 Tage nach der Restimulation wurden Spezifitätsanalysen durchgeführt.

5.2.2.4.19 T-Zellklonierung

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

Klonierungen wurden mit in Spezifitätsanalysen positiv getesteten T-Zellen in 96-Lochplatten durchgeführt. Das den Klonierungen zu Grunde liegende Prinzip war das der limitierenden Verdünnung. Dabei werden die zu klonierenden Zellen in so großen Volumina an T-Zellmedium aufgenommen, dass nur noch eine statistische Wahrscheinlichkeit von z.B. 1 Zelle pro Loch besteht. Es wurden Verdünnungen mit 1, 3, 5 oder 10 Zellen pro Loch eingesetzt. Zusätzlich wurden 5×10^4 allogene, mit 3000 rad bestrahlte PBMC und 1×10^5 mit je nach Linie 10000-15000 rad bestrahlte LCL als sogenannte Feeder-Zellen in jedes Loch pipettiert. Dem Medium wurden 30 ng/ml des Antikörpers OKT-3 zugegeben, der von den Fc-Rezeptoren der PBMC gebunden wird. Das gebundene OKT-3 ist in der Lage eine unspezifische Proliferation der T-Zellen auszulösen, indem es den mit dem T-Zellrezeptor assoziierten CD3-Komplex aktiviert. Die Proliferation wird weiterhin durch von den LCL produzierte Zytokine unterstützt. Zusätzlich wurden noch 50 U/ml IL-2 und 2 ng/ml IL-15 zugegeben. Am 7. Tag erfolgte wieder eine Zugabe dieser Zytokine in 100 μ l T-Zellmedium nach Abnahme von 100 μ l Medium. Die Proliferation potentieller Klone konnte ab dem 11. Tag mikroskopisch überprüft werden. Ab Tag 14 folgte ein Klon-Screening mittels ⁵¹Cr-Freisetzungstest oder IFN- γ -ELISpot.

5.2.2.4.20 Expansion von T-Zellen

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

Zur Expansion positiv getesteter Klone wurden jeweils $1-2 \times 10^5$ Zellen des Klons mit $2,5 \times 10^7$ bestrahlten allogenen PBMC und 5×10^6 bestrahlten LCL in 25 ml T-Zellmedium plus 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 addiert.

5.2.2.5 Funktionelle Tests

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

Zur Bestimmung der spezifischen zytolytischen Aktivität der CD8⁺ T-Zellen diente der ⁵¹Cr-Freisetzungstest (148). Dieser Test beruht darauf, dass in Na₂⁵¹CrO₄ enthaltendem Medium inkubierte Zellen, das Natriumchromat aktiv aufnehmen. Werden die Zellen nun mit zytolytischen T-Zellen koinkubiert, welche von den HLA-Molekülen der Zellen präsentiertes Peptid erkennen, kommt es zur Lyse der erkannten Zellen und damit zur Freisetzung von Na₂⁵¹CrO₄. Die vom ⁵¹Cr emittierte γ -Strahlung kann nun in einem γ -Counter gemessen und daraus die Lyse bestimmt werden.

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

5 x 10⁵ der jeweiligen Targetzellen wurden in RPMI gewaschen und trocken dekantiert. Das Pellet wurde in 100 μ l warmem FCS resuspendiert, dann wurden 100 μ Ci Na₂⁵¹CrO₄ hinzugefügt und das Ganze 60-90 min bei 37°C inkubiert. Alle 20 min wurde die Zellsuspension vorsichtig aufgeschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Targetzellen 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 Targetzellen mit verschiedenen Mengen an Peptid beladen, sonst waren es 10 μ g/ml. Während der Inkubation der Targetzellen wurden je 50 μ l der zu testenden Klone bzw. 1,35 x 10⁵ 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 μ l Medium. Zur Feststellung der spontanen Freisetzung von ⁵¹Cr wurden pro Zelllinie 6 Löcher als Mediumkontrollen mit 100 μ l Medium vorbereitet. Zur Kontrolle der maximalen Lysierbarkeit wurden 100 μ l eines Detergenz (1% NP40) pipettiert, das zum Platzen aller Targetzellen und damit zur Freisetzung des gesamten aufgenommenen ⁵¹Cr führen sollte. Pro Loch wurden nun 1 x 10³ Targetzellen in 100 μ l Medium eingesetzt.

Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurden je 100 μ l 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 ⁵¹Cr-Freisetzungstests als fragwürdig angesehen.

Zur Bestätigung der Peptidspezifität wurden CTL-Klone vor einem ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit unmarkierten Zielzellen inkubiert. Dazu wurden T2-Zellen mit dem relevanten bzw. einem irrelevanten Peptid beladen und im Verhältnis 20:1, 40:1 und 80:1 für 30 min bei 37°C mit den fraglichen Effektorzellen inkubiert. Anschließend wurde mit den CTL ein ⁵¹Cr-Freisetzungstest

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

5.2.2.5.22 Zytokinsekretionstests

Die Spezifität von CD8⁺ T-Zellen kann man nicht nur durch Bestimmung der spezifischen Lyse von Targetzellen, sondern auch durch Messen ihrer Zytokinsekretion bei Kontakt mit Targetzellen feststellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Bestimmung der IFN- γ - und TNF- α -Sekretion zwei Varianten des Enzyme-linked Absorbant Assays (ELISA) durchgeführt (Abb. 40). Beim ELISA wird zuerst eine polymere Matrix mit Antikörper beschichtet, dann die Probe dazugegeben, so dass das darin enthaltene Antigen daran binden kann. Nach mehreren Waschschritten wird ein zweiter an ein Enzym gekoppelter Antikörper addiert. Das Enzym kann nun ein zugegebenes Substrat in ein farbiges oder fluoreszierendes Produkt umwandeln, so dass indirekt die Menge des in der Probe vorhandenen Antigens bestimmt werden kann.

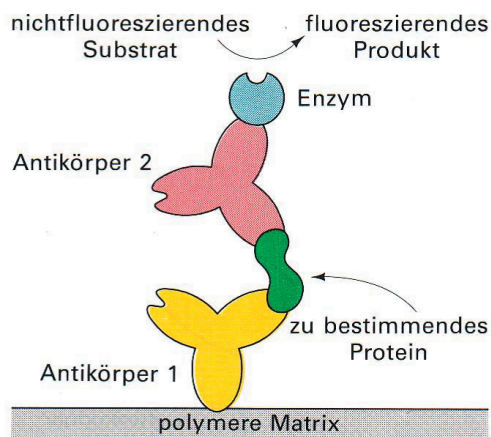


Abb.40 Modell des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (nach Stryer 1999¹³⁶)

5.2.2.5.23 ELISpot-Test

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

Zum Screening von Mikroturen aus den Löchern der verwendeten 96-Loch-Platten nach der Restimulation oder Klonierung wurden ELISpot-Tests zum Nachweis des Zytokins IFN- γ durchgeführt. Die Besonderheit des ELISpots ist, dass Effektor- und Targetzellen direkt in mit einem Fängerantikörper beschichteten Nitrozellulose-Mikrotiterplatten koinkubiert werden, so

dass nach dem Test Zytokin-sezernierende Zellen als Punkte (Spots) sichtbar sind.

