

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. St. Burdach)

**Isolierung und Charakterisierung allo-restringierter
zytotoxischer T-Zellen mit spezifischer Reaktivität gegen
HLA-A*0201-restringierte Peptidantigene der pädiatrischen
akuten lymphatischen Leukämie**

Christina Maria Selch

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. St. Burdach
2. Priv.-Doz. Dr. M. Keller
3. Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel

Die Dissertation wurde am 13.05.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Leukämie.....	1
1.1.1	Akute lymphatische Leukämie	2
1.1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.1.2	Ätiologie und Pathogenese	3
1.1.1.3	Klassifikation	4
1.1.1.4	Klinische Symptomatik.....	7
1.1.1.5	Diagnostik.....	8
1.1.1.6	Risikostratifizierung und Prognose	9
1.1.1.7	Therapie.....	10
1.1.1.7.1	Chemotherapie	10
1.1.1.7.2	Supportivtherapie	11
1.1.1.7.3	Hämatopoetische Stammzelltransplantation	11
1.2	Immuntherapie.....	13
1.2.1	Adoptive zelluläre Immuntherapie.....	13
1.2.2	Adoptive T-Zell-Therapie	14
2	Aufgabenstellung.....	17
3	Materialien und Methoden	19
3.1	Materialien.....	19
3.1.1	Herstellerliste.....	19
3.1.2	Instrumente und Geräte.....	20
3.1.3	Verbrauchsmaterial.....	21
3.1.4	Chemikalien und biologische Reagenzien	22
3.1.5	Kits	23
3.1.6	Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen.....	23
3.1.7	Zellen	24
3.1.8	ELISpot-Reagenzien.....	25

3.1.8.1	Antikörper.....	25
3.1.8.2	Platten ,Enzyme, Puffer.....	25
3.1.9	Durchflusszytometrie-Reagenzien	25
3.1.9.1	Reagenzien.....	25
3.1.9.2	Antikörper.....	25
3.1.10	Peptide	26
3.1.11	Pentamere	26
3.2	Methoden.....	27
3.2.1	<i>In silico</i> Auswahl geeigneter Peptidpitope	27
3.2.1.1	SYFPEITHI	27
3.2.1.2	The Bioinformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS).....	27
3.2.1.3	NetCTL 1.2.....	27
3.2.2	<i>In vitro</i> Erfassung der HLA-A*0201-Bindungsfähigkeit von Peptiden.....	28
3.2.3	Zellkultur	29
3.2.3.1	Zählen der Zellen	29
3.2.3.2	Zellkultur von in Suspension vorliegenden Zellen.....	29
3.2.3.3	Zellkultur adhärenter Zellen.....	30
3.2.3.4	Zellkultur primärer Zellen.....	30
3.2.3.5	Kryokonservierung von Zellen	30
3.2.3.6	Auftauen kryokonservierter Zellen	31
3.2.4	Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	31
3.2.4.1	Isolierung von PBMC aus Blutkonserven.....	31
3.2.4.2	Isolierung von PBMC aus Vollblut	32
3.2.4.3	Generierung von Pool-PBMC	32
3.2.5	Isolierung von CD14 ⁺ -Zellen	32
3.2.6	Isolierung von CD8 ⁺ -Zellen	35
3.2.7	Herstellung Dendritischer Zellen	37
3.2.8	Allogene Stimulation von CD8 ⁺ -T-Zellen mit peptidgepulsten DCs.....	40
3.2.9	Elektroporation	41

3.2.10	Durchflusszytometrie	41
3.2.11	Sortierung der Zellen mittels Pentamerfärbung.....	43
3.2.12	<i>Limiting Dilution</i> – Klonierung der T-Zellen	45
3.2.13	ELISpot.....	46
3.2.13.1	Interferon γ -ELISpot.....	47
3.2.13.2	Granzym B-ELISpot.....	48
3.2.14	Expansion spezifischer T-Zellen	49
3.2.15	V β -Analyse des T-Zell-Rezeptor Repertoires.....	49
3.2.16	Hochregulierung der HLA-Expression in Tumorzelllinien durch Interferon γ	51
4	Ergebnisse.....	52
4.1	HLA-A*0201 Peptidbindungstest.....	52
4.1.1	STK32B	53
4.1.2	LILRA2	53
4.2	Allogenes <i>in vitro Priming</i>	55
4.2.1	STK32B	55
4.2.1.1	STK32B-186-1A1	57
4.2.1.2	STK32B-186-2A10.....	59
4.2.1.3	STK32B-186-3G2.....	61
4.2.1.4	STK32B-186-2D4.....	62
4.2.1.5	STK32B-186-2E7	64
4.2.2	LILRA2	67
4.2.2.1	LILRA2-30-1G4.....	68
4.2.2.2	LILRA2-30-1H3	71
4.2.2.3	LILRA2-30-5H4	74
4.3	Charakterisierung der CTL-Oberflächenantigene.....	76
5	Diskussion	79
5.1	Auswahl geeigneter Gene.....	79
5.1.1	STK32B	79
5.1.2	LILRA2	80

5.2	Epitopauswahl und Verifizierung der Bindungsfähigkeit.....	82
5.3	Allogenes in vitro Priming	83
5.3.1	STK32B-186	84
5.3.2	LILRA2-30	86
5.3.3	Proliferation der CTL.....	87
5.3.4	Analyse des Reaktionsverhaltens im ELISpot.....	88
5.3.4.1	Klonalität der spezifischen CTL.....	89
5.3.4.2	Phänotyp der CTL.....	91
5.4	Optimierungsstrategien.....	93
5.4.1	Generierung von T _{CM} CTL.....	93
5.4.2	Gentechnische Modifikation der CTL	95
5.5	Einsatz alloreaktiver CTL bei der Therapie der ALL	96
6	Zusammenfassung	101
7	Literaturverzeichnis.....	102
8	Abbildungsverzeichnis	119
9	Tabellenverzeichnis	121

Abkürzungsverzeichnis

ACT	<i>adoptive cell transfer</i>
aHSCT	<i>allogeneic hematopoietic stem cell transplantation</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
ALL-BFM	ALL-Studie Berlin-Frankfurt-Münster
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serum Albumin
cALL	<i>common acute lymphoblastic leukemia</i>
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CF	<i>chamber factor</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CR	<i>complete remission</i>
CRP	C-reaktives Protein
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
DC	<i>dendritic cell</i>
DLI	<i>donor lymphocyte infusion</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalogramm
EFT	<i>Ewing Family of Tumors</i>
EGIL	<i>European Group for the Immunological Classification of Leukemias</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ELISpot	<i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>
ETV6	<i>Ets variant 6</i>
FAB	<i>French American British</i> (Klassifikation)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
g	Gravitationsbeschleunigung [g= 9,81 m/s ²]
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GVHD	<i>graft versus host disease</i>

GVL	<i>graft versus leukemia</i>
GVT	<i>graft versus tumor</i>
Gy	Gray
h	Stunde
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSCT	<i>hematopoietic stem cell transplantation</i>
HTLV	humanes T-lymphotropes Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVP	<i>in vitro priming</i>
KM	Knochenmark
LCL	<i>lymphoblastoid cell line</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LILRA	<i>Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A</i>
LIR	<i>leukocyte immunoglobulin-like receptor</i>
MACS	<i>Magnetic Activating Cell Sorting</i>
MART	<i>Melanoma Antigen Recognized by T cells</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
MRD	<i>minimal residual disease</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NK	<i>natural killer</i>
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PI	Propidiumiodid
RA	Relative Affinität
RNA	<i>ribonucleid acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RUNX	<i>Runt-related transcription factor</i>
Sek	Sekunde
SSC	<i>sideward scatter</i>
STK	Serin-Threonin-Kinase
T _(CM)	<i>central memory T-cell</i>
T _(EM)	<i>effector memory T-cell</i>

TAA	tumorassoziertes Antigen
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TEL	<i>translocation ets leukemia</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TSA	tumorspezifisches Antigen
U	<i>Unit</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wilms Tumor
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Leukämie

Leukämien sind bösartige Erkrankungen des blutbildenden Systems. Sie entstehen durch maligne Entartung von Vorläuferzellen der weißen Reihe im Knochenmark (Leukämie: von altgriechisch λευκός leukós „weiß“ und αἷμα haima „das Blut“). Ursächlich hierfür sind Mutationen im Genom der Zelle, die zu einer Störung ihrer Proliferation, Differenzierung oder des programmierten Zelltodes (Apoptose) führen. Die hohe Proliferationsrate und die Genumlagerungen während der Lymphozytenentwicklung begünstigen derartige Mutationen. Das ursprüngliche Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose ist zugunsten eines unkontrollierten Zellwachstums verschoben. Somit kommt es zu einer klonalen Expansion der entarteten Zelle. Dies führt zu einer Verdrängung der normalen hämatopoetischen Zellen im Knochenmark. Prinzipiell ist eine Entartung jeder Zellart an jedem Schritt ihrer Zelldifferenzierung möglich. Demzufolge unterscheidet man nach der Art der betroffenen Zellen myeloische und lymphatische Leukämien; bei myeloischen Leukämien sind Vorläuferzellen von Granulozyten und Monozyten, im weiteren Sinne auch von Erythrozyten und Thrombozyten betroffen. Bei lymphatischen Leukämien entarten Vorläuferzellen der Lymphozyten. Weiterhin lassen sich akute und chronische Leukämien unterscheiden. Akuten Leukämien liegt in der Regel eine Entartung sehr unreifer Zellen zugrunde, die hohen Teilungsraten der blastären Zellen erklären die meist fulminante klinische Symptomatik. Chronische Leukämien hingegen verlaufen über einen langen Zeitraum hinweg protrahiert, die entarteten Zellen weisen in der Regel einen höheren Differenzierungsgrad auf. Somit werden lymphatische Leukämien in die akute lymphatische Leukämie (ALL) und die chronische lymphatische Leukämie (CLL) unterteilt, wobei die CLL zu den niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen gezählt wird. Bei den myeloischen Leukämien unterscheidet man die akute myeloische Leukämie (AML) und die chronische myeloische Leukämie (CML), wobei letztere als chronisch myeloproliferative Erkrankung gewertet wird. Als Sonderformen der akuten Leukämien gelten die akute biphänotypische Leukämie, bei der es zur gleichzeitigen immunologischen Expression lymphatischer und myeloischer Differenzierungsmarker kommt, sowie die bilinäre Leukämie, bei der sich morphologisch zwei Blastenpopulationen nachweisen lassen. Da diese Arbeit sich mit der Entwicklung neuer Therapiestrategien bei der cALL, der häufigsten Subgruppe der ALL, insbesondere im pädiatrischen Spektrum beschäftigt wird nachfolgend näher hierauf eingegangen.

1.1.1 Akute lymphatische Leukämie

Das Diagnosespektrum maligner Erkrankungen bei Kindern unterscheidet sich signifikant von dem erwachsener Patienten, siehe Abbildung 1-1. Mit einem Anteil von 34,1 % sind Leukämien die vorherrschende Gruppe und somit die häufigste Krebserkrankung bei Kindern (Kaatsch 2010).

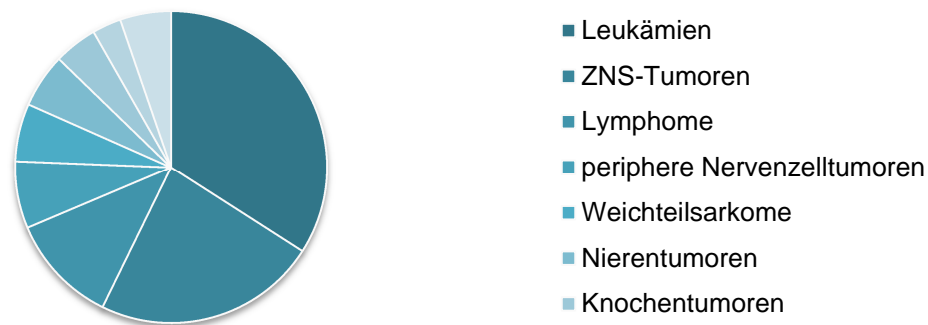


Abbildung 1-1 Verteilung der häufigsten Krebsdiagnosen bei Kindern ermittelt aus den Jahren 2001 – 2010 (nach: "Krebs in Deutschland")

Der größte Anteil hiervon entfällt mit einer relativen Häufigkeit von 78,8 % auf die akute lymphatische Leukämie, 13,7 % sind der AML, 1,3 % der CML und 5,5 % anderen myelodysplastischen Syndromen und myeloproliferativen Erkrankungen zuzurechnen. Bei der ALL wird weiterhin je nach betroffener Zellart zwischen B-Zell- und T-Zell-Formen unterschieden. Bei der häufigeren B-Zell-Leukämie ist die häufigste Untergruppe die *common ALL* (cALL).

1.1.1.1 Epidemiologie

Die ALL ist mit einer Häufigkeit von 26,6 % die häufigste Einzeldiagnose bei malignen Erkrankungen im Alter < 15 Jahren. Ihre Inzidenz beträgt 4,4 / 100.000 Kinder unter 15 Jahren (Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) 2012). Die Häufigkeit der ALL ist bei den unter Vierjährigen mehr als doppelt so hoch wie in den anderen Altersgruppen; das durchschnittliche Erkrankungsalter bei Erstdiagnose liegt bei 4 Jahren und 10 Monaten. Das Geschlechterverhältnis m : w beträgt 1,2 : 1. Bis zum Jahr 2004 lässt sich ein Anstieg der Inzidenz der ALL in Deutschland um etwa 0,7 % pro Jahr verzeichnen, eine ähnliche Situation findet sich in ganz Europa. Die Ursachen hierfür sind unklar, möglicherweise liegt dem Phänomen ein Wandel im Lebensstil zugrunde (Spix et al. 2008; Kaatsch und Mergenthaler 2008; Kaatsch et al. 2006). Die Inzidenz der Leukämien zeigt geographische Unterschiede; die Inzidenzrate liegt in Nordeuropa höher als in Süd- und Osteuropa (Kaatsch und Mergenthaler 2008), auf Deutschland bezogen ließ sich jedoch keine regionale oder

zeitliche Clusterbildung der Leukämieinzidenz feststellen (Schmiedel et al. 2010). Die Überlebensrate der ALL liegt bei 90 % nach 5 Jahren und bei 87 % nach 15 Jahren. Bei 3 % der Patienten kommt es zu einem Auftreten einer Zweitneoplasie innerhalb von 30 Jahren nach Erstdiagnose einer ALL (Kaatsch und Spix 2010). Die Häufigkeit der AML im Kindesalter beträgt 4,6 %, das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose liegt bei 5 Jahren und 5 Monaten und somit höher als bei der ALL, die meisten Fälle werden jedoch vor dem 2. Lebensjahr diagnostiziert. Die Überlebensraten bei der AML liegen bei 70 % nach 5 Jahren und bei 67 % nach 15 Jahren; sie sind somit signifikant niedriger als bei der ALL. Das Auftreten einer CML im Kindesalter ist sehr selten (0,4 %), die CLL kommt bei Kindern nicht vor (Kaatsch 2010).

1.1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Grundlage für die Entstehung einer ALL sind Mutationen im Genom der betroffenen Zelle; diese können bereits pränatal in pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen vorliegen oder als somatische Mutationen lymphoider Vorläuferzellen auftreten. Diese genetischen Veränderungen beeinflussen vor allem Differenzierung, Tumorsuppression, Zellzyklus, Apoptose, Signalwege und das Ansprechen auf Medikamente der jeweiligen Zelle (Pui et al. 2011). Oftmals sind hierfür mehrere ineinandergreifende Mutationen, sogenannte „*cooperative mutations*“, notwendig um eine leukämische Transformation der lymphoiden Vorläuferzelle zu bewirken; die mutierten Vorläuferzellen werden in einem bestimmten Differenzierungsschritt als unreife Vorstufen arretiert, andere Mutationen setzen grundlegende Regulationsvorgänge außer Kraft, die Kontrollpunkte der normalen Proliferation werden unterwandert und die Zelle zeigt eine Resistenz auf Signalwege des programmierten Zelltodes. Die Veränderungen entstehen durch aberrante Expression von Protoonkogenen, Fusionsgenen mit aktivierten Kinasen, veränderten Transkriptionsfaktoren, Hyperploidie, Hypoploidie und andere Mechanismen, die durch eine Beeinflussung der Zellfunktionen zur leukämischen Transformation der Zelle führen (Pui et al. 2004). Ursächlich hierfür sind strukturelle DNA-Veränderungen wie Deletionen, Amplifikationen, Inversionen, Translokationen und Duplikationen, aber auch Hyperploidien, der Verlust der Heterozygotie sowie epigenetische Veränderungen (Pui et al. 2011). Anhand der beim Patienten feststellbaren individuellen Mutationen ergeben sich neue Möglichkeiten der Klassifikation der ALL; dies ist insbesondere von Bedeutung da viele dieser Mutationen auch Konsequenzen für Therapie, Therapieansprechen und Prognose haben.

Die Ursachen für das Entstehen einer Leukämie sind noch nicht hinreichend geklärt. In einigen Fällen besteht eine genetische Prädisposition (Vijaykrishnan und Houlston 2010), auch bei einigen genetischen Syndromen besteht ein erhöhtes Leukämierisiko.

Beispielsweise ist das Risiko für die Entwicklung einer Leukämie bei Patienten mit Trisomie-21 20-fach erhöht (Ross et al. 2005), auch bei Klinefelter-Syndrom, Neurofibromatose Typ I, Fanconi-Anämie oder Bloom's-Syndrom besteht ein erhöhtes Erkrankungsrisiko. Knochenmarkschädigungen durch Benzol, Zytostatika (insbesondere Alkylanzien oder Topoisomerase-II-Inhibitoren) oder ionisierende Strahlung sind als Risikofaktoren bekannt. Der Kausalzusammenhang einer Infektion mit dem humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1), welches endemisch vor allem in SüdJapan, der Karibik, Teilen Südamerikas und Afrikas mit der Entwicklung einer T-Zell-Leukämie assoziiert vorkommt, ist gesichert (Gessain 2011). Die Ermittlung weiterer Risikofaktoren ist derzeit Gegenstand aktueller Forschung. Als mögliche prädisponierende Umweltfaktoren stehen beispielsweise Verkehrsabgase, Pestizide und verschiedene Chemikalien in der Diskussion (Wiemels 2012). Ein weiterer Ansatz betont die Relevanz frühkindlicher Infektionen im Zusammenhang mit der Entwicklung des Immunsystems. Aktuelle Daten zeigen zum einen eine inverse Korrelation der Häufigkeit des Auftretens einer Leukämie und einer höheren Exposition gegenüber Infektionen in der frühen Kindheit, zum anderen scheint es kongenitale Defekte des Immunsystems zu geben, bei denen es zu einer überhöhten Immunantwort auf Infektionen kommt; diese Immunregulationsdefekte sind mit niedrigeren kongenitalen IL-10 (Interleukin 10)-Werten korreliert. Die Kombination aus geringer Exposition gegenüber Infekten und überhöhter Immunreaktion auf die wenigen Infekte scheint als „*second strike*“ vorbestehender Genommutationen zu fungieren und somit ein erhöhtes Erkrankungsrisiko an Leukämie zu bedingen (Wiemels 2012).

1.1.1.3 Klassifikation

Die WHO-Klassifikation von 2001 teilt die ALL in B- und T-Zell-ALL ein, wobei bei der B-Zell-ALL die Untergruppen der Pro-B-ALL, *common* ALL, Prä-B-ALL und reifzelligen B-ALL unterschieden werden. Die T-Zell-ALL wird weiter in unreife, thymische und reife T-ALL differenziert. Während die traditionelle, auf morphologischen Gesichtspunkten beruhende FAB-Klassifikation, wonach die ALL in die Gruppen L1, L2 und L3 eingeteilt wird (Bennett et al. 1976), noch in Lehrbüchern vertreten ist, ist ihre klinische Relevanz mittlerweile gering. Neuere Methoden der Immunologie, Zytogenetik und Molekulargenetik erlauben eine differenziertere Unterteilung mit prognostischen und therapeutischen Konsequenzen. Eine dieser Methoden ist die Immunphänotypisierung, bei der die Oberflächenmarker der Leukämiezellen analysiert werden. Da es keine spezifischen Einzelmarker für bestimmte Differenzierungsstufen gibt, gibt erst eine Kombination verschiedener CD (*cluster of differentiation*)-Antigene Aufschluss über den jeweiligen Subtyp, siehe Tabelle 1-1, Seite 5. Zur Klassifikation wird hierzu vor allem das EGIL-Schema verwendet (Bene et al. 1995).

Tabelle 1-1 Oberflächenmarker und Zytogenetik der ALL-Subtypen
 Nach Ritter et al., Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, S. 650f.)

Leukämie	Subtyp	Häufigkeit bei Erwachsenen	Oberflächenmarker (Auswahl)	Zytogenetik / Molekulargenetik
B-ALL	Pro-B-ALL	11 %	CD19, (±CD20), ±CD34, cytCD79a, cytCD22, TdT	t(4;11), t(11;19)
	Common ALL	49 %	CD10, CD19, ±CD20, ±CD34, cytCD79a, cytCD22, ±TdT	t(9;22), t(12;21), hyperploid
	Prä-B-ALL	12 %	±CD10, CD19, ±CD20, ±CD34, cytCD22, cytCD79a, cytlgM, ±TdT	t(1;19)
	Reife B-ALL	4 %	±CD10, CD19, CD20, cytCD22, cytCD79a, cytlgM, slg	t(8;14), t(8;22), t(2;8)
T-ALL	Unreife T-ALL	6 %	cytCD3, CD7, ±CD2, ±CD5, ±CD4, ±CD8, ±CD34, TdT	t(14;11), t(10;14), t(8;14), t(1;14)
	intermediäre T-ALL	12 %	CD1a, CD2, CD7	
	reife T-ALL	6 %	Membran CD3, CD1a-	

Zytogenetische Untersuchungen von Chromosomenaberrationen bei Leukämiepatienten mittels RT-PCR oder In-situ-Fluoreszenzhybridisierung (FISH) sind eine weitere Methode der Klassifikation der ALL und spielen auch bei der Zuordnung zu Risiko- und Therapiegruppen eine Rolle. Strukturelle und numerische Genveränderungen sind bei der ALL häufig und zum Teil spezifisch für bestimmte ALL-Subtypen. Die Mechanismen, wodurch diese Genveränderungen eine Leukämieerkrankung bedingen, sind vom Prinzip her im gesamten Patientenkollektiv identisch, das Spektrum der spezifischen Mutationen jedoch unterscheidet sich bei erwachsenen Leukämiepatienten und betroffenen Kindern. Beispiele für häufige zytogenetische Veränderungen bei ALL-Patienten im Kindesalter zeigt Abbildung 1-2, Seite 6.

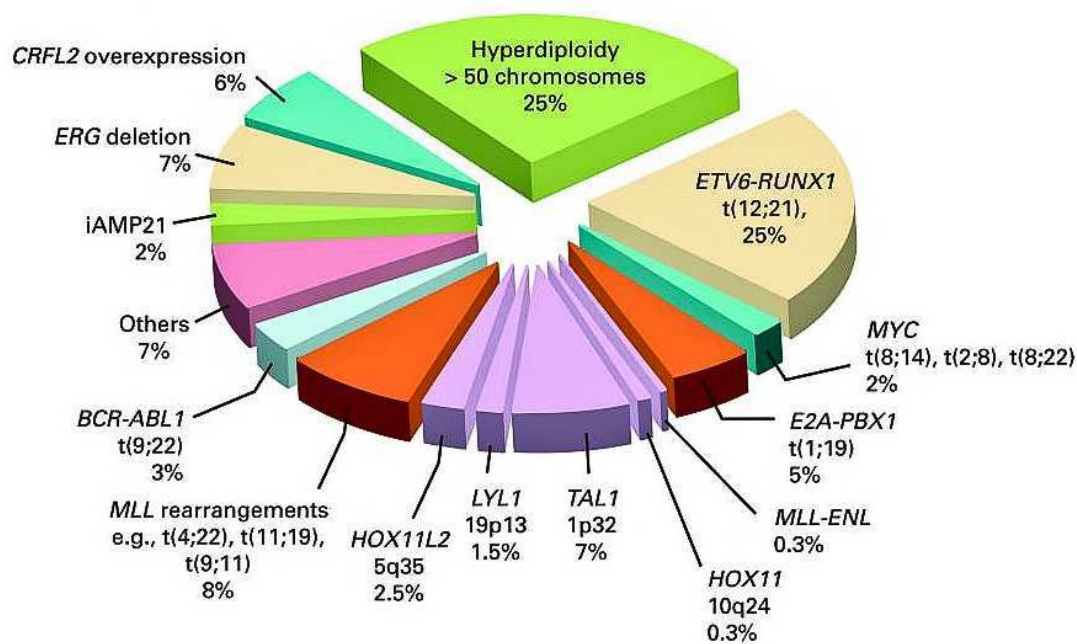


Abbildung 1-2 Genetische Abnormalitäten bei ALL im Kindesalter (nach: Pui et al., 2011)

Die häufigsten chromosomalen Veränderungen bei cALL im Kindesalter sind hyperdiploide Karyotypen, $t(12;21)(p13;q22)$ Translokationen und die $t(9;22)(q34;q11)$ BCR-abl-Translokation (Harrison et al. 2005; Gardner et al. 2006). Hyperploidie (54 - 58 Chromosomen) geht mit einer guten Prognose einher, insbesondere in Kombination mit Trisomien der Chromosomen 4, 10 oder 17 (Harris et al. 1992; Heerema et al. 2000). Im Gegensatz dazu gilt eine extreme Hyperploidie (59 - 84 Chromosomen) oder eine Hypoploidie als ungünstiger Prognosefaktor (Raimondi et al. 2003). Die Translokation $t(12;21)$ kommt bei mindestens 25 % der kindlichen cALL-Fälle vor, sie tritt im Stadium der frühen Stamm- oder Progenitorzellen der B-Reihe zu einem meist pränatal liegenden Zeitpunkt auf (Zelent et al. 2004). Die Translokation verbindet unter der Bildung eines Fusionsproteins das ETV6 (Synonym: TEL) Gen mit dem RUNX1 (Synonym: AML1) Gen (Golub et al. 1995). Das Fusionsprotein inhibiert die Transaktivationsfunktion von RUNX1, mit der RUNX1 normalerweise die Genexpression seiner Zielgene erhöhen kann. Da das ETV6 / RUNX1-Fusionsgen in B-Progenitorzellen bei etwa 1 % aller Feten nachgewiesen werden kann (Mori et al. 2002), sich daraus aber nur in etwa 1 % der betroffenen Fälle eine ALL entwickelt wird davon ausgegangen, dass die Effekte von ETV6 / RUNX1 eine präleukämische Transformation der Zellen induzieren, jedoch weitere *cooperative mutations* für die Konversion in eine ALL notwendig sind (Ford et al. 2009; Zelent et al. 2004). Das Vorliegen der $t(12;21)$ Translokation geht für gewöhnlich mit einer guten Prognose einher (Moorman et al. 2010).

1.1.1.4 *Klinische Symptomatik*

Die ALL im Kindesalter zeichnet sich meist durch eine nur sehr kurze Krankheitsanamnese von wenigen Tagen bis Wochen aus; die klinische Symptomatik beginnt oft akut. In einigen Fällen geht der Diagnose eine längere Phase von Allgemeinsymptomen voraus. Die meisten Frühsymptome der ALL sind nicht spezifisch, es gibt keine Möglichkeit der Früherkennung oder spezifische Einzelsymptome, die eine sichere Diagnose ermöglichen. Mögliche Frühsymptome sind anhaltendes Fieber, Anämie, Blutungen, Lymphadenopathie oder Knochenschmerzen. Ein Persistieren dieser oder ähnlicher Symptome kann ein Hinweis auf eine maligne Erkrankung sein und gibt Anlass zu weiterführender Diagnostik. Die Verdrängung der normalen hämatopoetischen Zellpopulation durch die leukämischen Zellen kann zu einer insuffizienten Hämatopoese oder Thrombopoese mit daraus resultierender Anämie oder Thrombopenie führen. Klinisch äußert sich eine Anämie beispielsweise in Blässe, Leistungsknick, Müdigkeit oder Atemnot; eine Thrombopenie kann durch petechiale Hautblutungen, Hämatome, eine Verlängerung der Blutungszeit oder vermehrtes Zahnfleisch- oder Nasenbluten in Erscheinung treten. Der Mangel an funktionstüchtigen Leukozyten und Granulozyten kann ein gehäuftes Auftreten fiebriger Infekte, Schleimhautentzündungen oder Pilzinfektionen bedingen. Insbesondere bei extramedullärer Ausbreitung der ALL ist eine Lymphadenopathie möglich. Tumorbedingte Lymphknotenschwellungen sind im Vergleich zu infektionsassoziierten Lymphadenopathien häufiger einseitig, von derber Konsistenz, schlecht verschieblich und indolent. Bei ausgeprägten, progressiven oder persistierenden Lymphadenopathien ist eine weiterführende Abklärung indiziert. Weiterhin kann sich eine ALL durch muskuloskeletale Beschwerden, beispielsweise Schmerzen in Muskeln, Gelenken und Knochen manifestieren. Knochenschmerzen bei ALL können durch aseptische Knochennekrosen oder einem Befall des Periosts verursacht werden (Sinigaglia et al.; Körholz et al. 2008). Bei kleinen Kindern kann sich dies in Hinken oder dem Unwillen, betroffene Extremitäten zu belasten, äußern. Bei Befall des ZNS kann es zu neurologischen Symptomen wie Kopfschmerzen, morgendlichem Nüchternbrechen, Sehstörungen, Hirnnervenausfällen und anderen Hirndruckzeichen kommen (Bleyer 1988). Insbesondere bei älteren Jugendlichen mit T-ALL können Mediastinaltumoren auftreten, welche eine obere Einflusstauung, Pleuraergüsse und Atemnot verursachen können. Weitere Symptome sind schmerzlose Hodenschwellungen bei Hodenbefall, Pleura- und Perikardergüsse, Hepato- und Splenomegalie; selten treten Haut- und Organinfiltrationen, Gingivahyperplasie, Niereninsuffizienz oder das Mikulicz-Syndrom auf.

Als nicht-maligne Differentialdiagnosen müssen unter anderem eine juvenile rheumatoide Arthritis, Osteomyelitis, infektiöse Mononukleose oder andere hämatologische Erkrankungen wie die aplastische Anämie, das myelodysplastische Syndrom oder die idiopathische Thrombozytopenie ausgeschlossen werden.

1.1.1.5 Diagnostik

Die Diagnostik der ALL gliedert sich in klinische und spezielle Leukämiediagnostik. Die Anamnese gibt Aufschluss über Art, Ausmaß und Dauer eventuell bestehender Symptome. Ein kompletter klinischer Status des Patienten wird erhoben um die Ausbreitung der Erkrankung und den akuten Gesundheitszustand des Patienten abzuschätzen. Besonderes Augenmerk ist hierbei auf Infektzeichen, Blutungszeichen, Organgrößen (Hepatomegalie, Splenomegalie, Hodengröße), Lymphknoten, Knochen, Gelenke und den neurologischen Status zu legen. Apparative Untersuchungen wie z.B. Sonografie von Hals, Mediastinum, Abdomen, Nieren und Lymphknoten, Röntgen-Thorax in 2 Ebenen, kraniales MRT (Magnetresonanztomographie), Echokardiographie, EKG (Elektrokardiogramm) und EEG (Elektroenzephalogramm) dienen dem Erkennen der Ausbreitung der Leukämie und dokumentieren Organfunktionen, was im Hinblick auf nachfolgende potenziell toxische Therapien von Relevanz ist. Laborchemisch sollte ein komplettes Blutbild mit Differentialblutbild, Gerinnungsparametern, Blutgruppe und ggf. HLA-Typisierung angefertigt werden. Zudem sind Funktionswerte von Leber und Niere, Harnsäure, Elektrolyte, CRP (C-reaktives Protein) bzw. Entzündungsparameter, Transaminasen und LDH (Laktatdehydrogenase) zu bestimmen. Die spezielle initiale Leukämiediagnostik beinhaltet Zytologie, Zytochemie, Immunphänotypisierung und Molekulargenetik und ist entsprechend aktueller Leitlinien (Schrappe und Creutzig 2008) an speziellen Referenzzentren durchzuführen. Neben Blutabnahme und Knochenmarkspunktion ist auch eine Liquorpunktion zum Ausschluss eines ZNS-Befalls durchzuführen. Zytologisch wird der Anteil der Blasten im Knochenmark bestimmt, der bei der ALL definitionsgemäß > 25 % liegt; hierdurch ergibt sich auch die Abgrenzung zum Non-Hodgkin-Lymphom. Im Zweifelsfall kann eine Abgrenzung zur AML zytochemisch erfolgen (ALL: POX negativ, PAS / saure Phosphatase positiv). Die immunphänotypische Differenzierung erfolgt anhand des Expressionsmusters der Oberflächenantigene. Beispiele für typische Antigenmuster der verschiedenen ALL-Subtypen zeigt Tabelle 1-1, Seite 5. Zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen, beispielsweise mittels PCR oder FISH, sind für die weitere Therapie und die prognostische Beurteilung, aber auch zur Überwachung des Therapieansprechens und zum Nachweis einer minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) von großer Bedeutung.

1.1.1.6 Risikostratifizierung und Prognose

Die Überlebensraten von ALL-Patienten im Kindesalter haben sich seit den achtziger Jahren dramatisch verbessert (Gatta et al. 2005). Die Daten der ALL-BFM-Studienreihen zeigen ein Ansteigen der 10-Jahres-Überlebensraten von 77 % während der ALL-BFM-81-Studie auf 85 % im Zeitrahmen der ALL-BFM-95-Studie (Moricke et al. 2010). Das deutsche Kinderkrebsregister beziffert die aktuellen Überlebensraten bei ALL auf 90 % nach 5 Jahren, 88 % nach 10 Jahren und 87 % nach 15 Jahren. Dies ist vor allem auf die Entwicklung risikoadaptierter Therapieverfahren zurückzuführen. Aktuell werden 99,7 % der ALL-Patienten in Deutschland im Rahmen klinischer Studien behandelt (Kaatsch und Spix 2010). Die individuelle Risikostratifizierung der Patienten ist von immenser Bedeutung, um ein optimales Therapieschema zur Erreichung eines rezidivfreien Überlebens bei gleichzeitiger Minimierung der Risiken einer akuten oder langfristigen Toxizität bei bestmöglicher Lebensqualität für den Patienten entwickeln zu können. Zu den ausschlaggebenden Faktoren bei der Risikostratifizierung zählen das Alter des Patienten, die initiale Leukozytenzahl, das initiale Therapieansprechen, der immunologische ALL-Subtyp sowie molekulargenetische und zytogenetische Veränderungen. Weiterhin gilt der Nachweis einer minimalen Resterkrankung (MRD) mittlerweile als wichtiger Prognoseparameter (Campana 2009). Die MRD bezeichnet das Persistieren oder Wiederauftreten von leukämischen Zellen im Körper des Patienten, auch wenn dieser sich morphologisch, also ausgehend von der mikroskopischen Beurteilung des Knochenmarks und des Blutausstrichs, in einer Vollremission befindet. Durch die geringe Anzahl der vorhandenen Leukämiezellen lässt sich der Anteil leukämischer Zellen in der Menge gesunder Zellen nicht morphologisch, sondern nur mit speziellen molekularbiologischen Methoden bis zu einer Sensitivität von 1 : 100.000 bis 1 : 1.000.000 erfassen. Die Prognose des Patienten kann somit anhand der genannten Faktoren beurteilt werden, siehe Tabelle 1-2, Seite 10.

Tabelle 1-2 Prognosefaktoren der ALL
 Nach: AWMF Leitlinien 2008

Faktor	günstige Prognose	ungünstige Prognose
Leukozyten	< 20.000 / μ l	> 100.000 / μ l
Alter	1 – 5 (9) Jahre	< 1 Jahr; \geq 10 (> 14) Jahre
Ansprechen nach 7d Prednison Vortherapie (+ MTX intrathekal)	< 1000 Blasten / μ l	\geq 1000 Blasten / μ l
Ansprechen auf initiale Induktionstherapie (Dauer: 4 – 5 Wochen)	< 5 % Blasten (M1) im KM	\geq 5 - < 25 % Blasten (M2); \geq 25 % Blasten (M3) im KM
Nachweis von MRD	negativ nach 5 Wochen	positiv ($\geq 10^{-3}$) nach 12 Wochen
Chromosomenzahl	> 40	< 46
DNA – Index	$\geq 1,16$	< 1,0
Translokationen / Fusionsgene	t(12;21) / ETV6 –RUNX1	t(9;22) / BCR-ABL; t(4;11) / MLL-AF4
Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens nach 5 Jahren	0,80	abh. von Konstellation zwischen 0,10 und 0,60

1.1.1.7 Therapie

1.1.1.7.1 Chemotherapie

Nahezu alle Patienten mit ALL im Kindesalter werden nach standardisierten Therapieschemata im Rahmen klinischer Studien behandelt. Gemeinsam ist allen Schemata die Anwendung von Medikamentenkombinationen und die Unterteilung der Therapie in mehrere Phasen (Induktionsphase, Konsolidierungsphase, Reintensivierung und Erhaltungstherapie), wobei die Therapiedauer durchschnittlich 2 - 3 Jahre beträgt. Die Induktionsphase dauert etwa 4 Wochen und hat die Erreichung einer kompletten Remission (CR, *complete remission*) zum Ziel. Diese ist definiert als ein Anteil von < 5 % Blasten an der Gesamtzahl aller nicht-erythrozytärer Zellen im Knochenmark. Zum Einsatz kommen unter anderem Kortikosteroide, L-Asparaginase, Anthrazykline und Vincristin. Bei Patienten mit vorhandener t(9;22)-Translokation verbessert der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren während der Induktionsphase die Prognose (Schultz et al. 2009). Die Geschwindigkeit des Therapieansprechens und das Vorhandensein einer MRD während der Induktionsphase sind prognostische Indikatoren für das *Outcome* des Patienten (Sutton et al. 2009; Schrappe et al. 2000). Die anschließende Konsolidierungstherapie soll insbesondere Extrakompartimente wie Hoden oder ZNS erreichen, vor allem um ZNS-Rezidive (Meningeosis leucaemica) zu verhindern. Die früher übliche präventive ZNS-Bestrahlung wurde aufgrund von toxischen Langzeitschäden (Langer et al. 2002; von der Weid 2001) mittlerweile für fast alle

Risikogruppen durch intrathekale und systemische Methotrexatgaben ersetzt, ohne dass sich hierdurch eine Verschlechterung des *Outcomes* ergeben hat (Pui et al. 2009; Clarke et al. 2003). Im Anschluss an die Konsolidierungsphase erfolgt die Phase der Reintensivierung, in der unter anderem Dexamethason, L-Asparaginase, Doxorubicin, Vincristin, Cytarabin, Cyclophosphamid und Thioguanin eingesetzt werden (Schrappe und Creutzig 2008). Die Reintensivierungstherapie begründet sich darauf, dass es trotz dem Erreichen einer histologischen CR zum Verbleib weniger leukämischer Zellen im Knochenmark im Sinne einer MRD kommen kann. Die risikoadaptierte Reintensivierung soll die eventuell verbliebene Tumorlast reduzieren, die Entstehung eines Rezidivs verhindern und der Resistenzbildung persistierender Tumorzellen entgegenwirken. Den Abschluss des Chemotherapieregimes bildet die Erhaltungstherapie, die mindestens bis zum Ablauf von 2 Jahren nach Diagnosestellung fortgeführt wird. Hierfür kommen Mercaptopurin oder Thioguanin sowie Methotrexat zum Einsatz.

1.1.1.7.2 Supportivtherapie

Neben der spezifischen Leukämietherapie kommt auch der Supportivtherapie eine große Bedeutung zu. Sie zielt vor allem auf die risikoadaptierte Prävention therapiebezogener Komplikationen, aber auch auf die Verbesserung des Wohlbefindens des Patienten hin. Beispiele für supportive therapeutische Maßnahmen sind Substitution von Blutbestandteilen, Prophylaxe und Bekämpfung von Infektionen, Ausgleich metabolischer Störungen sowie Bekämpfung von Schmerzen und Übelkeit.

1.1.1.7.3 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Bei Patienten mit ungünstiger Prognose, hohem Risikoprofil oder erhöhtem Rückfallrisiko stellt die allogene Knochenmark- bzw. Blutstammzelltransplantation (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) HLA-identischer Geschwisterspender, eines gut passenden verwandten oder unverwandten Spenders (*matched donor*) oder eines haploidentischen Spenders eine potenziell kurative Therapieoption dar. Sie ermöglicht den Ersatz des maligne transformierten lymphohämatopoetischen Systems durch ein gesundes Spendersystem und erlaubt den Einsatz toxischer Therapien, zusätzlich bietet das neue Immunsystem des Spenders einen antileukämischen Effekt auf im Körper des Empfängers verbliebene Tumorzellen (*graft versus leukemia reaction*, GVL). Die Indikationen für eine HSCT variieren je nach Einschlusskriterien der jeweiligen Studienprotokolle; die AWMF-Leitlinien definieren unter anderem folgende Qualifikationskriterien: Translokation t(9;22) / BCR-ABL, Translokation t(4;11) / MLL-AF4, ≥ 5 % Blasten im Knochenmark nach 4–5 Wochen Induktionstherapie, schlechtes frühes Therapieansprechen (≥ 1000 Blasten im Blut an Tag 8 + Leukozyten > 100.000 oder > 25 % Blasten im KM an Tag 15 oder immunologische T-ALL

oder pro-B-ALL) (Schrappe und Creutzig 2008). Die HSCT wird Anschluss an eine strahlen- oder medikamenteninduzierte immunsuppressive und meist myeloablative Konditionierung durchgeführt. Der Nachweis einer MRD vor geplanter Transplantation hat sich als wichtiger prädiktiver Faktor für Rezidive nach allogener Stammzelltransplantation bei ALL herausgestellt (Bader et al. 2009). Die Anzahl der durchgeführten Stammzelltransplantationen ist in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen (Gratwohl et al. 2003), dennoch bleibt die HSCT bei Kindern mit ALL derzeit eine seltene, Hochrisiko- oder Rezidivfällen vorbehaltene Therapieoption, was zum einen an den guten Ansprechraten auf konventionelle Therapieverfahren, zum anderen an den Komplikationen der HSCT liegt. Eine der häufigsten Komplikationen der HSCT ist die akute und chronische Transplantat gegen Empfänger-Reaktion (*Graft versus host disease*, GVHD), die entsteht, wenn immunkompetente Zellen (v.a. T-Zellen) eines genetisch nicht-identischen Spenders in einen immundefizienten Empfängerorganismus eingebracht werden. Je unterschiedlicher die HLA-Merkmale von Spender und Empfänger, desto größer das Risiko für das Auftreten und desto höher das Ausmaß dieser Reaktion. Betroffen sind vor allem Haut, Darm und Leber. In selteneren Fällen kann es auch zu Empfänger gegen Transplantat-Reaktionen (*Host versus graft*-Reaktion) kommen, wenn ausreichend Empfängerzellen trotz Konditionierung überleben, welche die Spenderzellen als fremd erkennen und folglich angreifen. Auch die Toxizität der Konditionierungsbehandlung darf nicht außer Acht gelassen werden. Zudem besteht in der Zeit während und nach der Transplantation ein erhöhtes Infektionsrisiko. Spätschäden, die vor allem mit Langzeitfolgen des Konditionierungsverfahrens sowie mit Folgen einer chronischen GVHD in Zusammenhang stehen (Ratanatharathorn et al. 2001), beinhalten unter anderem endokrine Störungen (Shalet und Brennan 2002) und das Risiko für Zweitmalignome. Andererseits haben klinische Studien ergeben, dass Patienten, die eine GVHD entwickeln, ein geringeres Risiko für Rezidive aufweisen und dass Infusionen von Spenderlymphozyten dauerhafte Remissionen bei Patienten mit Rezidiv nach HSCT induzieren können. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass ein GVL-Effekt nach allogener HSCT auftritt und dieser wie die GVHD eine alloreaktive Reaktion darstellt (Petersen 2007). Somit stellt die HLA-Typisierung und die dadurch erfolgende Angleichung von Spender und Empfänger im Rahmen der allogenen HSCT einen Balanceakt zwischen GVHD und GVL dar, wobei die besten Resultate bei einem geringen HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger zu erwarten sind (Felix und Allen 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Überlebensraten von Patienten mit ALL im Kindesalter erfreulich verbessert haben und derzeit über 80 % dieser Patienten dauerhaft geheilt werden können. Allerdings haben Kinder mit ungünstigem Risikoprofil nach wie vor

ein schlechtes *Outcome*. Insbesondere diese Patienten bedürfen auch eines intensiveren Therapieregimes, welches wiederum die Gefahr von akuten und chronischen Nebenwirkungen erhöht. In Anbetracht des jungen Lebensalters der pädiatrischen ALL-Patienten ist die Bedeutung therapieassoziiierter Spätschäden, die beispielsweise als kognitive Entwicklungsstörungen (Harila et al. 2009), Wachstumsstörungen (Chow et al. 2007a), Zweitmalignome (Maule et al. 2007), Übergewicht und kardiovaskuläre Risikofaktoren (Chow et al. 2007b), Kardiotoxizität (Chatterjee et al. 2010) oder Infertilität in Erscheinung treten, immens. Daher sollte das Bestreben der präklinischen und klinischen Forschung in der Entwicklung neuer Therapiestrategien liegen, die eine individuell an den Patienten mit all seinen Risikofaktoren angepasste Therapie ermöglicht, sodass der Nutzen der Therapie maximiert und gleichzeitig die toxischen Nebeneffekte verringert werden können um ein optimales *Outcome* des Patienten zu erreichen. In Bezug auf die allogene HSCT ist eine Optimierung des Verfahrens anzustreben, um die Gefahr einer GVHD zu minimieren und gleichzeitig den GVL-Effekt maximal auszunutzen zu können.

1.2 Immuntherapie

Bei der Immuntherapie wird eine Erkrankung behandelt indem eine Immunantwort induziert, verstärkt oder supprimiert wird. Suppressierende Immuntherapieverfahren kommen vor allem bei Autoimmunerkrankungen und Allergien zum Einsatz, Tumorerkrankungen stellen den Hauptanwendungsbereich für aktivierende Immuntherapien dar. Hierbei soll das Immunsystem angeregt werden, Tumoren als fremd zu erkennen und zu zerstören. Als Immunmodulatoren werden in einigen Ansätzen lösliche Substanzen wie Zytokine, beispielsweise G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor), sowie Interferone oder IL-2 (Interleukin-2) verwendet; die zelluläre Immuntherapie basiert auf dem Einsatz von Effektorzellen des Immunsystems wie Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen oder NK-Zellen (natürliche Killerzellen) und ist derzeit Gegenstand intensiver präklinischer Forschung und klinischer Studien zur Therapie verschiedener maligner Erkrankungen (Mellman et al. 2011; Meyer-Wentrup et al. 2005).

1.2.1 Adoptive zelluläre Immuntherapie

Bei der adoptiven T-Zell-Therapie werden dem Tumorpatienten autologe oder allogene T-Lymphozyten infundiert mit dem Ziel den Tumor zu zerstören und ein Wiederauftreten zu verhindern. Schon in den siebziger Jahren zeigten Southam et al. einen inhibitorischen Effekt transplantiertem autologer Leukozyten auf das Wachstum von Tumoren (Southam et al. 1966), was auf das Vorhandensein von Leukozyten im Körper des Patienten schließen ließ, welche eine spezifische inhibitorische Wirkung auf Implantation und Wachstum von

Tumorzellen vorwies. Eine weitere Bestätigung der Wirksamkeit transferierter Lymphozyten liefert die allogene HSCT. Wurde in der Anfangsphase der Stammzelltransplantationen noch angenommen, diese diene vor allem dem Ersatz des durch Chemotherapie oder Radiotherapie zerstörten Knochenmarks (Thomas et al. 1957) oder der Ermöglichung hochdosierter myeloablativer Konditionierungsverfahren, erkannte man später die antileukämische GVL-Wirkung immunkompetenter Spender-T-Zellen und die Zusammenhänge zwischen GVL und GVHD (Odom et al. 1978). Obwohl die genauen Mechanismen der *graft versus leukemia* Reaktion (GVL) noch nicht genau bekannt sind, spricht viel dafür, dass sowohl GVL als auch GVHD hauptsächlich unter Vermittlung alloreaktiver T-Zellen ablaufen (Ringdén et al. 2009). So verhindert die T-Zell-Depletion von HSC-Transplantaten nicht nur die Entwicklung einer GVHD, sondern erhöht auch signifikant das Risiko eines leukämischen Rezidivs (Marmont et al. 1991; Aschan et al. 1993). Die Transfusion von Spenderlymphozyten nach allogener HSCT (*donor lymphocyte infusion*, DLI) kann den antileukämischen Effekt des Transplantats verstärken (Kolb et al. 1990) und Remissionen bei Rezidiven nach HSCT induzieren (Kolb et al. 2004). Vor allem bei der CML, aber auch bei akuten Leukämien, Multiplem Myelom und chronisch lymphoproliferativen Erkrankungen hat sich die DLI als effektiv erwiesen (Roddie und Peggs 2011), die Transfusion nicht-manipulierter Spenderlymphozyten ist jedoch mit gravierenden Nebenwirkungen durch die dadurch induzierte GVHD assoziiert (Kolb et al. 1995). Es wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die die Nutzung des GVL-Effekts unter Minimierung der GVHD-assoziierten Nebenwirkungen ermöglichen sollten. Beispiele hierfür sind die Variation der transfundierten Zelldosis, Depletion CD8⁺ T-Zellen (Giralt et al. 1995) oder Anreicherung CD4⁺ T-Zellen (Alyea et al. 1998). Eine weitere Möglichkeit stellt die Transfusion von tumorantigenspezifischen T-Zellen dar.

1.2.2 Adoptive T-Zell-Therapie

In der adoptiven T-Zell-Therapie werden CD4⁺ T-Zellen sowie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL) verwendet. Letztere bieten im Gegensatz zu anderen zytolytischen Zellen wie NK-Zellen den Vorteil, dass sie Tumorantigene, die von HLA-Klasse I-Molekülen präsentiert und auf der Zelloberfläche exprimiert werden, erkennen können und dadurch zu einer spezifischen Zerstörung der antigenexprimierenden Zellen fähig sind (June 2007). Der erste Schritt zur Generierung tumorspezifischer T-Zellen ist die Identifizierung von Antigenen, die in Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert sind (Tumor-assoziierte Antigene, *tumor associated antigens*, TAA) oder die ausschließlich in Tumorzellen, nicht aber in normalem Gewebe vorkommen (tumorspezifische Antigene, *tumor specific antigens*, TSA). CTL, die sich spezifisch gegen ein Tumorantigen richten,

werden dann aus dem Patienten (autologer Ansatz) oder aus gesunden Spendern (allogener Ansatz) isoliert. Hierbei bieten TSA-spezifische CTL den Vorteil, dass sie sich ausschließlich gegen Tumorzellen richten, wohingegen TAA-spezifische CTL auch gesundes Gewebe angreifen können da die Antigene nicht ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert werden (Engelhard et al. 2002). Zudem können Mechanismen der zentralen und peripheren T-Zell-Toleranz die Immunantwort TAA-gerichteter T-Zellen abschwächen (Shafer-Weaver et al. 2007). Tumorspezifische autologe T-Zellen werden im Rahmen von Studien vor allem zur Behandlung viraler Infektionen (Peggs 2009) und maligner Erkrankungen (Brenner und Heslop 2010), insbesondere bei malignem Melanom eingesetzt (Rosenberg et al. 2008). Da sie sich gegen Antigene richten, die in gesundem Gewebe nicht exprimiert werden, sind TSA-spezifische T-Zellen im Körper des Patienten nur selten und in geringen Mengen vorhanden, was eine Isolation und *ex vivo*-Expansion dieser Zellen erschwert. Es wurden verschiedene Lösungsansätze für dieses Problem entwickelt. Eine Option ist die Generierung transgener T-Zellen (Uckert 2000), indem die Gene für die α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR) zuvor identifizierter TSA-spezifischer T-Zellen kloniert und in andere T-Zellen transfiziert werden (Clay et al. 1999). Eine weitere Möglichkeit ist die Generierung transgener T-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren. Hierbei wird ein Teil einer Antigenbindungsstelle (beispielsweise ein Fragment eines monoklonalen Antikörpers), welche spezifisch für ein Oberflächenantigen des Tumors ist, mit einem aktivierenden Immunrezeptor kombiniert. Hierdurch wird die modifizierte T-Zelle bei Bindung an das Antigen durch stimulatorische Signale des Immunrezeptors aktiviert. Dies erlaubt eine MHC-unabhängige Antigenerkennung und verbessert Proliferation und Überleben der modifizierten T-Zellen (Cartellieri et al. 2010). T-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren werden derzeit für die Therapie von malignen Tumoren (Ramos und Dotti 2011), aber auch von Virus- und Autoimmunerkrankungen erprobt (Mitsuyasu et al. 2000; Elinav et al. 2009). Eine weitere Möglichkeit besteht in der *in vitro*-Generierung antigenspezifischer T-Zellen mit Hilfe von Dendritischen Zellen (DC). Bei dieser Methode wird die schwierige Suche nach tumorspezifischen T-Zellen im Körper des Patienten umgangen, da die spezifischen T-Zellen *in vitro* generiert werden. DC gehören zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems, die T-Zellen aktivieren können. Im unreifen Zustand nehmen DC unterschiedliche Eigen- und Fremdartigene auf und prozessieren diese zu Peptiden. Entzündliche Reaktionen induzieren einen Reifungsprozess der Dendritischen Zellen infolgedessen sie keine neuen Antigene mehr aufnehmen, die bereits aufgenommenen jedoch effektiv in Form von peptidbeladenen MHC-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Reife DC wandern in sekundäre lymphatische Organe ein, wo sie mit T-Lymphozyten in Kontakt treten. Die T-Zellen erkennen

die von den DC prozessierten Antigene. Durch Interaktion des TCR mit dem MHC-Komplex sowie dem Einfluss kostimulatorischer Signale sind DC somit in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren und T-Zell-Immunität zu induzieren (Banchereau und Steinman 1998). DC lassen sich heute mit einfachen Methoden aus CD14⁺ Monozyten des peripheren Blutes generieren (Meyer-Wentrup und Burdach 2003). Daher besteht großes Interesse, die Fähigkeit der DC, T-Zellen zu *primen*, also die Entwicklung naiver T-Zellen zu antigenspezifischen T-Zellen durch Präsentation des jeweiligen Antigens zu induzieren, in der Tumorthherapie einzusetzen. Mehrere Verfahren der Tumoringung mit tumorantigenbeladenen autologen DC, die eine antigenspezifische T-Zell-Antwort auslösen sollen, sind in Erprobung (Andrews et al. 2008; Dougan und Dranoff 2009). Im Rahmen der adoptiven T-Zell Therapie können peptidbeladene DC zum *in vitro Priming* naiver T-Zellen verwendet werden. Hierdurch lassen sich in einem kurzen Zeitraum antigenspezifische T-Zellen generieren, die in der Therapie maligner Erkrankungen zum Einsatz kommen könnten. Zur Optimierung des Herstellungsverfahrens der Zellen könnten vergleichbare Methoden wie die im autologen Ansatz dargestellten verwendet werden, beispielsweise die Klonierung des TCR TSA-spezifischer T-Zellen oder der Einsatz chimärer T-Zell-Rezeptoren. Das *Priming* kann sowohl in einem autologen als auch in einem allogenen Ansatz erfolgen. Allerdings besteht bei autologen Verfahren, bei denen patienteneigene tumorspezifische T-Zellen expandiert und reinfundiert werden die Problematik, dass die Zellen regulatorischen Mechanismen der T-Zell-Toleranz unterworfen sind, was die Effektivität und das Überleben dieser Zellen limitieren kann. Während der T-Zell-Reifung im Thymus kommt es durch negative und positive Selektion der T-Lymphozyten zur Entwicklung einer zentralen Selbsttoleranz. T-Zellen, deren TCR zu stark oder zu schwach an körpereigene MHC-Antigene bindet werden apoptotisch eliminiert, lediglich die T-Zellen mit mäßiger MHC-Bindungsaffinität, die sie als funktionstüchtig und nicht autoreaktiv kennzeichnet, überleben (Schütt und Bröker 2011). Diese mäßig reaktiven T-Zellen können jedoch in der Tumorummuntherapie aufgrund ihrer geringeren Effektivität des Erkennens und Abtötens ihrer antigenpräsentierenden Zielzellen ein Problem darstellen (Shafer-Weaver et al. 2007). Alloreaktive Ansätze, bei denen die CTL und die DC von verschiedenen Spendern mit gewollten Unterschieden der HLA-Moleküle (*HLA-mismatch*) stammen, ermöglichen die Generierung alloreaktiver T-Zellen unter Umgehung von Problemen der T-Zell-Toleranz und geringer Bindungsavidität. Alloreaktive antigenspezifische CTL stellen somit einen vielversprechenden Ansatz für die Tumorummuntherapie dar (Amrolia et al. 2003; Kronig et al. 2009; Schuster et al. 2007).

2 Aufgabenstellung

Der adoptive Transfer von *in vitro* generierten T-Zellen, die infolge eines *Primings* durch peptidbeladene Dendritischen Zellen spezifisch sind für Antigenstrukturen, welche auf Tumorzellen exprimiert werden ist eine aussichtsreiche Strategie, um eine zielgerichtete und spezifische Reaktion gegen Tumoren zu erreichen. Sie stellt eine vielversprechende Herangehensweise in Richtung einer individualisierten Tumorthherapie dar. Im Falle der Leukämie ist das Immunsystem der betroffenen Patienten häufig nicht in der Lage die körpereigenen Leukämiezellen abzutöten, daher wird als letztes therapeutisches Mittel oft die allogene HSCT eingesetzt, die häufig mit schweren Nebenwirkungen einhergeht. Daher wurde hier ein allogener Ansatz für das *in vitro Priming* gewählt, welcher im Prinzip die Situation eines cALL-Patienten mit allogener HSCT simuliert, wobei die tumorspezifischen CTL als modifizierte DLI im Anschluss an die HSCT zum Einsatz kommen könnten. Die Alloreaktivität wurde durch eine gewollte Nicht-Übereinstimmung (*Mismatch*) des HLA-A*0201-Status erzielt: die verwendeten DC waren HLA-A*0201 positiv und repräsentierten den Patienten, die HLA-A*0201-negativen CTL repräsentierten den Spender.

Ziel dieser Arbeit war die Generierung alloreaktiver zytotoxischer T-Zellen (CTL), die spezifisch sind für zuvor ausgewählte cALL-spezifische Epitope. Die antigenspezifischen CTL sollten Zellen, die diese Epitope exprimieren, erkennen und sie *in vitro* selektiv zerstören. Die Generierung spezifischer CTL sollte durch ein *Priming* der naiven T-Zellen durch peptidbeladene Dendritische Zellen erreicht werden. Die Peptide, mit denen die DC beladen werden sollten, stellten die Zielepitope dar. Mögliche Zielgene, die in cALL-Zelllinien im Vergleich zu Normalgewebe überexprimiert sind, ergaben sich aus vorangegangenen Microarray-Analysen unseres Labors (Beinvogl 2010). In dieser Arbeit wurden Peptide aus den Genen STK32B und LILRA2 verwendet. STK32B ist ein auf Chromosom 4p16.2 lokalisiertes Gen das für die Serin/Threonin-Kinase 32B codiert. Die genaue Funktion von STK32B in der Zelle sowie seine Rolle bei der Pathogenese der cALL sind derzeit nicht bekannt und STK32B bzw. die enthaltenen Epitope wurden bisher nicht in Zusammenhang mit der cALL publiziert. LILRA2 (*leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 2*) ist auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert und kodiert für einen Immunrezeptor der *leukocyte Ig-like* Rezeptoren (LIR), die vor allem auf Monozyten und B-Zellen, in geringerer Ausprägung auch auf Dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK) vorkommen (Colonna et al. 1999). Eine Aktivierung von LILRA2 kompromittiert die Fähigkeit des angeborenen Immunsystems, eine adaptive T-Zell-Antwort auszulösen. Derzeit ist der Zusammenhang zwischen LILRA2 und der cALL unklar und wurde bisher nicht beschrieben.

Potenzielle Zielepitope sollten durch *in silico*-Berechnungen aus ausgewählten Zielgenen selektiert und die Bindungsfähigkeit der vielversprechendsten Epitope *in vitro* getestet werden. Naive CD8⁺ Zellen sollten aus Spenderblut isoliert werden. Spezifische CTL sollten nach dem *Priming*, welches mittels peptidbeladener Dendritischer Zellen durchgeführt wurde, durchflusszytometrisch identifiziert und expandiert werden. Ihre Spezifität sollte anhand ihrer zielgerichteten Interferon γ -Ausschüttung im ELISpot überprüft werden. Um die Fähigkeit der CTL, ihre Zielzellen spezifisch abzutöten zu analysieren, sollte ein Granzym B-Elispot durchgeführt werden. Die gewonnenen CTL sollten hinsichtlich ihrer exprimierten Oberflächenmoleküle durchflusszytometrisch charakterisiert werden, um sie hinsichtlich ihres Aktivierungsgrades, Differenzierungsstadiums und ihrer Peptidspezifität zu beurteilen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Herstellerliste

Hersteller	Firmensitz
AEG	Nürnberg, Deutschland
AID GmbH	Straßberg, Deutschland
Amersham Biosciences	Piscataway, New Jersey, USA
ATCC	Rockyville, Maryland, USA
B. Braun Biotech Int.	Melsungen, Deutschland
Bayer HealthCare Pharmaceuticals	Leverkusen, Deutschland
BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Beckman Coulter	Palo Alto, Kalifornien, USA
Beckton Dickinson	Jersey City, New Jersey, USA
Biochrom	Berlin, Deutschland
BioRad	Hercules, Kalifornien, USA
BioWhittacker	East Rutherford, New Jersey, USA
Biozym	Hess. Olendorf, Deutschland
Brand	Wertheim, Deutschland
Cayman Chemical Company	Ann Arbor, Michigan, USA
DSMZ	Braunschweig, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Falcon	Oxnard, Kalifornien, USA
Feather	Osaka, Japan
GE HealthCare	Uppsala, Schweden
GFL	Burgwedel, Deutschland
Greiner	Nürtingen, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
ImaGenes GmbH	Berlin, Deutschland
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Kern	Balingen, Deutschland
Leica	Wetzlar, Deutschland
Lonza	Basel, Schweiz
Mabtech	Nacka Strand, Schweden
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Molecular BioProducts, MßP	San Diego, Kalifornien, USA
Nalgene	Rochester, New York, USA
Nikon	Tokio, Japan

Nunc	Naperville, USA
Optech	Oxfordshire, UK
Pan Biotech GmbH	Aidingen, Deutschland
Pechiney Plastic Packaging	Menasha, Wisconsin, USA
Peske OHG	München, Deutschland
Prolimmune	Oxford, UK
Quiagen	Chatsworth, Kalifornien, USA
R&D Systems	Minneapolis, Minnesota, USA
Roche	Mannheim, Deutschland
ROTH	Karlsruhe, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Scientific Industries	Bohemia, New York, USA
Scotsman	Vernon Hills, Illinois, USA
Semperit	Wien, Austria
Sempermed	Wien, Österreich
Siemens	München, Deutschland
Sigma	St. Louis, Missouri, USA
Syngene	Cambridge, UK
Taylor-Wharton	Theodore, AL, USA
Thermo Fisher Scientific	Ulm, Deutschland
TKA GmbH	Niederelbert, Deutschland
TPP	Trasadingen, Schweiz
Zeiss	Jena, Deutschland

3.1.2 Instrumente und Geräte

Produkt	Produktname	Hersteller
Cryo-Einfriergerät	5100 Cryo 1°C Freezing Container, "Mr. Frosty"	Nalgene (Thermo Fisher Scientific)
Durchflusszytometer	FACSCalibur™	Becton Dickinson
Eismaschine	AF 100	Scotsman
Elektroporator	Gene Pulster Xcell™	BioRad
ELISpot Reader	AID iSpot Reader Unit	AID GmbH
Flüssigstickstofftank	L-240 K series	Taylor-Wharton
Gefrierschrank (-20 °C)	cool vario	Siemens
Gefrierschrank (-80 °C)	Hera freeze	Heraeus
Inkubator	Hera cell 150	Heraeus
Kühlschrank (+4 °C)	cool vario	Siemens
Mehrkanalpipette	Research 10 - 100 µl	Eppendorf
Mikropipetten	0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl	Eppendorf
Mikroskop		Optech
Mikroskop	DMIL	Leica
Mikroskop	Eclipse TS 100	Nikon

(Fluoreszenzmikroskop)		
Mikrowelle		AEG, Siemens
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf
Reinstwasser- Aufbereitungssystem	TKA GenPure	Thermo Fisher Scientific (TKA)
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	EW 300-LM	Kern
Waage – Analysenwaage	770	Kern
Wasserbad		GFL
Zählkammer	Neubauer	Brand
Zellseparationssystem	BD IMag™	BD Biosciences
Zellseparationssystem	MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus

3.1.3 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Kryoröhrchen	Nunc
FACS™-Teströhrchen (5 ml)	Falcon
Filter für Flüssigkeiten (0,2 µm und 0,45 µm)	Sartorius
Handschuhe (Latex, Nitril)	Sempermed
Kunststoffgefäße Safelock (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf
Pasteur Pipetten	Peste OHG
Pipetten (2, 5, 10 und 25 ml)	Falcon
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl mit Filter)	Biozym
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	MßP
Skalpelle (Nr. 12, 15, 20)	Feather
Zellfilter	Falcon
Zellkulturflaschen T25, T75 und T175 (25 cm², 75 cm² und 175 cm²)	TPP
Zellkulturflaschen T25, T75 und T175 (25 cm², 75 cm² und 175 cm²)	Falcon
Zellkulturplatten (6-well, 24-well, 96-well)	TPP
Zellkulturröhrchen (konisch, Polypropylen, 15 und 50 ml)	Falcon
Zellkulturröhrchen (konisch, Polystyren, 15 ml)	Falcon

3.1.4 Chemikalien und biologische Reagenzien

Produkt	Hersteller
100 x nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen
AIM V Medium	Invitrogen
Ampicillin	Merck
auto MACS™ Rinsing Solution	Miltenyi Biotec GmbH
Cyclosporin A	Sigma
Dimethylformamid	ROTH
DMEM Medium	Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
Erythrozyten-Lysepuffer	Krankenhausapotheke Klinikum Rechts der Isar
Ethanol	Merck
FACS™ Clean	Becton Dickinson
FACS™ Flow	Becton Dickinson
FACS™ Rinse	Becton Dickinson
FBS (<i>fetal bovine serum</i> , fetales Kälberserum)	Biochrom
Ficoll-Paque	GE HealthCare
Gentamicin	Biochrom
GM-CSF	Bayer HealthCare
Human CD14 Magnetic Particles-DM	BD Biosciences
Humanserum (männlich, Blutgruppe AB)	Lonza
IL-12 (Interleukin 12)	R&D Systems
IL-15 (Interleukin 15)	R&D Systems
IL-1β (Interleukin 1β)	R&D Systems
IL-2 (Interleukin 2)	R&D Systems
IL-4 (Interleukin 4)	R&D Systems
IL-6 (Interleukin 6)	R&D Systems
IL-7 (Interleukin 7)	R&D Systems
Isopropanol	Sigma
L-Glutamin	Invitrogen
MACS® BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec GmbH
Natriumchlorid	Merck
Natriumpyruvat	Invitrogen
PBS 10 x (<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung)	Invitrogen
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen
PGE2 (Prostaglandin E2)	Cayman Chemical Company
Propidiumiodid	Sigma
RPMI 1640 Medium	Invitrogen
TNFα (Tumornekrosefaktor α)	R&D Systems
Trypanblau	Sigma
Trypsin / EDTA	Invitrogen

Tween 20	Sigma
X-VIVO 15 Medium	BioWhittaker
β2-Mikroglobulin	Sigma

3.1.5 Kits

Produkt	Hersteller
CD8+ T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec GmbH
IOtest® Beta Mark Kit	Beckman Coulter

3.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Standardmedium	RPMI 1640
	10 % FCS
	2 mM L-Glutamin (200 mM)
	100 U / ml Penicillin / Streptomycin (10 ⁴ U / ml)

LCL-Medium	RPMI 1640
	10 % FCS
	2 mM L-Glutamin (200 mM)
	1 mM Natriumpyruvat (100 mM)
	1 x nichtessentielle Aminosäuren (100 x)
0,1 % Gentamicin (50 mg / ml)	

T-Zell-Medium	AIM V
	5 % Humanserum
	2 mM L-Glutamin (200 mM)
	0,1 % Gentamicin (50 mg / ml)

Cos-7-Medium	DMEM
	10 % FCS
	100 U / ml Penicillin
	100 µg / ml Streptomycin
	2 mM Glutamin

DC Medium	X-VIVO 15
	1 % Humanserum

Trypsin / EDTA 1 x	45 ml PBS
	5 ml Trypsin-EDTA (10 x)

Einfriermedium	FCS 90 %
	DMSO 10 %

Einfriermedium T-Zellen	Humanserum 90 %
	DMSO 10 %

3.1.7 Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Relevanz	Quelle
697	cALL-Zelllinie, HLA-A*0201 ⁺ , STK32B und LILRA2 negativ	HLA-A*0201-Spezifität, cALL-Spezifität	DSMZ (Findley et al. 1982)
(MHH)-CALL2	cALL Zelllinie, HLA-A*0201 ⁻	Kontrolle des HLA-Kontextes	DSMZ (Tomeczkowski et al. 1995)
A673	EFT Zelllinie HLA-A*0201 ⁺	Kontrolle der cALL-Spezifität	ATCC (Giard et al. 1973)
Cos-7	Cos-7 (ATTCC CRL 1651) stammt von einer Affen-Nierenzelllinie (ATCC CCL70) ab und wurde mit einer Mutante des Simian Virus 40 (SV40) transformiert, Transfektion mit relevantem / irrelevantem Peptid und HLA-A*0201 möglich	Erkennung transfizierter Strukturen	H. Bernhard (Gluzman 1981)
Dendritische Zellen	Differenziert aus Monozyten eines gesunden, HLA-A*0201-positiven Blutspenders		Im Labor generiert
LCL	EBV-immortalisierte B-Zellen		Im Labor generiert
Nalm-6	cALL-Zelllinie, HLA-A*0201 ⁺ , exprimiert STK32B und LILRA2	HLA-A*0201-Spezifität, cALL-Spezifität, Pepdispezifität	DSMZ (Hurwitz et al. 1979)
T2	Hybrid einer T- und B-lymphoblastoiden Zelllinie, TAP-defizient, dadurch kaum HLA-Expression HLA-A*0201 hochreguliert bei Kontakt mit daran bindenden Peptiden	Positiv- / Negativkontrolle	J. Mautner (Salter et al. 1985)
K562	CML-Zelllinie, MHC I - negativ	Kontrolle für unspezifische NK-Zell-Aktivität	DSMZ (Lozzio 1975)

3.1.8 ELISpot-Reagenzien

3.1.8.1 Antikörper

Produkt	Hersteller
Anti-h-Granzyme B mAb GB10, gereinigt	Mabtech
Anti-h-Granzyme B mAb GB11, gereinigt	Mabtech
Anti-h-IFN- γ mAb 1-D1K, gereinigt	Mabtech
Anti-h-IFN- γ mAb 7-B6-1, biotinyliert	Mabtech

3.1.8.2 Platten ,Enzyme, Puffer

Produktgruppe	Produkt	Hersteller
Platten	MultiScreen HA Filter Plate, 0,45 μ m, steril	Millipore
Enzyme	Streptavidin-Horse Radish Peroxidase	Mabtech
Puffer	Waschpuffer	1 x PBS / 0,05 % Tween
	Antikörperpuffer	1 x PBS / 0,5 % BSA
	Azetatpuffer	37,5 ml H ₂ O dest. + 3,75 ml 0,2 N Essigsäure + 8,8 ml 0,2 N Natriumazetat
AEC-Tabletten	3-Amino-9-ethyl-carbazol	Sigma
AEC-Lösung	1 AEC-Tablette in 2,5 ml Dimethylformamid (DMF) + 47,5 ml Azetatpuffer	
Entwicklerlösung	10 ml AEC-Lösung + 30 μ l 30 % H ₂ O ₂ pro Platte	

3.1.9 Durchflusszytometrie-Reagenzien

3.1.9.1 Reagenzien

Färbepuffer	0,1 % Natriumazid, 0,1 % BSA in PBS
Fixierlösung	1 % Paraformaldehyd in PBS

3.1.9.2 Antikörper

Antikörper	Klon	Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller
CD8	RPA-T8	FITC / PE / APC	BD Biosciences
CD27	M-T271	FITC	BD Biosciences
CD28	CD28.2	FITC	BD Biosciences
CD3	HIT3a	FITC / APC	BD Biosciences
CD4	RPA-T4	FITC / PE	BD Biosciences
CD45RA	HI100	PE	BD Biosciences
CD56	B159	PE	BD Biosciences
CD62L	Dreg 56	APC	BD Biosciences
CD83	HB15e	APC	BD Biosciences
CD86	2331 (FUN-1)	FITC	BD Biosciences
HLA-A2	BB7.2	FITC	BD Biosciences

MHC Klasse I	G46-2.6	APC	BD Biosciences
MHC Klasse II	L243	PE	BD Biosciences
Propidiumiodid	-	-	Sigma
CCR7	2H4	PE	BD Biosciences
CCR5	2D7	APC	BD Biosciences
CD127 (II7R)	40131	APC	R&D
CD25	M-A251	PE	BD Biosciences
CD69	L78	PE	BD Biosciences
IL7Ra	40131	APC	R&D

3.1.10 Peptide

Hersteller: Thermo Fischer Scientific

Gen	HLA-Allel	Sequenz	Position	SYFPEITHI	BIMAS	NetCTL 1.2
Influenza	A*0201	GILGFVFTL	-	30	550,93	1,29
LILRA2	A*0201	VLICLGLSL	7	27	36,32	1,13
	A*0201	TLWAEPGSV	30	23	75,05	0,99
	A*0201	VLGILLFEA	462	22	112,66	0,93
	A*0201	SLPSDLLEL	207	29	49,13	1,26
	A*0201	GLSQANFTL	274	23	123,90	1,22
	A*0201	ALPSPVVTI	127	31	49,13	0,96
	A*0201	LLELLVPGV	212	28	17,41	1,01
STK32B	A*0201	YMAPEVFQV	186	28	3082,44	1,54
	A*0201	KLYICELAL	124	24	239,26	1,14

3.1.11 Pentamere

Pentamer	Zugrundeliegendes Peptid	Hersteller
F2A-CUS-A*0201-YMAPEVFQV-PE	STK32B-186	ProlImmune
F0A-E-CUS-A*0201-TLWAEPGSV-unlabeled	LILRA2-30	ProlImmune

3.2 Methoden

3.2.1 *In silico* Auswahl geeigneter Peptidepitope

3.2.1.1 SYFPEITHI

<http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>

SYFPEITHI ist eine kostenlose Online-Datenbank, mit deren Hilfe sich die Bindungsfähigkeit von Peptiden an bestimmte HLA-Typen vorhersagen lässt. Die Algorithmen der Datenbank basieren auf vorausgegangenen Publikationen über T-Zell-Epitope und MHC-Liganden (Rammensee et al. 1999). Die Vorhersage der Bindungsfähigkeit begründet sich in der Bewertung einzelner Aminosäuren des jeweiligen Peptids mit besonderer Berücksichtigung der Aminosäuren an Ankerpositionen. Anhand dieser Bewertung wird ein Prädiktionswert errechnet, der das Bindungsverhalten und die entsprechenden T-Zell-Epitope vorhersagt.

3.2.1.2 *The Bioinformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS)*

http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/

BIMAS ist ein webbasierter Dienst, der die Prädiktion des Bindungsverhaltens von Oktamer-, Nonamer-, und Dekamer-Peptiden an MHC I-Moleküle ermöglicht. Die Analyse basiert auf Koeffiziententabellen, die sich aus Publikationen von Parker et al. ableiten (Parker et al. 1994). Der Prädiktionswert berechnet sich durch die Abschätzung der Geschwindigkeit, mit der sich ein Molekül mit der angegebenen Aminosäuresequenz aus der Bindung mit dem MHC I-Molekül löst. Die Höhe des Prädiktionswerts korreliert also positiv mit der Dauer und Stabilität der Bindung und somit mit dem Bindungspotenzial des jeweiligen Peptids.

3.2.1.3 *NetCTL 1.2*

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/>

NetCTL 1.2 ist ein kostenloser Internetdienst des *center for biological sequence analysis* der Technischen Universität Dänemark (Larsen et al. 2007). Angeboten wird neben der Vorhersage der Bindungsfähigkeit von CTL-Epitopen an MHC I auch die Berechnung der Wahrscheinlichkeit der Aufspaltung im Proteasom und des Transports der gespaltenen Peptide ins Endoplasmatische Retikulum (ER) durch Antigenpeptid-Transporter (*transporter associated with antigen processing, TAP*).

Die Prädiktionswerte jedes vorhergesagten Epitops wurden verglichen und die Peptide, welche am besten abgeschnitten hatten, wurden bestellt. Im Anschluss erfolgte eine *in vitro*-Testung der HLA-A*0201-Bindungsfähigkeit der ausgewählten Peptide (siehe 3.2.2).

3.2.2 *In vitro* Erfassung der HLA-A*0201-Bindungsfähigkeit von Peptiden

Nach *in silico* Vorhersage der Bindungsfähigkeit wurden die am besten bewerteten Peptide bestellt. Anschließend wurde die Bindungsaffinität der selektierten Peptide an HLA-A*0201 Moleküle *in vitro* getestet. Zu diesem Zweck wurden T2-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, bei der aufgrund einer Deletion der MHC-II-Region auf Chromosom 6 inklusive der TAP1- und TAP2-Gene die Fähigkeit zur Peptid-Prozessierung beeinträchtigt ist (Nijman et al. 1993; Stuber et al. 1994). Proteasomal prozessierte Peptide können nicht ins Endoplasmatische Retikulum transloziert werden, was die dort stattfindende Beladung der MHC Klasse I-Moleküle beeinträchtigt. Infolgedessen bleiben die MHC Klasse I-Moleküle instabil und werden nur in geringem Ausmaß auf der Zelloberfläche von T2-Zellen exprimiert. T2-Zellen besitzen daher unter normalen Kulturbedingungen nur wenig Oberflächen-MHC, somit können sie zytotoxischen T-Zellen keine endogen synthetisierten Peptide präsentieren. HLA-A*0201 ist in geringer Dichte vorhanden. Werden allerdings exogen Peptide hinzugefügt, die an HLA-A*0201 binden, können diese das HLA-A*0201-Molekül der T2-Zellen stabilisieren. Hierdurch wird die Expression von HLA-A*0201 hochreguliert. Somit kann die Hochregulation von HLA-A*0201 auf T2-Zellen als ein Hinweis auf ein HLA-A*0201-restringiertes Epitop gewertet werden (Lee et al. 2002). T2-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, gezählt und in einer Konzentration von 1×10^6 / ml in T-Zell-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die T2-Zellen in einem Volumen von 300 μ l / well auf eine 96-well-Platte aufgebracht. Getestet wurde die HLA-A*0201-Bindungsfähigkeit für Peptidkonzentrationen von 50 μ M und 100 μ M, siehe Tabelle 3-1. Für die Negativkontrolle wurden die T2-Zellen ohne Peptid, für die Positivkontrolle mit Influenza-Peptid (GILGFTVL) inkubiert.

Tabelle 3-1 Versuchsaufbau HLA-A*0201 Peptidbindungstest

Negativkontrolle	2 wells ohne Peptid (Isotypfärbung)
	2 wells ohne Peptid für HLA-A2-FITC-Färbung
Positivkontrolle	2 wells mit 50 μ M Influenza-Peptid
	2 wells mit 100 μ M Influenza-Peptid
Zu testendes Peptid	2 wells mit 50 μ M Test-Peptid
	2 wells mit 100 μ M Test-Peptid

Die T2-Zellen wurden 16 h lang bei 37 °C mit den Peptiden inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen dreimal gewaschen um ungebundenes Peptid zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit einem HLA-A*0201-FITC Antikörper angefärbt. Somit ließ sich durchflusszytometrisch die HLA-A*0201-Expression der Zellen ermitteln, welche mit der Menge an gebundenem Peptid korrelierte. Die relative Bindungsaffinität (RA) wurde

berechnet, indem die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität bei einer bestimmten Peptidkonzentration durch den Mittelwert der Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle dividiert wurden:

$$RA = \frac{\text{Mittelwert (T2 + Peptid)}}{\text{Mittelwert (T2 ohne Peptid)}}$$

Ein gut bindendes Peptid sollte eine ähnlich hohe Fluoreszenzintensität wie das Vergleichspeptid der Positivkontrolle (Influenza) aufweisen.

3.2.3 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte der Zellkultur wurden, sofern nicht anders angegeben, an der Sterilbank durchgeführt.

3.2.3.1 Zählen der Zellen

Zu zählende Zellen lagen in Suspension vor. Zur Vitalfärbung wurde Trypanblau verwendet; Trypanblau dringt in defekte Zellmembranen ein und färbt entsprechende Zellen dunkelblau an. Lebende Zellen sowie Zellen mit intakter Zellmembran bleiben hell. Die Färbung erfolgte im Verhältnis 1 : 2, beispielsweise 10 µl Trypanblau (0,4% Ausgangskonzentration) auf 10 µl Zellsuspension. Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine Neubauer Zählkammer aufgebracht. Bei hohen Zellkonzentrationen war zunächst eine Verdünnung vorzunehmen, da ab einer Anzahl von mehr als 200 Zellen pro Eckquadrat die Auszählung aufgrund der hohen Zelldichte nicht mehr möglich war. Die lebenden, also ungefärbten, Zellen in 4 großen Eckquadraten wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und ein Durchschnittswert durch Division durch 4 gebildet. Zellen, die sich an der linken oder oberen Randbegrenzung eines Quadrats befanden, wurden mitgezählt, nicht jedoch Zellen an den unteren oder rechten Randbegrenzungen. Die Mikroskopierarbeiten wurden am Mikroskoparbeitsplatz außerhalb der Sterilbank durchgeführt. Zur Ermittlung der Zellzahl pro µl wurde der Durchschnittswert der gezählten Zellen mit dem Kammerfaktor CF und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Der Kammerfaktor CF ergibt sich aus dem Kehrwert des Volumens eines Eckquadrates (0,1 µl) und beträgt somit 10. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl der Zellsuspension wurde die Zellzahl pro µl mit dem Gesamtvolumen der Suspension multipliziert.

3.2.3.2 Zellkultur von in Suspension vorliegenden Zellen

T2-Zellen, LCL sowie die Tumorzelllinien Nalm6, 697, CALL2 und K562 lagen in Suspension vor. Sie wurden in ihrem jeweiligen Medium in T75-Zellkulturflaschen in einem Volumen von 30 ml bei 37 °C kultiviert. Abhängig von der Geschwindigkeit des Wachstums wurde im

Abstand von wenigen Tagen die Hälfte der Zellsuspension entfernt und durch frisches Medium ersetzt.

3.2.3.3 Zellkultur adhärenter Zellen

Cos-7-Zellen sowie A673 sind adhärent wachsende Zellen. Die Zelllinien wurden in ihrem jeweiligen Medium bei 37°C kultiviert. Das Volumen der T25 Zellkulturflaschen betrug 10 ml bei 25 cm² Adhärenzfläche, das Volumen der T75 Zellkulturflaschen betrug 25ml bei 75 cm² Adhärenzfläche. Sobald die adhärenenten Zellen zu konfluieren begannen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt, je nach Wachstumsrate im Verhältnis von 1 : 2 bis 1 : 10. Hierbei wurden die Zellen nach Entfernen des verbrauchten Mediums zunächst einmal mit warmem PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin / EDTA für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die dadurch abgelösten Zellen wurden in neuem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

3.2.3.4 Zellkultur primärer Zellen

Die Kultivierung Dendritischer Zellen nach Isolation der CD14⁺ Zellfraktion aus PBMC erfolgte in X-VIVO 15-Medium mit 1 % humanem AB-Serum, 30 ng / ml Interleukin-4 (IL-4) und 800 U / ml GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor). Der Ablauf der Zytokingaben sowie die weiteren Kulturbedingungen sind unter 3.2.7, Seite 37 beschrieben. CD8⁺ Zellen wurden nach der Isolation aus PBMC nicht in Kultur gehalten, sondern bevorzugt unmittelbar für das *in vitro Priming* verwendet (siehe 3.2.8, Seite 40) oder alternativ kryokonserviert (siehe 3.2.3.5, Seite 30). CTL wurden in T-Zell-Medium (RPMI + 10 % humanem AB-Serum + 1 % Penicillin / Streptomycin + 1 % Glutamin) unter Anwesenheit von bestrahlten Stimulatorzellen (allogene PBMC, bestrahlt mit 30 Gy und LCL, bestrahlt mit 100 Gy) kultiviert. Als Zytokine kamen Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-15 (IL-15) zum Einsatz. Die genauen Kultivierungsbedingungen bei der Klonierung in 96-*well*-Platten und bei der Expansion in T25-Flaschen sind unter 3.2.12, Seite 45 sowie unter 3.2.14, Seite 49 beschrieben.

3.2.3.5 Kryokonservierung von Zellen

PBMC wurden in Konzentrationen von 5×10^7 / ml in einem Volumen von 1 ml eingefroren. Die Konzentration für Tumorzelllinien und T-Zellen betrug zwischen 1×10^6 und 1×10^7 / ml in jeweils 1 ml Volumen. Die Zellen wurden zunächst abzentrifugiert und anschließend in dem entsprechenden Volumen Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium für T-Zellen bestand aus 90 % humanem Serum (männlich, Blutgruppe AB) mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), für dendritische Zellen, die in reifem, gepulsten Zustand

eingefroren wurden, bestand das Medium aus Humanserum (männlich, Blutgruppe AB) mit 10 % DMSO und 5 % Glukose. Alle anderen Zellen wurden in 90 % Fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) mit 10 % DMSO eingefroren (Feuerstein et al. 2000). Je ein Milliliter der sorgfältig durchmischten Zellsuspension in Einfriermedium wurde in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in speziellen Cryo-Einfriergeräten, welche eine kontrollierte Temperatursenkung erlaubten, bei -80 °C eingefroren. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen in den Flüssigstickstofftank überführt und bei -196 °C konserviert.

3.2.3.6 Auftauen kryokonservierter Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Sobald der Aggregatzustand der Probe überwiegend flüssig war, wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens in ein Falconröhrchen (Volumen: 15 ml) überführt, in dem 1 ml Zellkulturmedium vorgelegt war. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min. Das Zellpellet wurde dann im jeweiligen, auf 37 °C vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert.

3.2.4 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

3.2.4.1 Isolierung von PBMC aus Blutkonserven

Bei der Weiterverarbeitung von Vollblutspenden zu Erythrozytenkonzentraten oder *Fresh Frozen Plasma* verbleibt je nach Verfahren ein Restvolumen im Blutkonservenbeutel, in dem die im Vergleich zu den Erythrozyten relativ leichten PBMC in relativ hoher Konzentration verbleiben („Buffy Coat - Präparate“). Für unsere Versuche wurden Buffy Coat - Präparate gesunder Spender vom DRK - Blutspendedienst Baden - Württemberg - Hessen bereitgestellt. Die Lieferung an unser Labor erfolgte innerhalb von 24 h, die Lagerung und der Transport erfolgten bei Raum - bzw. Fahrzeugtemperatur. Das Restvolumen einer 500 ml Blutkonserve belief sich auf 20 - 35 ml. Das Blut wurde aus dem Blutkonservenbeutel in Falconröhrchen überführt und im Verhältnis 1 : 3 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde das verdünnte Blut im Verhältnis 3 : 2 auf eine Schicht Ficoll-Paque pipettiert: ein 50 ml Falconröhrchen enthielt somit 30 ml Blut auf 20 ml Ficoll - Paque. Geringere Restmengen des verdünnten Blutes wurden im Verhältnis 2 : 1 in 15 ml Falconröhrchen auf eine Schicht Ficoll-Paque gegeben. Um ein Durchmischen der Schichten zu vermeiden war besonders langsames und vorsichtiges Überschichten notwendig. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 400 g für 30 min bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation wurde der überstehende Plasmaanteil vorsichtig bis etwa 1 cm über dem Ring mononukleärer Zellen abpipettiert, ohne die Schichten zu durchmischen. Daraufhin wurden die Zellen mit einer Pasteur - Glaspipette sorgfältig abgenommen und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt.

Dieses wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 45 ml mit PBS aufgefüllt. Zur Entfernung kontaminierender Thrombozyten wurden die Zellen bei 1500 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet im Residualvolumen resuspendiert. Zur Erythrozytenlyse wurden 3 ml Erythrozyten – Lyse - Puffer zugegeben und für 5 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von PBS bis zu einem Gesamtvolumen von 45 ml gestoppt. Es erfolgte wiederum eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und die Zellen wurden nach entsprechender Verdünnung gezählt (siehe 3.2.3.1, Seite 29).

3.2.4.2 Isolierung von PBMC aus Vollblut

Zur Isolierung von PBMC aus Vollblut gesunder Spender kam dasselbe Verfahren wie in 3.2.4.1 auf Seite 31 beschrieben zum Einsatz. Jedoch wurde der Arbeitsschritt der Verdünnung des Blutes mit PBS in diesem Fall nicht im Verhältnis 1 : 3, sondern in einem Verhältnis von 1 : 2 vorgenommen.

3.2.4.3 Generierung von Pool-PBMC

Bei der Generierung von allogenen Pool-PBMC wurde im Wesentlichen das unter 3.2.4.1 auf Seite 31 beschriebene Verfahren angewandt. Jedoch wurden als Grundlage 3 Buffy-Coat-Präparate unterschiedlicher Spender verwendet. Zunächst wurden aus den einzelnen Buffy-Coat-Präparaten getrennt PBMC isoliert. Nach abschließendem Zählen der Zellen wurden die PBMC der verschiedenen Spender zu je gleichen Anteilen in ein Falconröhrchen gegeben und sorgfältig vermischt. Diese Pool-PBMC wurden in Portionen zu 5×10^7 Zellen eingefroren (siehe 3.2.3.5, Seite 30).