In die Löcher der benötigten Nitrozellulose-Mikrotiterplatten wurden je 50 µl 1x PBS mit 10 µg/ml anti-IFN-γ 1-D1K-Antikörper pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung dekantiert und die Platten viermal für 15 min mit 1x PBS inkubiert. Durch diesen Waschschrift wurde ungebundener Antikörper entfernt. Als Nächstes wurden je 150 µl T-Zellmedium zugegeben, um durch das enthaltene Serum unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach 1 h bei 37°C wurde das Medium dekantiert und die T-Zellen in 50 µl T-Zellmedium pro Loch ausgesät. Dabei wurden die Zellen aus 50 µl aus einem Restimulations- oder Klonierungsloch dreimal gewaschen und auf 2 oder 3 Löcher verteilt. Aus Expansionsansätzen wurden 1 x 10³ CTL pro Loch eingesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurden je 1-2 x 10⁴ Targetzellen pro Loch in 50 µl T-Zellmedium addiert. Anschließend wurden die Platten 20 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten sechsmal in 1x PBS plus 0,05% Tween gewaschen, wobei sie jeweils 3 min inkubiert wurden. Nach der letzten Inkubation wurden die Platten auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Dann wurden 2 µg/ml 7-B6-Biotin-Antikörper in 100 µl 0,5% BSA/1x PBS in jedes Loch pipettiert. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurden die Platten wieder sechsmal mit 1x PBS plus 0,05% Tween gewaschen. Auf die Platten wurden dann je 100 µl 0,5% FCS/1x PBS mit 1:100 Streptavidin/Peroxidase gegeben. Durch die Bindung des Streptavidin an das Biotin des Sekundäntikörpers erhält dieser eine Peroxidase-Funktion. Nach 1-2 h Inkubation bei RT wurden die Platten je dreimal mit 0,05% Tween/1x PBS und 1x PBS gewaschen. Das Waschen mit PBS ist nötig, da Tween die Peroxidase-Reaktion stören würde. Durch Zugabe von je 100 µl H₂O₂-aktivierter AEC-Lösung erfolgt eine Farbreaktion, die nach 4 min 30 s durch gründliches Spülen unter fließendem Wasser gestoppt wird. Nach dem Trocknen können die Spots mit dem ELISpot-Mikroskop und der zugehörigen Software ausgezählt und ausgewertet werden.

5.2.2.5.24 Sandwich-ELISA

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

Coating-Buffer: 8,4 g NaHCO₃, 3,56 g Na₂CO₃ ad 1 l A.d.

Waschpuffer: 0,05% Tween/1x PBS

Stopplösung (2N H₂SO₄): 5,3 ml H₂SO₄ ad 50 ml A.d.

Beim ELISA wird im Gegensatz zum ELISpot die Zytokinsekretion aus dem Überstand von Zellen oder vorher koinkubierten Effektor- und Zielzellen gemessen. DC-Überstand wurde in einem IL-12p70-ELISA untersucht. Außerdem wurden IFN-γ- und Tumornekrosefaktor (TNF)-α-ELISA durchgeführt, um die Spezifität expandierter Klone zu bestimmen.

1 x 10⁴ Zielzellen, entweder endogen HER2 prozessierende oder mit HER2₃₆₉₋₃₇₇ beladene Zelllinien, wurden für 24 h bei 37°C mit 2 x 10⁴ CTL in 200 µl T-Zellmedium in 96-Loch-Rundbodenplatten koinkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden 100-150 µl Überstand/

Loch abpipettiert und entweder sofort im ELISA eingesetzt oder bei -20°C eingefroren. Die Löcher der für den ELISA verwendeten 96-Loch-MaxiSorp-Platten wurden zunächst mit dem 1. Antikörper beschichtet. Dazu wurden aus einem Mix aus 11,95 ml Coating-Buffer und 48 μl Capture Antibody pro Platte 100 μl in jedes Loch pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten dekantiert und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Platten auf saugfähigem Papier ausgeklopft, mit je 200 μl Assay Diluent/Loch gefüllt und 1 h bei RT inkubiert. Diese Inkubation diente der Blockierung unspezifischer Bindungen. Inzwischen wurden von den Zytokinstandards je sechs Verdünnungsschritte angesetzt, die bei IFN- γ von 1200 pg/ml und bei TNF- α von 500 pg/ml ausgingen. Dann wurden in die wieder dreimal gewaschenen Platten entweder 100 μl Assay Diluent als Blindwert, 100 μl Zytokinstandard oder 100 μl Kulturüberstand pro Loch pipettiert. Es folgten eine zweistündige Inkubation bei RT und fünfmaliges Waschen. Dann wurden 100 μl aus einer Mischung aus 11,95 ml Assay Diluent, 48 μl Detektionsantikörper und 48 μl Avidin-HRP in jedes Loch gegeben. Nach 1 h bei RT wurden die Platten siebenmal gewaschen. Zur Färbung wurden pro Loch 100 μl Substratlösung, die aus einer 1:1 Mischung aus den Reagenzien A und B bestand, eingesetzt. Nach einer etwa zehnminütigen Inkubation im Dunkeln ohne Deckel, wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μl 2 N H_2SO_4 gestoppt. Im ELISA-Reader wurden die Intensitäten der Färbungen bei 450 nm und 570 nm gemessen und die jeweiligen Zytokinkonzentrationen bestimmt.

5.2.2.5.25 Durchflusszytometrische Messungen (FACS-Analyse)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können innerhalb kurzer Zeit Tausende von Zellen einer Zellpopulation auf ihre Expression bestimmter Oberflächenmoleküle untersucht werden. Dazu werden diese Oberflächenantigene entweder direkt mit an entsprechende Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (direkte Immunfluoreszenz) oder ein erster wird von einem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper gebunden (indirekte Immunfluoreszenz). Die Fluorochrome werden im Durchflusszytometer durch einen Argon-Laser angeregt und emittieren Licht spezifischer Wellenlänge. Bei Verwendung in verschiedenen Wellenlängen fluoreszierender Farbstoffe können deshalb je nach Zytometer mehrere verschiedene Oberflächenmarker analysiert werden. Die Zellen fließen zur Messung einzeln in einem Trägerstrom durch ein Rohr, wobei das emittierte Licht von einem Detektor erfasst wird. Da die Fluoreszenzintensität mit der Menge des Fluorochroms korreliert, kann man auch Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des zu untersuchenden Antigens ziehen.

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

5.2.2.5.26 Färbung auf Oberflächenmarker

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

Für die direkte und indirekte FACS-Messung wurden die zu messenden Zellen geerntet, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 5 min. bei 423 x g bei 4°C), gezählt und in einer entsprechenden Menge FACS-Puffer aufgenommen. Von jeder Zelllinie wurden je 100 µl Zellsuspension für eine IgG-Kontrolle zur Ermittlung der Autofluoreszenz der Zellen und ein oder mehrere Ansätze für die jeweiligen Antikörper in FACS-Röhrchen überführt. Auf diese 100 µl kamen je 2,5-10 µl des primären bzw. gleich Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen. Die direkt markierten Zelllinien konnten nun gemessen werden, die Anderen wurden mit 1,5 µl des sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers für weitere 20 min bei 4°C inkubiert und anschließend noch einmal gewaschen. Mit dem retroviralen Vektor MSCV-MIGR1 transduzierte Zelllinien konnten ohne Färbung im FACS gemessen werden, weil der Vektor ein eGFP-Gen enthält (Abb. 16). War es nicht möglich, die gefärbten Zellen sofort zu messen, wurden sie in FACS-Puffer plus 1% Paraformaldehyd fixiert. Sie konnten dann mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

Die Differenz der mittleren Fluoreszenzen (Δ MFI) wurde aus der mittleren Fluoreszenz der jeweiligen Isotypkontrolle und des relevanten Antikörpers errechnet.

5.2.2.5.27 MHC/Peptid-Multimerfärbung

Erst seit wenigen Jahren ist es möglich antigenspezifische T-Zellen auf Grund ihrer Rezeptorspezifität zu identifizieren. Die Affinität zwischen T-Zellrezeptor und MHC:Peptid-Komplex ist nämlich zu gering für eine Markierung von T-Zellen mit ihren spezifischen MHC/Peptid-Komplexen. Dieses Problem wurde durch die Entwicklung multimerer MHC/Peptid-Komplexe zur Erhöhung der Avidität der Wechselwirkung gelöst (149). Die Multimere werden durch die Bindung rekombinanter biotinylierter MHC-Moleküle an ein fluoreszenzmarkiertes Streptavidin, das ein Tetramer mit vier Bindungsstellen für Biotin ist, hergestellt (Abb. 41). Eine Weiterentwicklung sind die sogenannten Streptamere, die nach der Messung im Durchflusszytometer durch Zugabe von Biotin monomerisiert werden und so wieder von T-Zellen ablösbar sind, was eine Überstimulation der T-Zellen verhindern soll (150).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Tetramer- als auch Streptamerfärbungen durchgeführt.

Zur Tetramerfärbung wurden je 5×10^5 zuvor mit FACS-Puffer gewaschene T-Zellen mit dem relevanten bzw. einem irrelevanten Phycoerythrin(PE)-markierten MHC:Peptid-Tetramer im Verhältnis 1:40 in 50 µl FACS-Puffer 45 min in einer 96-Loch-Rundbodenplatte auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde anti-CD8-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) im Verhältnis

1:100 zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis, wurden die Zellen dreimal in FACS-Puffer gewaschen und dann in 500 μl FACS-Puffer plus 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumjodid resuspendiert. Die Färbung mit dem rotfluoreszierenden Propidiumjodid dient der Markierung toter Zellen, da es durch deren defekte Zellmembranen eindringen und sich in die DNA der Zellkerne einlagern kann.

Zur Streptamerfärbung wurde mindestens 45 min vor der Färbung ein Gemisch aus 1 μg MHC-HER2 (IBA GmbH, Göttingen) und 0,75 μg Streptactin-PE (4°C) pro 1×10^6 Zellen im Dunkeln hergestellt, mit FACS-Puffer auf jeweils 50 μl aufgefüllt und bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden je 50 μl des Streptamergemisches und 0,5 μl anti-CD8-FITC addiert. Im Folgenden wurde genauso wie mit den tetramergefärbten Zellen verfahren.

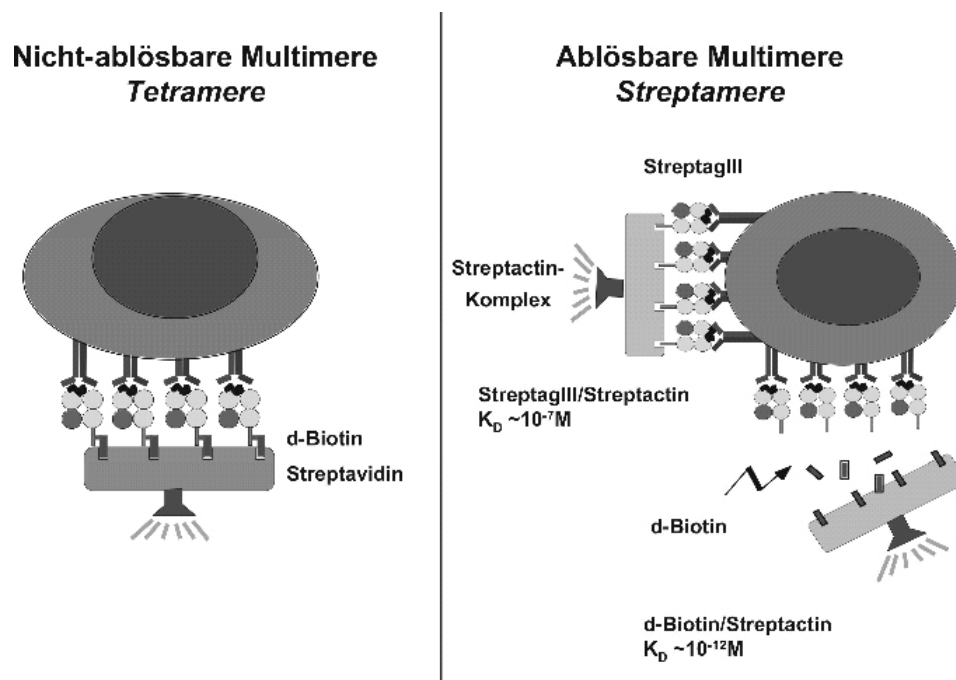


Abb. 41 Schematisierte Darstellung eines nicht-ablösbaren und eines ablösbaren MHC/Peptid-Multimers.

5.2.2.5.28 Sortierung im Durchflusszytometer

Die Färbung mit MHC:Peptid-Multimeren kann auch zur Sortierung spezifischer T-Zellen im Durchflusszytometer verwendet werden.