3.2.5 Isolierung von CD14⁺-Zellen

CD14⁺ Zellen wurden aus dem Blut gesunder, HLA-A*0201⁺ Spender gewonnen. Nach der Gewinnung von PBMC aus dem Vollblut der Spender erfolgte die Isolierung der CD14⁺ Zellfraktion mittels eines BD Anti-Human CD14 magnetic particle sets unter Verwendung eines BDTM-Magneten. Markierung und Isolierung der Zellen erfolgten gemäß dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll: PBMC wurden aus dem Blut gesunder, HLA-A*0201⁺ Spender isoliert, gezählt und anschließend mit 1X BDTM IMag Puffer gewaschen. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen. Die BDTM IMag anti-human CD14 Magnetpartikel wurden gründlich mit einer Vortexmaschine aufgeschüttelt; 50 µl Magnetpartikel pro 10^7 Zellen wurden zu den PBMC pipettiert, sorgfältig vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mittels Zugabe von 1 X BDTM IMag

Puffer auf eine Konzentration von 2×10^7 / ml gebracht. Unmittelbar darauf wurde das Falconröhrchen mit den Zellen in die Halterung des BDTM - Magneten eingebracht und für 8 - 10 min inkubiert, wodurch die mit Magnetpartikeln markierten CD14⁺ Zellen an die dem Magneten am nächsten liegende Seite des Falconröhrchens gezogen wurden. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert, wobei das Falconröhrchen in der Halterung des Magneten verblieb. Nach Entfernung der CD14- Negativfraktion wurde das Falconröhrchen aus dem Magneten entfernt, die Zellen wurden in 1X-BDTM-Pufferlösung resuspendiert. Das Falconröhrchen wurde erneut in der Halterung des Magneten befestigt und für weitere 2 – 4 min inkubiert. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert ohne das Falconröhrchen aus der Halterung zu entfernen. Dieser Arbeitsschritt wurde erneut wiederholt. Das nach den Waschsritten verbleibende Zellpellet stellte die CD14⁺-positive Zellfraktion dar und wurde zur Generierung von Dendritischen Zellen (siehe 3.2.7, Seite 37) weiterverwendet.

CD14 wird vor allem auf Monozyten und Makrophagen exprimiert. Der Anteil der CD14⁺ Zellen des verwendeten Spenderblutes wurde vor und nach Selektion durchflusszytometrisch erhoben.

Abbildung 3-1, Seite 34 zeigt exemplarisch den Anteil CD14⁺ Zellen vor und nach dem Selektionsverfahren. Nach der CD14⁺-Isolation betrug die Positivfraktion in der Regel > 95 %. Nur hochaufgereinigte CD14⁺ Zellen wurden für weitere Versuche verwendet.

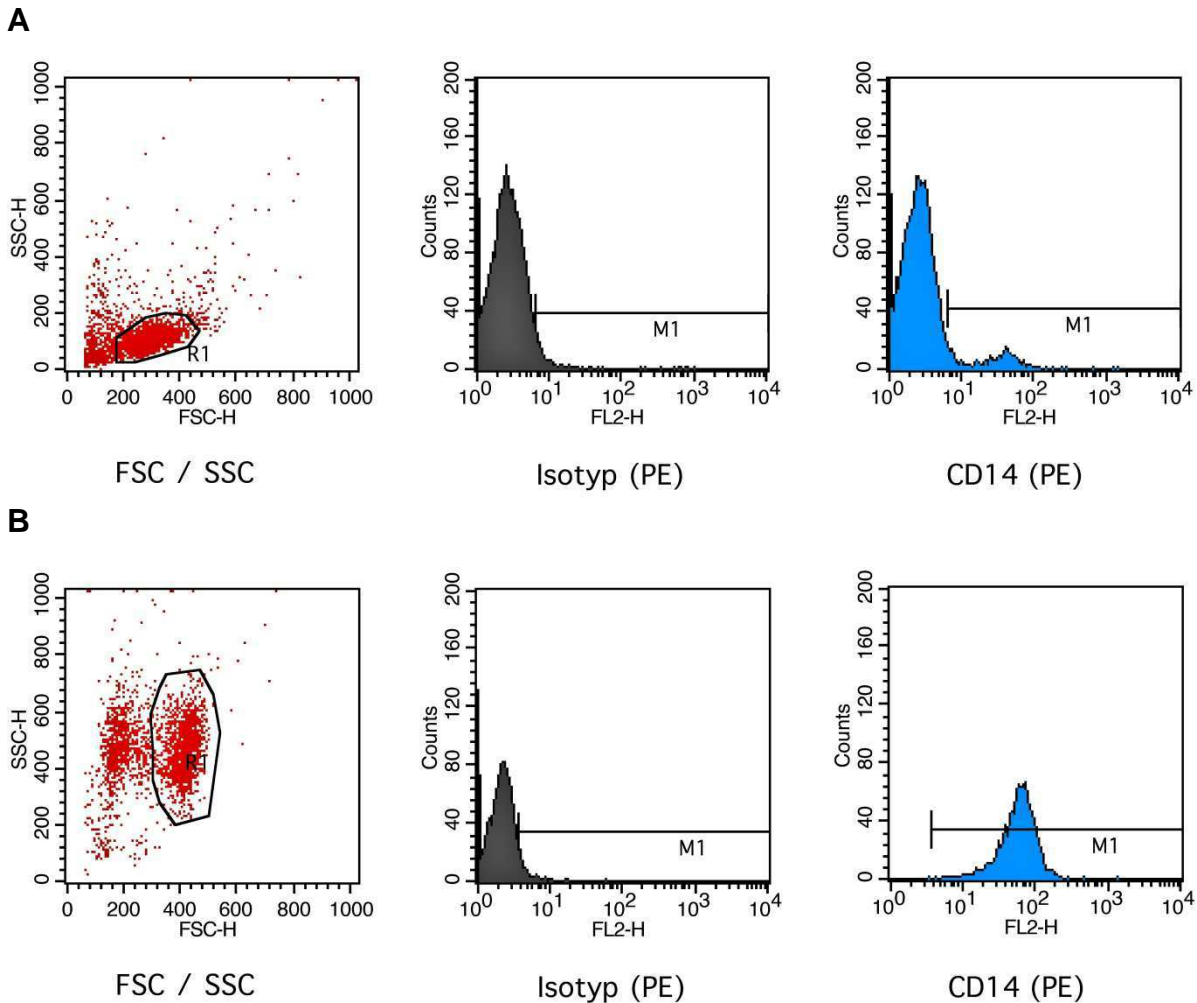


Abbildung 3-1 Durchflusszytometrische Kontrolle der CD14⁺ Zellfraktion

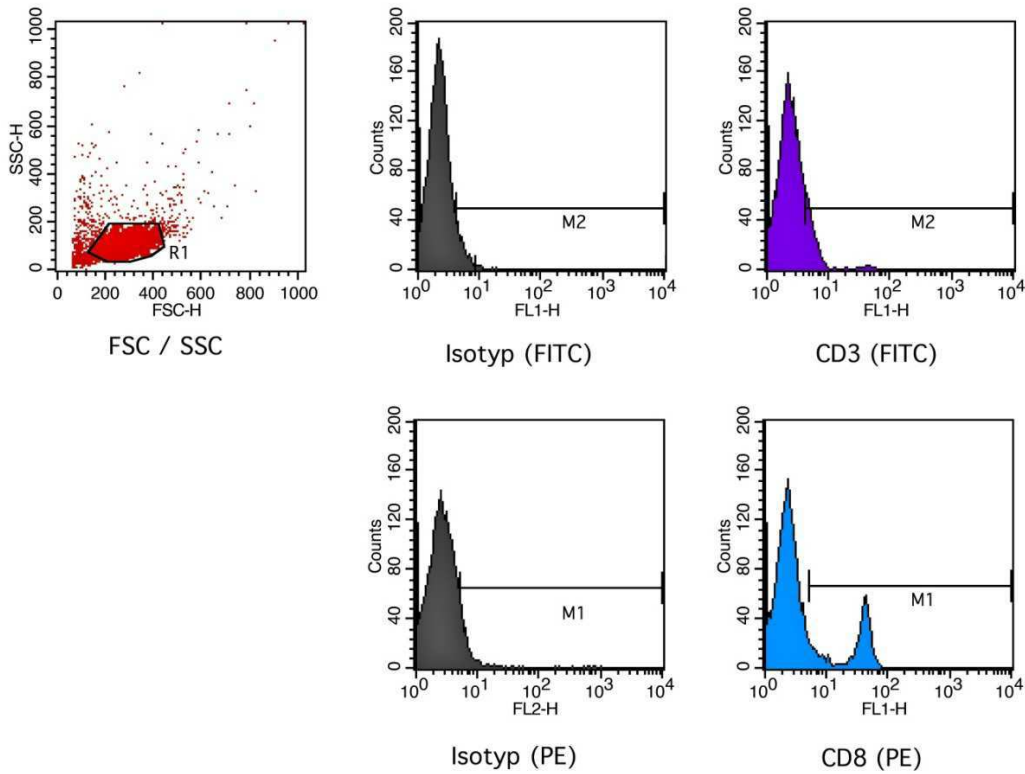
CD14⁺ Zellfraktion vor (A) und nach (B) der Isolierung CD14⁺ Zellen mittels magnetbeladener CD14-Antikörper. Die Darstellung erfolgt als *Dot Plot* mit SSC als Ordinate und FSC als Abszisse, sowie als Histogramm mit Ereigniszahl als Ordinate. Der Analysebereich R1 beinhaltet die bewertete Zellfraktion. Die CD14⁺ Zellfraktion ist definiert als Bereich M1. M1 vor der Selektion: 6,5 %, M1 nach Selektion: > 95 %.

Die obige exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Daten vor und nach Selektion der CD14⁺ Zellfraktion aus PBMC zeigte in der Punktauftragung (*Dot Plot*) des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts eine hinsichtlich Zellgröße, Zellvolumen und Granularität homogenere Zellpopulation nach Isolation der CD14⁺ Zellen. In der Histogrammdarstellung der mit PE markierten CD14-Antikörperfärbung zeigte sich eine deutliche Verschiebung der medianen Fluoreszenzintensität nach der CD14-Selektion: so betrug der Anteil CD14⁺ Zellen vor der Isolation etwa 6,5 %, nach der Selektion mittels magnetbeladener CD14-Antikörper lag die CD14⁺ Zellfraktion bei > 95 %.

3.2.6 Isolierung von CD8⁺-Zellen

CD8⁺ Zellen wurden aus Lymphozyten des peripheren Blutes gesunder, HLA-A*0201⁻ Spender gewonnen. Die Isolierung von CD8⁺-Zellen erfolgte unter Verwendung des MACS CD8⁺ T Cell Isolation Kits, einer LS-Säule und eines MidiMACSTM-Separators. PBMC wurden aus dem Spenderblut isoliert (siehe 3.2.4.1, Seite 31) und gezählt. Die indirekte Markierung und Isolierung der CD8⁺-Zellen erfolgten gemäß den Herstellerangaben. Es handelte sich um eine negative Selektionsmethode, bei der sämtliche CD8⁻ Zellen mit magnetbeladenen Antikörpern markiert wurden. Durch die Koppelung an magnetgebundene Antikörper wurde die CD8⁻ Zellfraktion im Magnetfeld der Säule zurückgehalten. Die unmarkierten Zellen konnten die Säule passieren und stellten die CD8⁺ Zellfraktion dar. Sämtliche Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt; alle Lösungen waren vorgekühlt. Die PBMC wurden gezählt und bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert, das Zellpellet wurde in 40 µL MACS separation Pufferlösung pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Die Pufferlösung bestand aus PBS mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA. Pro 10⁷ Zellen wurden 10 µl des CD8⁺ Biotin - Antikörper - Gemischs zugegeben, sorgfältig durchmischt und für 10 min bei 4 - 8 °C inkubiert. Pro 10⁷ Zellen wurden anschließend 30 µl Pufferlösung und 20 µl Anti - Biotin - MicroBeads zugegeben, sorgfältig durchmischt und wiederum für 15 min bei 4 - 8 °C inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen mit 1 - 2 ml Puffer gewaschen und 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und das Zellpellet in Pufferlösung resuspendiert. Durch Zugabe von Pufferlösung wurde die Zellkonzentration auf 2 x 10⁸ / ml gebracht. Um ein Verstopfen der Säule mit Zellklumpen zu vermeiden wurde die Zellsuspension durch ein 30 µm Nylonsieb gefiltert. Eine LS-Säule wurde im Magnetfeld eines MidiMACSTM-Separators platziert und mit 3 ml Pufferlösung gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und der Durchfluss in einem Falconröhrchen gesammelt. Die Säule wurde dreimal nacheinander mit jeweils 3 ml Pufferlösung gewaschen, der Durchfluss wurde im selben Falconröhrchen wie beim vorhergehenden Arbeitsschritt aufgefangen. Die im Durchfluss enthaltenen Zellen stellten die unmarkierte CD8⁺ Fraktion dar. Die Zellen wurden gezählt und der Reinheitsgrad der Zellfraktion wurde vor Verwendung der Zellen im *in vitro Priming* durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 3-2, Seite 36 zeigt exemplarisch die durchflusszytometrisch ermittelte CD3⁺- und CD8⁺ Zellfraktion vor und nach der Isolation aus PBMC.

A



B

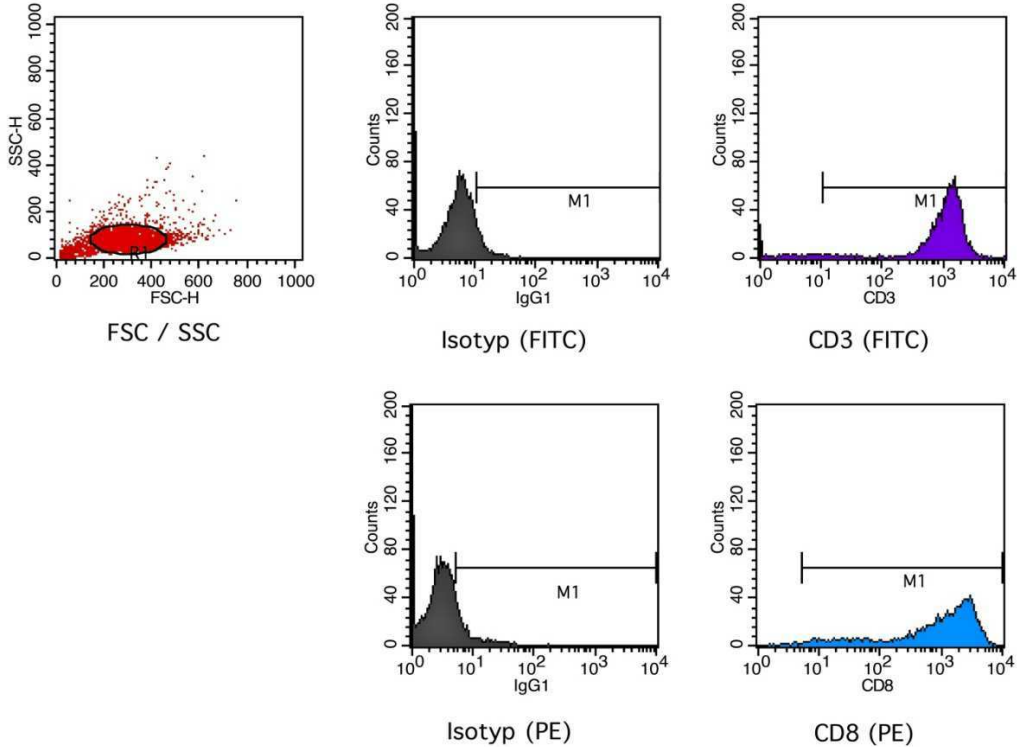


Abbildung 3-2 CD3⁺ und CD8⁺ Zellfraktionen vor und nach CD8⁺ Selektion

CD3⁺ und CD8⁺ Zellfraktion vor (A) und nach (B) Selektion der CD8⁺ Zellen. Die Darstellung erfolgt als *Dot Plot* mit SSC als Ordinate und FSC als Abszisse, sowie als Histogramm mit Ereigniszahl als Ordinate. Der Analysebereich R1 beinhaltet die bewertete Zellfraktion. Die CD3⁺ und CD8⁺ Zellfraktion werden jeweils definiert als Bereich M1. M1 (CD8⁺) vor der Selektion: 17 %, M1 (CD8⁺) nach Selektion: > 96 %.

Vor der CD8-Isolierung betrug die Fraktion der CD8⁺-Zellen in der exemplarischen Darstellung etwa 17 %. Die geringe, deutlich CD8 exprimierende Fraktion war in der Histogrammdarstellung lediglich als minimale Spitze erkennbar. Nach der CD8⁺-Isolierung zeigte sich eine deutliche Verschiebung der CD8⁺ Zellfraktion. Die PE-markierten CD8⁺ Zellen machten nun über 96 % der Gesamtzellzahl aus. Nur hochaufgereinigte CD8⁺ Zellen (Reinheitsgrad > 95 %) wurden für das *in vitro Priming* verwendet.

3.2.7 Herstellung Dendritischer Zellen

Dendritische Zellen wurden aus CD14⁺ Zellen generiert, die aus PBMC gesunder, HLA-A*0201⁺ Spender isoliert wurden (siehe 3.2.4.1, Seite 31 und 3.2.5, Seite 32). Als Kulturmedium wurde X-VIVO 15 mit 1 % humanem AB - Serum, 30 ng / ml IL-4 und 800 U / ml GM - CSF verwendet. Die CD14⁺ Zellen wurden gezählt und auf eine Konzentration von 3×10^5 / ml gebracht. Die Kultivierung erfolgte in einem Volumen von 25 - 30 ml in T75-Zellkulturflaschen, welche bei 37 °C und 5 % CO₂ stehend gelagert wurden. Nach 3 Tagen wurden erneut die oben genannten Zytokine zugegeben. Je nach Zelldichte und pH - Wert des Mediums wurde ein Teil des Mediums erneuert. Nach 5 - 6 Tagen wurde die Ausreifung der Dendritischen Zellen durch Zugabe folgender Zytokinkombination induziert:

Tabelle 3-2: Zytokinkombination zur Reifungsinduktion Dendritischer Zellen

Zytokin	Konzentration
IL-6	1000 U / ml
IL-1β	10 ng / ml
TNFα	10 ng / ml
PGE₂	1 μ g / ml

1 - 2 Tage nach Reifungsinduktion, somit an Tag 8 - 9 der Zellkultur, wurde die Zellmorphologie der Dendritischen Zellen mikroskopisch begutachtet. Reife Dendritische Zellen zeigten sich im Überstand, lagen einzeln vor, waren unregelmäßig geformt und wiesen segelartige Ausläufer sowie multiple Fortsätze auf, siehe

Abbildung 3-3, Seite 38.



Abbildung 3-3 Reife Dendritische Zellen

Darstellung der Phasenkontrastmikroskopie in 10-facher Vergrößerung (Bildausschnitt). Abgebildet wird der ausgereifte Phänotyp Dendritischer Zellen mit segelartigen Ausstülpungen und multiplen Fortsätzen.

Auch das Expressionsprofil der Oberflächenantigene veränderte sich bei der Ausreifung der Dendritischen Zellen. Es kam zu einer vermehrten Expression von MHC-Molekülen, Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Faktoren wie beispielsweise HLA-DR, CD86 und CD83 (Tuyaerts et al. 2007). Diese Oberflächenantigene wurden in der Durchflusszytometrie als Marker für den Reifegrad der DC verwendet. Die Dendritischen Zellen wurden vor Verwendung im allogenen *in vitro Priming* durchflusszytometrisch auf ihren Reifegrad untersucht. Nur ausgereifte Dendritische Zellen wurden für das *Priming* von T-Zellen verwendet.

Abbildung 3-4, Seite 39 stellt exemplarisch die Durchflusszytometrie-Ergebnisse ausgereifter Dendritischer Zellen dar.

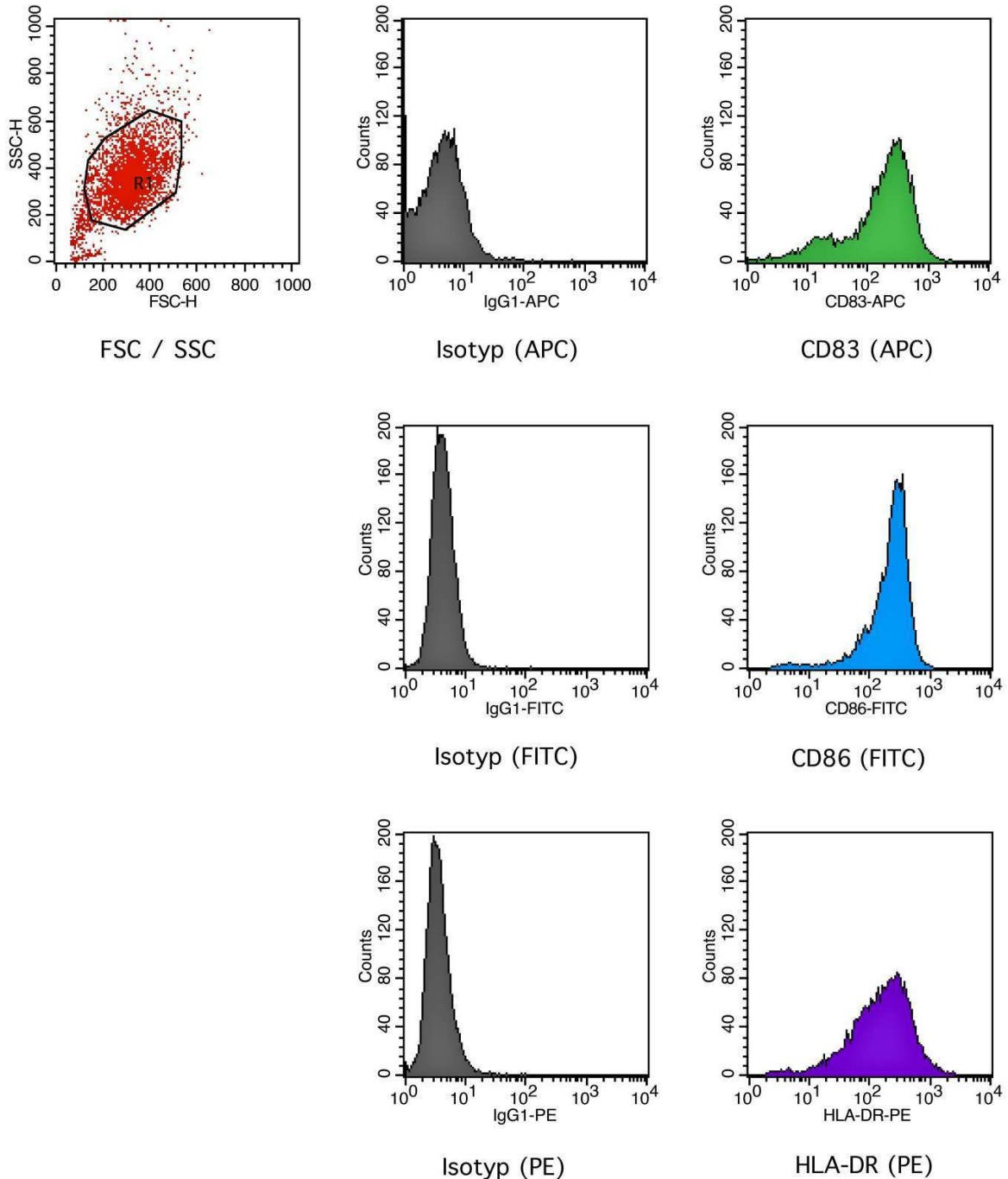


Abbildung 3-4 Durchflusszytometrische Kontrolle des Reifzustands von DC

Darstellung als *Dot Plot* mit SSC als Ordinate und FSC als Abszisse sowie als Histogrammdarstellungen mit Ereigniszahl als Ordinate. Das Analysefenster R1 beinhaltet die bewertete Zellfraktion. Als Reifemarker wurden fluoreszenzmarkierte mAB CD83, CD86 und HLA-DR verwendet. Die deutliche Rechtsverschiebung der mittleren Fluoreszenzintensität bei der Reifemarker-Färbung im Vergleich zu den jeweiligen Isotypen bestätigt den ausgereiften Phänotyp der DC.

In der grafischen Darstellung des Streulichtverhaltens (*Dot Plot*) zeigte sich im Hinblick auf die Zellgröße und Granularität, welche mit dem Wert des Seitwärtsstreulichts (*Side Scatter*, SSC) korrelieren, sowie auf das Zellvolumen, welches mit den Werten des Vorwärtsstreulichts (*Forward Scatter*, FSC) korreliert, eine relativ homogene Zellpopulation.

Die Histogrammdarstellungen der Antikörper-Färbungen gaben Rückschluss auf den Reifezustand der Dendritischen Zellen: in allen drei Färbungen mit den fluoreszenzmarkierten Reife-Markern HLA-DR, CD86 und CD83 ließ sich eine deutliche Rechtsverschiebung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zum jeweiligen Isotyp verzeichnen, was für einen ausgereiften Phänotyp der untersuchten Dendritischen Zellen sprach.

Die reifen DCs wurden mit Peptiden gepulst und zum T-Zell - *Priming* eingesetzt (siehe 3.2.8, Seite 40) oder zur späteren Verwendung eingefroren und in flüssigem Stickstoff konserviert (siehe 3.2.3.5, Seite 30).

3.2.8 Allogene Stimulation von CD8⁺-T-Zellen mit peptidgepulsten DCs

Nachfolgend wird das *in vitro Priming* naiver T-Zellen mit allogenen, peptidgepulsten DCs beschrieben. CD8⁺-T-Zellen wurden aus PBMC gesunder, HLA-A*0201⁻ Spender isoliert (siehe 3.2.6, Seite 35). Dendritische Zellen wurden aus CD14⁺ Zellen gesunder, HLA-A*0201⁺ Spender generiert (siehe 3.2.5, Seite 32 und 3.2.7, Seite 37). Als Medium wurde AIMV mit 5 % Humanserum, 1 % P/S und 1 % Glutamin verwendet. Zunächst wurden die DC mit den entsprechenden HLA-A*0201-bindenden, cALL-spezifischen Peptiden inkubiert (Pulsen); hierfür wurden pro 5×10^6 DC 5 µg des jeweiligen Peptids sowie 20 µg / ml β2-Mikroglobulin und 295 µl Medium zugegeben. Die Zellen wurden 4 Stunden bei 37 °C inkubiert, wobei die Mischung alle 20 min kurz mittels eines Vortexgeräts aufgeschüttelt wurde. Nach der Inkubation wurden die DC dreimal mit Medium gewaschen um ungebundene Peptide zu entfernen und anschließend mit 35 Gy bestrahlt. Die DC wurden in einer Konzentration von 5×10^3 pro *well* auf eine 96-*well*-Rundbodenplatte aufgebracht. Die CD8⁺-T-Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 pro *well* dazugegeben. Somit lagen die stimulierenden DC im Verhältnis 1 : 20 zu den T-Zellen vor. Das Gesamtvolumen pro *well* betrug 200 µl Medium. Weiterhin wurden 1000 U / ml IL-6 und 10 ng / ml IL-7 als Wachstumsfaktoren hinzugegeben. Die Zellen wurden für 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Restimulation der T-Zellen: von den 96-*well*-Platten wurden 100 µl Überstand pro *well* abgenommen. Frische DC wurden wie oben beschrieben gepulst und bestrahlt und in 100 µl Medium pro *well* auf die 96-*well*-Platten gegeben. 100 U / ml IL-2 und 5 ng / ml IL-7 wurden hinzugefügt. Die Zellen wurden weitere 7 Tage unter oben genannten Bedingungen inkubiert. Bei erkennbarem Farbumschlag des Mediums erfolgte ein Austausch von 100 µl des Mediums unter Hinzugabe der entsprechenden Zytokinmengen. 7 Tage nach der Restimulation, also an Tag 14 der Zellkultur, wurden die T-Zellen für die Pentamerfärbung geerntet (siehe 3.2.11, Seite 43).

3.2.9 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine Methode, mit der Zellmembranen permeabel gemacht werden um die Einschleusung von DNA in die Zelle zu ermöglichen. Bei prokaryotischen Zellen wird dieser Vorgang als Transformation, bei eukaryotischen Zellen als Transfektion bezeichnet. Durch einen sich entladenden Kondensator wird kurzzeitig ein elektrisches Feld erzeugt, welches zu einer Umkehrung des Membranpotenzials einer Zelle und dabei zur kurzfristigen Aufnahme von Molekülen aus der unmittelbaren Zellumgebung führen kann. Dadurch kann Fremd-DNA in die Zelle eingebracht werden. In dieser Arbeit wurde die Methode der Elektroporation zur Transfektion von Cos-7-Zellen verwendet, welche sich sehr gut für Transfektionsexperimente eignen. Cos-7-Zellen wurden in den 1960er Jahren aus den Nieren grüner Meerkatzen isoliert und ähneln Fibroblasten. Für die Elektroporation wurden zunächst je 1,4 ml DMEM-Medium pro *well* in 6-*well*-Platten vorgelegt und die Platten bei 37 °C / 5 % CO₂ präinkubiert. Die adhärennten Cos-7-Zellen wurden von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst (siehe 3.2.3.3, Seite 30), mit PBS gewaschen und gezählt. Pro Ansatz wurden 1×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei 1500 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl Nucleofector[®]-Lösung pro Ansatz resuspendiert. Hierbei war aufgrund der Zelltoxizität der Lösung eine Inkubationszeit über 15 min zu vermeiden. Pro Ansatz wurden 5 µg DNA auf die Zellsuspension gegeben. In dieser Arbeit wurden die Cos-7 Zellen mit jeweils 2,5 µg HLA-A*0201 und 2,5 µg Antigen-cDNA transfiziert. Die verwendeten Antigene waren die zu testenden Peptidantigene LILRA2-30 und STK32B-186 sowie GFP (*green fluorescent protein*, grün fluoreszierendes Protein) als irrelevantes Antigen der Negativkontrolle. Die Zell / DNA-Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette überführt, wobei es galt, die Entstehung von Blasen zu vermeiden. Die Küvette wurde im Elektroporator positioniert und das Programm W-001 (110 V, 20 msec, *square wave*) im GenePulser Xcell™ Elektroporator gestartet. Nach Ende des Programms wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur in der Küvette inkubiert. Anschließend wurden 500 µl vorgewärmtes DMEM-Medium in die Küvette gegeben und die Zellsuspension unter gleichmäßigem, vorsichtigem Tropfen in die vorbereiteten 6-*well*-Platten überführt, sodass das Gesamtvolumen pro *well* 1,9 ml Medium betrug. Die Zellen wurden bis zur Analyse, welche spätestens am Folgetag stattfand, bei 37 °C / 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode mit der Zellen anhand morphologischer Kriterien charakterisiert und zelluläre Expressionsmuster von Oberflächenantigenen mittels Fluorophor-gekoppelter Antikörper bestimmt werden können. Grundlage des Verfahrens ist

die Emission optischer Signale einer Zelle nach Anregung beim Passieren eines Laserstrahls. Hierbei wird eine Zellsuspension in eine Kapillare gesaugt und passiert einzeln einen fokussierten Laserstrahl, der die Zellen anregt. Das von der Zelle emittierte Streulicht und, sofern fluorphorgekoppelte Antikörper gebunden sind, das emittierte Fluoreszenzlicht werden separat gemessen und geben Aufschluss über bestimmte Charakteristika der Zelle. Das emittierte Streulicht steht in Wechselwirkung mit der Größe und Komplexität der Zelle, so korreliert das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) mit dem Volumen der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) wird durch die Größe, Struktur und Menge der Zellorganellen beeinflusst und ist somit ein Maß für die Granularität der Zelle. Werden die Zellen vor der Messung mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern angefärbt, so lassen sich durch die Analyse des emittierten Fluoreszenzlichts Aussagen über vorhandene Oberflächenmerkmale treffen. Diese Methode wurde in dieser Arbeit zur Charakterisierung spezifischer CTL-Klone verwendet, um Phänotyp, Differenzierungsstadium und T-Zell-Subpopulation der untersuchten Zellen zu analysieren. Hierfür wurde eine Reihe von Fluorophor-gekoppelten Antikörpern zur Färbung der Zellen eingesetzt, siehe Tabelle 3-3, Seite 42.

Tabelle 3-3 getestete T-Zell-Oberflächenantigene zur Charakterisierung des Immunphänotyps

Oberflächenantigen	Funktion	Vorkommen
CCR5 (CD195)	Chemokinrezeptor 5	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen
CCR7 (CD197)	Chemokinrezeptor CCR7	T-Subset, DC-Subgruppen
CD25	IL2-Rezeptor- α -Kette	aktivierte B- und T-Zellen, aktivierte Monzyten, NK-Zellen
CD27	Ligand für CD70	T-Subgruppen, B-Subgruppen
CD28	T-Zell-Kostimulation, Signal-TX, CD80/CD86-Ligand	T-Zellen, Plasmazellen
CD45Ra	Fibronectin Typ II	B-Zellen, naive T-Zellen, Monozyten
CD56	NKH-1, N-CAM	NK-Zellen, aktivierte T-Zellen
CD62L	L-Selektin, Adhäsionsmolekül	Endothel, Leukozyten, Thrombozyten
CD69	activation induction molecule	aktivierte T- und B-Zellen, aktivierte Makrophagen und NK-Zellen
CD8	MHCI-Ligand	v.a. zytotoxische T-Zellen
CD95	Fas, bindet Fas-Liganden, induziert Apoptose	aktivierte Lymphozyten, aktivierte NK-Zellen
IL7-Ra	Interleukin7-Rezeptor	u.a. naive und memory-T-Zellen

Durch den Einsatz verschiedenfarbiger Laser und Filter kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe pro Messung und somit die Informationsdichte erhöht werden. Einige Durchflusszytometriegeräte erlauben neben der Messung auch eine Sortierung der Zellen in verschiedene Reagenzgefäße. Hierdurch lassen sich Zellen mit bestimmten Fluoreszenzeigenschaften aus der Gesamtmenge der Zellen isolieren. Dieses Verfahren wurde zur Isolierung spezifischer T-Zellen nach Anfärbung mit einem peptidspezifischen fluoreszenzmarkierten HLA-Pentamer verwendet (siehe 3.2.11, Seite 43).

Pro Probe wurden $2 - 5 \times 10^5$ Zellen verwendet. Nach dem Waschen mit 1 ml Färbepuffer (Zentrifugation bei $500 \times g$ für 5 min bei 4°C) wurden die Zellen in jeweils 40 μl Puffer resuspendiert und in 96-well-Platten gegeben. Um unspezifische Bindungen zu verhindern erfolgte ein Block mit 100 μg / ml humanem IgG für 20 min unter Lichtabschluss. Nach dem IgG-Block wurden die Zellen erneut mit Färbepuffer gewaschen und pro Probe in 100 μl Färbepuffer resuspendiert. Es wurden jeweils 5 μl des entsprechenden Antikörpers hinzugefügt. Pro Versuchsansatz blieb eine Probe ungefärbt, um die korrekten Einstellungen für *Forward Scatter* (FSC) und *Sideward Scatter* (SSC) am FACS-Gerät durchzuführen. Eine weitere Probe pro Versuchsansatz wurde mit den Isotypkontrollen der verwendeten Fluoreszenzantikörper angefärbt, um die korrekten Parameter am FACS-Gerät zur Fluoreszenzmesung einzustellen. Unmittelbar nach der Färbung wurden die Zellen für 30 min unter Lichtabschluss auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Färbepuffer wurden die Zellen in 200 μl PBS resuspendiert, sofern die Auswertung am FACS-Gerät unmittelbar im Anschluss erfolgte. Sollten die Zellen vor der Auswertung länger als 2 Stunden aufbewahrt werden, so erfolgte eine Fixierung in 200 μl PBS / 1 % PFA (Paraformaldehyd).

3.2.11 Sortierung der Zellen mittels Pentamerfärbung

Nach Abschluss des *in vitro Priming* (siehe 3.2.8, Seite 40) wurden die T-Zellen geerntet. Die Färbung für die Durchflusszytometrie erfolgte mittels ProImmune Pro5[®] Recombinant MHC Pentamer sowie fluoreszenzmarkierten anti-CD8 Antikörpern. Die verwendeten Pentamere bestehen aus fünf MHC-Peptidkomplexen, mit denen sie an passende T-Zell-Rezeptoren (TCR) binden können und beinhalten Strukturen, die sich mit Fluorophoren koppeln lassen, siehe Abbildung 3-5, Seite 44. Die Pentamere wurden speziell für die zu untersuchenden Peptidantigene angefertigt, somit ermöglichten sie eine spezifische Bindung der gesuchten T-Zellen an die Zielepitope und boten die Möglichkeit, den geringen Anteil antigenspezifischer T-Zellen aus der Menge an unspezifischen alloreaktiven T-Zellen zu identifizieren.

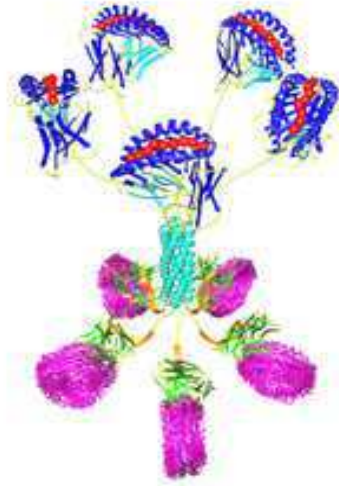


Abbildung 3-5 Pro5 MHC I Pentamer
(aus: http://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=pentamer_info)

5 MHC-Peptidkomplexe (blau, oben im Bild) gekoppelt mit 5 Fluorophoren (rosa, unten im Bild).

Sämtliche Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben auf Eis gekühlt, das Pentamer wurde stets lichtgeschützt aufbewahrt. Die T-Zellen wurden gewaschen und gezählt. Jeder Ansatz bestand aus 4 Proben (siehe Tabelle 3-4, Seite 37). Das Pro5® Pentamer wurde in einer gekühlten Zentrifuge für 3 min bei 14.000 x g zentrifugiert um Proteinaggregate zu entfernen, die zu unspezifischen Färbungen führen können. Die T-Zellen wurden mit Färbepuffer (PBS mit 0,1 % BSA und 0,1 % Natriumazid) gewaschen, in einer gekühlten Zentrifuge für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und nach Abnahme des Überstands im Residualvolumen (ca. 50 µl) resuspendiert. 2 – 3 µl unmarkiertes Pentamer pro $2 - 5 \times 10^5$ T-Zellen wurden dazugegeben und sorgfältig vermischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte ein Waschvorgang wie oben beschrieben. Die Zellen wurden erneut im Residualvolumen resuspendiert. Anschließend wurden pro Probe 8 µl Pro5® Fluorotag pro $2 - 5 \times 10^5$ T-Zellen sowie die jeweiligen Sekundärantikörper (5 µl pro Probe) hinzugegeben. Bei der Verwendung von bereits mit PE gekoppeltem Pentamer entfiel die Zugabe von Fluorotag.

Tabelle 3-4 Färbeschema Pentamer-Sortierung

Probe	FITC	PE	Zellzahl
Ungefärbt	-	-	$2 - 5 \times 10^5$
Kompensation 1	CD 8	-	$2 - 5 \times 10^5$
Kompensation 2		CD 8	$2 - 5 \times 10^5$
Zu sortierende Zellen	n (CD 8)	n (Pentamer)	n ($2 - 5 \times 10^5$)

Die Proben wurden unter Lichtabschluss für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten 2 Waschvorgänge mit je 2 ml Färbepuffer pro $2 - 5 \times 10^5$ Zellen wie oben beschrieben. Die Zellen wurden in 200 μ l PBS pro Probe resuspendiert und sorgfältig vermischt. Bis zur Sortierung wurden die Zellen auf Eis und lichtgeschützt gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung in der Durchflusszytometrie wurde jeder Probe 20 μ l Propidium-Iodid (Arbeitskonzentration: 1 μ g / ml) zur Diskriminierung toter Zellen im FACS zugegeben. Die durchflusszytometrische Analyse und Sortierung der Zellen wurde in der Durchflusszytometrieabteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München an einem BD FACSAria durchgeführt. Ziel war die Isolierung antigenspezifischer T-Zellen, die doppelt positiv für CD8 und Pentamer-PE waren. Die spezifischen doppelt positiven T-Zellen wurden in separaten Reaktionsgefäßen gesammelt und bis zur weiteren Verwendung in 1 – 2 ml humanem Serum (männlich, Blutgruppe AB) aufbewahrt. Sie wurden im Anschluss durch *Limiting Dilution* kloniert und expandiert (siehe 3.2.12, Seite 45).

3.2.12 *Limiting Dilution* – Klonierung der T-Zellen

Nachdem die spezifischen T-Zellen durch Pentamerfärbung und anschließende Sortierung identifiziert wurden (siehe 3.2.11, Seite 43), wurden die Zellen mittels *Limiting Dilution* kloniert. Hierbei wurden die Zellen in einer entsprechenden Verdünnung auf 96-*well*-Platten aufgebracht, sodass statistisch eine bestimmte Anzahl von T-Zell-Klonen pro *well* vorhanden waren. Die Zellen wurden gezählt und so verdünnt, dass statistisch 1, 3, 5 oder 10 T-Zell-Klone pro *well* vorlagen. Das Gesamtvolumen pro *well* betrug bei jeder Zellkonzentration 200 μ l, als Medium wurde T-Zell-Medium (RPMI + 10 % Humanserum + 1 % Penicillin / Streptomycin + 1 % Glutamin) verwendet. Die Klonierung erfolgte in Anwesenheit von Stimulatorzellen, die zuvor bestrahlt worden waren: LCL (EBV-transformierte B-Zellen, bestrahlt mit 100 Gy, 1×10^5 / *well*) sowie allogene Pool-PBMC (von 3 verschiedenen Spendern, siehe 3.2.4.3, Seite 32; bestrahlt mit 30 Gy, 5×10^4 / *well*). Weiterhin wurden 30 ng / ml anti-CD3, 50 U / ml IL-2 und 2 ng / ml IL-15 zugegeben. Nach 7 Tagen wurden 100 μ l Medium pro *well* sowie IL-2 und IL-15 erneuert. An Tag 13 - 14 der Zellkultur wurden die Klone im ELISpot auf ihre Spezifität getestet (siehe 3.2.13, Seite 46). Spezifische Klone wurden weiterexpandiert (siehe 3.2.14, Seite 49).

3.2.13 ELISpot

Der ELISpot Assay (*Enzyme Linked Immuno Spot Assay*) ist eine Methode mit der Zytokine oder Antikörper, die von einzelnen Immunzellen nach Stimulation ausgeschüttet werden, nachgewiesen werden können (Czerkinsky et al. 1983). Die Technik basiert auf dem ELISA Assay (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Zunächst wird die Membran der ELISpot-Platten mit einem immobilisierten Fang-Antikörper (*Capture- oder Coating - Antikörper*) beschichtet. Nach Blockieren unspezifischer Proteinbindungsstellen der Membran werden die sezernierenden Effektorzellen zusammen mit den zu untersuchenden Zielzellen auf die Platten aufgebracht. Die Effektorzellen werden durch den Kontakt mit den Zielzellen aktiviert und sezernieren Proteine, welche an den immobilisierten

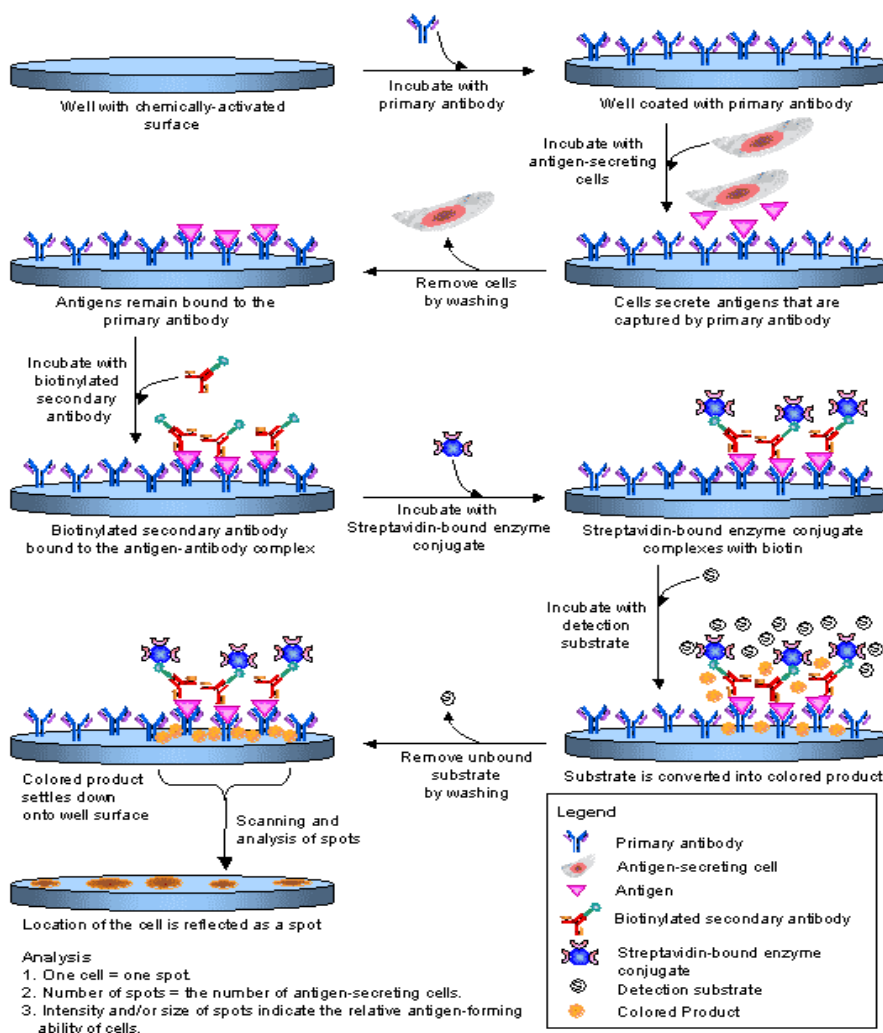


Abbildung 3-6 ELISpot Assay

(nach: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-peptides/learning-center/elispot-assay.html>)

Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte und des Reaktionsgeschehens beim ELISpot-Assay.

Capture-Antikörper binden. Die Detektion erfolgt über selektive Bindung eines zweiten, biotinylierten Antikörpers, gefolgt von der Bindung eines Streptavidins mit gekoppeltem Reporterenzym, das einen Farbstoff an der Sekretionsstelle umsetzt. Die sezernierten Produkte werden als farbige Punkte (*Spots*) auf den Platten sichtbar und können mit einem ELISpot-Lesegerät ausgewertet werden. Hierbei wird jedes *well* mit einer im Lesegerät installierten Kamera abfotografiert, anschließend werden Anzahl, Verteilung und Morphologie der Spots mit Hilfe einer speziellen Software ausgewertet.

3.2.13.1 Interferon γ -ELISpot

Ein ELISpot-Assay dauert 3 Tage. Am ersten Tag wurde der *Capture*-Antikörper 1-D1K auf die ELISpot-96-*well*-Platten aufgebracht. Dieser Antikörper bindet sowohl am Boden der Platte als auch später an das Antigen der Probe. 1-D1K wurde in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ in einem Gesamtvolumen von 50 μl PBS pro *well* auf die Platten pipettiert. Die Platten wurden bei 4 $^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert. Am zweiten Versuchstag wurden die Platten zunächst viermal mit jeweils 200 μl sterilem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte ein Block mit T-Zell-Medium, um unspezifische Bindungen zu verhindern. 150 μl T-Zell-Medium / *well* wurden auf die Platten aufgebracht und für 60 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die T-Zellen (Effektorzellen) und die Zielzellen vorbereitet. Die T-Zellen wurden gewaschen, gezählt und in einer Konzentration von 1000 Zellen / *well* in je 50 μl T-Zell-Medium auf die Platten aufgebracht. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$. Als Zielzellen wurden Tumorzelllinien und T2-Zellen verwendet. T2-Zellen wurden zuvor mindestens 2 Stunden mit den zu testenden Peptiden gepulst, hierfür wurden sie bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und alle 30 min aufgeschüttelt. Vor dem Aufbringen auf die Platten wurden die T2-Zellen gezählt und dreimal gewaschen. Den Tumorzelllinien wurde 48 h vor Verwendung im Experiment 100 U / ml Interferon γ zugegeben um ihre HLA Klasse-I Expression zu steigern, siehe 3.2.16, Seite 51. Die Zellen wurden ebenfalls gezählt und einmal gewaschen. Nach Ende der dreißigminütigen Inkubationszeit der T-Zellen wurden die Zielzellen in einem Verhältnis von 20 : 1 zu den Effektorzellen (pro *well* 20.000 Zielzellen und 1000 T-Zellen) in 50 μl T-Zell-Medium / *well* auf die Platten aufgebracht. Hierbei war auf ein langsames und vorsichtiges Pipettieren zu achten, um ein Auseinandertreiben des auf der Membran haftenden Antigens zu vermeiden. Die Platten wurden für 20 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am dritten Tag wurden die Platten 6 x mit Waschpuffer (PBS / 0,05 % Tween) gewaschen. Anschließend wurde der Detektions-Antikörper 7-B6-1 (biotinyliert) in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ in 200 μl PBS / 0,5 % PSA pro *well* auf die Platten gegeben. Es folgte eine Inkubation von 2 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$. Die Platten wurden erneut 6 x mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Streptavidin-Horse Radish-Peroxidase

(1 / 1000 verdünnt) in 200 µl PBS / 0,5 % BSA pro *well* auf die Platten gegeben. Die Platten wurden anschließend 2 h lang unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Entwicklerlösung (siehe 3.1.8.2, Seite 25) vorbereitet und durch einen 0,45 µm Nylon-Filter filtriert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer, anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Unmittelbar vor Verwendung der Entwicklerlösung wurden dieser 3 µl 30 % H₂O₂ / ml hinzugefügt. 100 µl Entwicklerlösung pro *well* wurden auf die Platten aufgebracht. Die Reaktion wurde gestoppt, sobald makroskopisch Farbpunkte (Spots) in den *wells* sichtbar wurden, was in der Regel nach 4 - 10 min der Fall war. Nach einer maximalen Reaktionszeit von 12 min wurde die Reaktion in jedem Fall beendet, auch wenn keine Spots erkennbar waren. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Platten unter fließendem Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die ELISpot-Platten im ELISpot-Lesegerät ausgewertet. T-Zell-Klone, die eine spezifische Interferon γ -Ausschüttung vorwiesen, wurden weiterexpandiert (siehe 3.2.14, Seite 49).

3.2.13.2 Granzym B-ELISpot

Die Arbeitsschritte zur Durchführung eines Granzym B ELI-Spots stimmen grundsätzlich mit denen des Interferon γ -Elispots überein. Jedoch unterscheiden sich die verwendeten Antikörper. Beim Granzym B-ELISpot wurde als Fang-Antikörper GB10 (10 µg / ml) verwendet, als Detektions-Antikörper kam GB11 (biotinyliert, 2 µg / ml) zum Einsatz. Weiterhin war das Verhältnis T-Zellen zu Zielzellen beim Granzym B-ELISpot nicht konstant, vielmehr wurde die Anzahl der T-Zellen pro *well* titriert, wohingegen die Anzahl der Zielzellen konstant bei 20.000 / *well* blieb. Die Titrationsreihe beinhaltete T-Zell- / Zielzell-Verhältnisse von 10 : 1 bis 0,15625 : 1, siehe Tabelle 3-5. Zusätzlich wurden in einigen *wells* nur T-Zellen ohne Zielzellen vorgelegt, um eine unspezifische Zytokinfreisetzung der T-Zellen ohne Kontakt mit Zielzellen zu detektieren.

Tabelle 3-5 Titrationsschema Effektorzellen : Zielzellen im Granzym B-ELISpot

Verhältnis T-Zellen : Targetzellen								
	10:1	5:1	2,5:1	1,25:1	0,625:1	0,3125:1	0,15625:1	leer
Anzahl der T-Zellen	100.000	50.000	25.000	12.500	6250	3125	1562	100.000
Anzahl der Targetzellen	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	-

3.2.14 Expansion spezifischer T-Zellen

T-Zell-Klone, die im ELISpot ein spezifisches Reaktionsmuster gezeigt hatten, wurden in kleinen Zellkulturflaschen (T25, 25 cm²) weiterexpandiert. Pro Klon wurden 5×10^4 bis 1×10^5 T-Zellen in 25 ml T-Zell-Medium (RPMI + 10 % Humanserum + 1 % Penicillin / Streptomycin + 1 % Glutamin) in Anwesenheit von $2,5 \times 10^7$ Pool-PBMC (bestrahlt mit 30 Gy) und 5×10^7 LCL (bestrahlt mit 100 Gy) pro Flasche als Stimulatorzellen in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Am folgenden Tag wurden 30 ng / ml anti-CD3, 50 U / ml IL-2 und 2 ng / ml IL-15 hinzugefügt. IL-2 sowie IL-15 wurden alle 2 Tage hinzugegeben, ein Mediumwechsel von ca. 14 ml / Flasche erfolgte bei sichtbarem Farbumschlag des vorhandenen Mediums. Nach 10 – 14 Tagen Zellkultur wurden die T-Zellen entweder direkt für weitere ELISpot-Versuche verwendet oder in Portionen zu 1×10^6 in jeweils 100 μ l T-Zell-Einfriermedium (90 % Humanserum, 10 % DMSO) kryokonserviert (siehe 3.2.3.5, Seite 30).

3.2.15 V β -Analyse des T-Zell-Rezeptor Repertoires

T-Zell-Klone wurden mittels *Limiting-Dilution* Klonierung generiert (siehe 3.2.12, Seite 45).

Um festzustellen, ob es sich bei einem T-Zell-Klon nicht nur statistisch, sondern auch tatsächlich um eine Einzelzellklonierung handelte, wurde eine V β -Analyse des T-Zell-Rezeptor Repertoires des betreffenden Klons durchgeführt. Hierfür wurde das IOTest[®] Beta Mark TCR V β Repertoire Kit verwendet. Mithilfe dieses Kits kann das TCR V β -Repertoire humaner T-Lymphozyten durchflusszytometrisch ermittelt werden. Das Kit enthält 8 Fläschchen. Jedes Fläschchen enthält eine Lösung mit drei monoklonalen Antikörpern (mAB). Ein Antikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt, der zweite mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE, der dritte ist mit einer ausbalancierten Mischung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe FITC und PE gekoppelt (siehe

Tabelle 3-6, Seite 50). Aufgrund der Tatsache, dass sich V β -Ausprägungen in einander gegenseitig ausschließende Kombinationen gruppieren lassen, können 3 V β -Familien mit der mAB-Kombination eines Fläschchens nachgewiesen werden. Somit erlaubt der Inhalt der 8 Fläschchen die Analyse von 24 verschiedenen V β -Ausprägungen, was etwa 70 % des normalen humanen TCR V β -Repertoires abdeckt. Infolgedessen wird die Anzahl der für die Testung notwendigen Zellen sowie der Zeitaufwand reduziert.

Tabelle 3-6 V β Familien und entsprechende Fluoreszenzfarbstoffe im IOTest® BetaMark Kit

Fläschchen	V β	Fluoreszenzfarbstoff
A	V β 5.3	PE
	V β 7.1	PE + FITC
	V β 3	FITC
B	V β 9	PE
	V β 17	PE + FITC
	V β 16	FITC
C	V β 18	PE
	V β 5.1	PE + FITC
	V β 20	FITC
D	V β 13.1	PE
	V β 13.6	PE + FITC
	V β 8	FITC
E	V β 5.2	PE
	V β 2	PE + FITC
	V β 12	FITC
F	V β 23	PE
	V β 1	PE + FITC
	V β 21.3	FITC
G	V β 11	PE
	V β 22	PE + FITC
	V β 14	FITC
H	V β 13.2	PE
	V β 4	PE + FITC
	V β 7.2	FITC

Das Färbeprotokoll entsprach dem unter 3.2.10, Seite 41 beschriebenen Verfahren. Für jeden Versuchsansatz wurden 10 Probenröhrchen benötigt. Jedes Röhrchen enthielt 2 - 5 x 10⁵ T-Zellen. Die Reagenzien des IOTest® Beta Mark Kits wurden wie in Tabelle 3-7 beschrieben auf die einzelnen Röhrchen verteilt:

Tabelle 3-7 Reagenzienkombinationen für TCR V β Analyse

Teströhrchen	Reagenzien
Kontrolle 1	20 μ l aus Fläschchen A + 10 μ l aus Fläschchen mit IgG1 PC5
Kontrolle 2	10 μ l aus Fläschchen mit CD3-PC5
Test A	20 μ l aus Fläschchen A + 10 μ l aus Fläschchen mit CD3-PC5
Test B	20 μ l aus Fläschchen B + 10 μ l aus Fläschchen mit CD3-PC5
Test C	20 μ l aus Fläschchen C + 10 μ l aus Fläschchen mit CD3-PC5
Test D	20 μ l aus Fläschchen D + 10 μ l aus Fläschchen mit CD3-PC5
Test E	20 μ l aus Fläschchen E + 10 μ l aus Fläschchen mit CD3-PC5
Test F	20 μ l aus Fläschchen F + 10 μ l aus Fläschchen mit CD3-PC5
Test G	20 μ l aus Fläschchen G + 10 μ l aus Fläschchen mit CD3-PC5
Test H	20 μ l aus Fläschchen H + 10 μ l aus Fläschchen mit CD3-PC5

3.2.16 Hochregulierung der HLA-Expression in Tumorzelllinien durch Interferon γ

HLA-Moleküle (*Human leukocyte antigen*, humanes Leukozytenantigen) präsentieren aufbereitete Antigene auf ihrer Zelloberfläche und sind für die Antigenerkennung durch T-Zellen erforderlich. Somit sind HLA-Klasse I Moleküle für die Erkennung von Tumorzellen durch tumorspezifische CTL ein essentieller Faktor, insbesondere da tumorspezifische Antigene meist intrazelluläre Proteine sind, die mit Hilfe von membrangebundenen HLA-Klasse I Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden. Eine fehlende oder nur geringfügige Ausprägung von HLA-Klasse I Molekülen, beispielsweise durch einen Verlust oder eine Herunterregulierung der HLA-Expression kann somit dazu führen, dass Tumoren von T-Zellen nicht erkannt werden und folglich deren immunologischer Überwachungsfunktion entgehen. Ein derartiger Verlust oder eine Herunterregulierung von HLA-Klasse I Molekülen kann beispielsweise durch Abwesenheit von Beta2-Mikroglobulin, TAP-Defizienz, Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*), sowie strukturelle Genmutationen verursacht werden (Masuda et al. 2007). Wenn die geringe oder fehlende HLA-Klasse I Expression nicht auf Verlust essentieller Genfunktionen sondern auf Herunterregulation der Transkription beruht, kann die HLA-Klasse I Expression der Zelllinien durch Zugabe von Interferon γ induziert werden (Chang et al. 1992). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit den Tumorzelllinien zur Verstärkung der HLA-Klasse I Expression 48 Stunden vor Verwendung im ELISpot-Assay 100 U / ml Interferon γ ins Zellkulturmedium zugegeben.

4 Ergebnisse

4.1 HLA-A*0201 Peptidbindungstest

Die Bindungsfähigkeit der HLA-A*0201 spezifischen Zielepitope wurde zunächst durch *in silico*-Berechnung vorhergesagt. Um die Bindungsfähigkeit *in vitro* zu verifizieren wurden T2-Zellen mit dem jeweiligen Peptid inkubiert (gepulst) und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle wurde das Influenza-Peptid (GILGFVFL) verwendet, welches eine hohe HLA-A*0201-Bindungsaffinität aufweist. Als Negativkontrolle dienten T2-Zellen ohne Peptid, die HLA-A*0201 in geringem Ausmaß exprimieren. Abbildung 4-1 zeigt die Fluoreszenzintensität der mit HLA-A2-Antikörper markierten T2-Zellen der Negativkontrolle sowie der mit 50 μM bzw. 100 μM Influenza-Peptid inkubierten T2-Zellen der Positivkontrolle.

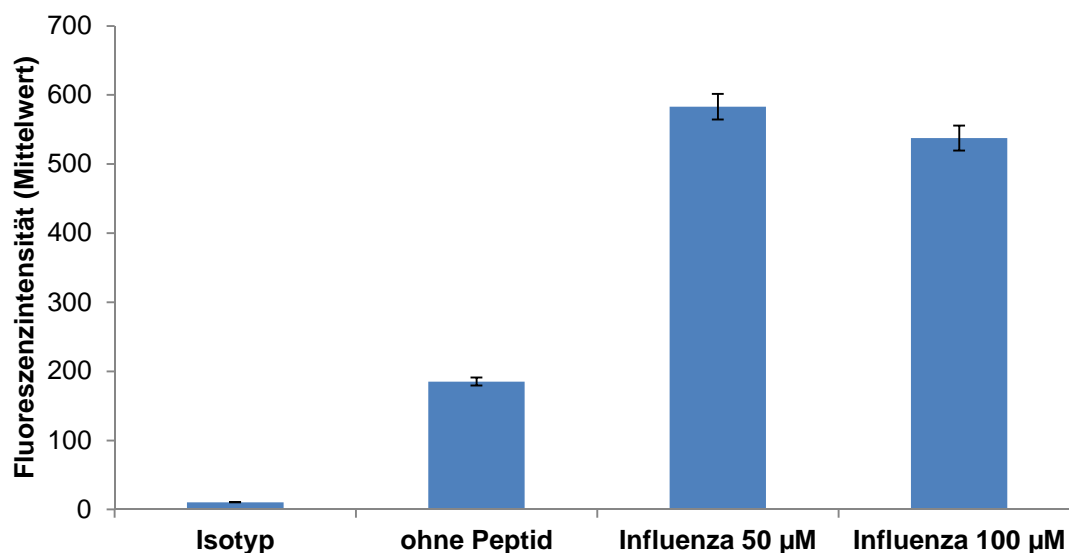


Abbildung 4-1 Bindungsaffinität des Influenzapeptids an HLA-A*0201

Die Bindungsaffinität des Influenzapeptids wird dargestellt durch die Höhe der Fluoreszenzintensität nach Anfärbung mit einem HLA-A*0201-spezifischen Antikörper, welche mit der Höhe der HLA-A*0201-Expression und folglich der Bindungsaffinität korreliert.

Dargestellt wird die Fluoreszenzintensität der HLA-A*0201-Isotypen, von T2-Zellen ohne Peptid sowie T2-Zellen inkubiert mit 50 μM bzw. 100 μM Influenza-Peptid.

Nach Messung der Fluoreszenzintensität der einzelnen Testpeptide wurde ihre jeweilige relative Affinität nach der in 3.2.2, Seite 28 dargestellten Formel berechnet. Die Relative Affinität (RA) der Positivkontrolle mit Influenza-Peptid wurde auf 100 % festgesetzt und die zu testenden Peptide hierzu ins Verhältnis gesetzt.

4.1.1 STK32B

Für STK32B wurden aufgrund der guten *in silico* Vorhersagen die Peptide 186 und 124 bestellt und deren relative Affinität durchflusszytometrisch getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 und Abbildung 4-2 dargestellt.

Tabelle 4-1 Relative Affinitäten der STK32B-Peptide im HLA-A*0201 Bindungsassay

Peptid	HLA-Allel	Sequenz	RA [50 µM]	RA [100 µM]	% Influenza [50 µM]	% Influenza [100 µM]
Influenza	HLA-A*0201	GILGFVFTL	3,08	2,97	100	100
STK32B-124	HLA-A*0201	KLYICELAL	2,51	2,53	81,72	85,36
STK32B-186	HLA-A*0201	YMAPEVFQV	3,73	3,60	121,27	121,21

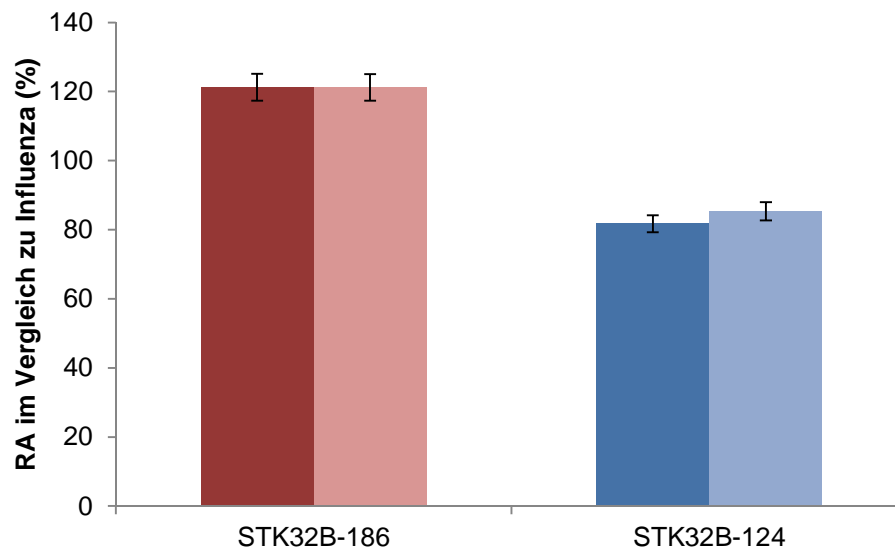


Abbildung 4-2 Relative Affinität von STK32B Peptiden in prozentuaem Anteil zur RA des Influenza-Peptids

Die RA wurde berechnet auf Grundlage der Bindungsaffinität von T2-Zellen nach Inkubation für 16 h mit 50 µM (jeweils linker Balken) bzw. 100 µM (jeweils rechter Balken) STK32B-186-Peptid (rot) bzw. STK32B-124-Peptid (blau) in Relation zur Positivkontrolle mit Influenza-Peptid.

Beide STK32B-Peptide zeigten eine gute HLA-A*0201-Bindungsaffinität in der Durchflusszytometrie. STK32B-186, dessen Bindungsaffinität die der Positivkontrolle übertraf, wurde für weitere Versuche ausgewählt, ein entsprechendes Pentamer für die spätere Sortierung peptidspezifischer CTLs wurde in Auftrag gegeben.

4.1.2 LILRA2

Für LILRA2 wurden zunächst die Peptide 207 und 274, dann auch 7 und 462 aufgrund der *in silico* Prädiktion ausgewählt, bestellt und durchflusszytometrisch getestet. LILRA2-127 zeigte ungenügende, LILRA2-7 durchschnittlich ausgeprägte Bindungseigenschaften im HLA-A*0201-Bindungsassay. Sowohl LILRA2-274 als auch LILRA2-462 verzeichneten eine

gute Bindungsaffinität und wurden deshalb als vielversprechende Kandidaten für weitere Versuche erachtet. Jedoch war eine Synthese der entsprechenden Pentamere von der Herstellerfirma nicht möglich, sodass die Auswahl neuer Peptide erforderlich war. Aus den LILRA2-Peptiden 127, 30 und 212 zeigte LILRA2-30 die höchste Bindungsaffinität an HLA-A*0201 im Vergleich zu Influenza-Peptid. Die Bindungsaffinitätswerte von LILRA2-30 lagen bis zu 48 % über denen der Positivkontrolle, sodass dieses Peptid für weitere Versuche ausgewählt wurde und ein entsprechendes Pentamer angefertigt wurde. Tabelle 4-2 und Abbildung 4-3 zeigen die relativen Bindungsaffinitäten der LILRA2-Peptide.

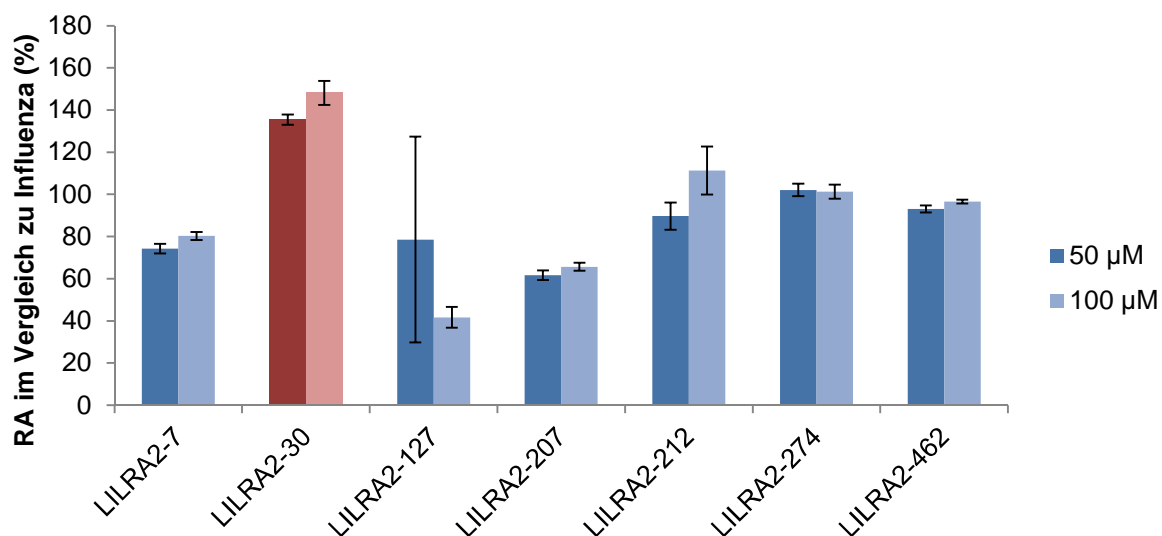


Abbildung 4-3 Relative Affinität von LILRA2-Peptiden in prozentalem Anteil zur RA des Influenza-Peptids

Die RA wurde berechnet auf Grundlage der Bindungsaffinität von T2-Zellen nach Inkubation für 16 h mit 50 µM (jeweils linker Balken) bzw. 100 µM (jeweils rechter Balken) LILRA2-Peptid im Vergleich zur Affinität von T2-Zellen inkubiert mit Influenza-Peptid. LILRA2-30 (rot) weist die höchste RA im Vergleich zur Positivkontrolle auf.

Tabelle 4-2 Relative Affinitäten der LILRA2-Peptide im HLA-A*0201-Bindungsassay

Peptid	HLA-Allel	Sequenz	RA [50 µM]	RA [100 µM]	% Influenza [50 µM]	% Influenza [100 µM]
LILRA2-7	HLA-A*0201	VLICLGLSL	1,29	1,18	74,28	79,59
LILRA2-30	HLA-A*0201	TLWAEPGSV	2,37	2,76	135,43	148,15
LILRA2-127	HLA-A*0201	ALPSPVVTI	1,38	0,78	78,57	41,67
LILRA2-207	HLA-A*0201	SLPSDLLEL	1,91	1,95	61,68	65,66
LILRA2-212	HLA-A*0201	LLELLVPGV	1,57	2,07	89,72	111,29
LILRA2-274	HLA-A*0201	GLSQANFTL	3,15	3,01	102,11	101,30
LILRA2-462	HLA-A*0201	VLGILLFEA	1,61	1,42	93,07	96,59

4.2 Allogenes *in vitro* Priming

Reife, HLA-A*0201⁺ Dendritische Zellen wurden mit dem jeweiligen Zielpeptid (1 µg pro 1 x 10⁶ DC) inkubiert und zum *Priming* naiver, HLA-A*0201⁻ zytotoxischer T-Zellen verwendet. Nach einer zweiwöchigen Expansionsphase wurden die T-Zellen geerntet und die peptidspezifischen CTL mittels Pentamer-Sortierung isoliert. Die peptidspezifischen CTL wurden durch *Limiting Dilution* kloniert und mittels ELISpot-Assays weiter charakterisiert. Als Zielzelllinien kamen in den ELISpot-Assays T2-Zellen, welche mit Peptiden inkubiert wurden, sowie die Tumorzelllinien Nalm6, 697, CALL2, K562 und A673 zum Einsatz. Die Eigenschaften der Zelllinien sind in 3.1.7, Seite 24 dargestellt. Nalm6 ist eine HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie, die STK32B und LILRA2 exprimiert. Eine Reaktion der CTL auf Nalm6 sprach somit für eine peptidspezifische Erkennung von cALL-Zellen im korrekten HLA-Kontext. 697 ist eine HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie, STK32B und LILRA2 werden jedoch nicht exprimiert. Eine Reaktion der CTL auf 697 deutete auf eine HLA-Erkennung der cALL-Zelllinie durch die allorestriktierten CTL hin. CALL2 ist eine HLA-A*0201 negative cALL-Zelllinie, welche STK32B und LILRA2 in geringem Maße exprimiert. Sie diente als Kontrolle der Allorestriktion. Die HLA-A*0201⁺ EFT-Zelllinie A673 wurde als Kontrolle für die cALL-Spezifität eingesetzt. K562 diente als Kontrolle für unspezifische NK-Zell-Aktivität. Um die HLA-Expression der Tumorzelllinien zu steigern, wurden 48 h vor Verwendung im EliSpot-Assay 100 U / ml Interferon γ ins Zellkulturmedium zugegeben.

Vor jedem ELISpot-Experiment erfolgte eine zweiwöchige Expansionsphase. Insgesamt wurden 5 Pentamer-Sorts für STK32B und 2 für LILRA2 durchgeführt. Nachfolgend sind die relevantesten Ergebnisse aufgeführt.

4.2.1 STK32B

HLA-A*0201⁺ reife Dendritische Zellen wurden mit 1 µg STK32B-186 (YMAPEVFQV) pro 1 x 10⁶ DC beladen und zur Aktivierung HLA-A*0201⁻ CD8⁺ T-Zellen verwendet. Nach zweiwöchiger Expansion wurden die T-Zellen geerntet und mit peptidspezifischem PE-markiertem Pentamer sowie FITC-gekoppeltem CD8-Antikörper angefärbt.

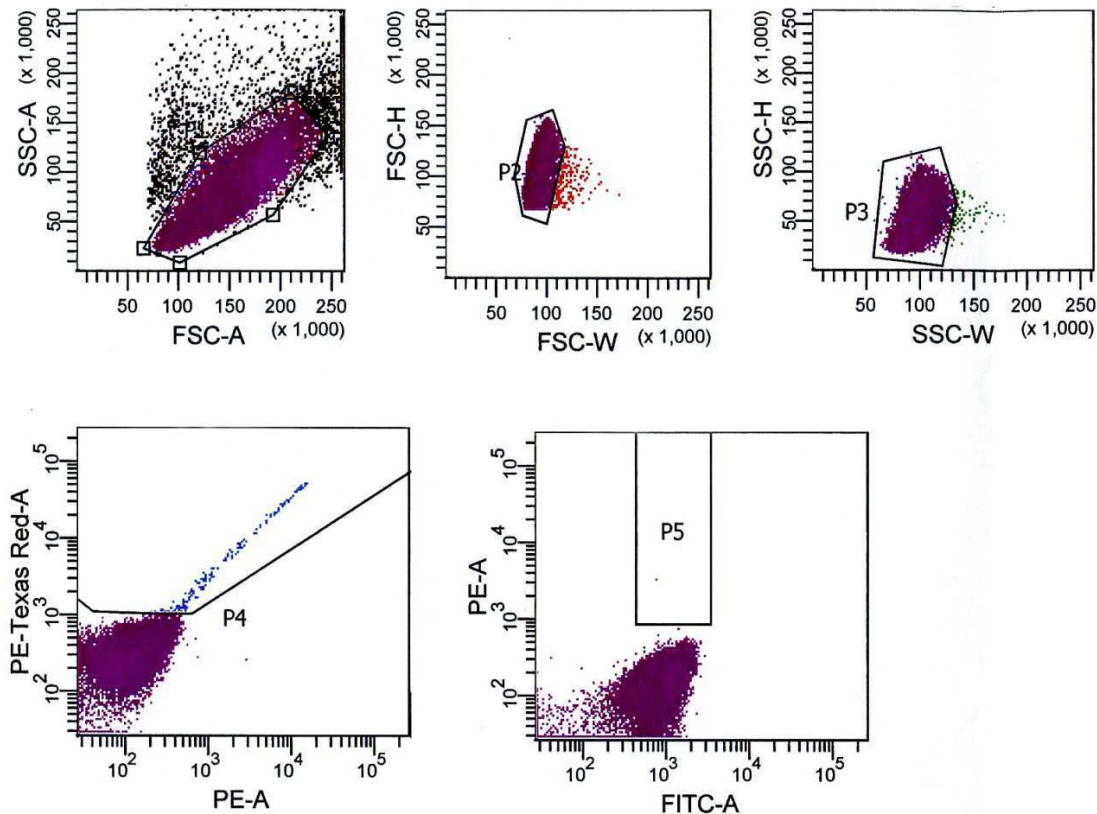


Abbildung 4-4 Sortierung der STK32B-186 Pentamer-PE / CD8-FITC doppelpositiven spezifischen T-Zellen

Durchflusszytometrische Analyse der mit peptidspezifischem, PE-gekoppeltem Pentamer und FITC-gekoppeltem CD8-Antikörper angefärbten T-Zellen. Anzahl der doppelpositiven (CD8-FITC und STK32B-186-Pentamer-PE) Zellen im Analysefenster P5: 629

Aus etwa $2,5 \times 10^7$ lebenden Zellen wurden 629 Zellen als doppel positiv (CD8-FITC und Pentamer-PE) gewertet und in einem Reagenzgefäß mit Humanserum gesammelt. Der Anteil peptidspezifischer T-Zellen im CTL-Pool betrug somit etwa 0,025 %. Die ausgewählten Zellen wurden anschließend mittels *Limiting Dilution* kloniert und in einer statistischen Konzentration von einer bzw. 3 T-Zellen pro *well* auf 96-*well*-Platten aufgebracht. Zwei Wochen nach Expansion der ausgewählten und vereinzelt T-Zellen wurde die Spezifität der Zellen in einem Interferon γ -ELISpot überprüft. Als Zielzellen für den ELISpot dienten T2-Zellen, die für die Positivkontrolle mit STK32B-186 (YMAPEVFQV), für die Negativkontrolle mit Influenzapeptid (GILGFVFL) inkubiert wurden. Abbildung 4-5, Seite 57 zeigt die Darstellung der Interferon γ -Ausschüttung bei Kontakt mit relevantem / irrelevantem Peptid einiger T-Zell-Klone.

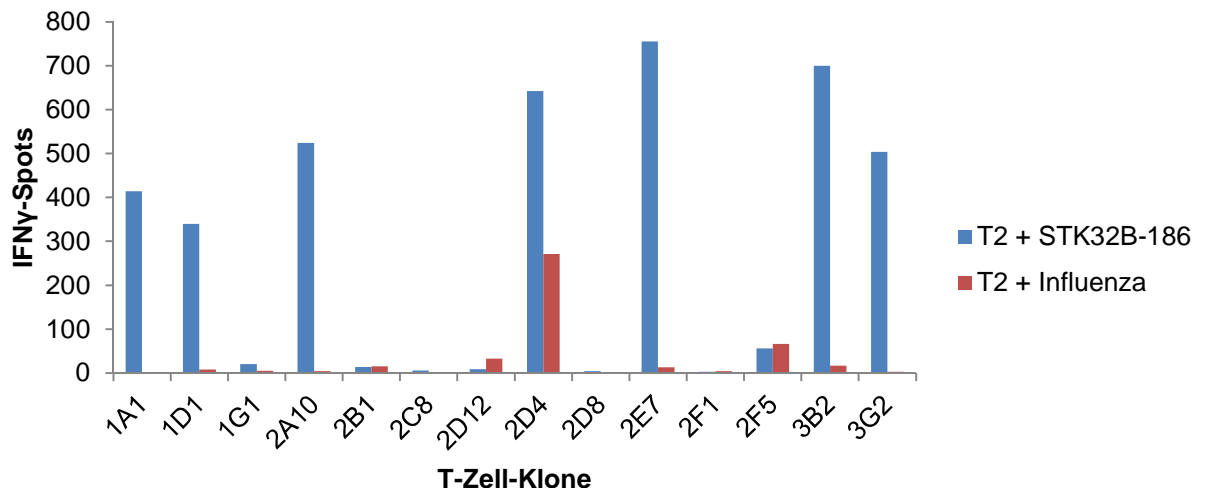


Abbildung 4-5 IFN γ Screening alloreaktiver STK32B-186-spezifischer CTL

IFN γ -Ausschüttung ausgewählter alloreaktiver CTL-Klone bei Kontakt mit T2-Zellen, welche zuvor mit relevantem (STK32B-186, blau) bzw. irrelevantem (Influenza, rot) Peptid inkubiert wurden. 1A1, 1D1, 2A10, 3B2, 3G2, 2D4 und 2E7 zeigten eine deutliche IFN γ -Ausschüttung bei Kontakt mit relevantem Peptid und somit eine spezifische Erkennung des STK32B-Peptids.

Die 7 Klone 1A1, 1D1, 2A10, 3B2, 3G2, 2D4 und 2E7 zeigten eine spezifische Interferon γ -Ausschüttung in der Positivkontrolle und wurden für Folgeexperimente weiterexpandiert. Alle 7 Klone stammten aus Platten, bei denen nach *Limiting Dilution* statistisch eine T-Zelle pro *well* ausgesät worden war.

Jedoch erwiesen sich die Klone STK32B-186-1D1 und STK-32B-186-3B2 im Verlauf als unspezifisch und wurden somit nicht in Folgeversuchen weiter charakterisiert.

4.2.1.1 STK32B-186-1A1

Zwei Wochen nach der initialen Interferon γ -Analyse erfolgte ein weiterer IFN γ -Assay, in dem der Klon jedoch unspezifisch reagierte. Daraufhin wurden die Zellen in Portionen zu je 1×10^6 Zellen eingefroren. Die Zellen wurden später für weitere Versuche aufgetaut und vor weiterer Verwendung 2 Wochen expandiert. Im darauffolgenden IFN γ -ELISpot zeigte STK32B-186-1A1 Peptidspezifität und eine Erkennung von cALL-Tumorzelllinien, allerdings in sehr geringfügiger Ausprägung, siehe Abbildung 4-6 und Abbildung 4-7, Seite 58.

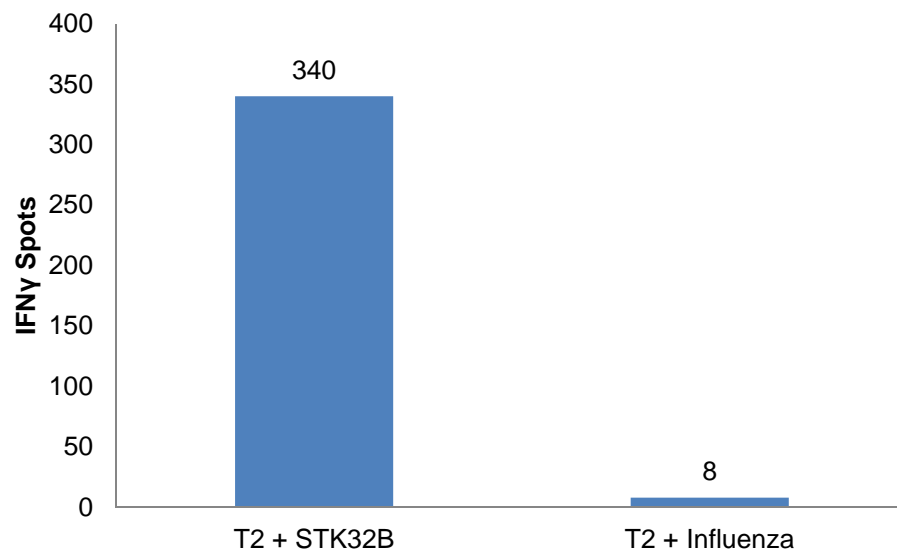


Abbildung 4-6 Peptidspezifität von STK32B-186-1A1 im Screening-IFN γ -ELISpot

IFN γ -Ausschüttung beim Kontakt mit T2-Zellen, die vorher mit relevantem (STK32B-186) bzw. irrelevantem (Influenza) Peptid inkubiert wurden. Die Balkenbeschriftung entspricht der Anzahl der detektierten Spots.

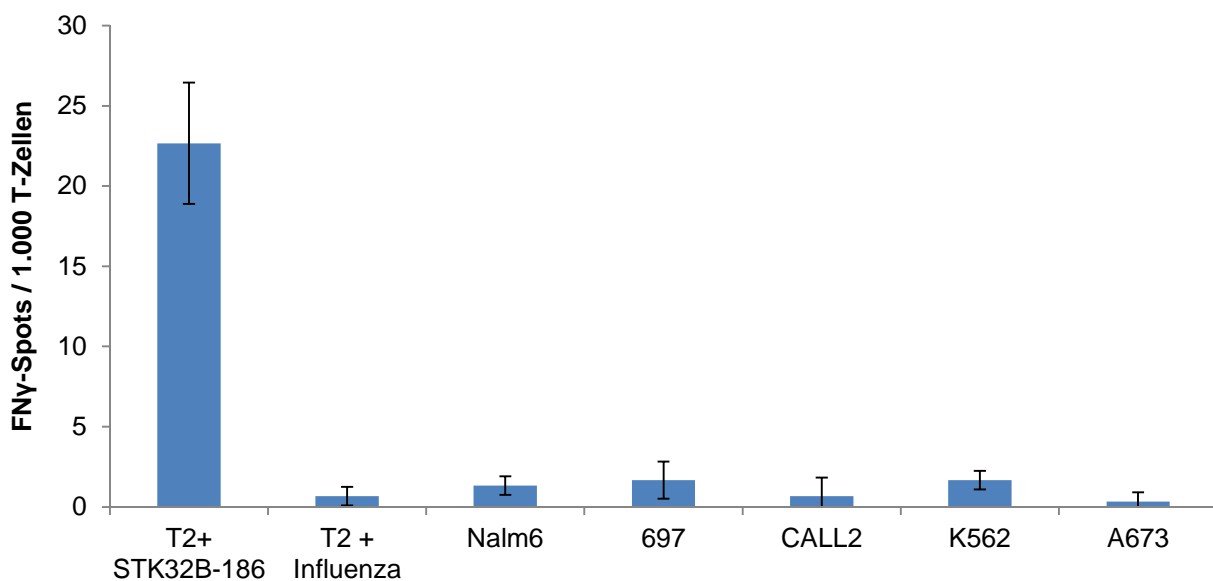


Abbildung 4-7 Peptidspezifität von STK32B-186-1A1 im IFN γ -ELISpot mit Tumorzelllinien

IFN γ -Ausschüttung beim Kontakt mit peptidbeladenen T2-Zellen der Positiv-/Negativkontrolle und den HLA-A*0201⁺ cALL-Linien Nalm6 (exprimiert STK32B) und 697 (STK32B negativ) im Vergleich zur HLA-A*0201⁺ cALL-Linie (CALL2) sowie Negativkontrollen zur cALL-Spezifität (A673) und unspezifischer NK-Zell-Aktivität (K562). Es zeigte sich eine spezifische Erkennung des Antigens in T2-Zellen.

Im Granzym B-Assay, in dem die Zytotoxizität beim Kontakt mit Tumorzelllinien getestet wurde, zeigte STK32B-186-1A1 spezifische Reaktionen. Die cALL-Tumorzelllinien lösten stärkere Reaktionen aus als die Negativkontrolle zur NK-Zell-Aktivität K562 und die Negativkontrolle mit leeren wells, die zur Kontrolle einer spontanen

Granzym B-Ausschüttung nur mit T-Zellen, aber nicht mit Zielzellen beladen waren. Nachdem im ersten Granzym B-ELISpot 697 die stärkste Reaktion auslöste (nicht abgebildet), provozierte im darauffolgenden Granzym B-Assay die HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie Nalm6, welche STK32B exprimiert, die stärkste Reaktion. Der Klon reagierte besser auf die HLA-A*0201⁻ cALL-Zelllinie CALL2, welche STK32B in geringem Maße exprimiert, als auf die STK32B-negative HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie 697, siehe Abbildung 4-8. Die starke Reaktion auf die HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien kann als eine Allorestriktion des Klon gedeutet werden. Jedoch löste auch die HLA-A*0201⁻ cALL-Zelllinie CALL2, welche STK32B-186 exprimiert, messbare Reaktionen aus, was auf eine peptidspezifische Reaktion des Klon zurückgeführt werden könnte.

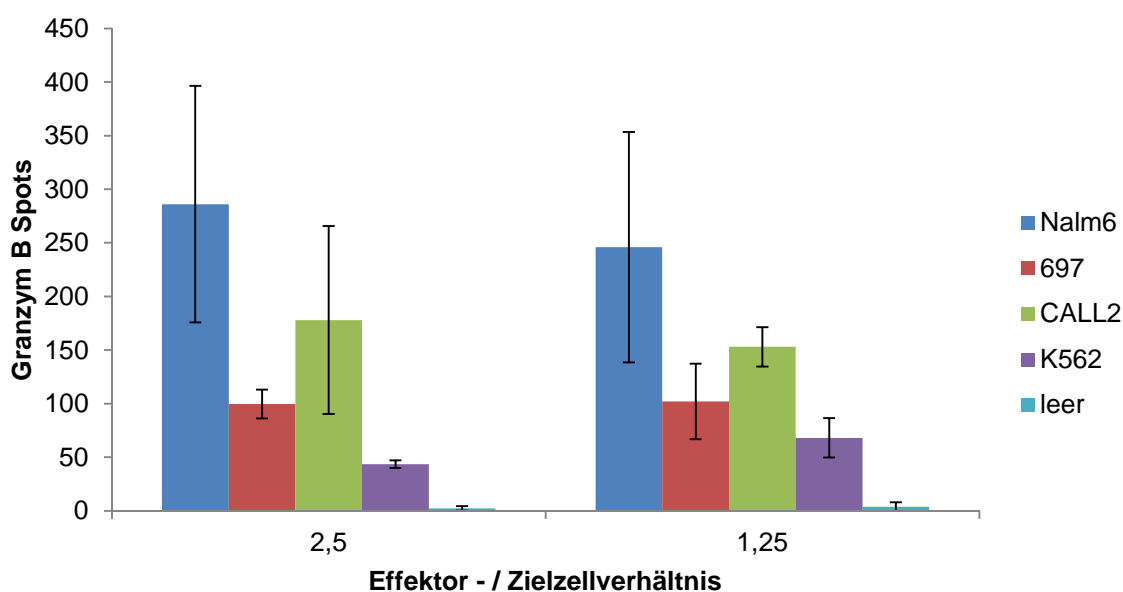


Abbildung 4-8 Peptidspezifische Zytotoxizität von STK32B-186-1A1 im Granzym B-Assay

Dargestellt wird die Granzym B-Ausschüttung bei Effektor-/Zielzellverhältnis von 2,5 : 1 bzw. 1,25 : 1. Es zeigt sich eine peptidspezifische Zytotoxizität der allorestriktierten CTL bei Kontakt mit der STK32B-186-exprimierenden, HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie Nalm6.

4.2.1.2 STK32B-186-2A10

Im IFN γ -Screening reagierte der Klon STK32B-186-2A10 gut auf die mit spezifischem Peptid beladenen T2-Zellen. Wie beim Klon STK32B-186-1A1 reagierte auch Klon 2A10 im zweiten IFN γ -ELISpot unspezifisch und wurde zunächst kryokonserviert. Nach dem Auftauen und zweiwöchiger Expansion wurde ein IFN γ -ELISpot durchgeführt, in dem STK32B-186-2A10 spezifisch die peptidbeladenen T2-Zellen der Positivkontrolle erkannte, wobei der Unterschied zur Reaktion auf die Negativkontrolle (T2-Zellen inkubiert mit Influenza-Peptid) signifikant war ($p = 0,008$), siehe Abbildung 4-9, Seite 60. Weiterhin wurde die Reaktion auf Tumorzelllinien getestet, hierbei zeigte sich eine sehr geringfügig ausgeprägte Erkennung

der cALL-Tumorzelllinien (nicht abgebildet). Die HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie Nalm6, welche STK32B-186 exprimiert, wurde am besten erkannt.