Die Färbung wird in diesem Fall unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Für die Kompensation wurden jeweils 1×10^5 T-Zellen in 100 μl FACS-Puffer mit anti-CD8-FITC oder dem PE-markierten MHC:Peptid-Multimer gefärbt bzw. ungefärbt belassen. Der Rest der Zellen wurde in 500 μl FACS-Puffer aufgenommen und mit 10 μl Multimer und 5 μl anti-CD8-FITC gefärbt. Zur Sortierung wurden die Kontrollzellen in 200 μl , die zu sortierenden Zellen in 1000 μl FACS-Puffer aufgenommen. Nach der Sortierung wurden die spezifischen T-Zellen in T-Zellmedium aufgenommen und kloniert. Überzählige Zellen wurden expandiert. Zellen, die mit dem MSCV-MIGR1-Vektor transduziert worden waren, wurden auf das im

Vektor kodierte eGFP sortiert.

5.2.2.5.29 TCR-V β -Analyse

Eine Möglichkeit, eine poly- oder oligoklonale von einer monoklonalen T-Zellproliferation zu unterscheiden, ist die Analyse der variablen Region ihrer β -Ketten (V β) mittels monoklonaler Antikörper im Durchflusszytometer. Es gibt 65 V β -Segmente im β -Genlocus (151), von denen jeweils nur ein einziges zufällig während der T-Zellontogenese „ausgewählt“ wird. Die Bestimmung des V β -Motivs ist also eine sehr geeignete Methode zur Untersuchung des Klonalitätsgrades.

Die TCR-V β -Analyse wurde angewendet, um den Klonalitätsgrad der mit der Methode der limitierenden Verdünnung klonierten T-Zellen zu ermitteln.

Zur Analyse wurde das IOTest[®] Beta Mark TCR V β Repertoire Kit verwendet. Das Kit deckt mit 24 verschiedenen Spezifitäten etwa 70% des normalen humanen T-Zellrepertoires ab.

Für die zu testenden T-Zellen werden jeweils 8 Röhrchen vorbereitet. In die Teströhrchen werden je $1-2 \times 10^5$ Zellen pipettiert und mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend werden $10 \mu\text{l}$ anti-CD3-PC5 und $20 \mu\text{l}$ der entsprechenden Reagenzien pro Röhrchen zu $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer addiert, die drei entweder mit FITC, PE oder FITC/PE markierte Antikörper enthalten. Nach 30 min. Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal gewaschen, in Propidiumjodid aufgenommen und gefacst.

5.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Der Nachweis sehr geringer Mengen eines bestimmten Proteins in einer Zelle ist durch eine immunologische Technik, das Western-Blotting, möglich. Dabei werden die Proteine zunächst in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und dann vom Gel auf eine Polymerschicht übertragen. Das interessierende 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.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Western-Blotting zum Nachweis von HER2-ECD in transduzierten Zellen durchgeführt, da der Nachweis im Durchflusszytometer auf Grund der Unvollständigkeit des Proteins nicht möglich war.

5.2.3.1 SDS-Gelelektrophorese

Lysis-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumorthovanadat; 20 mM NaF; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette/10 ml A.d

SDS-Probenpuffer (2-fach): 1 M Tris/HCl, pH 6,8; 200 mM DTT; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycin in A.d.

Trenngel: 5-15% Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

Sammelgel: 5% Polyacrylamid-Lösung; 12,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS in A.d.

Für die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen im elektrischen Feld sind ihre Größe, Form und elektrische Ladung verantwortlich. Die bei der SDS-PAGE eingesetzten Proteine werden zunächst hitzeinaktiviert. SDS, das ein starkes anionisches Detergenz ist, lagert sich an die denaturierten Proteine an, wodurch sie eine stark negative Ladung erhalten. Die Disulfidbrücken in den Polypeptiden werden durch Reduktionsmittel gespalten. So erreicht man, dass nur die molare Masse der Proteine für ihre Wanderung verantwortlich ist (152).

Zunächst mussten die Proteine aus den Zellen isoliert und ihr Proteingehalt bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden Zellpellets der zu untersuchenden Zellen auf Eis mit 50 µl Lyse-Puffer resuspendiert und in Eppendorfröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden gevortext und 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben 20 min bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert. Je 50 µl des Überstandes wurden mit 50 µl Ladepuffer gemischt und für 15 min bei 95°C im Thermomixer denaturiert. Anschließend wurden die Proteine für 10 min bei 16000 x g und RT zentrifugiert.

Zur Herstellung eines Polyacrylamidgels wurden mit 70 % Ethanol gereinigte Glasplatten mit einem Dichtungsgummiband zusammengesetzt und mit Klammern fixiert. 10,5 ml des flüssigen Trenngels wurden luftblasenfrei in die Gelvorrichtung gegeben und dann mit Methanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Gels wurde das Methanol abgegossen, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt. Das Gel wurde nach der Aushärtung des Sammelgels in die 1x Laufpuffer enthaltende Elektrophoresekammer eingespannt. Der Kamm wurde gezogen und die Geltaschen gespült. Dann wurden die denaturierten Proben in die Geltaschen pipettiert. Bis zum Erreichen des Trenngels wurde eine Spannung von 25 V, dann für 30 min eine Spannung von 60 V angelegt, anschließend wurde die Trennung der Proteine bei 25 V über Nacht fortgeführt.

5.2.3.1.30 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Transferpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol in A.d.

Beim Western-Blotting werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus der Gelmatrix auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF-)Membran übertragen.

Die Transfermembran wurde mit Methanol benetzt und in eine mit Transferpuffer gefüllte Schale überführt. Dann wurde das Gel möglichst luftblasenfrei auf die Membran gelegt und zwischen je zwei Lagen Whatman-Papier und einem Schwamm in eine Kassette eingespannt. Das Ganze wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer gehängt. Unter ständiger Wasserkühlung erfolgte der Transfer bei 1000 mA für 80 min.

5.2.3.1.31 Immunchemische Färbung transferierter Proteine

Blockierungs-Puffer: 10% Trockenmilchpulver (entfettet) in 1x PBS/0,1% Tween

Bei der immunchemischen Färbung werden Proteine mit spezifischem Antikörper markiert und mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Systems nachgewiesen.