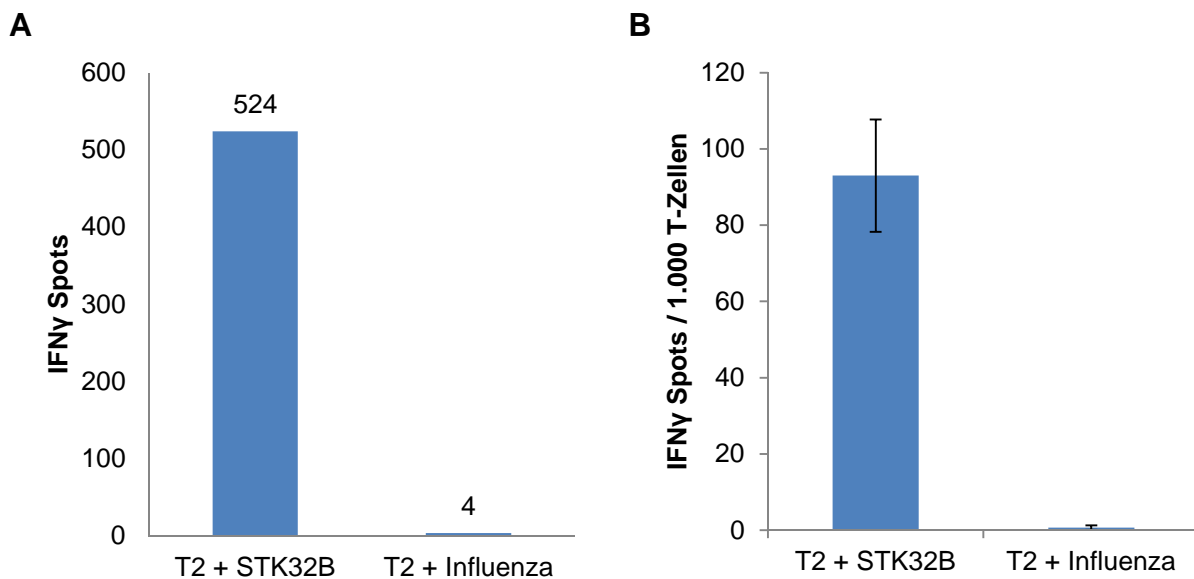


Abbildung 4-9 Peptidspezifität von STK32B-186-2A10 im initialen Screening sowie im wiederholten IFN γ -ELISpot

Dargestellt wird die spezifische IFN γ -Ausschüttung bei Kontakt mit STK32B-peptidbeladenen T2-Zellen im initialen Screening (A) sowie im wiederholten IFN γ -ELISpot-Assay (B) im Vergleich zur Negativkontrolle (Influenza). Balkenbeschriftung entspricht der Anzahl der detektierten Spots im Screening-ELISpot. Es zeigt sich eine signifikante Peptidspezifität von STK32B-186-2A10 ($p = 0,008$) (B).

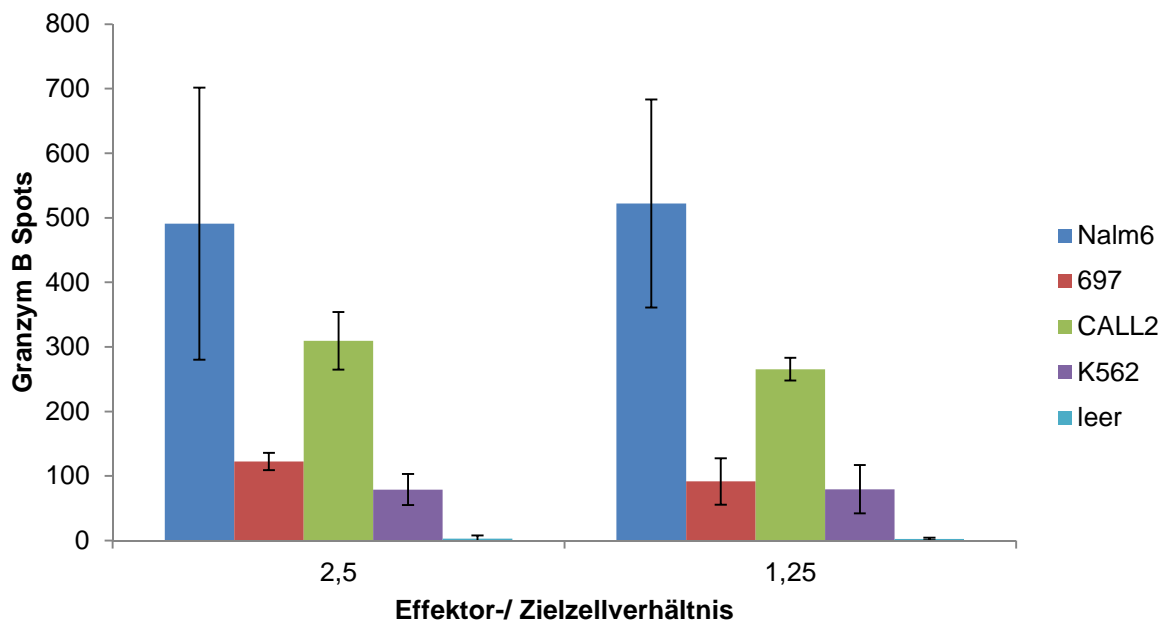


Abbildung 4-10 Peptidspezifische Zytotoxizität von STK32B-186-2A10 im Granzym B-ELISpot

Dargestellt ist die Granzym B-Ausschüttung bei einem Effektor-/Zielzellverhältnis von 2,5 : 1 bzw. 1,25 : 1. Es zeigt sich eine peptidspezifische Zytotoxizität der allorestrierten CTL bei Kontakt mit der STK32B-186-exprimierenden, HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie Nalm6.

Im Granzym B-Assay wurde die spezifische Zytotoxizität der T-Zellen überprüft, siehe Abbildung 4-10, Seite 60. Hierbei zeigte STK32B-186-2A10 eine ausgeprägte Granzym B-Ausschüttung bei Kontakt mit der HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie Nalm6. Der Kontakt mit 697 löste kaum Reaktionen aus, wohingegen eine vermehrte Granzym B-Ausschüttung bei der HLA-A*0201⁻ cALL-Linie CALL2 festzustellen war, welche STK32B in geringem Ausmaß exprimiert. Die Reaktion auf die cALL-Zelllinien war stärker ausgeprägt als auf die Negativkontrollen K562 (NK-Zell-Aktivität) und leere *wells* (nur T-Zellen ohne Zielzellen zum Ausschluss von spontaner Granzym B-Ausschüttung). Somit erfolgte eine peptidspezifische zytotoxische Reaktion der allorestingierten CTL auf die STK32B-exprimierende Zelllinie Nalm6 mit guter Diskrimination zu den Negativkontrollen.

4.2.1.3 STK32B-186-3G2

Der Klon STK32B-186-3G2 reagierte im initialen IFN γ -Screening auf die mit STK32B-186-Peptid beladenen T2-Zellen mit guter Diskriminierung zur Negativkontrolle, siehe Abbildung 4-11.

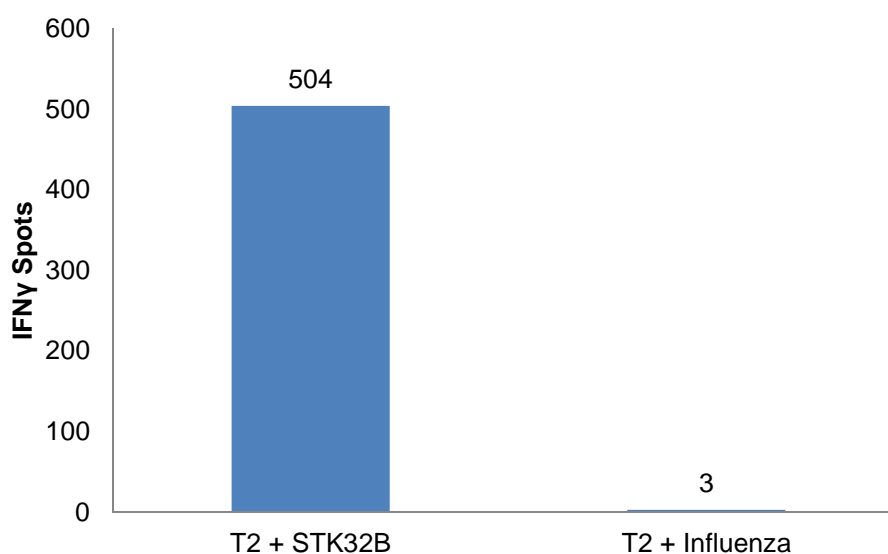


Abbildung 4-11 Peptidspezifität von STK32B-186-3G2 im initialen Screening-IFN γ -ELISpot-Assay

Dargestellt wird die spezifische IFN γ -Ausschüttung beim Kontakt mit STK32B-peptidbeladenen T2-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Influenza).

Die Balkenbeschriftung entspricht der Anzahl der detektierten Spots.

In folgenden IFN γ -Screens zeigte sich der Klon jedoch unspezifisch und wurde zunächst kryokonserviert. Auch in weiteren IFN γ -ELISpots nach Auftauen und Re-Expansion war keine spezifische Reaktion feststellbar, jedoch ließen sich spezifische zytolytische Reaktionen bei Kontakt mit cALL-Tumorzelllinien im Granzym B-ELISpot nachweisen, siehe Abbildung 4-12, Seite 62.

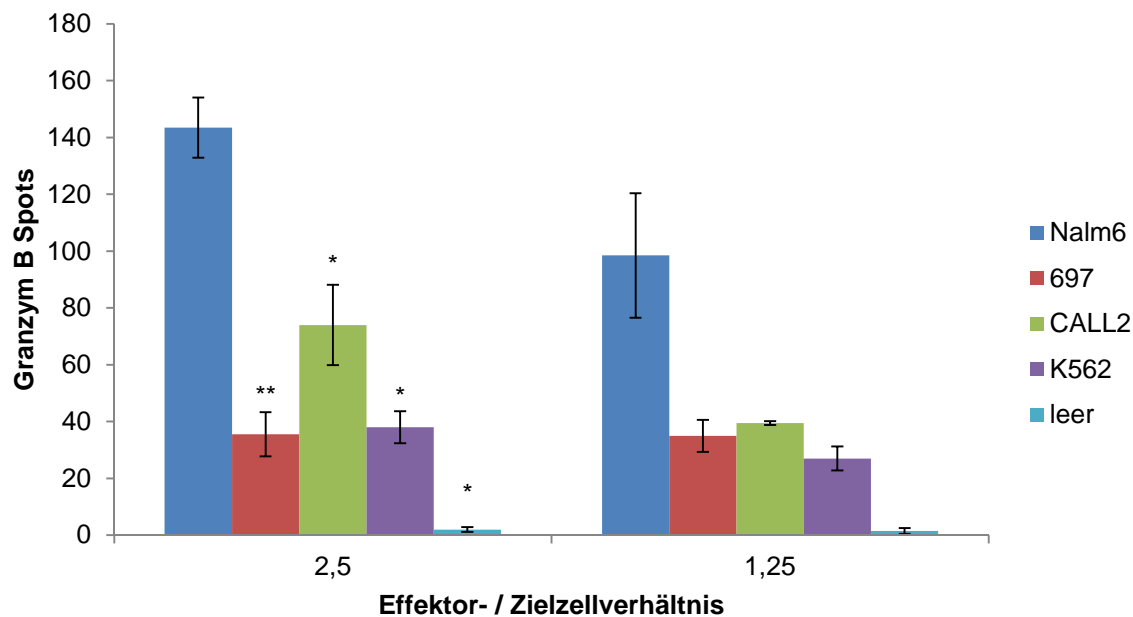


Abbildung 4-12 Peptidspezifische Zytotoxizität von STK32B-186-3G2 im Granzym B-ELISpot

Dargestellt wird die Granzym B-Ausschüttung von STK32B-186-3G2 bei Kontakt mit Tumorzelllinien bei einem Effektor-/Zielzellverhältnis von 2,5 : 1 bzw. 1,25 : 1.

Es zeigt sich eine peptidspezifische Zytotoxizität der allorestrierten CTL bei Kontakt mit der STK32B-186-exprimierenden, HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie Nalm6. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede in der Granzym B-Ausschüttung bei Kontakt mit Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (* p < 0,05, ** p < 0,01).

Der Klon 3G2 zeigte eine spezifische Zytotoxizität bei Kontakt mit der HLA-A*0201⁺ STK32B-exprimierenden cALL-Zelllinie Nalm6, mit guter Diskrepanz zur HLA-A*0201⁻ cALL-Linie CALL2 und zu den Negativkontrollen K562 und T-Zellen allein. Die aussagekräftigsten Ergebnisse wurden bei einem Effektor- / Zielzell-Verhältnis von 2,5 : 1 bzw. 1,25 : 1 beobachtet. Es ließ sich eine lediglich gering ausgeprägte Erkennung von 697, der zweiten HLA-A*0201⁺ cALL-Linie, finden, welche STK32B nicht exprimiert. Dies ließ auf eine peptidspezifische zytotoxische Reaktion der allorestrierten CTL auf die STK32B-exprimierende, HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie Nalm6 schließen. Die Unterschiede in der Reaktion bei Kontakt mit Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien beim Effektor- / Zielzellverhältnis von 2,5 : 1 waren statistisch signifikant.

4.2.1.4 STK32B-186-2D4

Im initialen IFN γ -Screen zwei Wochen nach Beginn der ersten Expansion zeigte der Klon 2D4 gute Peptidspezifität. Die mit spezifischem Peptid gepulsten T2-Zellen wurden gut erkannt, siehe Abbildung 4-13, Seite 63.

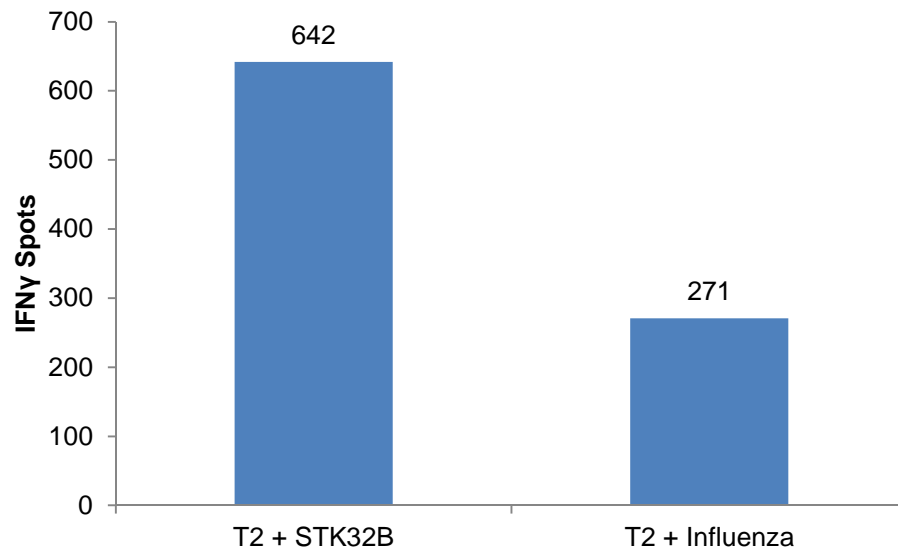


Abbildung 4-13 Peptidspezifität von STK32B-186-2D4 im initialen Screening IFN γ -ELISpot-Assay

Dargestellt wird die spezifische IFN γ -Ausschüttung beim Kontakt mit STK32B-peptidbeladenen T2-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Influenza). Die Balkenbeschriftung entspricht der Anzahl der detektierten Spots.

Im weiteren Verlauf zeigte sich 2D4 jedoch unspezifisch im Interferon-Assay. Allerdings ließ sich im Granzym B-ELISpot eine spezifische Granzym B-Ausschüttung bei Kontakt mit den HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien Nalm6 und 697 nachweisen, wobei die Reaktion auf Nalm6 stärker ausgeprägt war. Da Nalm6 im Gegensatz zu 697 STK32B exprimiert kann dies als eine peptidspezifische Reaktion gewertet werden. Der Klon reagierte kaum auf die HLA-A*0201⁻ Zelllinie CALL2 und zeigte kaum Spontanaktivität. Die höhere Granzym B-Ausschüttung bei Kontakt mit den HLA-A*0201 positiven cALL-Zelllinien Nalm6 und 697 im Vergleich zur HLA-A*0201⁻ cALL-Zelllinie CALL2 deutet auf eine HLA-A*0201-Spezifität der alloreaktiven CTL hin. Die spezifische Granzym B-Ausschüttung war auch in nachfolgenden Titrations-Assays nachweisbar, die Reaktionsintensität war jedoch im Verlauf abnehmend, siehe Abbildung 4-14, Seite 64.

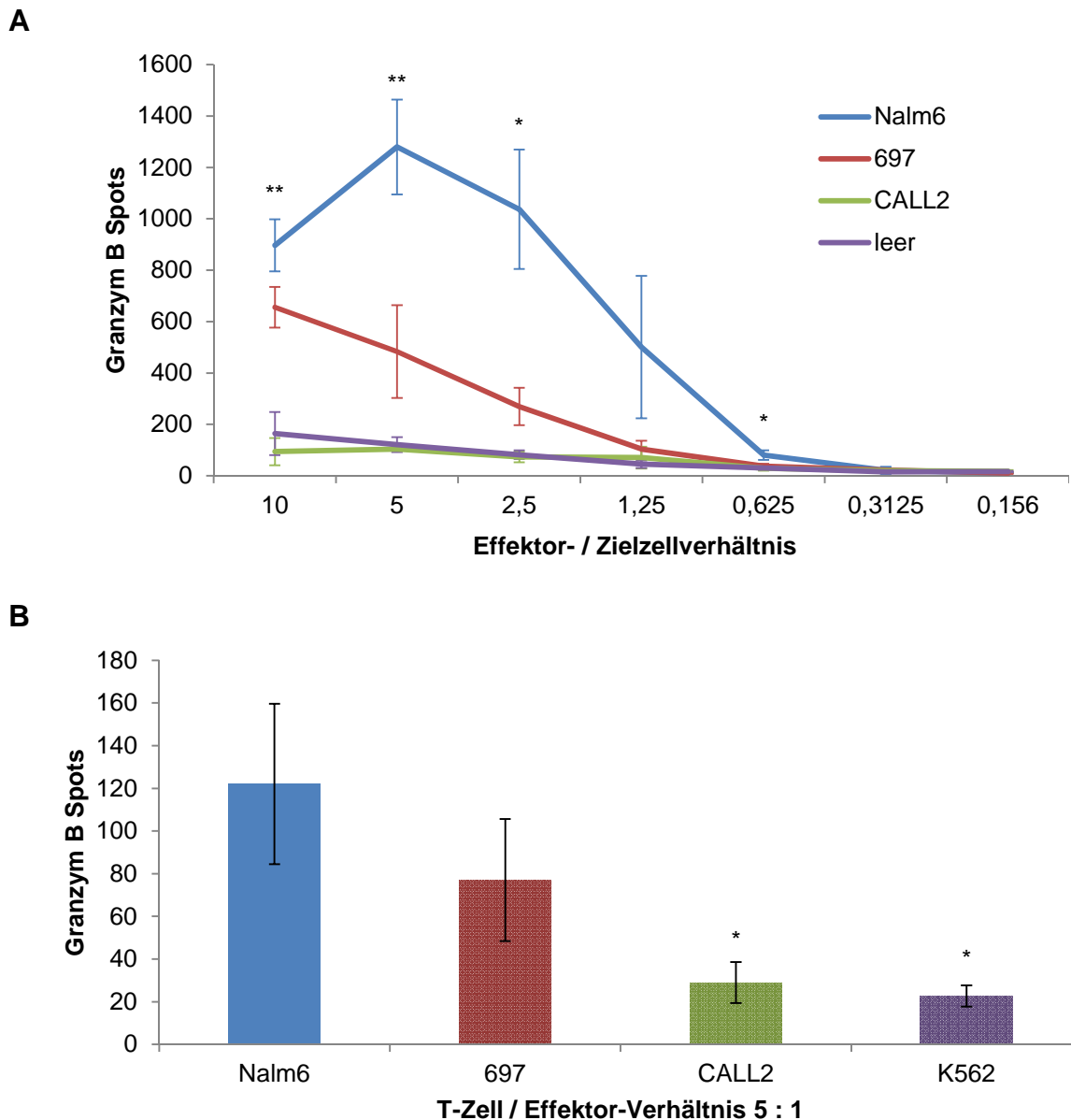


Abbildung 4-14 Peptidspezifische und HLA-A*0201 spezifische Zytotoxizität von STK32B-186-2D4 im Granzym B-ELISpot

Gezeigt wird die Granzym B-Ausschüttung bei Kontakt mit Tumorzelllinien bei titriertem Effektor-/Zielzellverhältnis von 10 : 1 bis 0,156 : 1 (A) bzw. 5 : 1 bei wiederholtem Granzym B-Assay (B).

Es zeigt sich eine peptidspezifische Zytotoxizität der allorestingierten CTL bei Kontakt mit der HLA-A*0201⁺, STK32B-186-exprimierenden cALL-Zelllinie Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. Sterne kennzeichnen das Signifikanzniveau der Unterschiede in den Reaktionen bei Kontakt mit Nalm6 im Vergleich zur HLA-A*0201 negativen cALL-Zelllinie CALL2 (A) bzw. zu allen Kontrollzelllinien (B) (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

4.2.1.5 STK32B-186-2E7

Der Klon 2E7 zeigte im initialen IFN γ -Screening eine sehr gute Erkennung der mit relevantem Peptid beladenen T2-Zellen, wohingegen der Kontakt mit den Influenza-peptidbeladenen T2-Zellen der Negativkontrolle nahezu keine Reaktion hervorrief, siehe Abbildung 4-15, Seite 65.

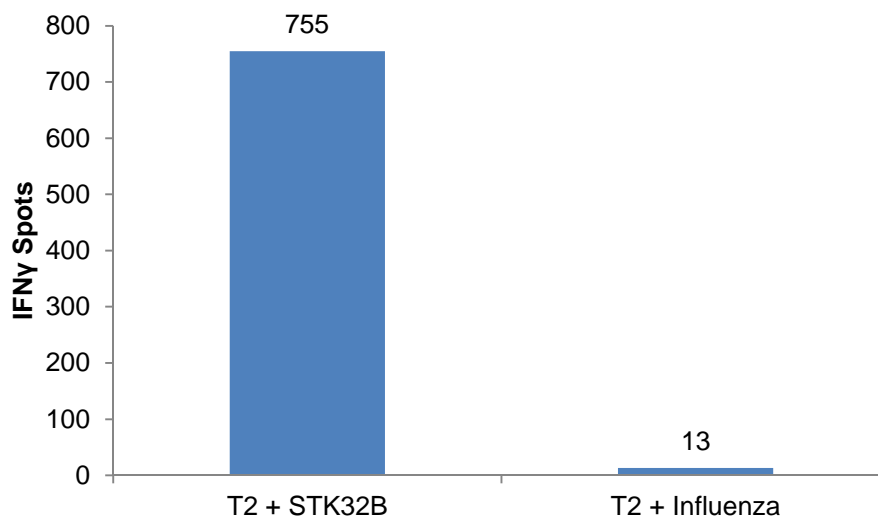


Abbildung 4-15 Peptidspezifität von STK32B-186-2E7 im initialen Screening-IFN γ -ELISpot-Assay

Dargestellt wird die spezifische IFN γ -Ausschüttung beim Kontakt mit STK32B-peptidbeladenen T2-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Influenza).

Die Balkenbeschriftung entspricht der Anzahl der detektierten Spots.

Im Verlauf weiterer Expansionszyklen und ELISpot-Testungen zeigte sich der Klon zunehmend unspezifisch im IFN γ -Assay. Eine spezifische Reaktion auf Tumorzelllinien konnte hier nicht nachgewiesen werden. Trotz der mangelnden Spezifität im IFN γ -Assay zeigte der Klon im Granzym B-ELISpot gute Ergebnisse. Beim Kontakt mit HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien war eine spezifische Granzym B-Ausschüttung zu beobachten. Die höchste Granzym B-Ausschüttung erfolgte im Sinne einer peptidspezifischen Reaktion bei Kontakt mit der STK32B-exprimierenden cALL-Linie Nalm6. 697, welche kein STK32B exprimiert, wurde in geringerem Ausmaß erkannt, jedoch war die Granzym B-Ausschüttung höher als bei der HLA-A*020⁻ cALL-Zelllinie CALL2, was auf eine HLA-A*0201-Spezifität des Klons hindeutet. Diese Spezifität blieb in darauffolgenden Granzym B-ELISpots zunächst erhalten, nahm im Verlauf jedoch ab. Nachfolgend werden die deutlichsten Ergebnisse der Titrations-Assays gezeigt, siehe Abbildung 4-16, Seite 66. Beim Effektor- / Zielzellverhältnis von 2,5 : 1 im ersten Granzym B-ELISpot löste der Kontakt mit Nalm6 eine sehr ausgeprägte Granzym B-Freisetzung der Effektorzellen aus, sodass aufgrund der hohen Dichte der Spots keine Auswertung deren Anzahl erfolgen konnte, infolgedessen auch eine statistische Auswertung nicht möglich war. Aufgrund der hochgradigen Reaktivität beim Kontakt mit Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien kann jedoch von einer Signifikanz der spezifischen Zytotoxizität ausgegangen werden.

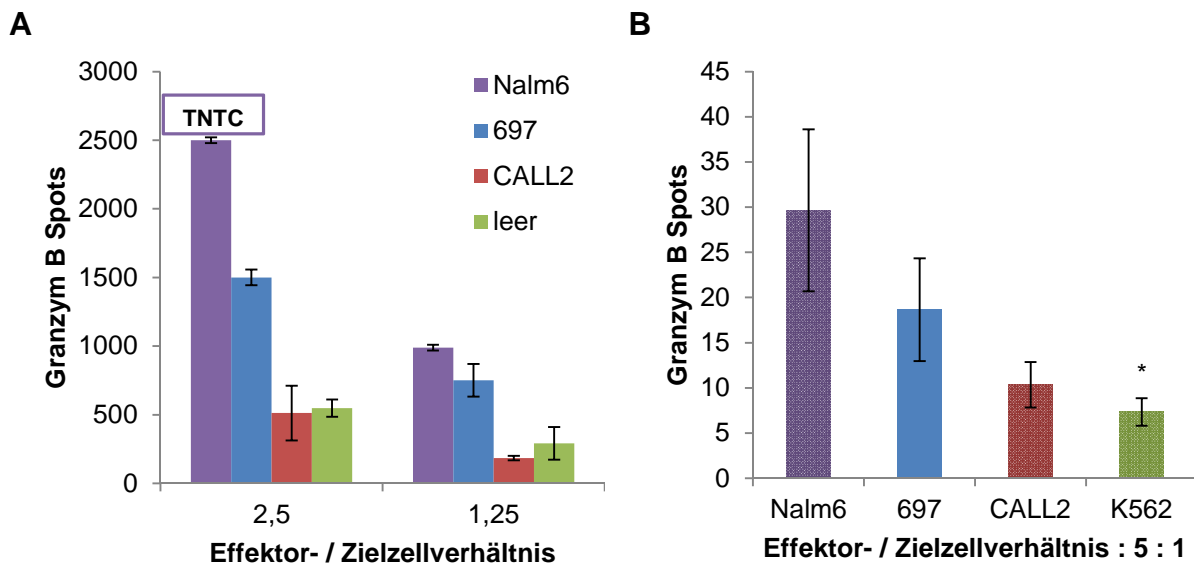


Abbildung 4-16 Peptidspezifische und HLA-A*0201 spezifische Zytotoxizität von STK32B-186-2E7 im Granzym B-ELISpot

Dargestellt wird die Granzym B-Ausschüttung von STK32B-186-2E7 bei Kontakt mit Tumorzelllinien. Die deutlichsten Unterschiede ergaben sich bei einem Effektor- / Zielzellverhältnis von 2,5 : 1 und 1,25 : 1 (A) bzw. von 5 : 1 im wiederholten Granzym B – Assay (B).

TNTC= *too numerous to count* (Auswertung aufgrund zu hoher Anzahl der ELISpot-Punkte nicht möglich).

Sterne kennzeichnen Signifikanzniveau der Unterschiede in der Reaktion bei Kontakt mit Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (* $p < 0,05$).

Es zeigte sich eine peptidspezifische Zytotoxizität der allorestingierten CTL beim Kontakt mit der HLA-A*0201⁺, STK32B exprimierenden cALL-Zelllinie Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien.

Es wurden 5 STK32B-spezifische CTL-Klone im Interferon γ -ELISpot auf ihre peptidspezifische Erkennung antigenexprimierender Zielzellen sowie im Granzym B-ELISpot auf ihre peptidspezifische Zytotoxizität beim Kontakt mit den Zielzellen getestet. Alle untersuchten CTL-Klone zeigten eine peptidspezifische Erkennung ihrer Epitope im initialen IFN γ -ELISpot, auffallend war jedoch eine im Verlauf abnehmende Reaktivität und eine Zunahme unspezifischer Reaktionen, vor allem im IFN γ -Assay. Dahingegen blieb die Reaktivität, wenn auch hier im Verlauf tendenziell abnehmend, im Granzym B-ELISpot länger erhalten. Alle untersuchten Klone reagierten im Zytotoxizitäts-Assay mit einer spezifischen Granzym-B-Ausschüttung, welche bei Kontakt mit der HLA-A*0201⁺, STK32B-exprimierenden cALL-Zelllinie Nalm6 durchwegs am höchsten ausgeprägt war. Somit gelang die Generierung allorestingierter STK32B-spezifischer CTL, die selektiv das präsentierte Antigen erkannten und in der Lage waren, antigenexprimierende Zellen im korrekten HLA-Kontext abzutöten.

4.2.2 LILRA2

CD8⁺ T-Zellen wurden mit reifen Dendritischen Zellen kokultiviert, welche zuvor mit LILRA2-30 Peptid (TLWAEPGSV) inkubiert worden waren. Nach einer zweiwöchigen Expansionsphase wurden die T-Zellen gerettet und mit PE-gekoppeltem Pentamer sowie FITC-markiertem CD8-Antikörper angefärbt um die LILRA2-spezifischen T-Zellen zu isolieren.

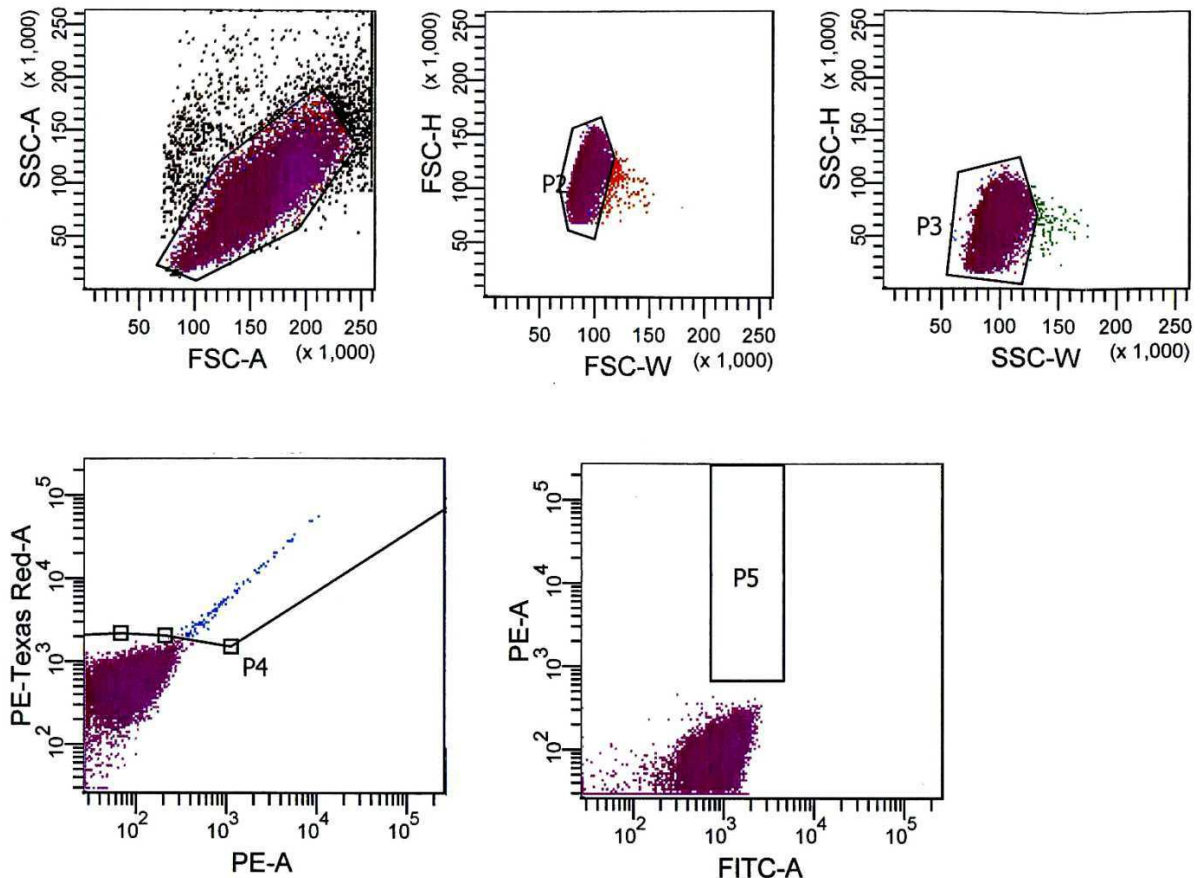


Abbildung 4-17 Sorting der LILRA2-30 Pentamer-PE / CD8-FITC doppelpositiven, antigenspezifischen T-Zellen

Dargestellt wird die durchflusszytometrische Analyse der mit peptidspezifischem, PE-gekoppeltem Pentamer und FITC-gekoppeltem CD8-Antikörper angefärbten T-Zellen. Anzahl der doppelpositiven (CD8-FITC und STK32B-186-Pentamer-PE) Zellen im Analysefenster P5: 152

Doppelt positive Zellen (CD8-FITC + Pentamer-PE) wurden als spezifisch gewertet und in einem separaten Reagenzgefäß gesammelt. Aus etwa $2,85 \times 10^7$ lebenden T-Zellen wurden 152 doppel positive CTL isoliert, somit betrug der Anteil peptidspezifischer T-Zellen etwa 0,000537 % der Gesamtzellzahl. Es erfolgte eine Klonierung der Zellen mittels *Limiting Dilution*, wobei statistisch 1,5 T-Zellen pro *well* ausgesät wurden, anschließend wurden die T-Zellen zwei Wochen expandiert. Am Ende der Expansionsphase wurde ein initialer IFN γ -ELISpot zum Screening der Spezifität der Zellen durchgeführt. Hierbei wurde die

Reaktion der Zellen auf peptidbeladene T2-Zellen getestet. Als Positivkontrolle dienten T2-Zellen, welche mit dem Testpeptid LILRA2-30 inkubiert wurden, als Negativkontrolle T2-Zellen beladen mit Influenza-Peptid. Abbildung 4-18 zeigt die IFN γ -Ausschüttung der CTL aus einigen *wells*.

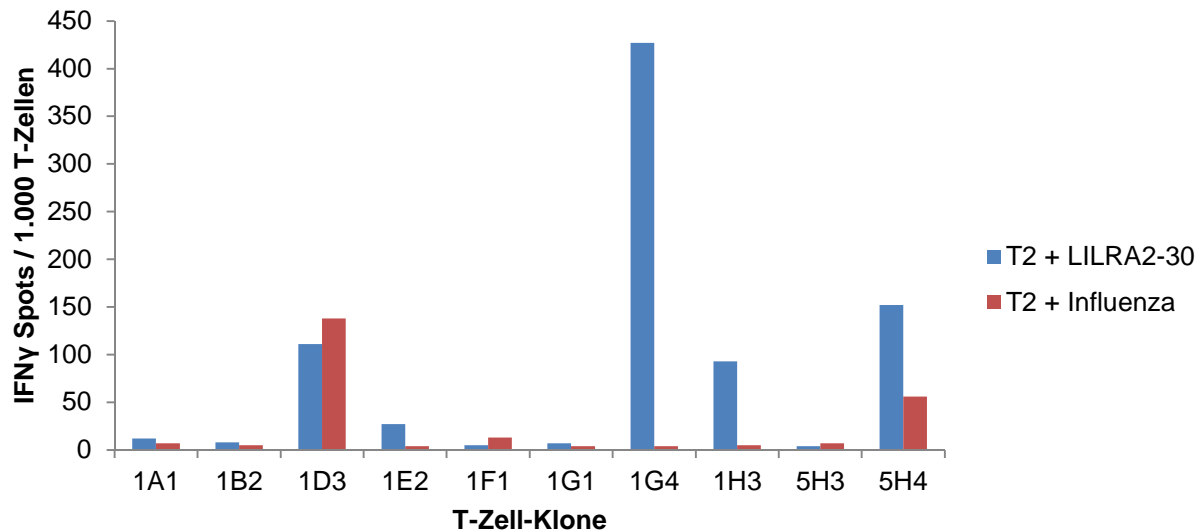


Abbildung 4-18 IFN γ Screening-ELISpot alloreaktiver LILRA2-30 spezifischer CTL

Dargestellt wird die IFN γ -Ausschüttung ausgewählter alloreaktiver CTL-Klone bei Kontakt mit T2-Zellen, welche zuvor mit relevantem (LILRA2-30) bzw. irrelevantem (Influenza) Peptid inkubiert wurden. 1G4, 1H3 und 5H4 zeigten eine spezifische Erkennung des LILRA2-30-Peptids.

Die 3 Klone 1G4, 1H3 und 5H4 zeigten hierbei spezifische Reaktionen und wurden für weitere Versuche ausgewählt und expandiert.

4.2.2.1 LILRA2-30-1G4

Im initialen IFN γ -Screening zwei Wochen nach der Einzelzellklonierung mittels *Limiting Dilution* erkannte LILRA2-30-1G4 spezifisch die mit LILRA2-30-Peptid gepulsten T2-Zellen, wohingegen die Negativkontrolle kaum Reaktionen hervorrief. Die Spezifität sowie die Reaktion auf Tumorzelllinien wurden in weiteren IFN γ -ELISpots untersucht. Hierbei zeigte der Klon zwar weiterhin eine spezifische Reaktion auf T2-Zellen mit relevantem / irrelevantem Peptid, jedoch war die Reaktion geringer ausgeprägt als im initialen Screening, siehe Abbildung 4-19, Seite 69.

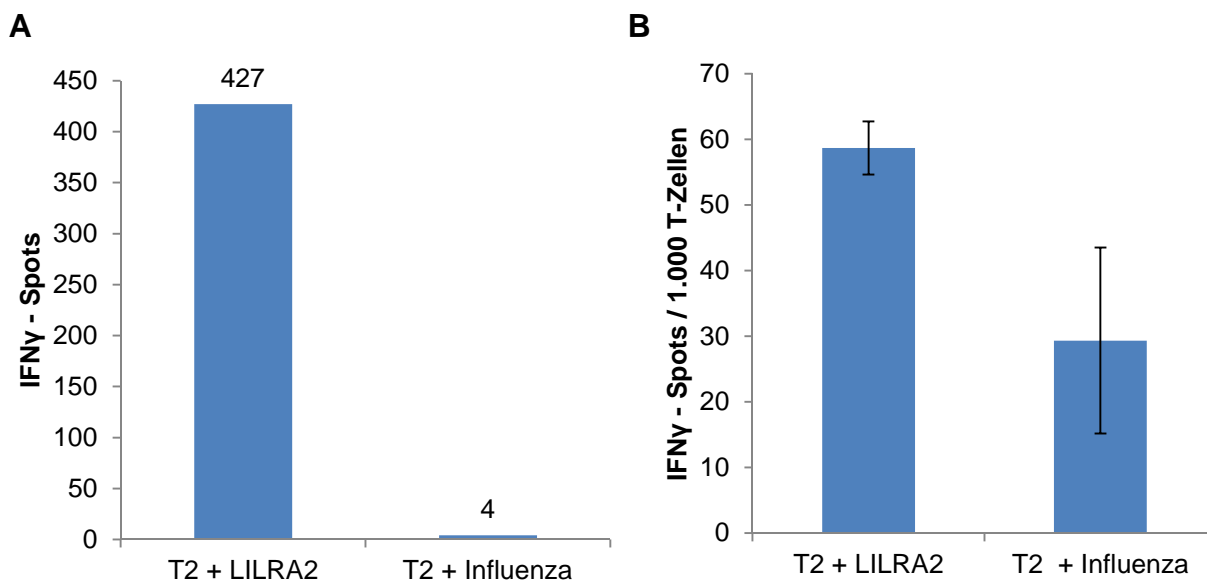


Abbildung 4-19 Peptidspezifität von LILRA2-30-1G4 im initialen sowie wiederholten IFN γ -ELISpot

Dargestellt wird die spezifische IFN γ -Ausschüttung bei Kontakt mit LILRA2-peptidbeladenen T2-Zellen im initialen IFN γ -Screening (A) sowie beim wiederholten IFN γ -ELISpot (B) im Vergleich zur Negativkontrolle (Influenza). Die Balkenbeschriftung entspricht der Anzahl der detektierten Spots (A).

LILRA2-30-1G4 war in der Lage, die HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie Nalm6 im IFN γ -Assay spezifisch zu erkennen, siehe Abbildung 4-20, Seite 70. Die Reaktion auf die zweite HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie 697 fiel geringer aus, war jedoch weiterhin gut abgrenzbar von der Reaktion auf die HLA-A*0201⁻ cALL-Linie CALL2. Dies deutet sowohl auf eine HLA-Restriktion als auch eine peptidspezifische Reaktion des Klons hin, da Nalm6 im Gegensatz zu 697 LILRA2 exprimiert. Die Peptidspezifität von 1G4 wurde zusätzlich mit Hilfe des Zellkonstrukts Cos-7 getestet, siehe Abbildung 4-20, Seite 70. Cos-7 ist eine etablierte Affen-Fibroblasten-Zelllinie, die sich gut für Transfektionsexperimente eignet. Die Cos-7-Zellen wurden in diesem Versuchsansatz mit HLA-A*0201 und dem Zielgen LILRA2 bzw., für die Negativkontrolle, mit HLA-A*0201 und GFP transfiziert. Nach erfolgreicher Transfektion exprimieren die Cos-7-Zellen die transfizierten Gene in hohem Ausmaß. Wird das jeweilige Peptidepitop auf der Zelloberfläche präsentiert, sollten die Epitop-spezifischen T-Zellen es auf den Cos-7-Zellen erkennen und mit einer entsprechenden Interferon γ -Ausschüttung reagieren.

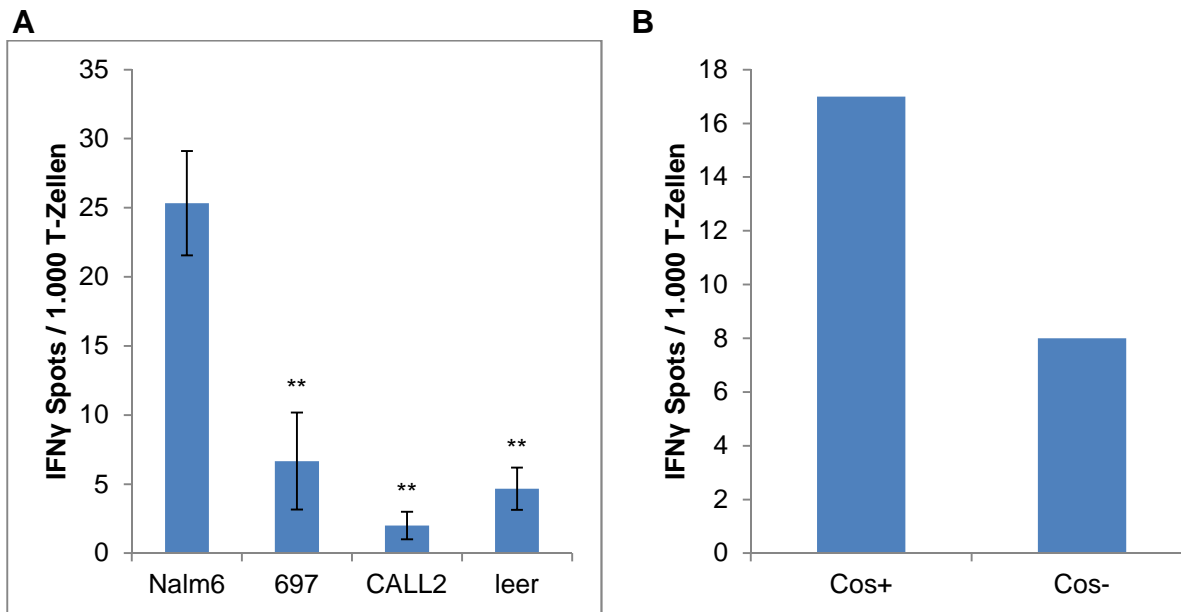


Abbildung 4-20 Peptidspezifität und HLA-A*0201 Spezifität von LILRA2-30-1G4 im IFN γ -ELISpot mit Tumorzelllinien und Cos-7

Dargestellt wird die IFN γ -Ausschüttung bei Kontakt mit Tumorzelllinien (A) sowie transfizierten Cos-7-Zellen (Cos+ transfiziert mit HLA-A*0201 und LILRA2, Cos- transfiziert mit HLA-A*0201 und GFP), repräsentatives Ergebnis dargestellt in Abbildung (B).