Um eine Hintergrundfärbung durch unspezifische Proteinbindungsstellen zu vermeiden, wurde die Membran unmittelbar nach dem Transfer in 20 ml 1x PBS/0,1% Tween gewaschen und anschließend für 1h in Blockierungspuffer bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder kurz mit 1x PBS/0,1% Tween gespült und dann der Primäantikörper c-erbB-2/HER-2/neu Ab-20 (NeoMarkers) nach Herstellerangaben verdünnt in Blockierungspuffer addiert. Zur Bindung des ersten Antikörpers erfolgte eine mindestens zweistündige Inkubation bei RT auf einem Schüttler. Danach wurde der ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS/0,1% Tween entfernt. Der Sekundäantikörper war gegen den F_c-Teil des Primäantikörpers gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Er wurde ebenfalls in Blockierungspuffer zugegeben, woraufhin eine Inkubation von 30-60 min bei RT auf einem Schüttler folgte. Anschließend folgten zwei zehnmünütige Inkubationen mit 1x PBS/0,1% Tween und eine mit 1x PBS. Zur Detektion des Proteins wurde die Membran mit einer Chemilumineszenz-Substrat-Lösung inkubiert, deren Substrate von der Peroxidase am Sekundäantikörper in ein lumineszierendes Produkt umgewandelt wurden. Die Dokumentation des erzeugten Signals erfolgte auf Hyperfilm (Amersham, Braunschweig).

6 Literatur

1. Hewitt, H.B., Blake, E.R. and Walder, A.S. A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *Br. J. Cancer* 33, 241-59 (1976)
2. Livingston, P.O., Takeyama, H., Pollack, M.S., Houghton, A.N., Albino, A., Pinsky, C.M., Oettgen, H.F. and Old, L.J. Serological responses of melanoma patients to vaccines derived from allogeneic cultured melanoma cells. *Int J Cancer*. 31(5),567-75 (1983)
3. Knuth, A., Danowski, B., Oettgen, H.F. and Old, L.J. T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures. *PNAS* 81(11), 3511-5 (1984)
4. Rosenberg, S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380-384 (2001)
5. Yannelli, J.R. and Wroblewski, J.M. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine* 23, 97-113 (2004)
6. Call, M.E. and Wucherpfennig, K.W. The T cell receptor: Critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol*. 23, 101-25. (2005)
7. Dave, V.P., Cao, Z., Browne, C., Alarcon, B., Fernandez-Miguel, G., Lafaille, J., de la Hera, A., Tonegawa, S. and Kappes, D.J. CD3d deficiency arrests development of the ab but not the gd T cell lineage. *EMBO J*. 16, 1360-70 (1997)
8. Haks, M.C., Krimpenfort, P., Borst, J. and Kruisbeek, A.M. The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalpha and TCRgammadelta lineages. *EMBO J*. 17, 1871-82 (1998)
9. Rammensee, H.G., Friede, T. and Stevanovic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing *Immunogenetics* 41, 178-228 (1995)
10. Borowski, C., Li, X., Aifantis, I., Gounari, F. and von Boehmer, H. Pre-TCRalpha and TCRalpha are not interchangeable partners of TCRbeta during T lymphocyte development. *J.Exp.Med.*199(5), 607-15 (2004)
11. Suchin, E.J., Langmuir, P.B., Palmer, E., Sayegh, M.H., Wells, A.D. and Turka, L.A. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question.

J.Immunol. 166, 973-81 (2001)

12. Detours, V. and Perelson, A.S. The paradox of alloreactivity and self MHC restriction: quantitative analysis and statistics. PNAS. USA 97, 8479-83 (2000)

13. Gotter, J., Brors, B., Hergenbahn, M. and Kyewski, B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. J. Exp. Med. 199(2), 155-66 (2004)

14. Young, A.J. The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node in vivo. Semin. Immunol. 11, 73-83 (1999)

15. Bajénoff, M., Granjeaud, S. and Guézer, S. The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation. J.Exp.Med. 198(5), 715-724 (2003)

16. Mellman, I. and Steinman, R.M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell 106, 255-8 (2001)

17. Liu, Y.-J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. Cell 106, 259-62 (2001)

18. Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. Cell 106, 263-6 (2001)

19. Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y.-J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nature Immunology 5(12), 1219-26 (2004)

20. Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A. and Steinkasserer, A. Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. In. Arch. Allergy Immunol. 129, 113.8 . (2002)

21. Scholler, N., Hayden-Ledbetter, M., Dahlin, A., Hellström, I., Hellström, K.E. and Ledbetter, J.A.. CD83 regulates the development of cellular immunity. J. Immunol. 168, 2599-602 (2002)

22. Melief, C.J.M. Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? Eur. J. Immunol. 33, 2645-54 (2003)

23. Albert, M.L., Sauter, B. and Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature 392, 86 (1998)

24. Gallucci, S., Lolkema, M. and Matzinger, P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* 5, 1249- 55 (1999)
25. Norbury, C.C., Chambers, B.J., Prescott, A.R., Ljunggren, H.G. and Watts, C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 280-8 (1997)
26. Harshyne, L.A., Watkins, S.C., Gambotto, A. and Barratt-Boyes, S.M. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J. Immunol.* 166, 3717-23 (2001)
27. Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R. and Liu, Y.-J. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 282, 1183-6 (1999)
28. Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S. and Ikehara, S. A CD1a⁺/CD11c⁺ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J. Immunol.* 163, 1409-19 (1999)
29. Teoh, C.Y. and Davies, K.J.A. Potential roles of protein oxidation and the immunoproteasome in MHC class I antigen presentation: the 'ProXI' hypothesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 423, 88-96 (2003)
30. Rock, K.L. and Goldberg, A.L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739- 79 (1999)
31. Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 29, 10289-97 (1996)
32. Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R. and Kloetzel, P.M. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur. J. Immunol.* 26, 863-9 (1996)
33. Fruh, K., Gossen, M., Wang, K., Bujard, H., Peterson, P.A. and Yang, Y. Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J.* 13, 3236-44 (1994)
34. Belich, M.P., Glynn, R.J., Senger, G., Sheer, D. and Trowsdale, J. Proteasome compo-

- nents with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr. Biol.* 4, 769-76 (1994)
35. Eleutheri, A.M., Kohanski, R.A., Cardozo, C. and Orłowski, M. Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). *J. Biol. Chem.* 272, 11824-31 (1997)
36. Goldberg, A.L., Cascio, P., Saric, T. and Rock, K.L. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol.* 39, 147-64 (2002)
37. Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L. and Goldberg, A.L. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 20, 2357-66 (2000)
38. Rivett, A.J., Bose, S., Brooks, P. and Broadfoot, K.I. Regulation of proteasome complexes by gamma-interferon and phosphorylation. *Biochimie* 83, 366-6 (2001)
39. Heemels, M.T., Schumacher, T.N., Wonigeit, K. and Ploegh, H.L. Peptide translocation by variants of the transporter associated with antigen processing. *Science* 262, 2059-63 (1993)
40. Haurum, J.S., Bjerring Höier, I., Arsequell, G., Neisig, A., Valencia, G., Zeuthe, J., Neefjes, J. and Elliott, T. Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules in vivo. *J. Exp. Med.* 190(1), 145-50 (1999)
41. Abarca-Heidemann, K., Friederichs, S., Klamp, T., Boehm, U., Guethlein, L.A. and Ortman, B. Regulation of the expression of mouse TAP-associated glycoprotein (tapasin) by cytokines. *Immunol Lett.* 83(3), 197-207 (2002)
42. Ribas, A., Butterfield, L.H., Glaspy, J.A. and Economou, J.S. Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J. Clin. Oncol.* 21, 2415-32 (2003)
43. Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. and McGuire, W.L. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182 (1987)
44. Velu, T.J., Beguinot, T., Vass, W.C., Willingham, M.C., Merlino, G.T., Pastan, I. and Lowy, D.R. Epidermal growth factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene. *Science* 238, 1408-1410 (1987)
45. Stern, D.F. ErbBs in mammary development. *Exp. Cell Res.* 284, 89-98 (2002)

46. Lee, K.F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.-C. and Hauser, C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378, 394-8 (1995)
47. Erickson, S.L., O'Shea, K.S., Ghaboosi, N., Loverrol, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L.H. and Moorel, M.W. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development* 124, 4999-5011 (1997)
48. Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R. and Lemke, G. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378, 390-4 (1995)
49. Miettinen, P.J., Berger, J.E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R.A., Werb, Z. and Derynck, R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376, 337-41 (1995)
50. Özcelik, C., Erdmann, B., Pilz, B., Wettschreck, N., Britsch, S., Hübner, N., Chen, K.R., Birchmeier, C. and Garratt, A.N. Conditional mutation of the ErbB1 (HER1) receptor in cardiomyocytes leads to cardiomyopathy. *PNAS* 99, 1880-5 (2002)
51. Jackson-Fisher, A.J., Bellinger, G., Ramabhadran, R., Morris, J.K., Kuo-Fen Lee and Stern, D. ErbB2 is required for ductal morphogenesis of the mammary gland. *PNAS* 101, 17138-43 (2004)
52. Press, M.F., Cordon-Cardo, C and Slamon, D. Expression of HER-2/neu protooncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 5, 953-62 (1990)
53. Van de Geer, P., Hunter, T. and Lindberg, R.A. Receptor protein-kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 251-337 (1994)
54. Horan, T., Wen, J., Arakawa, T., Liu, N.L., Brankow, D., Hu, S. Ratzkin, B. and Philo, J.S. Binding of neu differentiation factor with the extracellular domain of Her2 and Her3. *J.Biol. Chem.* 270, 24604-8 (1995)
55. Burgess, A.W., Cho, H.S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W. and Yokoyama, S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell* 12, 541-52 (2003)
56. Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-25 (2000)

57. Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signaling network. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 127-37 (2001)
58. Olayioye, M., A., Neve, R.M., Lane, H.A. and Hynes, N.E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19, 3159-67 (2000)
59. DiFiore, P., Segatto, O., Taylor, W., Aaronson, S. and Pierce, J. EGF receptor and erbB2 tyrosine kinase domains confer cell specificity for mitogenic signaling. *Science* 248, 79-83 (1990)
60. Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M. and Hynes, N.E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptor, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 16, 1647-55 (1997)
61. Pinkas-Kramarsky, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B.J., Sela, M. and Yarden, Y. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* 15(10), 2452-67 (1996)
62. Karunagaran, D., Tzahar, E., Beerli, R.R., Chen, X., Graus-Porta, D., Ratzkin, B.J., Seger, R., Hynes, N.E. and Yarden, Y. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J.* 15, 254-64 (1996)
63. Beerli, R.R., Graus-Porta, D., Woods-Cook, K., Chen, X., Yarden, Y. and Hynes, N.E. Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB2. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6496-505 (1995)
64. Graus-Porta, D., Beerli, R.R. and Hynes, N.E. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1182-91 (1995)
65. Neve, R.M., Holbro, T. and Hynes, N.E. Distinct roles for phosphoinositide-3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediation cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene* 21, 4567-76 (2002)
66. Klemke, R., Cai, S., Giannini, A., Gallagher, P., de Lanerolle, P. and Cheresch, D. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell. Biol.* 137, 481-92 (1997)
67. Nguyen, D., Catling, A.D., Webb, D.J., Sankovic, M., Walker, L.A., Somlyo, A.V., Weber, M.J. and Gonias, S.L. Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote

te migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-mediated manner. *J. Cell Biol.* 146, 149-64 (1999)

68. Spencer, K.S.R., Graus-Porta, D., Leng, J., Hynes, N.E. and Klemke, R.L. ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J. Cell Biol.* 148, 385-97 (2000)

69. Citri, A., Skaria, K.B. and Yarden, Y. *Exp. Cell Res.* 284, 54-65 (2003)

70. Le, X.-F., Lammayot, A., Gold, D., Lu, Y., Mao, M.W., Chang T., Patel A., Mills G.B. and Bast, R.C.Jr. Genes affecting the cell cycle, growth, maintenance, and drug sensitivity are preferentially regulated by anti-HER2 antibody through PI3K-AKT signaling. *J.B.C* 280(3), 2092-104 (2005)

71. Woods Ignatoski, K.M., Livant, D.L., Markwart, S., Grewal, N.K. and Ethier, S.P. The role of phosphatidylinositol 3'-kinase and its downstream signals in erbB-2-mediated transformation. *Mol. Canc. Res.* 1, 551-60 (2003)

72. Loureiro, R.M.B., Maharaj, A.S.R., Dankort, D., Muller, W.J. and D'Amore, P.A. ErbB2 overexpression in mammary cells upregulates VEGF through the core promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326. 455-65 (2005)

73. Worthylake, R., Opresko, L.K. and Wiley, H.S. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and Epidermal Growth Factor Receptors. *J. Biol. Chem.* 274(13), 8865-74 (1999)

74. Disis, M.L., Calenoff, E., McLaughlin, G., Murphy, A.D., Chen, W., Groner, B., Jeschke, M., Lydon, N., McGlynn, E. and Livingston, R.B. Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res.* 54, 16-20 (1994)

75. Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T. and Ioannides, C.G. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu proto-oncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J.Exp.Med.* 181, 2109-17 (1995)

76. Zaks, T.Z. and Rosenberg, S.A. Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors. *Cancer Res.* 58, 4902-8 (1998)

77. Disis, M.L., Grabstein, K.H., Sleath, P.R. and Cheever, M.A. Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-

based vaccine. *Clin. Cancer Res.* 5, 1289-97 (1999)

78. Lustgarten, J., Theobald, M., Labadie, C., LaFace, D., Peterson, P., Disis, M.L., Cheever, M.A. and Sherman, L.A. Identification of Her-2/Neu CTL epitopes using double transgenic mice expressing HLA-A2.1 and human CD8. *Hum. Immunol.* 52, 109-18 (1997)