Sterne kennzeichnen das Signifikanzniveau der Unterschiede in der Reaktion bei Kontakt mit Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (** $p < 0,01$) (A).

Die Peptidspezifität der allorestrierten CTL wird gezeigt durch die selektive IFN γ -Ausschüttung bei Kontakt mit der HLA-A*0201⁺, LILRA2 exprimierenden cALL-Zelllinie Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (A). Zudem ließ sich eine spezifische Erkennung des Peptidantigens in den mit LILRA2 transfizierten Cos-7-Zellen (Cos+) nachweisen (B).

Beim Klon LILRA2-30-1G4 ließ sich eine vermehrte Interferon γ -Ausschüttung beim Kontakt mit Cos+ (Cos-7, transfiziert mit HLA-A*0201 und LILRA2) im Vergleich zur Cos⁻ Testreihe (Cos-7, transfiziert mit HLA-A*0201 und GFP) feststellen, siehe Abbildung 4-20, Seite 70.

Die Zytotoxizität des Klons LILRA2-30-1G4 wurde in mehreren Granzym B-Assays getestet, siehe Abbildung 4-21, Seite 71. Den einzelnen ELISpots ging jeweils eine zweiwöchige Expansion der Zellen voraus.

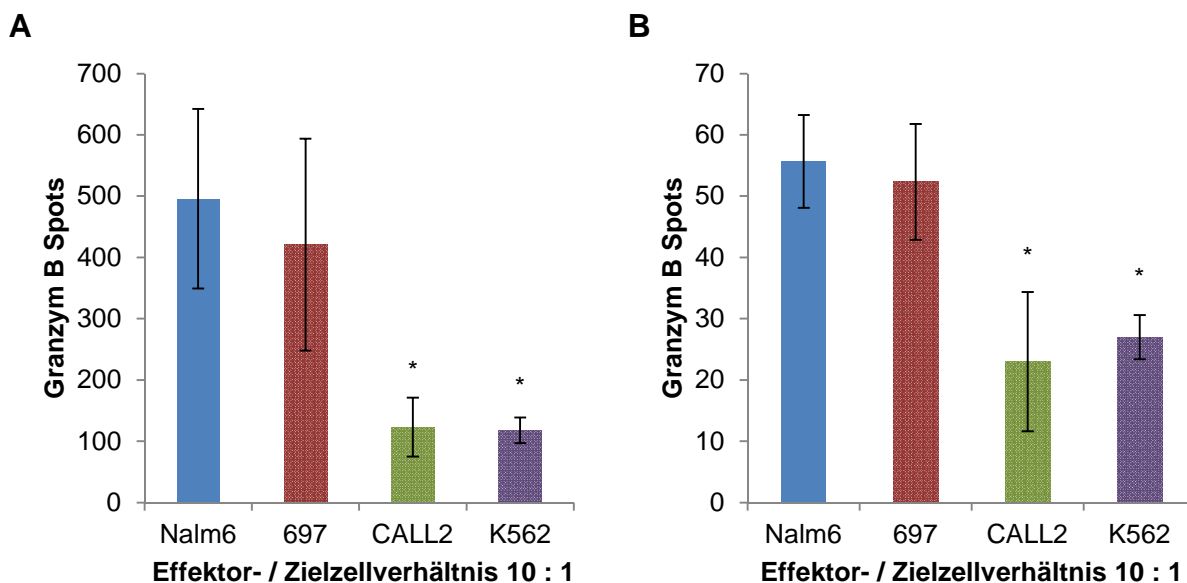


Abbildung 4-21 Alloreaktive Zytotoxizität von LILRA2-30-1G4 im Granzym B-ELISpot

Dargestellt wird die Granzym B-Ausschüttung von LILRA2-30-1G4 bei Kontakt mit cALL-Tumorzelllinien und der Negativkontrolle zur NK-Zell-Aktivität in wiederholten Granzym B-ELISpots. Das Effektor- / Zielzellverhältnis in der Abbildung beträgt 10 : 1.

Sterne kennzeichnen das Signifikanzniveau der Unterschiede in der Reaktion bei Kontakt mit Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (* $p < 0,05$).

Es zeigt sich eine spezifische Zytotoxizität des Klon bei Kontakt mit den HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien Nalm6 und 697 im initialen Granzym B-ELISpot (A) und wiederholten Granzym B-Assays (B) im Sinne einer Alloreaktivität.

1G4 zeigte eine spezifische Granzym B-Ausschüttung bei Kontakt mit HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien im Sinne einer Alloreaktivität. Es ergaben sich signifikante Unterschiede in den Reaktionen auf Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien CALL2 und K562. Die spezifische Zytotoxizität blieb auch nach mehreren Expansionszyklen erhalten, jedoch nahm die Reaktivität im Allgemeinen ab, die Anzahl der Spots verringerte sich zunehmend.

4.2.2.2 LILRA2-30-1H3

Beim initialen IFN γ -Screen mit peptidbeladenen T2-Zellen zwei Wochen nach der Sortierung der spezifischen T-Zellen zeigte der Klon LILRA2-30-1H3 eine spezifische IFN γ -Ausschüttung beim Kontakt mit den LILRA2-peptidbeladenen T2-Zellen. Diese Spezifität blieb auch bei erneuten IFN γ -Assays erhalten, siehe Abbildung 4-22, Seite 72, wobei sich jedoch die Reaktivität der Zellen und somit die Anzahl der Spots im IFN γ -ELISpot verringerte.

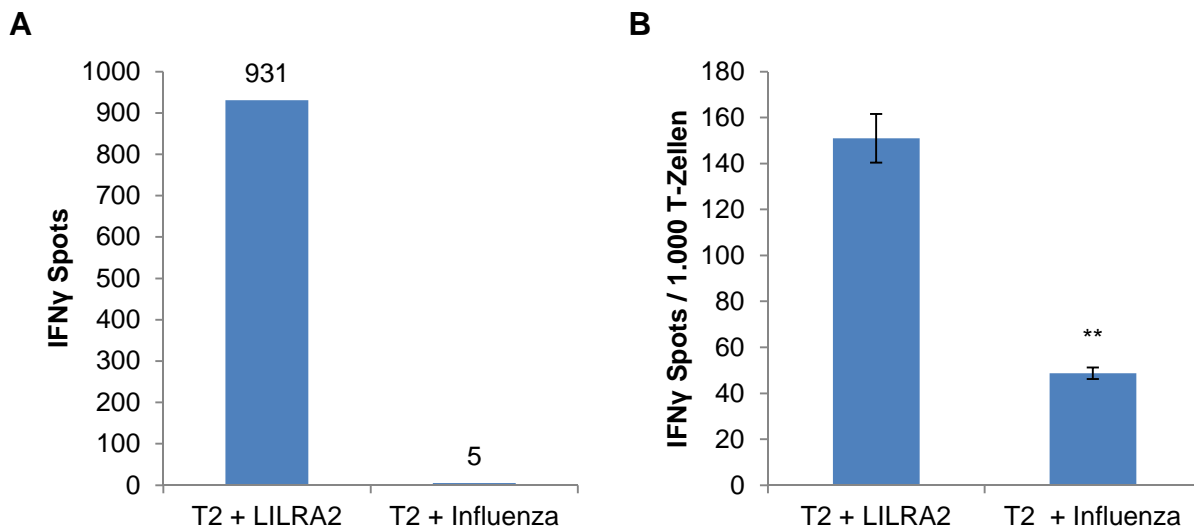


Abbildung 4-22 Peptidspezifität von LILRA2-30-1H3 im initialen Screening sowie im wiederholten IFN γ -ELISpot

Dargestellt wird die spezifische IFN γ -Ausschüttung bei Kontakt mit LILRA2-30-peptidgepulsten T2-Zellen im initialen Screening (A) und im wiederholten IFN γ -ELISpot (B) im Vergleich zur Negativkontrolle (Influenza). Die Balkenbeschriftung entspricht der Anzahl der detektierten Spots (A). Sterne kennzeichnen das Signifikanzniveau der Unterschiede in den Reaktionen bei Kontakt mit dem spezifischen Peptid im Vergleich zur Kontrollzelllinie (** $p < 0,01$).

Weiterhin wurde die Reaktionsfähigkeit des Klons bei Kontakt mit Tumorzelllinien sowie transfizierten Cos-7-Zellen im IFN γ -Assay überprüft, siehe Abbildung 4-23, Seite 72.

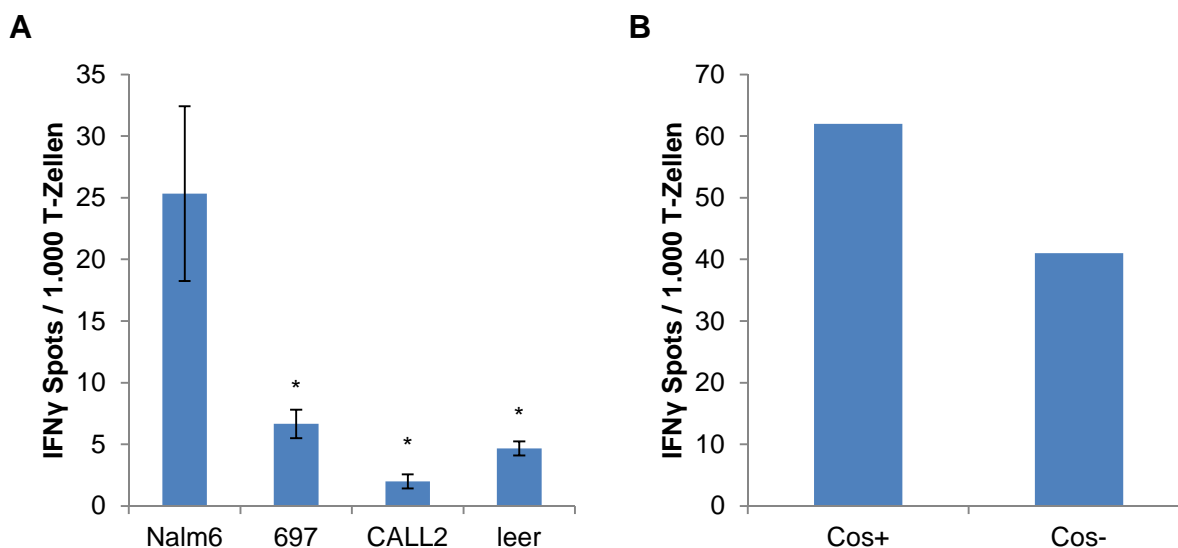


Abbildung 4-23 Peptidspezifität und HLA-A*0201 Spezifität von LILRA2-30-1H3 im IFN γ -ELISpot mit Tumorzelllinien und Cos-7

Dargestellt wird die IFN γ -Ausschüttung bei Kontakt mit Tumorzelllinien (A) sowie transfizierten Cos-7-Zellen (Cos+ transfiziert mit HLA-A*0201 und LILRA2, Cos- transfiziert mit HLA-A*0201 und GFP), repräsentatives Ergebnis dargestellt in Abbildung (B).

Sterne kennzeichnen das Signifikanzniveau der Unterschiede in den Reaktionen bei Kontakt mit Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (* $p < 0,05$).

Die Peptidspezifität der allorestingierten CTL wird gezeigt durch selektive IFN γ -Ausschüttung bei Kontakt mit der HLA-A*0201⁺, LILRA2 exprimierenden cALL-Zelllinie Nalm6 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (A). Zudem spezifische Erkennung des Peptidantigens in den mit LILRA2 transfizierten Cos-7-Zellen (Cos+) (B).

1H3 erkannte spezifisch die HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie Nalm6, welche LILRA2 exprimiert. Eine geringere IFN γ -Ausschüttung war bei Kontakt mit 697 zu erkennen, sodass von einer peptidspezifischen Reaktion auszugehen war. HLA-A*0201⁻ Zelllinien riefen kaum Reaktionen hervor. Somit lag eine statistisch signifikante HLA-A*0201-Spezifität des Klons vor. Mit HLA-A*0201 und LILRA2 transfizierte Cos-7 Zellen lösten bei 1H3 eine IFN γ -Ausschüttung aus, jedoch war die Abgrenzung zur Negativkontrolle mäßig.

Zur Beurteilung der spezifischen Zytotoxizität wurde der Zellklon im Granzym B-Elispot getestet, siehe Abbildung 4-24, Seite 73 und Abbildung 4-25, Seite 74.

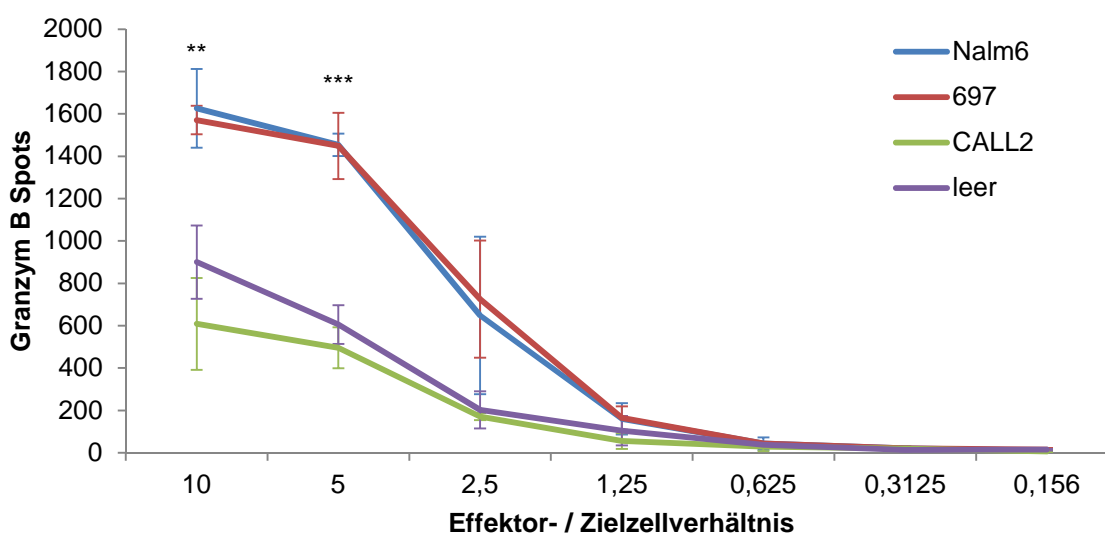


Abbildung 4-24 HLA-A*0201 Alloreaktive Zytotoxizität von LILRA2-30-1H3 im Titrations-Granzym B-ELISpot

Dargestellt ist die Granzym B-Ausschüttung von LILRA2-30-1H3 bei Kontakt mit Tumorzelllinien und der Negativkontrolle zur Spontanaktivität bei titriertem Effektor- / Zielzellverhältnis von 10 : 1 bis 0,156 : 1. Sterne kennzeichnen das Signifikanzniveau der Unterschiede in den Reaktionen bei Kontakt mit Nalm6 im Vergleich zur HLA-A*0201 negativen cALL-Linie CALL2 (**p < 0,01, ***p < 0,001). Die Alloreaktivität wird gezeigt durch die selektive Granzym B-Ausschüttung beim Kontakt mit den HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien Nalm6 und 697.

Im Granzym B-Assay konnte eine spezifische Zytotoxizität bei Kontakt mit den beiden HLA-A*0201⁺ cALL-Linien Nalm6 und 697 im Sinne einer alloreaktiven Reaktion nachgewiesen werden. Der Kontakt mit Nalm6 löste eine geringfügig höhere Granzym B-Ausschüttung aus als der Kontakt mit 697. Die Reaktion war bei einem Effektor- / Zielzellverhältnis von 10 : 1 am stärksten und nahm im Verlauf der Titration ab. Die spezifische Granzym B-Ausschüttung war gut abgrenzbar zu den Vergleichswerten der HLA-A*0201⁻ cALL-Linie CALL2 und den leeren, nur mit T-Zellen beladenen wells.

Auch nach weiteren Expansionszyklen zeigte sich eine erhaltene Spezifität in nachfolgenden Granzym B-Assays, welche allerdings weniger ausgeprägt war als in den initialen

Versuchsansätzen. Auch die Gesamtanzahl der Spots verringerte sich im Verlauf. Die deutlichsten Ergebnisse sind in Abbildung 4-25, Seite 74 dargestellt.

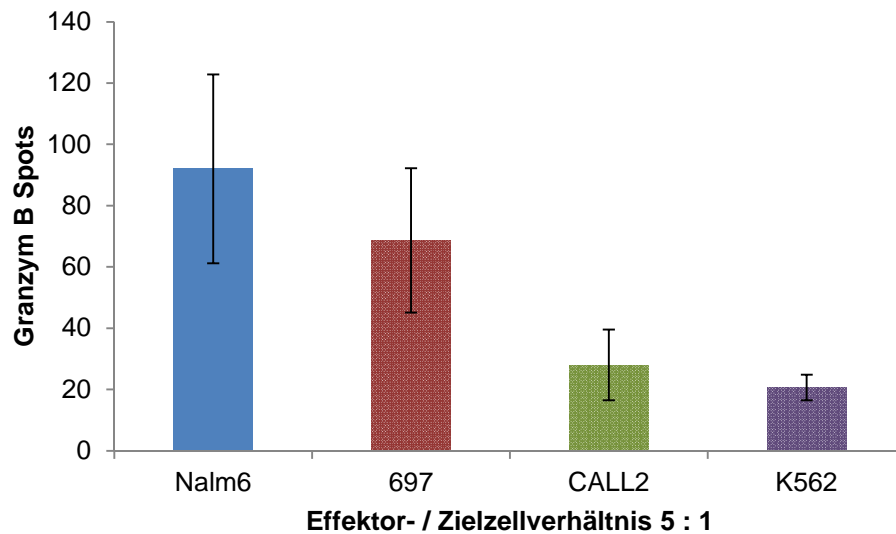


Abbildung 4-25 Peptidspezifische und HLA-A*0201 spezifische Zytotoxizität von LILRA2-30-1H3 im Granzym B-ELISpot

Dargestellt ist die Granzym B-Ausschüttung von LILRA2-30-1H3 bei Kontakt mit Tumorzelllinien und der Negativkontrolle zur NK-Zell-Aktivität bei einem Effektor- / Zielzellverhältnis von 5 : 1 im wiederholten Granzym B-Assay.

Die höhere Granzym B-Ausschüttung bei den HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien Nalm6 und 697 ist ein Hinweis auf eine Alloreaktivität der CTL.

4.2.2.3 LILRA2-30-5H4

Der Klon LILRA2-30-5H4 zeigte im initialen IFN γ -Screening ein spezifisches Reaktionsverhalten, siehe Abbildung 4-26.

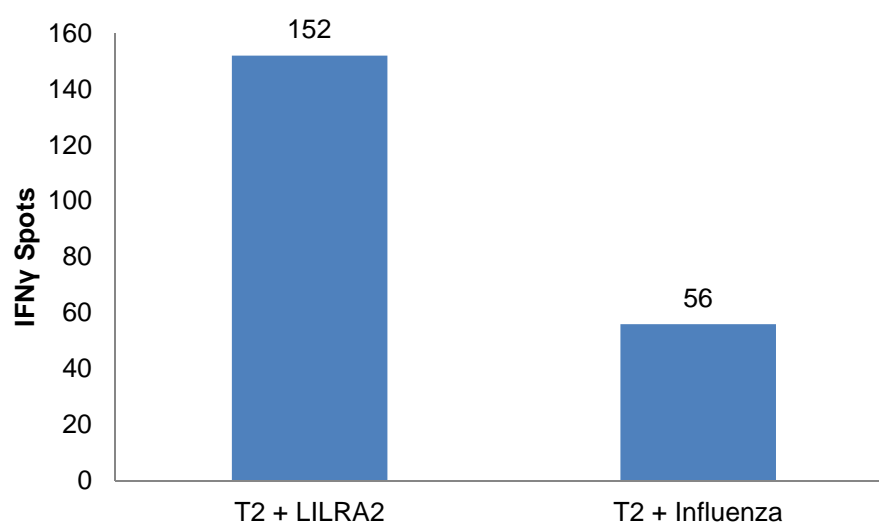


Abbildung 4-26 Peptidspezifität von LILRA2-30-5H4 im initialen Screening-IFN γ -ELISpot-Assay

Dargestellt ist die spezifische IFN γ -Ausschüttung beim Kontakt mit LILRA2-30-peptidgepulsten T2-Zellen im initialen Screening im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Balkenbeschriftung entspricht der Anzahl der detektierten Spots.

Daraufhin wurde der Klon weiterexpandiert und erneut im IFN γ -Assay getestet. Allerdings nahmen die Reaktionsintensität und somit auch die Spezifität in folgenden IFN γ -ELISpots stetig ab (nicht abgebildet). Die Zellen wurden zunächst kryokonserviert. Nach Auftauen und zweiwöchiger Expansionsphase wurde der Klon erneut getestet. Wiederum ergab der IFN γ -Ansatz keine spezifischen Ergebnisse, im Granzym B-ELISpot zeigte LILRA2-30-5H4 jedoch spezifische Reaktionen, siehe Abbildung 4-27.

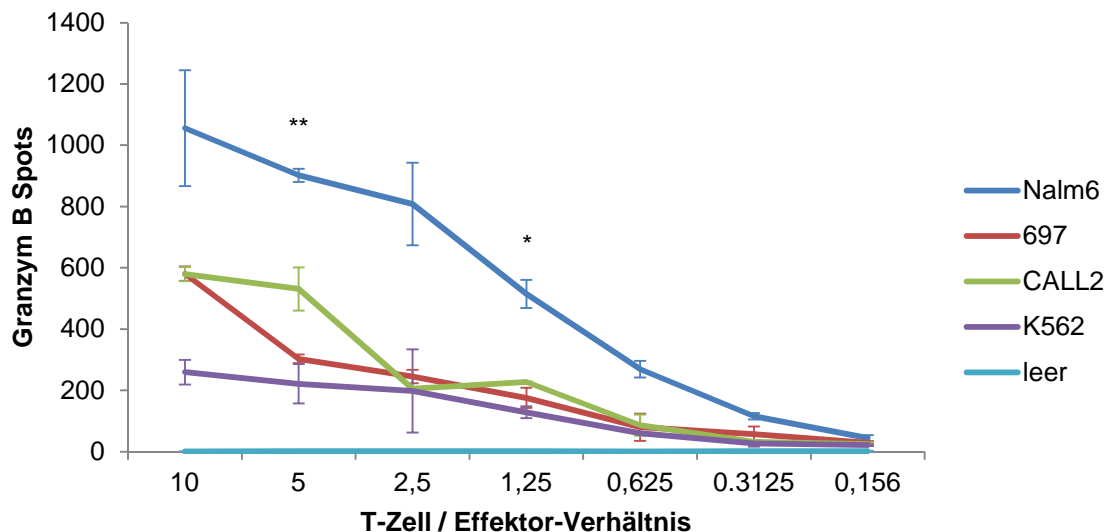


Abbildung 4-27 Peptidspezifische und HLA-A*0201 spezifische Zytotoxizität von LILRA2-30-5H4 im Titrations-Granzym B-ELISpot

Dargestellt ist die Granzym B-Ausschüttung von LILRA2-30-5H4 bei Kontakt mit cALL-Tumorzelllinien sowie den Negativkontrollen zu NK-Zell-Aktivität und Spontanaktivität bei titriertem Effektor- / Zielzellverhältnis von 10 : 1 bis 0,156 : 1.

Sterne kennzeichnen das Signifikanzniveau der Unterschiede in den Reaktionen bei Kontakt mit Nalm6 im Vergleich zur HLA-A*0201 negativen cALL-Linie CALL2 (*p < 0,05, **p < 0,01).

Die peptidspezifische Zytotoxizität wird gezeigt durch die spezifische Granzym B-Ausschüttung bei Kontakt mit der HLA-A*0201⁺, LILRA2 exprimierenden cALL-Zelllinie Nalm6.

Der Klon 5H4 zeigte eine deutliche Granzym B-Ausschüttung bei Kontakt mit der HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie Nalm6, welche LILRA2 exprimiert. Weniger ausgeprägt, jedoch dennoch erkennbar war die Reaktion auf die zweite HLA-A*0201⁺ cALL-Linie 697. Jedoch reagierte der Klon auch auf die HLA-A*0201⁻ cALL-Linie CALL2, die LILRA2 in geringem Maße exprimiert. Von den positiven Reaktionen deutlich abgrenzbar war die geringe Granzym B-Ausschüttung bei Kontakt mit K562, die als Kontrolle der NK-Zell-Aktivität diente. In den leeren wells, die nur mit T-Zellen befüllt wurden, wurde keine Granzym B-Ausschüttung beobachtet, somit ergibt sich kein Hinweis auf eine Spontanaktivität der T-Zellen. Daher ist von einer peptidspezifischen Zytotoxizität der allorestingierten CTL auszugehen.

Es wurden 3 LILRA2-30-spezifische CTL-Klone im Interferon γ -ELISpot auf ihre peptidspezifische Erkennung antigenexprimierender Zielzellen sowie im Granzym B-ELISpot auf ihre peptidspezifische Zytotoxizität beim Kontakt mit den Zielzellen getestet. Alle untersuchten CTL-Klone zeigten eine peptidspezifische Erkennung ihrer Epitope im initialen IFN γ -ELISpot, auffallend war jedoch eine im Verlauf abnehmende Reaktivität und eine Zunahme unspezifischer Reaktionen, vor allem im IFN γ -ELISpot. Dahingegen blieb die Reaktivität, wenn auch hier im Verlauf tendenziell abnehmend, im Granzym B-ELISpot länger erhalten. 1G4 und 1H3 erkannten das präsentierte Antigen sowohl bei Kontakt mit LILRA2-30-peptidbeladenen T2-Zellen als auch in antigenexprimierenden Tumorzelllinien und im künstlichen Zellkonstrukt Cos-7. Im Sinne einer Alloreaktivität lösten die HLA-A*0201⁺ Tumorzelllinien die stärksten Reaktionen aus. Alle drei Klone reagierten im Zytotoxizitäts-Assay mit einer spezifischen Granzym B-Ausschüttung, welche bei Kontakt mit der HLA-A*0201⁺, LILRA2-exprimierenden cALL-Zelllinie Nalm6 durchwegs am höchsten ausgeprägt war. Somit gelang die Generierung allorestingierter LILRA2-spezifischer CTL, die selektiv das präsentierte Antigen erkannten und in der Lage waren, antigenexprimierende Zellen im korrekten HLA-Kontext abzutöten.

4.3 Charakterisierung der CTL-Oberflächenantigene

T-Zell-Klone, die in den ELISpot-Assays spezifische Reaktionen zeigten und deren Wachstumsverhalten ausreichende Zellzahlen für weitere Versuche ermöglichte, wurden durchflusszytometrisch genauer charakterisiert. Die 4 Klone STK32B-2D4, STK32B-2E7, LILRA2-1H3 und LILRA2-1G4 erfüllten diese Voraussetzungen.

Um Hinweise auf eine Klonalität der CTL-Kulturen zu gewinnen, wurde eine Analyse des V β -Repertoires des TCR der Zellen durchgeführt. Aufgrund durchgängig geringer Zellzahlen und daraus resultierender Auswertungsschwierigkeiten in der Durchflusszytometrie blieb die Analyse jedoch ohne verwertbares Ergebnis.

Anhand des Expressionsmusters der Oberflächenantigene konnten Rückschlüsse auf Reifegrad und Subpopulation der Zellen gezogen werden. Zusätzlich wurde die Peptidspezifität der CTL durch Anfärbung mit fluoreszenzmarkiertem peptidspezifischem Pentamer untersucht. Tabelle 3-3, Seite 42 zeigt die untersuchten Oberflächenantigene sowie deren Funktion und Vorkommen (Wahn 2005). Nachfolgend ist exemplarisch die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenantigene von Klon STK32B-186-2D4 dargestellt, siehe Abbildung 4-28, Seite 77.

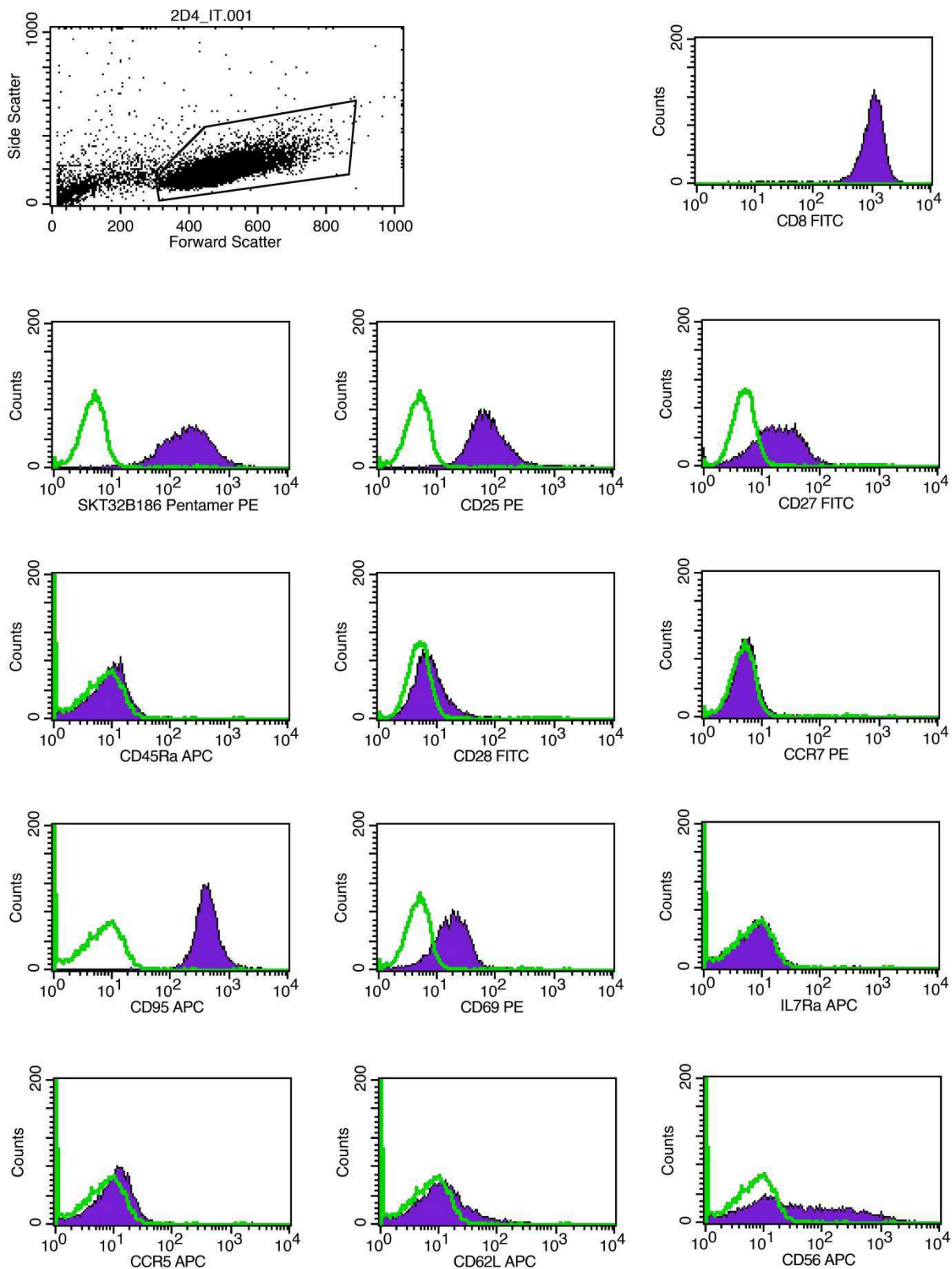


Abbildung 4-28 durchflusszytometrische Analyse der exprimierten Oberflächenantigene von STK32B-186-2D4

Das Expressionsprofil der Oberflächenantigene ist aufgrund niedriger Expression von CD62L, CCR7, IL7Ra, CD27 und CD28 sowie vermehrter Ausprägung von CD25 und CD69 vereinbar mit einem ausgereiften T-Zell-Phänotyp (*late effector* bzw. *effector memory* T-Zellen, T_{EM}). Peptidspezifität gezeigt durch Rechtsverschiebung im Vergleich zum Isotyp nach Anfübung mit fluoreszenzmarkiertem Pentamer.

Zusammenfassend ließ sich bei allen 4 Klonen ein konkordanter Phänotyp feststellen:

Tabelle 4-3 Expressionsprofil der Oberflächenantigene der T-Zell-Klone

Oberflächenantigen	LILRA2-30-1G4	LILRA2-30-1H3	STK32B-186-2D4	STK32B-186-2E7
CD8	+	+	++	++
Pentamer	(+)	(+)	+	(+)
CD25	+	+	+	+
CD27	(+)	(+)	(+)	(+)
CD45Ra	-	-	-	-
CD28	-	-	-	-
CCR7 (CD197)	-	-	-	-
CD95	+	+	+	+
CD69	(+)	(+)	(+)	(+)
IL7-Ra	-	-	-	-
CCR5 (CD195)	-	-	-	-
CD62L	-	-	-	-
CD56	+/-	++	+/-	+

Zeichenerklärung: Mittelwert der Verschiebung in der Histogrammdarstellung der Durchflusszytometrie: ++: $> 10^3$, +: $10^2 - 10^3$, (+): $10^1 - 10^2$, +/-: $< 10^1$, -: kein Shift

Alle Zellklone exprimierten als CTL definitionsgemäß CD8 und zeigten bei Anfärbung mit dem jeweiligen Pentamer Peptidspezifität. Die Expression von CD25, CD56 und CD69 war vereinbar mit dem Phänotyp aktivierter T-Zellen. CD45Ra ist ein typischer Oberflächenmarker unreifer T-Zellen, infolgedessen entsprach die Abwesenheit des Faktors auf den untersuchten T-Zell-Klonen deren phänotypischem Reifegrad nach *Priming*, Aktivierung und mehreren Expansionszyklen. Sallusto prägte 1999 die Subklassifikation von *Memory-T-Zellen* in *central memory* (T_{CM}) und *effector memory* (T_{EM}) T-Zellen (Sallusto et al. 1999). Die beiden Subtypen unterscheiden sich in ihren *homing*-Fähigkeiten und Effektorfunktionen sowie im Expressionsmuster ihrer Oberflächenantigene. Das Hauptunterscheidungsmerkmal hierbei war die Expression von CCR7 und CD62L, wobei T_{CM} $CCR7^+CD62L^+$, T_{EM} $CCR7^-CD62L^-$ waren. Demnach entsprachen die hier getesteten Zellklone dem ($CCR7^- / CD62L^-$)-Phänotyp der *effector memory* (T_{EM}) T-Zellen.

5 Diskussion

5.1 Auswahl geeigneter Gene

Ziel dieser Arbeit war die Generierung alloreaktiver T-Zellen, die sich spezifisch gegen von maligne transformierten cALL-Blasten exprimierte Antigene richten. Der erste Schritt vor der Bestimmung geeigneter Zielepitope bestand in der Auswahl der zugrundeliegenden Gene. Voraussetzung war, dass diese Gene, im Sinne tumorassoziierter (*tumor associated antigen*, TAA) oder tumorspezifischer (*tumor specific antigen*, TSA) Antigene in cALL-Tumorzellen, nicht aber in Normalgewebe exprimiert werden, um eine zielgerichtete Zerstörung Antigen exprimierender Tumorzellen durch die CTL zu ermöglichen, ohne das Normalgewebe zu schädigen. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gene STK32B und LILRA2 in cALL-Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe deutlich stärker exprimiert werden (Beinvogl 2010).

5.1.1 STK32B

STK32B ist auf Chromosom 4p6.2 lokalisiert und kodiert für das Protein Serin / Threonin Kinase 32B (Ingersoll et al. 2010). Kinasen sind Enzyme, die Phosphatgruppen auf ihre Substrate übertragen. Im Falle der Proteinkinasen führt dies in der Regel zu einer funktionellen Veränderung des Substratproteins, beispielsweise durch Veränderung der Enzymaktivität, der Lokalisation oder der Bindungsfähigkeit an andere Proteine. Die Serin-Threonin-Kinasen stellen eine Untergruppe der Proteinkinasen dar, die spezifisch Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin und Threonin phosphorylieren. Proteinkinasen vermitteln einen Großteil der Signaltransduktion in eukaryotischen Zellen. Durch Modifikation der Substrataktivität beeinflussen sie überdies andere komplexe Zellprozesse wie Metabolismus, Transkription, Progression des Zellzyklus, Zellbewegung sowie Apoptose und Differenzierung der Zelle. Aufgrund ihrer immensen Bedeutung für die Zellfunktion sind Mutationen von Proteinkinasen häufig an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, insbesondere auch Erkrankungen des onkologischen Spektrums, beteiligt (Manning et al. 2002). Eine Veränderung ihres Expressionsprofils kann weitreichende Folgen haben. Die Serin / Threonin Kinase 32B zeigt in leukämischen Blasten von cALL-Zelllinien eine deutliche Expression, bei sehr geringer bis fehlender Expression in Normalgewebe (Beinvogl 2010; Lukk et al. 2010).

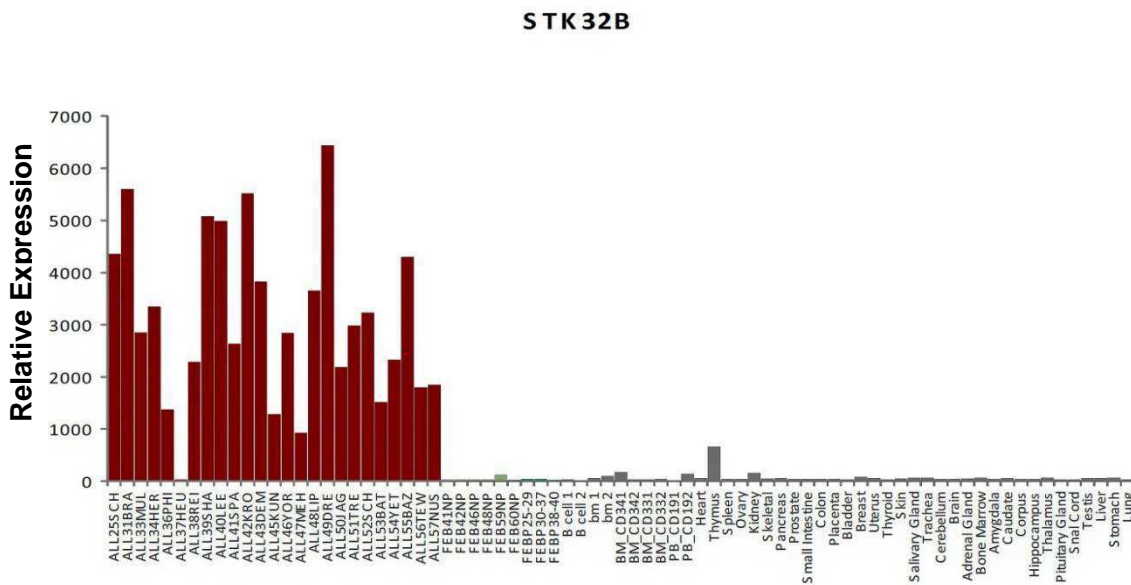


Abbildung 5-1 Relative Expression von STK32B

cALL-Zelllinien (rot), Kontrollproben fetale B-Zellen (grün), Normalgewebe (grau)
aus: Beinvogel, 2010, S. 75

Eine vermehrte Expression eines Gens, beispielsweise bedingt durch eine fehlerhafte Genregulation, führt zur erhöhten Synthese des Proteins, das durch dieses Gen kodiert wird. Der Mechanismus der veränderten Regulation von STK32B oder eine potenziell aktivierende Mutation im Rahmen einer cALL ist derzeit nicht bekannt, ebenso wenig die reguläre Funktion von STK32B in der Zelle (Ingersoll et al. 2010). Ein Kausalzusammenhang zwischen der vermehrten Expression von STK32B und der Pathogenese der cALL ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beschrieben. Die relativ hohe Genexpression von STK32B in ALL-Zelllinien bei äußerst geringer bis fehlender Expression in Normalgewebe qualifizierte das Gen als tumorassoziiertes Antigen und daher als ein interessantes Zielgen für cALL-spezifische CTL.

5.1.2 LILRA2

LILRA2 (*leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A, member 2*, Synonyme: ILT1, LIR7, CD85H, LIR-7) ist ein auf Chromosom 19q13.4 lokalisiertes Gen das für einen Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor (*LIR, leukocyte immunoglobulin-like receptor*) kodiert. LILRA2 gehört zur LIR-Familie von Immunrezeptoren, die vor allem auf der Zelloberfläche von Monozyten und B-Zellen, in geringerer Ausprägung auch auf Dendritischen Zellen und NK-Zellen (natürliche Killerzellen) exprimiert werden. Es werden aktivierende (A) und inhibitorische (B) LIR-Oberflächenrezeptoren unterschieden, wobei LILRA2 den aktivierenden zuzuschreiben ist. Als aktivierender Rezeptor ist LILRA2 in inflammatorischem

Gewebe hochgradig exprimiert (Mamegano et al. 2008), ein verändertes Expressionsprofil und ein daraus resultierender Kausalzusammenhang ist bei Autoimmunerkrankungen beschrieben (Anderson und Allen 2009). LILRA2 ist in der Lage, Immunantworten zu modulieren, beispielsweise indem die Fähigkeit des angeborenen Immunsystems, die adaptive T-Zell-Antwort zu aktivieren, unterdrückt und im Gegenzug eine Entzündungsreaktion gefördert wird (Lee et al. 2007). Diese immunsuppressive Wirkung von LILRA2 wird am Beispiel der Lepra deutlich. Die klinische Verlaufsform der Lepra ist abhängig vom zugrundeliegenden Genexpressionsprofil. Hierbei wird die milder verlaufende, limitierte tuberkuloide Verlaufsform von der disseminierten, mit hoher Bakterienlast einhergehenden lepromatösen Verlaufsform unterschieden. LILRA2 wird bei der lepromatösen Form vermehrt exprimiert; es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von LILRA2 bei der Lepra über die Veränderung der von Monozyten produzierten Zytokine die zellvermittelten Abwehrmechanismen supprimiert (Sieling et al. 1994) und über die Beeinflussung TLR (*toll like receptors*)-vermittelter Mechanismen die antimikrobielle Immunantwort blockiert (Bleharski 2003). Neben entzündlichem Gewebe wird LILRA2 auch in hämatopoetischem und lymphatischem Gewebe exprimiert. Es lassen sich hohe relative Expressionswerte von LILRA2 in cALL-Leukämiezelllinien im Vergleich zu gesunden Lymphoblasten nachweisen. In anderen Arbeiten unseres Labors (unveröffentlicht) konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Gens in LILRA2-positiven cALL-Linien zu einer Suppression der T-Zellantwort führt.

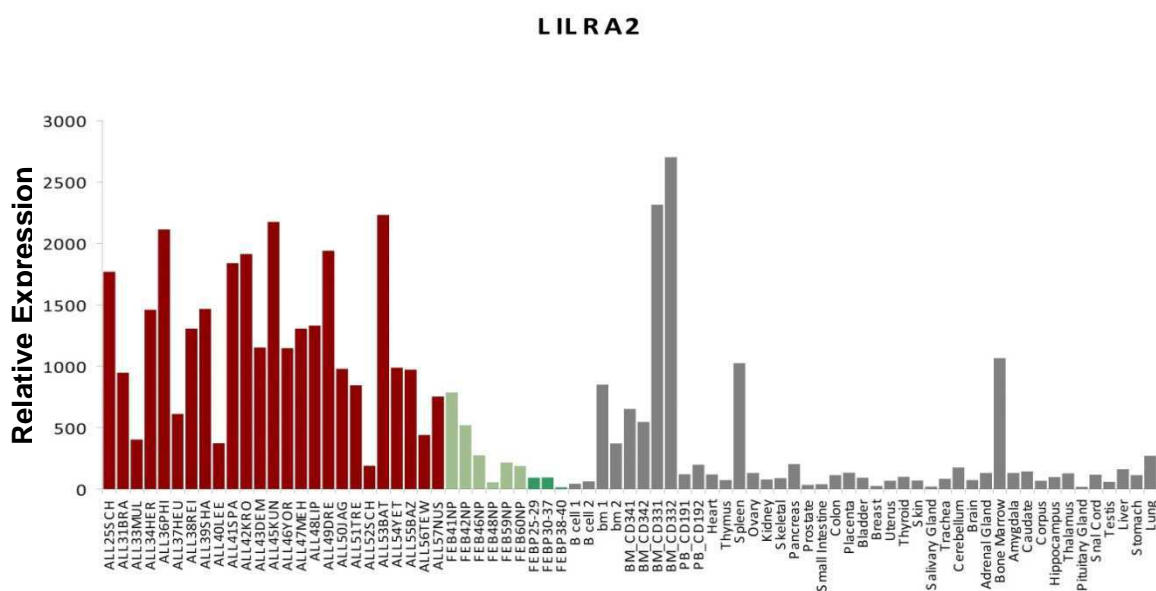


Abbildung 5-2 Relative Expression von LILRA2

cALL-Zelllinien (rot), Kontrollproben fetale B-Zellen (grün), Normalgewebe (grau)
 aus: Beinvogel, 2010, S. 80

Durch die vermehrte Expression von LILRA2 in cALL-Zelllinien bei äußerst geringer Expression in gesunden Lymphoblasten konnte LILRA2 als tumorassoziiertes Antigen gewertet werden und stellte somit ein interessantes Zielgen für cALL-spezifische CTL dar.