79. Rosenberg, S.A., Lotze M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J.T. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 313, 1485-1492 (1985)

80. Morgan, D.A., Ruscetti, F.W. and Gallo, R.G. Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal bone marrow. *Science* 193, 1007-8 (1976)

81. Yannelli, J.R. The preparation of effector cells for use in the adoptive cellular immunotherapy of cancer. *J. Immunol. Methods* 139, 1-16 (1991)

82. Rosenberg, S.A., Spiess, P. and Lafreniere, R.A. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233, 1318-21 (1986)

83. Pockaj, B.A., Sherry, R.M., Wei, J.P., Yannelli, J.R., Carter, C.S., Leitman, S.F., Carasquillo, J.A., Steinberg, S.M., Rosenberg, S.A. and Yang, J.C. Localization of 111 indium-labeled tumor infiltrating lymphocytes to tumor in patients receiving adoptive immunotherapy. Augmentation with cyclophosphamide and correlation with response. *Cancer* 73(6) 1731-7 (1994)

84. Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254 1643-7 (1991)

85. Rosenberg, S.A., Yannelli, J.R., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Weber, J.S., Parkinson, D.R., Seipp, C.A., Einhorn, J.H. and White, D.E. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J. Natl. Cancer Inst.* 86(15), 1159-66 (1994)

86. Schumacher, T.N. T-cell-receptor gene therapy. *Nat Rev Immunol.* 2(7),512-9 (2002)

87. Roskoski, R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem. Biophys. Research Communications* 319, 1-11 (2004)

88. Meyer zum Büschenfelde, C.M., Hermann, C., Schmidt, B., Peschel, C. and Bernhard,

- H. Antihuman epidermal growth factor receptor 2 (HER2) monoclonal antibody trastuzumab enhances cytolytic activity of class I-restricted HER2-specific T lymphocytes against HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.* 62(8), 2244-7. (2002)
89. Keefe, D.L. Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer* 95(7), 1592-600 (2002)
90. Dunn, G.P., Old, L.J. and Schreiber, R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329-60 (2004)
91. Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J. and Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* 74, 181-273 (2000)
92. Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J. and Schreiber, R.D. Demonstration of an interferon g-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *PNAS* 95, 7556-61 (1998)
93. Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H. and Okumura, K. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med.* 195, 161-69 (2002)
94. Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G. Dalton, W.S. and Jove, R. Constitutive activation of stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10, 105-15 (1999)
95. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. and Schreiber, R.D. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-11 (2001)
96. Herrmann, F., Lehr, H.A., Drexler, I., Sutter, G., Hengstler, J., Wollscheid, U. and Seliger, B. HER-2/neu-mediated regulation of components of the MHC class I antigen-processing pathway. *Cancer Res.* 64, 215-20 (2004)
97. Meyer zum Büschenfelde, C., Nicklisch, N., Rose-John, S., Peschel, C. and Bernhard H. Generation of tumor-reactive CTL against the tumor-associated antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells derived from CD34⁺ hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 165(7), 4133-40 (2000)
98. Meyer zum Büschenfelde, C.M., Hermann, C., Schmidt, B., Peschel, C. and Bernhard,

- H. Antihuman epidermal growth factor receptor 2 (HER2) monoclonal antibody trastuzumab enhances cytolytic activity of class I-restricted HER2-specific T lymphocytes against HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.* 62(8), 2244-7. (2002)
99. Kumar, R.K. and Penny R. Escape of tumours from immunological destruction. *Pathology* 14(2), 173-9 (1982)
100. Bernhard, H., Salazar, L., Schiffman, K., Smorlesi, A., Schmidt, B., Knutson, K.L. and Disis, M.L. Vaccination against the HER-2/neu oncogenic protein. *Endocrine-Related Cancer* 9, 33-44 (2002)
101. Yee, C., Savage, P.A., Lee, P.P., Davis, M.M. and Greenberg, P.D. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. *J Immunol.* 162(4), 2227-34 (1999)
102. Yang, S., Linette, G.P., Longerich, S. and Haluska, F.G. Antimelanoma activity of CTL generated from peripheral blood mononuclear cells after stimulation with autologous dendritic cells pulsed with melanoma gp100 peptide G209-2M is correlated to TCR avidity. *J. Immunol.* 169, 531-9 (2002)
103. Nair, S.K., Boczkowski, D., Morse, M., Cumming, R.I., Lysterly, H.K., and Gilboa, E. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat. Biotechnol.* 1998,16(4),364-9 (1998)
104. Gordon-Thomson, C., Jones J., Mason R.S. and Moore G.P. ErbB receptors mediate both migratory and proliferative activities in human melanocytes and melanoma cells. *Melanoma Res.* 15(1), 21-8 (2005)
105. Storkus, W.J., Howell, D.N., Salter, R.D., Dawson, J.R. and Cresswell, P. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J. Immunol.* 138, 1657- (1987)
106. Zemmour, J., Little, A.-M., Schendel, D.J. and Parham, P. The HLA-A,B „negative“ mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J. Immunol.* 148, 1941-48 (1992)
107. Algarra, I., Cabrera, T. and Garrido, F. The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum. Immunol.* 61, 56-73 (2000)
108. Seliger, B., Maeurer, M.J. and Ferrone, S. Antigen-processing machinery breakdown and

tumor growth. *Immunol. Today* 21, 455-64 (2000)

109. Ebner, S., Ratzinger, G., Krösbacher, B., Schmuth, M., Weiss, A., Reider, D., Kroczek, R.A., Herold, M., Heufler, C., Fritsch, P. and Romani, N. Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. *J. Immunol.* 166(1), 633-41 (2001)

110. Gately, M.K., Renzetti, L.M., Magram, J., Stern, A.S., Adorini, L., Gubler, U. and Presky, D.H. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 16, 495-521 (1998)

111. Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F.I. and Berneman, Z.N. Cancer immunotherapy using RNA-loaded dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 134, 378-384 (2003)

112. Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor plus Interleukin 4 and downregulated by Tumor Necrosis Factor α . *J. Exp. Med.* 179(4), 1109-18 (1994)

113. Jonuleit, H., Kuhn, U. Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. and Enk, A.H. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 27(12), 3135-42 (1997)

114. Felzmann, T., Huttner, K.G., Breuer, S.K., Wimmer, D., Ressmann, G., Wagner, D., Paul, P., Lehner, M., Heitger, A. and Holter, W. Semi-mature IL-12 secreting dendritic cells present exogenous antigen to trigger cytolytic immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.*, Jan 13 (2005)

115. Dauer, M., Obermaier, B., Herten, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., Schnurr, M., Endres, S. and Eigler, A. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J. Immunol.* 170(8), 4069-76. (2003)

116. Kono, K., Halapi, E., Hising, C., Petersson, M., Gerdin, E., Vanky, F. and Kiessling, R. Mechanisms of escape from CD8⁺ T-cell clones specific for the HER2/neu proto-oncogene expressed in ovarian carcinomas: related and unrelated to decreased MHC class I expression. *Int. J. Cancer* 70, 112-9 (1997)

117. Xu, S., Koski, G.K., Faries, M., Bedrosian, I., Mick, R., Maeurer, M., Cheever, M.A.,

Cohen, P.A. and Czerniecki, B.J. Rapid high efficiency sensitization of CD8⁺ T Cells to tumor antigens by dendritic cells leads to enhanced functional avidity and direct tumor recognition through an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol.* 171(5), 2251-61 (2003)

118. Gilboa, E. and Vieweg J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunological Reviews* 199, 251-63 (2004)

119. Bonehill, A., Heirman, C., Tuyaerts, S., Michiels, A., Breckpot, K., Brasseur, F., Zhang, Y., van der Bruggen, P. and Thielemans, K. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *J. Immunol.* 172, 6649-57 (2004)

120. Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L. and Wilson, I.A. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274(5285), 209-19 (1996)

121. Spencer, J.V. and Braciale, T.J. Incomplete CD8⁺ T lymphocyte differentiation as a mechanism for subdominant cytotoxic T lymphocyte responses to a viral antigen. *J. Exp. Med.* 191 (10), 1687-98 (2000)

122. Rubio-Godoy, V., Dutoit, V., Rimoldi, D., Lienard, D., Lejeune, F., Speiser, D., Guillaume, P., Cerottini, J.-C., Romero, P. and Valmori, D. Discrepancy between ELISPOT IFN- γ secretion and binding of A2/peptide multimers to TCR reveals interclonal dissociation of CTL effector function from TCR-peptide/MHC complexes half-life. *PNAS* 98, 10302-7 (2001)

123. Whelan, J.A., Dunbar, P.R., Price, D.A., Purbhoo, M.A., Lechner, F., Ogg, G.S., Griffiths, G., Phillips, R.E., Cerundolo, V. and Sewell, A.K. Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent. *J. Immunol.* 163, 4243-8(1999)

124. Drake, D.R. 3. and Braciale, T.J. Cutting edge: lipid raft integrity affects the efficiency of MHC class I tetramer binding and cell surface TCR arrangement on CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 166(12), 7009-13 . (2001)

125. Kovacs, B., Maus, M.V., Riley, J.L., Derimanov, G.S., Koretzky, G.A., June, C.H. and Finkel, T.H. Human CD8⁺ T cells do not require the polarization of lipid rafts for activation and proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23), 15006-11 (2002)

126. Rammensee, H.G. and Bevan, M.J. Evidence from in vitro studies that tolerance to self antigens is MHC-restricted. *Nature* 308, 741-4 (1984)

127. Stauss, H.J. Immunotherapy with CTLs restricted by nonself MHC. *Immunol. Today* 20, 180-3 (1999)
128. Sadovnikova, E. and Stauss, H.J. Peptide-specific cytotoxic T lymphocytes restricted by nonself major histocompatibility complex class I molecules: reagents for tumor immunotherapy. *PNAS* 93, 13114-8 (1996)
129. Alexander-Miller, M.A., Leggatt, G.R., Sarin, A. and Berzofsky, J.A. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J. Exp. Med.* 184, 485-92. (1996)
130. Lee, D.-S., Ahn, C., Ernst, B., Sprent, J. and Surh, C.D., Thymic selection by a single MHC/peptide ligand: autoreactive T cells are low-affinity cells. *Immunity* 10, 83–92. (1996)
131. Apostolopoulos, V., Yuriev, E., Ramsland, P.A., Halton, J., Osinski, C., Wenjung, L., Plebanski, M., Paulsen, H. and McKenzie, I.F.C. A glycopeptide in complex with MHC class I uses the GalNAc residue as an anchor. *PNAS* 100 (25), 15029-34 (2003)
132. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. *Immunobiology: The Immunsystem in Health & Disease*. Sixth Edition, Garland Science Publishing (2005)
133. Carlsson, B. (2005) Adoptive T cell therapy of viral infection and cancer. Ex vivo expansion of cytomegalovirus- and prostate antigen-specific T cells. *Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 15. (2005)
134. Griffin, T.A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., Van Kaer, L., Monaco, J.J. and Colbert, R.A. Immunoproteasome assembly: Cooperative incorporation of interferon γ (IFN- γ)-inducible subunits. *J.Exp.Med.* 187, 97-104 (1998)
135. Harari, P.M. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr. Relat. Cancer* 11, 689-708 (2004)
136. Stryer, L. *Biochemie*. 4. Auflage, Spektrum Adademischer Verlag Heidelberg (1999)

Danksagung

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

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

Herrn Prof. Dr. Michael Schemann für die Übernahme dieser Dissertation an die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München.

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

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Kerstin Gebhard für die hervorragende Zusammenarbeit.

Weiter möchte ich mich bei Frau Julia Neudorfer, Frau Kerstin Holtz, Frau Kathrin Hofer, Herrn Florian Scheich, Herrn Dr. Jochen Metzger, Frau Barbara Kast und Herrn Dr. Nicolas Graf für die tatkräftige Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Duyster, Licht und Decker danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima.

Meinen Eltern danke ich für die große Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich auch noch bei Sven bedanken, der mir bei allen Fragen und Problemen hilfreich zur Seite stand.

Lebenslauf

Persönliche Daten: Heinke Conrad
geboren am 16.01.1973 in Hildesheim

Anschrift: Drächslstraße 8
81541 München

Schulbildung:
1979-1983 Grundschule Ochtersum, Hildesheim

1983-1992 Gymnasium Andreanum, Hildesheim
mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Studium:
10/1992-04/1999 Studium der Biologie an der Universität Bremen

04/1995 Vordiplom

04/1999 Diplom

Wissenschaftliche Tätigkeit:
05/1999-12/1999 Werkvertrag am Institut für Ökologie und Evolutionsbiologie,
Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Bremen

12/1999-03/2001 wissenschaftliche Angestellte an der Medizinischen Klinik mit
Schwerpunkt Nephrologie und Hypertensiologie, Franz-
Volhard-Klinik, Medizinische Fakultät der Humboldt-
Universität zu Berlin Campus Berlin-Buch am Max-Delbrück-
Centrum für Molekulare Medizin

04/2001- wissenschaftliche Angestellte im Hämatologischen
Forschungslabor, III. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der
Isar, Technische Universität München