5.2 Epitopauswahl und Verifizierung der Bindungsfähigkeit

Nach der Auswahl geeigneter Gene bestand der nächste Schritt in der Identifizierung von in deren Peptidstruktur enthaltenen Epitopen, die sich als spezifische Bindungsstellen für CTL eigneten. Entscheidend hierbei war, dass diese Epitope eine ausreichend hohe Bindungsaffinität an ein vordefiniertes HLA-Molekül aufwiesen, um eine starke und stabile Bindung zu ermöglichen. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf das HLA-A*0201-Molekül gelegt, da dieses in der kaukasischen Bevölkerung am häufigsten vorkommt (Sánchez-Velasco et al. 2001). Studien aus den USA über die Häufigkeitsverteilung von HLA-Allelen beziffern HLA-A*0201 als häufigstes HLA-Allel bei europäischstämmigen Amerikanern (Kaukasier) und Hispanics (spanische oder hispanoamerikanische Abstammung). Bei den asiatischen und afroamerikanischen Bevölkerungsgruppen wird HLA-A*0201 als viert- respektive siebthäufigstes HLA-Allel angegeben (Maiers et al. 2007). Eine Auswertung der Daten von 11.407 registrierten Knochenmarkspendern in Deutschland im Jahr 2005 ergab eine Häufigkeit des HLA-A*02-Allels von 49,9 % (Gonzalez-Galarza et al. 2011). Potenzielle CTL-Epitope wurden *in silico* ausgewählt. Die dafür verwendeten Softwareprogramme berechnen die Bindungswahrscheinlichkeit eines Peptids an HLA-A*0201 und ermitteln aus den Daten einen Prädiktionswert. Grundlagen der Berechnung sind Bindemotive (Bewertung aller Aminosäuren und deren Position im Peptid im Hinblick auf mögliche Primär- und Sekundäranker und im Vergleich zu natürlichen MHC-Liganden, T-Zell-Epitopen oder Bindepeptiden) sowie experimentell abgeleitete quantitative Matrizen und komplexe Algorithmen. Die verwendeten Softwareprogramme sind etabliert und liefern zuverlässige Ergebnisse (Yu et al. 2002; Liao und Arthur 2011); die Bindungsaffinität der anhand der *in silico* erhobenen Prädiktionswerte ausgewählten Peptide wurde vor Verwendung in weiteren Experimenten zusätzlich *in vitro* verifiziert. Von den 9 ausgewählten Peptiden wiesen 5 eine sehr gute Bindungsaffinität (> 90 % der Positivkontrolle) auf. STK32B-186 war STK32B-124 im *in vitro*-Experiment überlegen und wurde daher als Testpeptid ausgewählt; ein entsprechendes Pentamer für die anschließende Sortierung peptidspezifischer T-Zellen wurde in Auftrag gegeben. Bei den LILRA2-Peptiden wurden insgesamt 3 *in vitro*-Versuche durchgeführt, da bei den vielversprechendsten Peptiden der ersten beiden Versuchsreihen die Synthese der entsprechenden Pentamere seitens der Herstellerfirma aufgrund zu hoher Hydrophobizität nicht möglich war. Im dritten Versuchsdurchlauf wurde LILRA2-30 als bestes Peptid ausgewählt und das entsprechende

Pentamer synthetisiert. Weder STK32B-186 noch LILRA2-30 sind bisher als bekannte Epitope publiziert worden; in dieser Arbeit wurden somit antigenspezifische CTL generiert, welche sich spezifisch gegen zuvor unbekannte cALL- Epitope richteten.

5.3 Allogenes in vitro Priming

Die Qualität der Selektion CD8⁺ Zellen aus PBMC wurde vor deren Verwendung im *Priming*-Experiment durchflusszytometrisch überprüft. Nur hoch aufgereinigte CD8⁺ Zellfraktionen (> 95 %) wurden verwendet. Ebenso wurde die Effizienz der CD14⁺ Isolation aus PBMC durchflusszytometrisch erfasst. Auch hier kamen nur hochaufgereinigte CD14⁺ Zellen (> 95 %) für die Generierung Dendritischer Zellen zum Einsatz. Die Ausreifung der DC wurde mikroskopisch und durchflusszytometrisch verifiziert; ausschließlich ausgereifte DC, welche die Reifungsmarker CD83, CD86 und HLA-DR in hoher Ausprägung exprimierten wurden für das IVP verwendet.

Entsprechend dem allogenen Ansatz waren die antigenpräsentierenden DC HLA-A*0201⁺ und die naiven T-Zellen HLA-A*0201⁻. Um die raren peptidspezifischen allorestingierten CTL nach dem IVP und der darauffolgenden Expansionsphase in der Menge der mehrheitlich vorkommenden unspezifischen alloreaktiven CTL zu identifizieren und daraus zu isolieren, wurden die CTL mit einem peptidspezifischen PE-gekoppelten MHC-Pentamer sowie einem CD8-FITC Antikörper angefärbt. Somit konnten die doppelpositiven (CD8-FITC und Pentamer-PE) peptidspezifischen CTL durchflusszytometrisch identifiziert und separiert werden. Diese Methode erlaubte die Isolation von peptidspezifischen CTL-Populationen bis zu einer Fraktion von 0,005 % der Ausgangszellzahl. Die spezifischen CTL wurden nach der Sortierung mittels *Limiting Dilution* vereinzelt und expandiert. Hierbei betrug die statistische Zellzahl pro *well* je nach gewählter Verdünnung zwischen 1 und 5 CTL. Eine geringere Zellzahl pro *well* erhöht die Wahrscheinlichkeit, tatsächlich einen Einzelzellklon zu expandieren, wohingegen die Wahrscheinlichkeit des Anwachsens der Zellen mit der Anzahl der statistisch vorhandenen Zellen pro *well* steigt. Die Wahl der Zellzahl pro *well* stellte somit einen Kompromiss zwischen diesen beiden Ausgangspunkten dar. Für die Weiterexpansion wurden bevorzugt Zellen aus den *wells* mit geringeren statistischen CTL-Zahlen verwendet. Alle im Ergebnisteil aufgeführten Zellklone stammten aus *wells* mit 1 bzw. 1,5 statistisch vorhandenen spezifischen CTL, sodass von einer klonalen Situation ausgegangen werden konnte. Nach einer zweiwöchigen Expansionsphase in 96-*well*-Platten wurde ein initialer Screening-ELISpot durchgeführt, in welchem die Interferon γ -Ausschüttung der CTL bei Kontakt mit relevantem / irrelevantem Peptid (STK32B bzw LILRA2 als relevantes, Influenzapeptid als irrelevantes Peptid) präsentiert auf T2-Zellen untersucht wurde. Die IFN γ -Ausschüttung ist hierbei ein Maß der spezifischen T-Zell-Aktivierung (Shafer-Weaver et

al. 2003). CTL mit spezifischer IFN γ -Ausschüttung im Screening-Versuch wurden in T25-Zellkulturflaschen für weitere zwei Wochen expandiert, um ausreichend hohe Zellzahlen für Folgeversuche zu ermöglichen. Die spezifischen CTL wurden in weiteren ELISpot-Assays auf spezifische IFN γ -Ausschüttung als Zeichen der spezifischen Zellerkennung mit entsprechender T-Zell-Aktivierung sowie im Granzym B-ELISpot auf spezifische Zytotoxizität getestet. Die Exozytose zytoplasmatischer Granula aus Effektorzellen bei Kontakt mit Zielzellen ist einer der Hauptmechanismen der zellvermittelten Zytotoxizität. Die Granula enthalten unterschiedliche Proteine, unter anderem das perforierende Protein Perforin und eine Art von Serinproteasen, genannt Granzyme, einschließlich Granzym B. Granzym B wird vor allem in CTL und NK-Zellen gefunden und stellt durch die Vermittlung einer raschen Apoptoseinduktion der Zielzellen einen wichtigen Bestandteil der Abwehrmechanismen gegenüber virusinfizierten und Tumorzellen dar (Bots und Medema 2006). Somit kann die Granzym B-Ausschüttung von CTL bei Kontakt mit Zielzellen als Maß der zellvermittelten Zytotoxizität dienen; der Granzym B-ELISpot-Assay gilt hierbei als ausgezeichnete Methode um die Granzym B-Ausschüttung stimulierter CTL zu erfassen (Shafer-Weaver et al. 2003). Als Zielzelllinien wurden hierfür neben den peptidbeladenen T2-Zellen und mit relevantem / irrelevantem Peptid transfizierten Cos-7-Zellen verschiedene Tumorzelllinien verwendet. Eine spezifische Erkennung von Nalm6 durch CTL war als peptidspezifische Reaktion HLA-A*0201-restringierter alloreaktiver CTL zu werten, da die HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie sowohl STK32B als auch LILRA2 exprimiert. 697 diente dem Nachweis einer cALL-spezifischen alloreaktiven Reaktion. Eine im Vergleich zu HLA-A*0201⁺ Zelllinien gering ausgeprägte Reaktion der CTL auf die HLA-A*0201⁻ cALL-Zelllinie CALL2 war ein Hinweis auf Allorestriktion der Klone. Die EFT-Zelllinie A673 kontrollierte die cALL-Spezifität. K562 diente als Kontrolle einer unspezifischen NK-Zell-Aktivität. Darüber hinaus wurde auch die IFN γ - bzw. Granzym B-Ausschüttung in „leeren“ wells, welche nur T-Zellen enthielten, untersucht, um eine Spontanaktivität der CTL ohne Kontakt mit Zielzellen zu erfassen.

5.3.1 STK32B-186

Aus der Menge alloreaktiver CTL nach dem IVP mit STK32B-186 wurden 629 Zellen als spezifisch gewertet und isoliert (entsprechend einem Anteil von 0,025 % der Gesamtzellzahl). Die Zellen wurden mittels *Limiting Dilution* vereinzelt und nach zwei Wochen Expansion in einem Screening-EliSpot auf eine spezifische IFN γ -Ausschüttung überprüft. Die CTL zeigten variable Ergebnisse in diesem Versuch, 7 Klone reagierten jedoch spezifisch auf die mit relevantem Peptid beladenen T2-Zellen und wurden weiterexpandiert. Alle Klone stammten aus wells, bei denen nach der *Limiting Dilution* statistisch eine T-Zelle pro well enthalten war. Im Verlauf erwiesen sich zwei der selektierten

Klone als unspezifisch und wurden nicht weiter charakterisiert. Die Klone 1A1, 2A10, 2D4 und 2E7 wurden in weiteren ELISpot-Assays auf eine spezifische IFN γ -Ausschüttung als Zeichen der Peptiderkennung und ihre spezifische Zytotoxizität, gekennzeichnet durch Granzym B-Freisetzung, getestet. Klon 1A1 zeigte eine spezifische Erkennung des Epitops in T2-Zellen. Die Reaktion auf Tumorzelllinien im IFN γ -Assay war äußerst gering ausgeprägt. Es zeigte sich eine alloreaktive Zytotoxizität beim Kontakt mit HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien im Granzym B-Elispot, wobei einmal Nalm6, ein andermal 697 die stärkeren Reaktionen auslöste. Klon 2A10 reagierte bei Kontakt mit peptidbeladenen T2-Zellen mit einer peptidspezifischen IFN γ -Ausschüttung, was für eine spezifische Aktivierung der CTL sprach, zeigte allerdings nur geringfügig ausgeprägte Reaktionen auf Tumorzelllinien im IFN γ -Assay, sodass die im Vergleich stärker ausgeprägte Reaktion auf HLA-A*0201⁺ cALL-Linien nicht als statistisch signifikant gelten konnte. 2A10 reagierte auf die STK32B-exprimierende HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinie Nalm6 mit einer peptidspezifischen Granzym B-Ausschüttung. Die Diskrimination zu den anderen Zelllinien war am deutlichsten bei einem Effektor-/Zielzell-Verhältnis von 2,5 : 1 und 1,25 : 1; somit lag eine peptidspezifische Zytotoxizität vor. Klon 3G2 erkannte zwar das Epitop in peptidbeladenen T2-Zellen, nicht aber in Tumorzelllinien. Im Granzym B-Assay reagierte 3G2 jedoch mit einer peptidspezifischen Zytotoxizität bei Kontakt der HLA-A*0201⁺, STK32B-exprimierenden cALL-Zelllinie Nalm6. Die Abgrenzung zu den Reaktionen auf andere Zelllinien war bei Effektor / Target-Verhältnissen von 2,5 : 1 und 1,25 : 1 am deutlichsten ausgeprägt. Klon 2D4 zeigte ebenfalls gute Ergebnisse im initialen IFN γ -Screening, nicht jedoch in weiteren IFN γ -Assays mit Tumorzelllinien. Dahingegen waren in wiederholten Granzym B-Assays kontinuierlich spezifische zytotoxische Reaktionen nachweisbar. Die höchste Granzym B-Ausschüttung war bei Kontakt mit Nalm6 zu verzeichnen, was auf eine peptidspezifische Reaktion des allorestriktierten Klons schließen ließ. Insgesamt wurden die beiden HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien am besten erkannt; dies war ein Hinweis auf eine Alloreaktivität von 2D4. Es ergab sich kein Hinweis auf eine unspezifische NK-Zell-Antwort oder spontane Granzym B-Freisetzung der Zellen. Klon 2E7 zeigte eine deutliche Erkennung des Epitops in peptidbeladenen T2-Zellen beim initialen IFN γ -Screening, reagierte jedoch in anschließenden ELISpot-Assays nicht mehr mit einer spezifischen IFN γ -Ausschüttung. Im Granzym B-ELISpot hingegen war eine peptidspezifische Reaktion bei Kontakt mit Nalm6 zu verzeichnen. Die Reaktion auf HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien war stärker ausgeprägt als auf HLA-A*0201⁻ Zelllinien, was auf eine Allorestriktion des Klons schließen ließ. Es ergaben sich keine Hinweise auf unspezifische NK-Zell-Aktivität oder Spontanaktivität der CTL. Diese Ergebnisse waren in folgenden Granzym B-ELISpots reproduzierbar.

Es gelang somit die Generierung allorestingierter CTL, die spezifisch das bisher unbekannte Peptidantigen STK32B-186 des in cALL-Leukämiezellen übermäßig exprimierten Gens STK32B sowohl in Modellzelllinien als auch in cALL-Zelllinien erkennen konnten und die peptidexprimierenden Zielzellen mittels spezifischer zytolytischer Reaktionen abtöten konnten.

5.3.2 LILRA2-30

Nach dem IVP mit LILRA2-30-peptidbeladenen DC wurden nach einer zweiwöchigen Expansionsphase 152 doppelt positive T-Zellen im Pentamer-Sortierungsversuch identifiziert und als spezifische CTL isoliert, dies entsprach einer Fraktion von 0,0005 % der Gesamtzellzahl alloreaktiver CTL. Mittels *Limiting Dilution* wurden die Zellen anschließend auf eine Konzentration von statistisch 1,5 CTL pro *well* vereinzelt. Im initialen ELISpot-Screening zeigten die T-Zellen variable Ergebnisse, 3 Klone (1G4, 1H3 und 5H4) reagierten mit einer spezifischen IFN γ -Ausschüttung auf die mit LILRA2-30 beladenen T2-Zellen und wurden weiterexpandiert. 1G4 zeigte spezifische Reaktionen im IFN γ -Assay auf peptidbeladene T2-Zellen und erkannte die HLA-A*0201⁺ cALL-Linien im Sinne einer spezifischen Aktivierung der allorestingierten CTL. Hierbei war die Reaktion auf die LILRA2-exprimierende Zelllinie Nalm6 entsprechend einer peptidspezifischen Reaktion am stärksten ausgeprägt. Auch auf das artifizielle Zellkonstrukt der mit HLA-A*0201 und LILRA2-30 transfizierten Cos-7-Zellen reagierte 1G4 mit einer peptidspezifischen IFN γ -Ausschüttung. Im Granzym B-Assay war eine spezifische Zytotoxizität bei Kontakt mit den HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien festzustellen, bei gering ausgeprägter Reaktion auf die Negativkontrollen zum HLA-Kontext (CALL2) und NK-Zell-Aktivität (K562). Dies spricht für eine HLA-A*0201-Allorestriktion mit spezifischer Zytotoxizität von 1G4. Diese Ergebnisse waren, wenn auch in geringerer Intensität, in folgenden Granzym B-Assays reproduzierbar. Hierbei waren die deutlichsten Unterschiede bei einer Effektor / Target-Ratio von 10 : 1 zu verzeichnen. Klon 1H3 zeigte in wiederholten IFN γ -ELISpots eine reproduzierbare spezifische Erkennung des Epitops in T2-Zellen. Der Klon reagierte zudem mit einer peptidspezifischen IFN γ -Ausschüttung auf die LILRA2-exprimierende Zelllinie Nalm6. Bei Kontakt mit Cos-7-Zellen, welche mit HLA-A*0201 und LILRA2-30 transfiziert wurden und diese Moleküle auf der Zelloberfläche präsentierten, zeigte 1H3 eine spezifische Erkennung im Vergleich zur Negativkontrolle. Somit konnte eine peptidspezifische Aktivierung mit IFN γ -Ausschüttung der CTL nachgewiesen werden. Im Granzym B-Assay war eine spezifische zytotoxische Reaktion auf die beiden HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien Nalm6 und 697 zu verzeichnen, was auf eine Alloreaktivität der CTL schließen ließ. Diese Ergebnisse waren in weiteren Granzym B-Assays reproduzierbar. Klon 5H4 zeigte gute Reaktionen im

initialen IFN γ -Screening, welche jedoch nicht reproduzierbar waren; weiterhin erfolgte keine Erkennung der Tumorzelllinien im IFN γ -Assay. Auf spezifische Zytotoxizität getestet reagierte 5H4 jedoch auf die LILRA2-exprimierende HLA-A*0201⁺ Zelllinie Nalm6 mit einer peptidspezifischen Granzym B-Ausschüttung im Sinne einer peptidspezifischen Reaktion des Klons. Die beiden anderen cALL-Linien 697 und cALL2 lösten geringe Reaktionen aus. Es ergab sich kein Hinweis auf Spontanaktivität der CTL.

Es gelang somit die Herstellung peptidspezifischer allorestingierter CTL, welche sich spezifisch gegen das bisher unbekannte Epitop LILRA2-30 des in cALL-Leukämiezellen übermäßig exprimierten Gens LILRA2 richteten. Die CTL waren in der Lage, das Epitop sowohl in Modellzelllinien als auch in cALL-Zelllinien spezifisch zu erkennen und zudem mit spezifischen zytotoxischen Reaktionen die antigenexprimierenden Tumorzellen im korrekten HLA-Kontext abzutöten.

5.3.3 Proliferation der CTL

Problematisch im Versuchsaufbau dieser Arbeit waren die durchwegs geringen Zellzahlen; die CTL expandierten nur langsam und in geringem Maße. Schon bei der Pentamer-Sortierung wurde ein geringerer Anteil spezifischer T-Zellen identifiziert als bei methodisch vergleichbaren Arbeiten unseres Labors (Thiel et al. 2011; Pirson 2009); die Problematik der geringen Zellzahlen setzte sich während der verschiedenen Expansionszyklen fort. Dies hatte zur Folge, dass zum einen die verwendeten Zellzahlen rationalisiert werden mussten und beispielsweise nicht alle gewünschten Zielzelllinien im ELISpot untersucht werden konnten, da es an Effektorzellen mangelte. Hierdurch erklärt sich die teilweise Diskrepanz der untersuchten Zielzelllinien zwischen den verschiedenen Zellklonen. Zum anderen konnten zeitgleich geplante Versuche oft aus Mangel an CTL nicht durchgeführt werden und wurden durch einen zwischengeschalteten Expansionszyklus verzögert. Dadurch kam es in logischer Konsequenz zur Zunahme der Expansionszyklen für die einzelnen CTL-Klone, mit den nachfolgend ausführlicher aufgeführten negativen Folgen hinsichtlich der Reaktivität im ELISpot. In einigen Fällen war eine durchflusszytometrische Auswertung von CTL, welche unter dem Mikroskop als morphologisch vital eingestuft worden waren, aufgrund mangelhafter Reaktivität nicht möglich. Diese Faktoren erklären die in einigen Fällen nicht konkordante Versuchsanordnung bei den verschiedenen CTL-Klonen.

Ein Grund für die geringen Proliferationsraten und die daraus resultierenden geringen CTL-Zellzahlen könnte eine noch nicht ideale Auswahl der Peptidantigene sein. Die Reaktion von CTL auf Fremdanigene ist am Beispiel viraler Infektionen am besten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass aus der Vielzahl von Peptidepitopen aus Fremdanigenen, die den CTL

präsentiert werden können, nur ein Bruchteil der Epitope in Verbindung mit MHC-Klasse I-Komplexen messbare CTL-Antworten induziert. Dieses Phänomen wird als Immundominanz bezeichnet. Die genauen Mechanismen der Immundominanz sind noch nicht bekannt; die Immunogenität eines Peptideptops wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Lediglich ein Teil der Peptidantigene zeigt eine ausreichende Bindungsaffinität an MHC-Klasse-I-Moleküle, wobei hierfür die Stabilität des Bindungskomplexes von Bedeutung ist. Darüber hinaus gibt es Epitope, welche zwar gute Bindungseigenschaften aufweisen, denen gegenüber die CTL jedoch eine niedrige Sensitivität zeigen, was diese Epitope folglich als nicht immunogen kennzeichnet. Auch eine ineffiziente Antigenprozessierung der Zelle kann zu einer mangelnden Immunogenität eines Peptidepitops führen (Yewdell und Bennink 1999). Zusammengefasst lösen immundominante Epitope stärkere T-Zellreaktionen aus als weniger immunogene, „subdominante“ Peptidepitope, welche nur schwache oder überhaupt keine CTL-Antworten induzieren (Welsh und Fujinami 2007). Es besteht die Möglichkeit, dass die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Peptidepitope zwar eine gute Bindungsaffinität an MHC-Klasse I-Moleküle aufweisen, jedoch aufgrund anderer Faktoren nicht immundominante Epitope darstellen. Dies würde folglich zu einer gering ausgeprägten CTL-Antwort und somit zu einer mangelhaften CTL-Proliferation führen. Ein weiterer Grund für die geringen Proliferationsraten der CTL könnte in der Tatsache begründet sein, dass die in dieser Arbeit verwendeten Expansionsprotokolle die Generation von CTL mit einem relativ weit differenzierten Effektorphänotyp begünstigten. Gattinoni et al. beschrieben die inverse Relation des Differenzierungsstadiums antigenspezifischer CTL zu ihrer Proliferationsfähigkeit (Gattinoni et al. 2005). In ihrer Differenzierung fortgeschrittene CTL weisen erhöhte Expressionsraten proapoptotischer Moleküle sowie Faktoren der replikativen Seneszenz auf, was zu einem reduzierten proliferativen Potenzial der Zellen führen kann. Eine Veränderung des Expansionsprotokolls, welches die Generierung weniger ausgereifter CTL-Phänotypen mit höherem Proliferationspotenzial ermöglicht, könnte eine Lösungsstrategie zur Erlangung ausreichender CTL-Proliferationsraten und Zellzahlen darstellen und wird nachfolgend im Detail beschrieben, siehe 5.4, Seite 93.

5.3.4 Analyse des Reaktionsverhaltens im ELISpot

Allen Klonen gemeinsam war die deutliche peptidspezifische IFN γ -Ausschüttung im initialen Screening-ELISpot. Zusammenfassend ließ sich auch eine spezifische Erkennung und Zytotoxizität bei Kontakt mit dem jeweiligen Epitop, exprimiert auf T2-Zellen sowie auf Tumorzelllinien beobachten. Auffallend war jedoch zum einen das variable Verhalten der T-Zell-Klone je nach Aktivierungsstatus, Expansionsschritt und Expansionsbedingungen,

welches die Erhebung reproduzierbarer Daten erschwerte, zum anderen die im Verlauf abnehmende Reaktivität der Zellen, welche mit Dauer der Expansion bzw. Anzahl der Expansionszyklen fortschritt. Hiervon betroffen war vor allem die spezifische IFN γ -Ausschüttung. Klone, die zunächst gut im IFN γ -Assay reagiert hatten zeigten im Verlauf unspezifische oder sehr gering ausgeprägte Reaktionen, während im zeitgleich durchgeführten Granzym B-Assay noch deutlich ausgeprägte spezifische Reaktionen zu verzeichnen waren. Auch die Reaktivität im Granzym B-Assay nahm im Verlauf ab, war jedoch deutlich länger nachweisbar als die im IFN γ -Assay. Zum Teil wurde auch die Beobachtung gemacht, dass Zellklone zunächst unspezifisch reagierten, im wiederholten Versuchsansatz nach Kryokonservierung und Re-Expansion jedoch erstmals spezifische Reaktionen zeigten. Die Problematik des variablen Reaktionsverhaltens der CTL-Klone in Abhängigkeit von Expansionsbedingungen, Expansionszeitpunkt und Expansionszyklus, bzw. Alter der Zellen wurde auch in methodisch ähnlichen Arbeiten unseres Labors beschrieben (Pirson 2009). Völlig identische Expansionsbedingungen waren von vornweg schwer realisierbar, da die als Stimulatorzellen verwendeten allogenen Pool-PBMC und LCL sich bei jeder Expansion unterschieden. Um möglichst vergleichbare Bedingungen zu schaffen wurden die CTL in möglichst frühen Expansionszyklen in Portionen zu 1×10^6 Zellen eingefroren, um für Folgeexperimente möglichst gering expandierte und mit identischen Zellen stimulierte CTL zur Verfügung zu haben. Allerdings war vor jedem Experiment eine zweiwöchige Expansionsphase notwendig, um die benötigten Zellzahlen zu erreichen, sodass eine Zunahme der Expansionszyklen nicht zu vermeiden war. Ein weiterer Erklärungsansatz beruht auf der Hypothese, dass die CTL durch die verwendeten Peptidpitope möglicherweise nicht vollständig aktiviert wurden, beispielsweise aufgrund einer mangelnden Immundominanz der ausgewählten Epitope. Dies könnte aufgrund der insuffizienten Aktivierung zu einer raschen Abnahme der CTL-Reaktivität führen, welche die im Verlauf abnehmende Reaktivität im ELISpot erklären könnte.

5.3.4.1 Klonalität der spezifischen CTL

Eine weitere mögliche Ursache für das variable Verhalten der CTL im ELISpot liegt auch in der Möglichkeit, dass es sich bei der jeweiligen CTL-Population potenziell nicht um klonal expandierte Zellen, sondern um eine aus mehreren, unterschiedlich reagierenden Zellklonen bestehende Population handelte. Befinden sich unterschiedlich reagierende oder spezifische zusammen mit unspezifisch reagierenden CTL in der Zellkultur der im ELISpot getesteten CTL-Linie, so ist ein unspezifisches Reaktionsverhalten hinsichtlich IFN γ - bzw. Granzym B-Ausschüttung durch Überwachsen der Linie mit unspezifischen Zellen möglich. Eine Ursache für eine Polyklonalität der CTL-Linien liegt in der Natur der Methode der

Einzelzellklonierung (Staszewski 1990): bei der *Limiting-Dilution* Vereinzelung besteht die Methode der Klonierung in der statistischen Berechnung der theoretischen Zellzahl pro *well* durch Aufteilung der Gesamtzellzahl auf die *wells* mittels Verdünnungsreihen. Hierbei ist stets ein Kompromiss einzugehen zwischen der höheren Wahrscheinlichkeit des Anwachsens der Zellen, welche mit Anzahl der ausgesäten T-Zellen pro *well* steigt, und der Wahrscheinlichkeit der Klonalität, welche invers mit der Anzahl der ausgesäten T-Zellen pro *well* korreliert. Auch wenn in dieser Arbeit nur CTL aus *wells* mit maximal 1,5 statistisch vorhandenen T-Zellen verwendet wurden ergibt sich hierdurch keine Garantie auf das Anwachsen einer einzelnen Zelle und deren monoklonale Expansion. Um die Klonalität des T-Zell-Rezeptors der CTL zu untersuchen, wurde eine durchflusszytometrische V β -Analyse des TCR durchgeführt. Jedoch blieb die Analyse aufgrund der geringen Zellzahlen und der durchflusszytometrisch ungenügenden Anfärbarkeit der CTL ohne Ergebnis. Jedoch wäre selbst ein eindeutiges Resultat in der V β -Analyse lediglich als Hinweis, keineswegs als Beweis der Klonalität zu werten gewesen. Das verwendete Kit zur V β -Analyse ermöglicht die Untersuchung von 24 V β -Ausprägungen, wodurch etwa 70 % des humanen TCR V β -Repertoires abgedeckt werden. Somit kann durch diese Methode keine vollständige Analyse des TCR V β -Repertoires erfolgen, da gewisse V β -Gruppen und Subgruppen nicht im Kit repräsentiert sind. Zudem ist zu beachten, dass der TCR neben der β -Domäne auch aus einer α -Domäne (in selteneren Fällen findet sich überdies eine γ / δ Domäne anstatt der α / β Domäne) besteht, über deren Ausprägung mit der V β -Analyse allein keine Aussage getroffen werden kann.

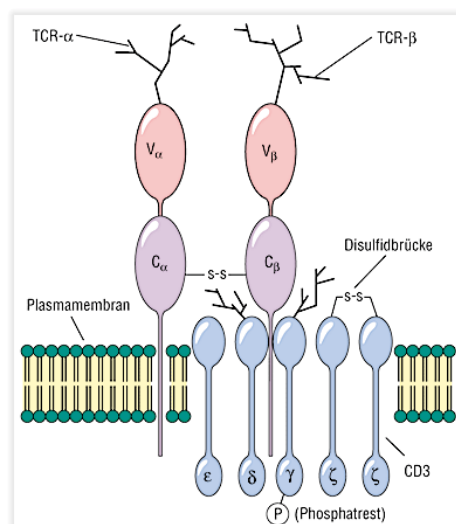


Abbildung 5-3 Aufbau des TCR
aus: Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage

Eine geeignete Methode zum vollständigen Nachweis der Klonalität einer CTL-Population wäre beispielsweise eine PCR-Analyse der gesamten V α - und V β -Ausprägungen der jeweiligen Zelle.

Ein weiterer Erklärungsansatz für das variable Reaktionsverhalten der CTL-Klone im ELISpot ist die mögliche Überwucherung eines spezifischen Zellklons mit einer unspezifischen Zellpopulation. Dies kann zum einen durch ein Fehlschlagen der *Limiting Dilution*-Klonierung geschehen, wodurch der spezifische CTL-Klon durch im selben *well* anwachsende unspezifische CTL verdrängt oder überwuchert wird; zum anderen ist es prinzipiell möglich, wenngleich sehr unwahrscheinlich, dass die als Stimulator-Zellen verwendeten allogenen PBL oder LCL trotz des intensiven Bestrahlungsregimes ihre Teilungsfähigkeit behalten und somit den ursprünglichen spezifischen CTL-Klon durch ihre höheren Wachstumsraten überwuchern. Hierdurch könnte sich eine Erklärung für das zunehmend unspezifische Reaktionsverhalten eines ursprünglich spezifischen Klons im Laufe mehrerer Expansionszyklen ergeben. Diese Problematik könnte beispielsweise durch eine durchflusszytometrische Analyse und ggf. erneute Durchführung der Pentamer-Färbung mit anschließender Re-Sortierung der spezifischen CTL gelöst werden.

5.3.4.2 *Phänotyp der CTL*

Eine weitere Begründung des variablen und im Verlauf abnehmenden Reaktionsverhaltens der CTL könnte in der Tatsache begründet liegen, dass das in dieser Arbeit verwendete Expansionsprotokoll die Entwicklung relativ weit differenzierter CTL vom Effektorphänotyp begünstigt. Dies wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse des Expressionsprofils der Oberflächenantigene der expandierten CTL bestätigt; die untersuchten CTL-Klone STK32B-186-2E7, STK32B-186-2D4, LILRA2-30-1H3 und LILRA2-30-1G4 zeigten einen konkordanten Phänotyp mit niedriger Expression von CD62L, CCR7, IL7Ra, CD27 und CD28 sowie vermehrter Ausprägung von CD25 und CD69. In Abgleich mit den von Gattinoni et al. definierten CTL-Subtypen (Gattinoni et al. 2005) zeigen die in dieser Arbeit generierten CTL Merkmale des *Effector*- bzw. *Late effector*-Phänotyps.

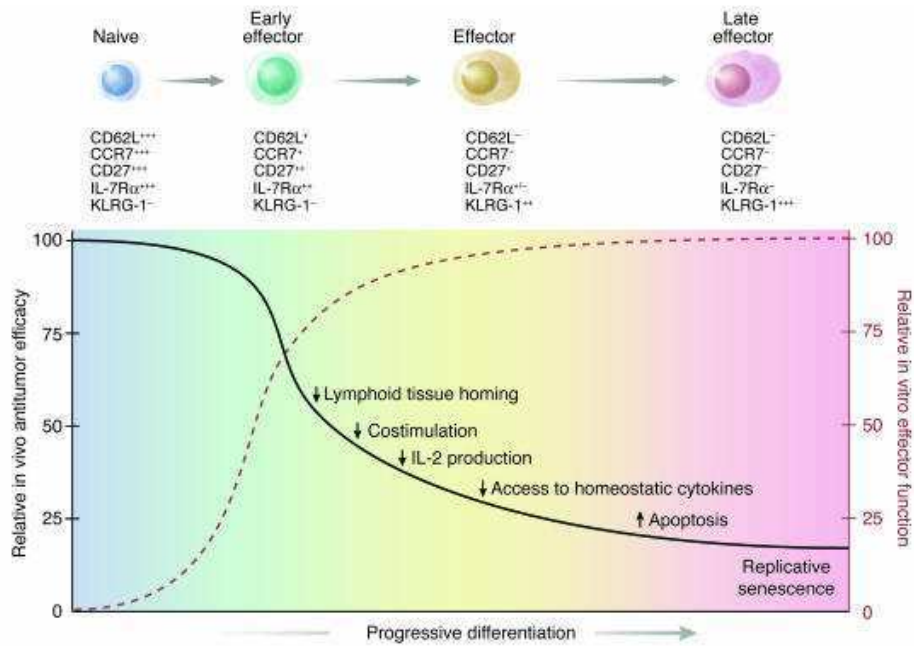


Abbildung 5-4 Schematische Darstellung der CTL-Differenzierungssubgruppen und ihres Reaktionsverhaltens

aus: Gattinoni et al., 2005

Gezeigt wird die inverse Relation der *in vitro* und *in vivo* Effektorfunktionen der T-Zell-Subgruppen nach ACT. Naive T-Zellen proliferieren nach initialem Antigenkontakt und entwickeln sich in terminal differenzierte Effektorzellen. Der graduelle Erwerb von Effektorfunktionen (rote, gestrichelte Linie) ist assoziiert mit der zunehmenden Ineffektivität der T-Zellen hinsichtlich der Tumorregression nach ACT (schwarze Linie). Die daran beteiligten Mechanismen sind als Beschriftung der schwarzen Linie aufgeführt.

Die Autoren beschreiben die inverse Korrelation des Differenzierungsstadiums der CTL zu ihrer Proliferationskapazität sowie ihrer Wirksamkeit gegen Tumoren nach adoptivem Zelltransfer (*adoptive cell transfer*, ACT) im *in vivo*-Versuch. Zwar beziehen sich die Daten vornehmlich auf das Verhalten der Zellen *in vivo* nach ACT, die Kernaussagen über die Veränderungen des Reaktionsverhaltens bei fortgeschrittener Differenzierung der CTL lassen sich jedoch auf das Verhalten der Zellen *in vitro* nach multiplen Expansionszyklen übertragen. So induzieren wiederholte Expansionszyklen eine Differenzierung der Zellen in reife CD8⁺ Effektorzellen. Diese zeichnen sich durch eine vermehrte Expression proapoptotischer Moleküle wie beispielsweise Fas-Ligand, sowie diverser Mortalitätsfaktoren aus. Weiterhin werden Marker der replikativen Seneszenz übermäßig exprimiert, wohingegen Rezeptoren für kostimulatorische Faktoren wie IL-7 nur geringgradig ausgeprägt werden. Die daraus resultierende Erschöpfung der proliferativen und überlebenstechnischen Fähigkeiten der Zellen könnte die beobachtete Abnahme der Reaktivität der CTL im ELISpot nach multiplen Expansionszyklen erklären. Als Lösungsansatz könnte daher eine Veränderung des Expansionsprotokolls in Betracht gezogen werden, wodurch die Generierung von weniger ausdifferenzierten CTL, entsprechend einem *early effector*-Phänotyps mit fortwährender Reaktivität und langfristigem Überleben der Zellen ermöglicht würde.

5.4 Optimierungsstrategien

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung alloreaktiver peptidspezifischer CTL, welche sich gegen cALL-assoziierte Epitope richteten. Es gelang, antigenspezifische CTL aus naiven CD8⁺ Zellen zu generieren; diese CTL erkannten spezifisch das ihnen präsentierte Antigen und waren in der Lage, bei Kontakt mit antigenexprimierenden Tumorzelllinien spezifische zytolytische Reaktionen zu erbringen. Die generelle Umsetzbarkeit dieses Verfahrens wurde somit gezeigt, jedoch auch die Beschränkungen der gewählten Herangehensweise dargelegt. Gerade im Hinblick auf eine Übertragung der *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse in *in vivo*-Experimente auf dem Weg zu einer tatsächlichen klinischen Anwendung sind Strategien zur Optimierung des Verfahrens sowie weiterführende Forschungsarbeiten für die Erlangung optimaler Resultate essentiell.

5.4.1 Generierung von T_{CM} CTL

Die Gruppe der antigenspezifischen CD8⁺ Zellen ist durch Heterogenität gekennzeichnet. In der Expansions- und Differenzierungsphase nach dem initialen Antigenkontakt entwickeln sich die meisten CTL in terminal differenzierte Effektorzellen, eine kleine Untergruppe der Zellen differenziert in Gedächtnis-Zell-Vorläufer, wobei auch weitere Zwischenstufen einer intermediären Differenzierung existieren (Cui und Kaech 2010). Die Effektorzellen zeigen ausgeprägte zytolytische Eigenschaften *in vitro* und exprimieren in hohem Maße Moleküle die für das Abtöten von Zellen notwendig sind. Gedächtniszellen sind *in vitro* weniger zytolytisch aktiv, zeigen jedoch ein verlängertes Überleben, die Fähigkeit zur antigenunabhängigen Selbsterneuerung und eine starke Reaktion auf wiederholten Antigenkontakt (Hinrichs et al. 2006). Bei den diversen Untergruppen der T-Gedächtniszellen lassen sich die phänotypischen Subtypen der *central memory* (T_{CM}) und der in ihrer Differenzierung fortgeschrittenen *effector memory* T-Zellen (T_{EM}) unterscheiden (Sallusto et al. 1999). T_{EM} ähneln Effektorzellen, reagieren unzureichend auf erneuten Antigenkontakt, zeigen wenig Proliferationspotenzial und gehen letztendlich zugrunde. T_{CM} hingegen persistieren langfristig *in vivo*, produzieren stimulatorisch wirkendes IL-2 und reagieren stark auf wiederholten Antigenkontakt (Cui und Kaech 2010). Die in dieser Arbeit verwendete Methodik begünstigte die Generierung relativ weit differenzierter CTL vom T_{EM}-Phänotyp. Diese Tatsache ist zum einen eine mögliche Erklärung für *in vitro* beobachtete Unzulänglichkeiten hinsichtlich Proliferation und Reaktivität der generierten CTL, zum anderen geben Daten aus *in vivo*-Experimenten Hinweise auf eine langfristig geringere Wirksamkeit der T_{EM} im Vergleich zu T_{CM} (Berger et al. 2008; Klebanoff et al. 2005; Nicholson 2012; Wang et al. 2011). Die übermäßige Expression proapoptotischer Moleküle und Faktoren der replikativen Seneszenz in T_{EM} bedingt ein vermindertes proliferatives

Potenzial der Zellen; darüber hinaus werden Kostimulanzen und weitere Faktoren, die für das fortbestehende Überleben der aktivierten CTL *in vivo* notwendig sind, im ausgereiften T_{EM}-Phänotyp nur unzureichend exprimiert (Gattinoni et al. 2005). In klinischen Studien zur ACT bei Tumoren erwiesen sich CD8⁺ Zellen nach mehreren Stimulationszyklen als ineffektiv, da die Zellen des *late effector*-Phänotyps nach dem ACT zugrunde gingen; Zellen früherer Differenzierungsstufen (*early effector*-Phänotyp) zeigten jedoch die gewünschten Eigenschaften und erschienen den ausgereifteren Zellen überlegen (Hinrichs et al. 2006). Ein möglicher Ansatzpunkt zur Optimierung des Verfahrens ist daher die Veränderung des verwendeten Expansionsprotokolls, um eine komplette Ausreifung der CTL in T_{EM} zu verhindern und dadurch eine verbesserte Reaktionsfähigkeit sowie ein prolongiertes Überleben der Zellen, gerade im Hinblick auf ihre Anwendung in *in vivo*-Experimenten, zu erreichen. In neueren Studien wurde eine nachteilige Wirkung von im IVP verwendetem IL-2 im Hinblick auf die nachfolgende Funktionsfähigkeit tumorspezifischer T-Zellen in der adoptiven Immuntherapie gezeigt (Hinrichs et al. 2008). IL-2 erhöhte zwar die zytolytische Funktion der CTL *in vitro*, förderte jedoch die Entwicklung eines Effektorphänotyps und einer Effektorfunktionalität der Zellen und hatte einen negativen Einfluss auf deren Fähigkeit, nach adoptivem Transfer eine Regression des Tumorwachstums zu induzieren. IL-21 hingegen supprimierte die antigeninduzierte Ausreifung der T-Zellen in einen T_{EM}-Phänotyp, was nach adoptivem Transfer der CTL zu einer verbesserten Effektivität gegen Tumoren führte. Auch Li et al. beschrieben die Effekte von IL-21 auf naive CTL. Wurde IL-21 anstelle von IL-2 zum IVP naiver CD8⁺ Zellen eingesetzt, so erhöhte sich der relative Anteil antigenspezifischer CTL, welcher durch Tetramer-Sortierung identifiziert wurde. Diese CTL zeigten neben verringerten Apoptoseraten und verlängertem Überleben eine ausgeprägte antigenspezifische Proliferationskapazität. Phänotypisch ließ sich ein weniger ausgereifter Status der Zellen nachweisen, welcher durch die vermehrte Ausprägung von CD28 und die Fähigkeit der IL-2-Produktion gekennzeichnet war. Überdies exprimierten die mit IL-21 stimulierten CTL einen hochaffinen TCR und waren somit in der Lage, ihre Zielzellen mit hoher Avidität zu erkennen und durch ihre ausgeprägte zytolytische Aktivität abzutöten (Li et al. 2005; Casey und Mescher 2007). Andere Studien beschrieben die Vorzüge eines Einsatzes von IL-12 während des IVP naiver T-Zellen. IL-12 induzierte eine Hochregulierung von CD62L auf naiven CD8⁺ Zellen und zugleich eine vermehrte Expansion dieser CD62L^{high}CD8⁺-Subpopulation durch Verhinderung eines aktivierungsbedingten apoptotischen Zelltodes. Diese einem *early effector*-Phänotyp entsprechenden T-Zellen zeigten einen den Vergleichsgruppen überlegenen Antitumor-Effekt im Mausmodell (Diaz-Montero et al. 2008). Somit könnte eine Veränderung des Expansionsprotokolls im Sinne eines Einsatzes von IL-21 oder IL-12 anstatt IL-2 im initialen IVP die Generierung von *early*

effector-CTL vom T_{CM} Phänotyp ermöglichen, welche den im Rahmen dieser Arbeit generierten Zellen hinsichtlich Reaktivität und langfristigem Überleben überlegen sein könnten.

5.4.2 Gentechnische Modifikation der CTL

Die antigenspezifischen CTL-Klone, welche im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, wurden aus einer großen Menge unspezifischer CTL herausgefiltert, aufwändig vereinzelt, expandiert und hinsichtlich ihrer Funktionalität getestet. Die Herausforderung hierbei liegt zum einen in der reproduzierbaren Generierung spezifischer, hochaffiner Klone, zum anderen in der Erlangung ausreichender Zellzahlen ohne die Funktionalität der CTL-Klone durch wiederholte Expansionszyklen zu kompromittieren. Gerade im Hinblick auf eine zukünftige klinische Anwendung sind Optimierungsstrategien zur Steigerung der Effizienz und Sicherheit gefragt, um die Herstellung hochspezifischer CTL-Klone in ausreichend großer Zellzahl zuverlässig, reproduzierbar und innerhalb kurzer Zeit zu ermöglichen und das Verfahren zur Generierung dieser Zellen zu vereinfachen. Eine Möglichkeit dieses Ziel zu erreichen besteht in der genetischen Modifikation der CTL, beispielsweise durch Identifizierung, anschließende Klonierung und Transfektion des TCR antigenspezifischer CTL in Spender-T-Zellen: Die Spezifität der Antigenerkennung bei T-Zellen wird durch den TCR vermittelt; durch den Transfer von TCR-Genen in Empfängerzellen kann die Antigenspezifität des transfizierten TCR auf diese übertragen werden (Dembic et al. 1986). Diese Tatsache kann zur Vereinfachung des Verfahrens, mit dem tumorantigenspezifische CTL generiert werden, genutzt werden. Auch hier bestehen die ersten Schritte in der Identifizierung geeigneter Antigen-Epitope, der HLA-Restriktion sowie der Generierung und *in vitro* Expansion eines spezifischen CTL-Klons. Anschließend wird der tumorantigenspezifische TCR dieses CTL-Klons in naive T-Zellen eingebracht, welche dann als genetisch modifizierte (*engineered*) T-Zellen für den adoptiven Zelltransfer verwendet werden können. Der Transfer der TCR-Gene erfolgt in der Regel mittels eines retroviralen Vektors. Die Forschung auf diesem Gebiet ist beim Melanom am weitesten fortgeschritten. Besonders hervorzuheben ist hierbei die wegbereitende Arbeit der Gruppe um Rosenberg, welche große Erfahrung im Bereich der adoptiven T-Zell-Therapie beim Melanom hat und mittlerweile im Rahmen klinischer Studien gentechnisch veränderte T-Zellen zum adoptiven Zelltransfer bei Patienten mit metastasiertem Melanom einsetzt (Rosenberg et al. 2011). Hierbei zeigten die adoptiv übertragenen T-Zellen, welche mit einem TAA-spezifischen TCR (MART1) transfiziert worden waren, eine prolongierte Persistenz *in vivo* und bedingten objektive Tumorregressionen in bis zu 40 % der Patienten (Johnson et al. 2009; Morgan et al. 2006; Rosenberg 2012). Der Einsatz gentechnisch veränderter T-Zellen bei malignen

hämatologischen Erkrankungen hingegen steht derzeit noch am Anfang, Ergebnisse klinischer Studien liegen noch nicht vor. Die Forschung auf diesem Gebiet befindet sich überwiegend in der präklinischen Phase, erbringt jedoch vielversprechende Ergebnisse. Xue et al. generierten CTL welche spezifisch auf das in Leukämiezellen überexprimierte Wilms-Tumor-Antigen-1 (WT1) reagierten. Die entsprechenden TCR-Gene wurden in T-Zellen transfiziert und im Mausexperiment getestet. Die genetisch veränderten T-Zellen waren in der Lage, leukämische Zellen *in vivo* zu eliminieren (Xue et al. 2005; Xue et al. 2010). Ähnliche antileukämische Effekte gentechnisch veränderter T-Zellen *in vivo* konnten auch in anderen Arbeiten nachgewiesen werden (Dossett et al. 2009; Nagai et al. 2012; Ochi et al. 2011). Der Transfer tumorantigenspezifischer TCR-Gene in frische T-Zellen und die Verwendung dieser Zellen im adoptiven Transfer stellt somit eine vielversprechende Möglichkeit dar, das Verfahren der Generierung antigenspezifischer CTL zur Therapie hämato-onkologischer Erkrankungen zu vereinfachen und effizienter zu gestalten, was einen wichtigen Schritt im Hinblick auf einen klinischen Einsatz der adoptiven T-Zell-Therapie in der Hämato-Onkologie darstellt.

5.5 Einsatz alloreaktiver CTL bei der Therapie der ALL

Aufgrund großer Fortschritte im Bereich der Leukämietherapie können mittlerweile über 80 % der Kinder mit ALL mit konventionellen Therapiemethoden geheilt werden. Dies ist vor allem auf die Etablierung großangelegter randomisierter Studien, in deren Rahmen die Patienten behandelt werden, sowie auf Verbesserungen im Bereich der Risikostratifizierung, der risikoadaptierten Therapie und der intensivierten Therapieoptionen für Hochrisikopatienten zurückzuführen (Mehta und Davies 2007). Dennoch stellt die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allogene HSCT bzw. aHSCT) für viele Patienten mit Hochrisikoprofil sowie refraktärer oder rezidivierter ALL nach wie vor die Therapie der Wahl und oftmals die einzige potenziell kurative Therapieoption dar. Zunächst basierte der Einsatz der allogenen HSCT bei der Leukämie auf der Grundlage zweier angenommener Wirkungsprinzipien: zum einen stellte die HSCT eine Möglichkeit dar, ein maligne transformiertes hämatopoetisches System mit dem eines gesunden Spenders zu ersetzen, zum anderen ermöglichte die HSCT die vorherige Verabreichung hochdosierter, myeloablativer Dosen an Radio- oder Chemotherapie zur Eradikation der leukämischen Zellen (Peccatori und Ciceri 2010). Dieses myeloablative Konditionierungsregime war jedoch mit hochgradiger Toxizität und therapieassoziiierter Mortalität verbunden, sodass die HSCT für Patienten in schlechtem Allgemeinzustand oder mit Komorbiditäten nicht zugänglich war und auch für alle anderen Patienten als risikoreiche Therapieoption anzusehen war. Eine weitere, oft schwerwiegende Folge einer allogenen HSCT ist die akute oder chronische *Graft*

versus host disease (GVHD). Hierbei handelt es sich um eine vor allem durch T-Zellen vermittelte Reaktion der Immunzellen des Spenders auf das Gewebe des Empfängers. Im Verlauf einer inflammatorischen Kaskade kommt es zur Aktivierung der transfundierten Spender-T-Zellen, welche mittels zytotoxischer Reaktionen das Empfängergewebe schädigen, wobei Haut, Leber und der Gastrointestinaltrakt die am häufigsten betroffenen Organe darstellen. Daher kann sich eine GVHD klinisch unter anderem durch Dermatitis, Hepatitis, Ikterus, abdominale Schmerzen oder Diarrhö manifestieren. Etwa 35 – 50 % aller HSCT-Empfänger entwickeln eine akute GVHD (Jacobsohn und Vogelsang 2007), welche je nach Anzahl und Ausmaß der Organmanifestationen in 4 Schweregrade eingeteilt wird (Przepiorka et al. 1995); hierbei gehen höhergradige GVHD-Manifestationen mit einer schlechten Prognose für den Patienten einher. Die Aktivierung der Spender-T-Zellen in der Pathogenese der GVHD wird zu einem Großteil durch Unterschiede in den HLA-Molekülen von Spender und Empfänger vermittelt, wobei alloreaktive Spender-T-Zellen die HLA-Antigene des Empfängers als fremd erkennen und infolgedessen die Zellen mit dem fremden HLA-Antigen zerstören (Klein und Sato 2000). Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer akuten GVHD nach allogener HSCT korreliert direkt mit dem Ausmaß der HLA-Unterschiede (Sun et al. 2007). Aufgrund dieser Erkenntnis wurde daher lange Zeit versucht, die HLA-Antigene von Spender und Empfänger bei der HSCT möglichst optimal einander anzugleichen und möglichst HLA-identische Transplantationen vorzunehmen. Jedoch stellte sich heraus, dass die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bei Leukämiepatienten mit dem Grad der HLA-Disparität zwischen Spender und Empfänger und mit dem Auftreten einer GVHD korrelierte – Patienten, die eine GVHD nach einer allogenen HSCT entwickelten, hatten ein geringeres Rezidivrisiko (Weiden et al. 1979) als Patienten nach HLA-identischer Transplantation eineiiger Zwillinge. Dies war darauf zurückzuführen, dass die alloreaktiven Spender-T-Zellen nicht nur das Normalgewebe des Empfängers schädigten, sondern auch die nach der Konditionierung im Empfängerorganismus verbliebenen Leukämiezellen im Sinne einer *Graft versus Leukemia*-Reaktion (GVL) als fremd erkannten und zerstörten. Dieses Phänomen führte zu einem Paradigmenwechsel im Hinblick auf das Verständnis der Wirkungsweise der HSCT. Wurde der kurative Effekt der GVHD zunächst vor allem dem myeloablativen Konditionierungsregime zugeschrieben, so erkannte man nun den immuntherapeutischen Ansatz der HSCT, vermittelt durch die alloreaktive Zerstörung der leukämischen Zellen durch den GVL-Effekt der Spender-T-Zellen. Dies ermöglichte die Entwicklung nicht myeloablativer, intensitätsreduzierter Konditionierungsschemata, deren geringe zytoreduktive Kapazität alleine zu gering für eine kurative Wirkung wäre und deren antineoplastische Aktivität nach aHSCT somit dem GVL-Effekt zugesprochen wird (Champlin et al. 2000; Slavin et al. 1998).

Der Erfolg der allogenen HSCT mit intensitätsreduziertem Konditionierungsregime macht das Verfahren auch für Patienten mit Komorbiditäten zugänglich und bestätigt die Wirkungsweise des GVL-Effekts. Ein weiterer Beleg für die Existenz einer GVL-Reaktion ergibt sich aus den Arbeiten von Kolb et al., in denen Patienten, die ein Rezidiv nach einer aHSCT entwickelt hatten, Spenderlymphozyten transfundiert wurden (*donor lymphocyte infusion*, DLI) um eine GVHD und einen damit assoziierten antileukämischen Effekt hervorzurufen. Bei einem großen Anteil der CML-Patienten, aber auch bei Patienten mit anderen hämato-onkologischen Erkrankungen ließen sich hierdurch komplette Remissionen auslösen (Kolb et al. 1995; Slavin et al. 1995). Der GVL-Effekt wird wie die GVHD hauptsächlich durch T-Zellen vermittelt, was dadurch ersichtlich wurde, dass T-Zell-depletierte Transplantate zu häufigeren Rezidiven führten (Horowitz et al. 1990). Obwohl die Entdeckung des GVL-Effekts durch die Ermöglichung intensitätsreduzierter Konditionierungsschemata die therapieassoziierte Toxizität verringerte ist die allogene HSCT nach wie vor eine mit hohem Risiko behaftete Therapieoption. Dies ist zu einem Großteil auf die GVHD-assoziierten Schädigungen zurückzuführen, welche nach wie vor ein großes Problem darstellen. Es ist daher das Ziel intensiver Forschung, Strategien zur Optimierung von allogener HSCT und DLI zu entwickeln, welche es ermöglichen, die Vorteile des GVL-Effekts optimal zu nutzen und gleichzeitig die Risiken der GVHD soweit wie möglich zu minimieren. So wurden verschiedene Verfahren getestet, um den GVL-Effekt von der GVHD zu entkoppeln. Die Effizienz der DLI nach allogener HSCT wird unter anderem vom Zeitpunkt des adoptiven Zelltransfers, der verabreichten Zelldosis und von der Beschaffenheit des Empfängerorganismus beeinflusst. So erfolgte in einigen Versuchsansätzen eine Variation der DLI-Zelldosis und des Transfusionszeitpunktes, wobei eine geringer dosierte und später erfolgende Verabreichung der Spenderlymphozyten insbesondere bei der CML mit verringerten GVHD-Ausprägungen ohne Kompromittierung des GVL-Effekts einherging (Mackinnon et al. 1995). Diese Herangehensweise ist jedoch nicht uneingeschränkt auf aggressivere akute Leukämieformen übertragbar, da in diesen Fällen unter Umständen höhere Zelldosen sowie ein zeitnaher Zelltransfer nach allogener HSCT unabdingbar sind um ein Frührezidiv zu verhindern (Falkenburg und Warren 2011). In anderen Studien wurden die alloreaktiven Spender-T-Zellen oder deren diverse Subgruppen weitmöglichst depletiert oder inhibiert, die beobachtete Reduktion der GVHD ging jedoch auch mit einer Verringerung des GVL-Effekts einher, sodass sich hierdurch keine Vorteile für das Überleben der Patienten ergaben (Wagner et al. 2005). Da Spender-T-Zellen, welche Empfänger-Alloantigene erkennen, die zentralen, wenn auch nicht exklusiven Vermittler sowohl von GVHD als auch von GVL nach allogener HSCT sind, stellt der Einsatz von antigenspezifischen, *in vitro* selektierten T-Zellen einen vielversprechenden Ansatzpunkt für

die Induktion eines GVL-Effekts ohne begleitende GVHD dar. Als Zielstrukturen kommen hierfür vor allem *minor*-Antigene sowie tumorassoziierte bzw. tumorspezifische Antigene infrage. CTL erkennen Peptide, welche durch die Degradation von zellulären Proteinen entstehen und durch MHC Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche der meisten kernhaltigen Zellen präsentiert werden. Selbst wenn die MHC-Antigene von Spender und Empfänger bei einer allogenen HSCT soweit wie möglich abgestimmt werden, gibt es genetische Unterschiede außerhalb des MHC-Systems, welche zu erheblichen Differenzen im Hinblick auf die Peptide, welche durch MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche von Spender- und Empfängerzellen präsentiert werden, führen. Peptide, die hierbei auf Empfänger- aber nicht auf Spenderzellen präsentiert werden, können, in Abhängigkeit von den Geweben, in denen das jeweilige Gen exprimiert und das entsprechende Peptid präsentiert wird, somit eine Immunreaktion im Sinne einer GVL-Reaktion bzw. GVHD auslösen und werden als *minor* Histokompatibilitätsantigene (mHAg) bezeichnet (Falkenburg und Warren 2011). Gene, die ausschließlich in hämatopoetischem Gewebe exprimiert werden und deren Genprodukte somit selektiv auf den hämatopoetischen Zellen – einschließlich der leukämischen Zellen – des Empfängers präsentiert werden, stellen somit geeignete Zielstrukturen für *in vitro* selektierte und expandierte antigenspezifische CTL dar, um nach adoptivem Zelltransfer einen selektiven GVL-Effekt zu vermitteln. Entsprechende klinische Studien mit mHAg-spezifischen alloreaktiven T-Zellen werden derzeit durchgeführt und zeigen vielversprechende Ergebnisse (Warren et al. 2010). Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Identifizierung von Antigenen, welche mit dem malignen Phänotyp der entarteten Zellen assoziiert sind (Richter et al. 2009; Thiel et al. 2011). Hierfür kommen vor allem tumorassoziierte oder tumorspezifische nichtpolymorphe Selbstantigene infrage, welche vorwiegend oder ausschließlich in Tumorzellen exprimiert und durch MHC Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche leukämischer Blasten präsentiert werden. Diese Antigene stellen potente Zielepitope für *in vitro* generierte und expandierte, antigenspezifische CTL dar. Durch die selektive Expression auf Tumorzellen ermöglichen diese Zielstrukturen eine zielgerichtete leukämiespezifische Reaktivität der als DLI nach allogener HSCT adoptiv verabreichten CTL. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, den GVL-Effekt zur immuntherapeutischen Prävention eines Rezidivs bei Leukämiepatienten mit Hochrisikoprofil zu nutzen und zugleich die Toxizität sowie die Risiken einer GVHD zu minimieren. Die Identifizierung leukämiespezifischer Antigene, die Generierung tumorantigenspezifischer T-Zellen und ihre mögliche Anwendung zum adoptiven Zelltransfer sind Gegenstand aktueller Forschung (Wernicke et al. 2012).

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurden die Gene STK32B und LILRA2 als tumorassoziierte bzw. tumorspezifische Antigene identifiziert, die bei der cALL im Vergleich zu Normalgewebe vermehrt exprimiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in vitro* allorestingierte peptidspezifische CTL generiert, welche spezifisch waren für an HLA-A*0201 bindende STK32B- bzw. LILRA2-Peptidepitope. Diese CTL erkannten nicht nur spezifisch die peptidexprimierenden Zellen im HLA-A*0201-Kontext, sondern reagierten bei Kontakt mit HLA-A*0201⁺ cALL-Zelllinien, welche die entsprechenden Antigene exprimierten, mit einer spezifischen Granzym B-Ausschüttung, wohingegen der Kontakt mit HLA-A*0201⁻ cALL-Zelllinien keine zytolytischen Reaktionen hervorrief. Dies zeigt die hohe Spezifität und Effektivität der allorestingierten CTL, welche bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien im Rahmen der allogenen HSCT bzw. des adoptiven Zelltransfers nach aHSCT zur Induktion eines GVL-Effekts unter Umgehung der Toxizität einer GVHD eine Rolle spielen könnten.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung und Charakterisierung cALL-spezifischer alloreaktiver CTL. In Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit wurden mittels Microarray-Analysen mehrere Gene identifiziert, die als cALL-assoziiert oder cALL-spezifisch angesehen werden konnten. Zwei dieser Gene, STK32B und LILRA2, wurden als potenzielle Zielgene für cALL-spezifische CTL ausgewählt. Aus der Proteinsequenz dieser Gene wurden Peptidepitope selektiert, welche laut *in silico* angewandten bioinformatischen Algorithmen gut an HLA-Moleküle binden. Aus praktischen Gründen beschränkten wir uns hierbei auf das HLA-A*0201 Molekül, da dieses das am häufigsten vorkommende HLA-Allel in der kaukasischen Bevölkerung darstellt. Die ausgewählten Peptide wurden synthetisiert und durchflusszytometrisch auf ihre Bindungsfähigkeit an HLA-A*0201 *in vitro* getestet. Die Peptide mit den besten Bindungseigenschaften wurden als potenzielle Zielepitope für cALL-spezifische CTL selektiert. Keines der ausgewählten Epitope ist zuvor in Bezug auf die cALL oder andere Tumorerkrankungen beschrieben worden. Dendritische Zellen wurden aus HLA-A*0201-positiven CD14⁺ Zellen generiert und für das allogene *in vitro* „*Priming*“ naiver T-Zellen verwendet. CD8⁺ T-Zellen wurden dem allogenen Ansatz entsprechend aus den PBMC eines HLA-A*0201 negativen Spenders isoliert und beim allogenen *in vitro Priming* mit den peptidgepulsten Dendritischen Zellen kokultiviert. Epitopspezifische CTL wurden mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten peptidspezifischen HLA-A*0201-Pentamers aus der Menge unspezifischer alloreaktiver T-Zellen identifiziert und isoliert. Die spezifischen CTL wurden durch Vereinzelung kloniert, expandiert und mittels ELISpot charakterisiert. In dieser Arbeit gelang die Gewinnung mehrerer T-Zell-Linien, welche in der Lage waren, cALL-Antigene peptidspezifisch und im HLA-Kontext zu erkennen und abzutöten. Dies wurde im Interferon γ - und Granzym B-ELISpot überprüft. Die T-Zell-Linien erkannten nicht nur spezifisch die peptidpräsentierenden Zellen im korrekten HLA-Kontext, sondern reagierten bei Kontakt mit HLA-A*0201 positiven cALL-Zelllinien, welche das entsprechende Antigen exprimierten, mit einer spezifischen Granzym B-Ausschüttung als Zeichen einer spezifischen zytolytischen Reaktion. HLA-A*0201 negative cALL-Tumorzelllinien lösten hingegen keine Reaktion aus. Es gelang somit reproduzierbar die Gewinnung alloreaktiver cALL-spezifischer CTL, welche spezifisch auf bisher unbekannte cALL-Antigene reagierten. Diese CTL könnten in Zukunft als Bestandteil immuntherapeutischer Therapiestrategien bei der cALL eingesetzt werden, insbesondere im Bereich des adoptiven Zelltransfers zur Rezidivprophylaxe oder –therapie nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation.

7 Literaturverzeichnis

1. Alyea, E. P.; Soiffer, R. J.; Canning, C.; Neuberg, D.; Schlossman, R.; Pickett, C.; Collins, H.; Wang, Y.; Anderson, K. C.; Ritz, J. (1998): Toxicity and efficacy of defined doses of CD4(+) donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. In: *Blood* 91 (10), S. 3671–3680.
2. Amrolia, P.; Reid, S.; Gao, L.; Schultheis, B.; Dotti, G.; Brenner, M.; Melo, J.; Goldman, J.; Stauss, H. (2003): Allorestricted cytotoxic T cells specific for human CD45 show potent antileukemic activity. In: *Blood* 101 (3), S. 1007–1014.
3. Anderson, K.; Allen R. (2009): Regulation of T-cell immunity by leucocyte immunoglobulin-like receptors: innate immune receptors for self on antigen-presenting cells. In: *Immunology* 127 (1), S. 8–17.
4. Andrews, D.; Maraskovsky, E.; Smyth, M. (2008): Cancer vaccines for established cancer: how to make them better? In: *Immunol Rev* 222 (1), S. 242–255.
5. Appelbaum, F. R. (2001): Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. In: *Nature* 411 (6835), S. 385–389.
6. Aschan, J.; Ringden O.; Sundberg B.; Klaesson S.; Ljungman P.; Lonnqvist B. (1993): Increased risk of relapse in patients with chronic myelogenous leukemia given T-cell depleted marrow compared to methotrexate combined with cyclosporin or monotherapy for the prevention of graft-versus-host disease. In: *Eur J Haematol* 50 (5), S. 269–274.
7. Bader, P.; Kreyenberg, H.; Henze, G. H. R.; Eckert, C.; Reising, M.; Willasch, A.; Barth, A.; Borkhardt, A.; Peters, C.; Handgretinger, R.; Sykora, K. W.; Holter, W.; Kabisch, H.; Klingebiel, T.; Stackelberg, A. von (2009): Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. In: *J Clin Oncol* 27 (3), S. 377–384.
8. Banchereau, J.; Steinman R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (6673), S. 245–252.
9. Beinvogl, B. (2010): Hochaufgereinigte CD19+CD10+ fetale B-Zellen aus Nabelschnurblut als Vergleichszellen zur pädiatrischen Akuten Lymphoblastischen Leukämie (cALL) identifizieren eine neue Expressionssignatur des malignen Phänotyps. Dissertation, zuletzt geprüft am 07.03.2012.
10. Bene, M. C.; Castoldi G.; Knapp W.; Ludwig W. D.; Matutes E.; Orfao A.; van't Veer, M. B. (1995): Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). In: *Leukemia* 9 (10), S. 1783–1786.
11. Bennett, J. M.; Catovsky, D.; Daniel, M. T.; Flandrin, G.; Galton, D. A.; Gralnick, H. R.; Sultan, C. (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. In: *Br J Haematol* 33 (4), S. 451–458.
12. Berger, C.; Jensen, M. C.; Lansdorp, P. M.; Gough, M.; Elliott, C.; Riddell, S. R. (2008): Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. In: *J Clin Invest* 118 (1), S. 294–305.

13. Bleakley, M.; Riddell, S. R. (2011): Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia. In: *Immunol Cell Biol* 89 (3), S. 396–407.
14. Bleharski, J. R. (2003): Use of Genetic Profiling in Leprosy to Discriminate Clinical Forms of the Disease. In: *Science* 301 (5639), S. 1527–1530.
15. Bleyer, W. A. (1988): Central nervous system leukemia. In: *Pediatr. Clin. North Am* 35 (4), S. 789–814.
16. Borges, L.; Hsu, M. L.; Fanger, N.; Kubin, M.; Cosman, D. (1997): A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. In: *J Immunol* 159 (11), S. 5192–5196.
17. Bots, M.; Medema, J. P. (2006): Granzymes at a glance. In: *Journal of Cell Science* 119 (24), S. 5011–5014.
18. Brenner, M. K.; Heslop, H. E. (2010): Adoptive T cell therapy of cancer. In: *Curr Opin Immunol* 22 (2), S. 251–257.
19. Campana, D. (2009): Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. In: *Semin Hematol* 46 (1), S. 100–106.
20. Campana, D. (2012): Should Minimal Residual Disease Monitoring in Acute Lymphoblastic Leukemia be Standard of Care? In: *Current hematologic malignancy reports*.
21. Capra, M. (2006): Frequent Alterations in the Expression of Serine/Threonine Kinases in Human Cancers. In: *Cancer Research* 66 (16), S. 8147–8154.
22. Cartellieri, M.; Bachmann, M.; Feldmann, A.; Bippes, C.; Stamova, S.; Wehner, R.; Temme, A.; Schmitz, M. (2010): Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells for Immunotherapy of Cancer. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, S. 1–14.
23. Casey, K. A.; Mescher, M. F. (2007): IL-21 promotes differentiation of naive CD8 T cells to a unique effector phenotype. In: *J Immunol* 178 (12), S. 7640–7648.
24. Champlin, R.; Khouri, I.; Shimoni, A.; Gajewski, J.; Kornblau, S.; Molldrem, J.; Ueno, N.; Giralt, S.; Anderlini, P. (2000): Harnessing graft-versus-malignancy: non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy. In: *Br J Haematol* 111 (1), S. 18–29.
25. Chang, C. H.; Hammer, J.; Loh, J. E.; Fodor, W. L.; Flavell, R. A. (1992): The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1). In: *Immunogenetics* 35 (6), S. 378–384.
26. Chatterjee, K.; Zhang, J.; Honbo, N.; Karliner, J. S. (2010): Doxorubicin cardiomyopathy. In: *Cardiology* 115 (2), S. 155–162.
27. Chen, Y.; Chu, F.; Gao, F.; Zhou, B.; Gao, G. F. (2007): Stability engineering, biophysical, and biological characterization of the myeloid activating receptor immunoglobulin-like transcript 1 (ILT1/LIR-7/LILRA2). In: *Protein Expr Purif* 56 (2), S. 253–260.

28. Chow, E. J.; Friedman, D. L.; Yasui, Y.; Whitton, J. A.; Stovall, M.; Robison, L. L.; Sklar, C. A. (2007): Decreased adult height in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. In: *J. Pediatr* 150 (4), S. 370-5, 375.e1.
29. Chow, E. J.; Pihoker, C.; Hunt, K.; Wilkinson, K.; Friedman, D. L. (2007): Obesity and hypertension among children after treatment for acute lymphoblastic leukemia. In: *Cancer* 110 (10), S. 2313–2320.
30. Clarke, M.; Gaynon, P.; Hann, I.; Harrison, G.; Masera, G.; Peto, R.; Richards, S. (2003): CNS-directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: Childhood ALL Collaborative Group overview of 43 randomized trials. In: *J. Clin. Oncol* 21 (9), S. 1798–1809.
31. Clay, T. M.; Custer, M. C.; Sachs, J.; Hwu, P.; Rosenberg, S. A.; Nishimura, M. I. (1999): Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. In: *J. Immunol* 163 (1), S. 507–513.
32. Colonna, M.; Nakajima, H.; Navarro, F.; Lopez-Botet, M. (1999): A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. In: *J Leukoc Biol* 66 (3), S. 375–381.
33. Cui, W.; Kaech, S. M. (2010): Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. In: *Immunol Rev* 236, S. 151–166.
34. Czerkinsky, C. C.; Nilsson, L. A.; Nygren, H.; Ouchterlony, O.; Tarkowski, A. (1983): A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. In: *J Immunol Methods* 65 (1-2), S. 109–121.
35. Davison, G. M. (2010): Dendritic cells, T-cells and their possible role in the treatment of leukaemia and lymphoma. In: *Transfus Apher Sci* 42 (2), S. 189–192.
36. Deetjen, P.; Alzheimer, C. (2005): Physiologie. 4. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
37. Dembic, Z.; Haas, W.; Weiss, S.; McCubrey, J.; Kiefer, H.; von Boehmer, H.; Steinmetz, M. (1986): Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. In: *Nature* 320 (6059), S. 232–238.
38. Diaz-Montero, C. M.; El Naggar, S.; Al Khami, A.; El Naggar, R.; Montero, A. J.; Cole, D. J.; Salem, M. L. (2008): Priming of naive CD8+ T cells in the presence of IL-12 selectively enhances the survival of CD8+CD62Lhi cells and results in superior anti-tumor activity in a tolerogenic murine model. In: *Cancer Immunol Immunother* 57 (4), S. 563–572.
39. Dossett, M. L.; Teague, R. M.; Schmitt, T. M.; Tan, X.; Cooper, L. J.; Pinzon, C.; Greenberg, P. D. (2009): Adoptive immunotherapy of disseminated leukemia with TCR-transduced, CD8+ T cells expressing a known endogenous TCR. In: *Mol. Ther.* 17 (4), S. 742–749.
40. Dougan, M.; Dranoff, G. (2009): Immune therapy for cancer. In: *Annu. Rev. Immunol* 27, S. 83–117.
41. Drexler, H. G. (1994): Leukemia cell lines: in vitro models for the study of chronic myeloid leukemia. In: *Leuk. Res* 18 (12), S. 919–927.

42. Eden, T. (2010): Aetiology of childhood leukaemia. In: *Cancer Treat Rev* 36 (4), S. 286–297.
43. Elinav, E.; Adam, N.; Waks, T.; Eshhar, Z. (2009): Amelioration of colitis by genetically engineered murine regulatory T cells redirected by antigen-specific chimeric receptor. In: *Gastroenterology* 136 (5), S. 1721–1731.
44. Engelhard, V. H.; Bullock, T. N. J.; Colella, T. A.; Sheasley, S. L.; Mullins, D. W. (2002): Antigens derived from melanocyte differentiation proteins: self-tolerance, autoimmunity, and use for cancer immunotherapy. In: *Immunol Rev* 188, S. 136–146.
45. Falkenburg, J. H. F.; Warren, E. H. (2011): Graft versus leukemia reactivity after allogeneic stem cell transplantation. In: *Biol Blood Marrow Transplant* 17 (1 Suppl), S. S33-8.
46. Fears, S.; Vignon, C.; Bohlander, S. K.; Smith, S.; Rowley, J. D.; Nucifora, G. (1996): Correlation between the ETV6/CBFA2 (TEL/AML1) fusion gene and karyotypic abnormalities in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. In: *Genes Chromosomes Cancer* 17 (2), S. 127–135.
47. Felix, N. J.; Allen, P. M. (2007): Specificity of T-cell alloreactivity. In: *Nat Rev Immunol* 7 (12), S. 942–953.
48. Feuerstein, B.; Berger, T. G.; Maczek, C.; Röder, C.; Schreiner, D.; Hirsch, U.; Haendle, I.; Leisgang, W.; Glaser, A.; Kuss, O.; Diepgen, T. L.; Schuler, G.; Schuler-Thurner, B. (2000): A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use. In: *J. Immunol. Methods* 245 (1-2), S. 15–29.
49. Findley, H. W. J.; Cooper, M. D.; Kim, T. H.; Alvarado, C.; Ragab, A. H. (1982): Two new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes. In: *Blood* 60 (6), S. 1305–1309.
50. Ford, A. M.; Palmi, C.; Bueno, C.; Hong, D.; Cardus, P.; Knight, D.; Cazzaniga, G.; Enver, T.; Greaves, M. (2009): The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF-beta pathway in early B lineage progenitor cells. In: *J. Clin. Invest* 119 (4), S. 826–836.
51. Gadner, G.; Gaedicke, G.; Niemeyer, C.; Ritter, J. (Hrsg.) (2006): Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
52. Gassas, A.; Sung, L.; Saunders, E. F.; Doyle, J. (2007): Graft-versus-leukemia effect in hematopoietic stem cell transplantation for pediatric acute lymphoblastic leukemia: significantly lower relapse rate in unrelated transplantations. In: *Bone Marrow Transplant* 40 (10), S. 951–955.
53. Gatta, G.; Capocaccia, R.; Stiller, C.; Kaatsch, P.; Berrino, F.; Terenziani, M. (2005): Childhood cancer survival trends in Europe: a EURO CARE Working Group study. In: *J. Clin. Oncol* 23 (16), S. 3742–3751.
54. Gattinoni, L.; Klebanoff, C. A.; Palmer, D. C.; Wrzesinski, C.; Kerstann, K.; Yu, Z.; Finkelstein, S. E.; Theoret, M. R.; Rosenberg, S. A.; Restifo, N. P. (2005): Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. In: *J Clin Invest* 115 (6), S. 1616–1626.

55. Gattinoni, L.; Powell, D. J.; Rosenberg, S. A.; Restifo, N. P. (2006): Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. In: *Nat Rev Immunol* 6 (5), S. 383–393.
56. Gessain, A. (2011): Le retrovirus humain oncogene HTLV-1. Epidemiologie descriptive et moleculaire, origine, evolution et aspects diagnostiques et maladies associees. In: *Bull Soc Pathol Exot* 104 (3), S. 167–180.
57. Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. In: *J. Natl. Cancer Inst* 51 (5), S. 1417–1423.
58. Giralto, S.; Hester, J.; Huh, Y.; Hirsch-Ginsberg, C.; Rondón, G.; Seong, D.; Lee, M.; Gajewski, J.; van Besien, K.; Khouri, I.; Mehra, R.; Przepiorka, D.; Körbling, M.; Talpaz, M.; Kantarjian, H.; Fischer, H.; Deisseroth, A.; Champlin, R. (1995): CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. In: *Blood* 86 (11), S. 4337–4343.
59. Gluzman, Y. (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. In: *Cell* 23 (1), S. 175–182.
60. Golub, T. R.; Barker, G. F.; Bohlander, S. K.; Hiebert, S. W.; Ward, D. C.; Bray-Ward, P.; Morgan, E.; Raimondi, S. C.; Rowley, J. D.; Gilliland, D. G. (1995): Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92 (11), S. 4917–4921.
61. Gonzalez-Galarza, F. F.; Christmas, S.; Middleton, D.; Jones, A. R. (2011): Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. In: *Nucleic Acids Res* 39 (Database issue), S. D913–9.
62. Gratwohl, A.; Baldomero, H.; Passweg, J.; Frassoni, F.; Niederwieser, D.; Schmitz, N.; Urbano-Ispizua, A. (2003): Hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies in Europe. In: *Leukemia* 17 (5), S. 941–959.
63. Harila, M. J.; Winqvist, S.; Lanning, M.; Bloigu, R.; Harila-Saari, A. H. (2009): Progressive neurocognitive impairment in young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. In: *Pediatr Blood Cancer* 53 (2), S. 156–161.
64. Harris, M. B.; Shuster, J. J.; Carroll, A.; Look, A. T.; Borowitz, M. J.; Crist, W. M.; Nitschke, R.; Pullen, J.; Steuber, C. P.; Land, V. J. (1992): Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. In: *Blood* 79 (12), S. 3316–3324.
65. Harrison, C. J.; Moorman, A. V.; Barber, K. E.; Broadfield, Z. J.; Cheung, K. L.; Harris, R. L.; Jalali, G. R.; Robinson, H. M.; Strefford, J. C.; Stewart, A.; Wright, S.; Griffiths, M.; Ross, F. M.; Harewood, L.; Martineau, M. (2005): Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study. In: *Br. J. Haematol* 129 (4), S. 520–530.
66. Heemskerk, M. H. M.; Griffioen, M.; Falkenburg, J. H. F. (2008): T-cell receptor gene transfer for treatment of leukemia. In: *Cytotherapy* 10 (2), S. 108–115.

67. Heerema, N. A.; Sather, H. N.; Sensel, M. G.; Zhang, T.; Hutchinson, R. J.; Nachman, J. B.; Lange, B. J.; Steinherz, P. G.; Bostrom, B. C.; Reaman, G. H.; Gaynon, P. S.; Uckun, F. M. (2000): Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (50 chromosomes). In: *J. Clin. Oncol* 18 (9), S. 1876–1887.
68. Hinrichs, C. S.; Borman, Z. A.; Cassard, L.; Gattinoni, L.; Spolski, R.; Yu, Z.; Sanchez-Perez, L.; Muranski, P.; Kern, S. J.; Logun, C.; Palmer, D. C.; Ji, Y.; Reger, R. N.; Leonard, W. J.; Danner, R. L.; Rosenberg, S. A.; Restifo, N. P. (2009): Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8+ T cells mediate superior antitumor immunity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (41), S. 17469–17474.
69. Hinrichs, C. S.; Gattinoni, L.; Restifo, N. P. (2006): Programming CD8+ T cells for effective immunotherapy. In: *Curr Opin Immunol* 18 (3), S. 363–370.
70. Hinrichs, C. S.; Spolski, R.; Paulos, C. M.; Gattinoni, L.; Kerstann, K. W.; Palmer, D. C.; Klebanoff, C. A.; Rosenberg, S. A.; Leonard, W. J.; Restifo, N. P. (2008): IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. In: *Blood* 111 (11), S. 5326–5333.
71. Horowitz, M. M.; Gale, R. P.; Sondel, P. M.; Goldman, J. M.; Kersey, J.; Kolb, H. J.; Rimm, A. A.; Ringdén, O.; Rozman, C.; Speck, B. (1990): Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. In: *Blood* 75 (3), S. 555–562.
72. Hudecek, M.; Anderson J. R., Larry D.; Nishida, T.; Riddell, S. R. (2009): Adoptive T-cell therapy for B-cell malignancies. In: *Expert Rev. Hematol.* 2 (5), S. 517–532.
73. Hurwitz, R.; Hozier, J.; LeBien, T.; Minowada, J.; Gajl-Peczalska, K.; Kubonishi, I.; Kersey, J. (1979): Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. In: *Int J Cancer* 23 (2), S. 174–180.
74. Ingersoll, R. G.; Hetmanski, J.; Park, J.-W.; Fallin, M. D.; McIntosh, I.; Wu-Chou, Y.-H.; Chen, P. K.; Yeow, V.; Chong, S. S.; Cheah, F.; Sull, J. W.; Jee, S. H.; Wang, H.; Wu, T.; Murray, T.; Huang, S.; Ye, X.; Jabs, E. W.; Redett, R.; Raymond, G.; Scott, A. F.; Beaty, T. H. (2010): Association between genes on chromosome 4p16 and non-syndromic oral clefts in four populations. In: *Eur J Hum Genet* 18 (6), S. 726–732.
75. Jacobsohn, D. A.; Vogelsang, G. B. (2007): Acute graft versus host disease. In: *Orphanet J Rare Dis* 2 (1), S. 35.
76. Johnson, L. A.; Morgan, R. A.; Dudley, M. E.; Cassard, L.; Yang, J. C.; Hughes, M. S.; Kammula, U. S.; Royal, R. E.; Sherry, R. M.; Wunderlich, J. R.; Lee, C.-C R.; Restifo, N. P.; Schwarz, S. L.; Cogdill, A. P.; Bishop, R. J.; Kim, H.; Brewer, C. C.; Rudy, S. F.; VanWaes, C.; Davis, J. L.; Mathur, A.; Ripley, R. T.; Nathan, D. A.; Laurencot, C. M.; Rosenberg, S. A. (2009): Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. In: *Blood* 114 (3), S. 535–546.
77. June, C. H. (2007): Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. In: *J. Clin. Invest.* 117 (6), S. 1466–1476.
78. June, C. H. (2007): Principles of adoptive T cell cancer therapy. In: *J. Clin. Invest.* 117 (5), S. 1204–1212.

-
79. Kaatsch, P. (2010): Epidemiology of childhood cancer. In: *Cancer Treat Rev* 36 (4), S. 277–285.
 80. Kaatsch, P.; Mergenthaler, A. (2008): Incidence, time trends and regional variation of childhood leukaemia in Germany and Europe. In: *Radiat Prot Dosimetry* 132 (2), S. 107–113.
 81. Kaatsch, P.; Spix, C. (2010): Jahresbericht 2010 (1980 - 2009) des Deutschen Kinderkrebsregisters. Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik, Universität Mainz, www.kinderkrebsregister.de.
 82. Kaatsch, P.; Steliarova-Foucher, E.; Crocetti, E.; Magnani, C.; Spix, C.; Zambon, P. (2006): Time trends of cancer incidence in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. In: *Eur J Cancer* 42 (13), S. 1961–1971.
 83. Kaech, S. M.; Wherry, E. J.; Ahmed, R. (2002): Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. In: *Nat Rev Immunol* 2 (4), S. 251–262.
 84. Kahle, P.; Wernet, P.; Rehbein, A.; Kumbier, I.; Pawelec, G. (1981): Cloning of functional human T lymphocytes by limiting dilution: impact of filler cells and interleukin 2 sources on cloning efficiencies. In: *Scand. J. Immunol.* 14 (5), S. 493–502.
 85. Klebanoff, C. A.; Gattinoni, L.; Torabi-Parizi, P.; Kerstann, K.; Cardones, A. R.; Finkelstein, S. E.; Palmer, D. C.; Antony, P. A.; Hwang, S. T.; Rosenberg, S. A.; Waldmann, T. A.; Restifo, N. P. (2005): Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (27), S. 9571–9576.
 86. Klein, J.; Sato, A. (2000): The HLA system. First of two parts. In: *N Engl J Med* 343 (10), S. 702–709.
 87. Klein, J.; Sato, A. (2000): The HLA system. Second of two parts. In: *N Engl J Med* 343 (11), S. 782–786.
 88. Kolb, H. J. (2008): Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. In: *Blood* 112 (12), S. 4371–4383.
 89. Kolb, H. J.; Mittermuller, J.; Clemm, C.; Holler, E.; Ledderose, G.; Brehm, G.; Heim, M.; Wilmanns, W. (1990): Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. In: *Blood* 76 (12), S. 2462–2465.
 90. Kolb, H. J.; Schattenberg, A.; Goldman, J. M.; Hertenstein, B.; Jacobsen, N.; Arcese, W.; Ljungman, P.; Ferrant, A.; Verdonck, L.; Niederwieser, D.; van Rhee, F.; Mittermueller, J.; Witte, T. de; Holler, E.; Ansari, H. (1995): Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. In: *Blood* 86 (5), S. 2041–2050.
 91. Kolb, H. J.; Schmid, C.; Barrett, A. J.; Schendel, D. J. (2004): Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. In: *Blood* 103 (3), S. 767–776.
 92. Kolb, H. J.; Schmid, C.; Chen, X.; Woiciechowski, A.; Roskrow, M.; Weber, M.; Guenther, W.; Ledderose, G.; Schleuning, M. (2003): Adoptive immunotherapy in chimeras with donor lymphocytes. In: *Acta Haematol* 110 (2-3), S. 110–120.

93. Körholz, D.; Bruder, M.; Engelbrecht, V.; Rüter, W.; Göbel, U. (1998): Aseptic osteonecrosis in children with acute lymphoblastic leukemia. In: *Pediatr Hematol Oncol* 15 (4), S. 307–315.
94. Kronig, H.; Hofer, K.; Conrad, H.; Guillaume, P.; Muller, J.; Schiemann, M.; Lennerz, V.; Cosma, A.; Peschel, C.; Busch, D. H.; Romero, P.; Bernhard, H. (2009): Allorestricted T lymphocytes with a high avidity T-cell receptor towards NY-ESO-1 have potent anti-tumor activity. In: *Int J Cancer* 125 (3), S. 649–655.
95. Langer, T.; Martus, P.; Ottensmeier, H.; Hertzberg, H.; Beck, J. D.; Meier, W. (2002): CNS late-effects after ALL therapy in childhood. Part III: neuropsychological performance in long-term survivors of childhood ALL: impairments of concentration, attention, and memory. In: *Med Pediatr Oncol* 38 (5), S. 320–328.
96. Langerak, A. W.; van DenBeemd, R.; Wolvers-Tettero, I. L.; Boor, P. P.; van Lochem, E. G.; Hooijkaas, H.; van Dongen, J. J. (2001): Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha T-cell proliferations. In: *Blood* 98 (1), S. 165–173.
97. Larsen, M. V.; Lundegaard, C.; Lamberth, K.; Buus, S.; Lund, O.; Nielsen, M. (2007): Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. In: *BMC Bioinformatics* 8, S. 424.
98. Lee, D. J.; Sieling, P. A.; Ochoa, M.T; Krutzik, S. R.; Guo, B.; Hernandez, M.; Rea, T. H.; Cheng, G.; Colonna, M.; Modlin, R. L. (2007): LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. In: *J Immunol* 179 (12), S. 8128–8136.
99. Lee, K.-Y.; Chun, E.; Kim, N.-Y.; Seong, B. L. (2002): Characterization of HLA-A2.1-restricted epitopes, conserved in both Hantaan and Sin Nombre viruses, in Hantaan virus-infected patients. In: *J Gen Virol* 83 (Pt 5), S. 1131–1136.
100. Leung, W. (2009): Immunotherapy in Acute Leukemia. In: *Seminars in Hematology* 46 (1), S. 89–99.
101. Li, J. M.; Giver, C. R.; Lu, Y.; Hossain, M. S.; Akhtari, M.; Waller, E. K. (2009): Separating graft-versus-leukemia from graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *Immunotherapy* 1 (4), S. 599–621.
102. Li, Y.; Bleakley, M.; Yee, C. (2005): IL-21 influences the frequency, phenotype, and affinity of the antigen-specific CD8 T cell response. In: *J Immunol* 175 (4), S. 2261–2269.
103. Liao, W. W. P.; Arthur, J. W. (2011): Predicting peptide binding to Major Histocompatibility Complex molecules. In: *Autoimmun Rev* 10 (8), S. 469–473.
104. Lopez, R. G.; Carron, C.; Oury, C.; Gardellin, P.; Bernard, O.; Ghysdael, J. (1999): TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. In: *J. Biol. Chem* 274 (42), S. 30132–30138.
105. Lozzio, C. B.; Lozzio, B. B. (1975): Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. In: *Blood* 45 (3), S. 321–334.
106. Lukk, M.; Kapushesky, M.; Nikkila, J.; Parkinson, H.; Goncalves, A.; Huber, W.; Ukkonen, E.; Brazma, A. (2010): A global map of human gene expression. In: *Nat Biotechnol* 28 (4), S. 322–324.

107. Mackinnon, S.; Papadopoulos, E. B.; Carabasi, M. H.; Reich, L.; Collins, N. H.; Boulad, F.; Castro-Malaspina, H.; Childs, B. H.; Gillio, A. P.; Kernan, N. A. (1995): Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. In: *Blood* 86 (4), S. 1261–1268.
108. Maiers, M.; Gragert, L.; Klitz, W. (2007): High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. In: *Hum. Immunol* 68 (9), S. 779–788.
109. Mamegano, K.; Kuroki, K.; Miyashita, R.; Kusaoi, M.; Kobayashi, S.; Matsuta, K.; Maenaka, K.; Colonna, M.; Ozaki, S.; Hashimoto, H.; Takasaki, Y.; Tokunaga, K.; Tsuchiya, N. (2008): Association of LILRA2 (ILT1, LIR7) splice site polymorphism with systemic lupus erythematosus and microscopic polyangiitis. In: *Genes Immun* 9 (3), S. 214–223.
110. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. (2002): The protein kinase complement of the human genome. In: *Science* 298 (5600), S. 1912–1934.
111. Mansoor, W.; Gilham, D. E.; Thistlethwaite, F. C.; Hawkins, R. E. (2005): Engineering T cells for cancer therapy. In: *Br J Cancer* 93 (10), S. 1085–1091.
112. Marmont, A. M.; Horowitz, M. M.; Gale, R. P.; Sobocinski, K.; Ash, R. C.; van, BekkumDW; Champlin, R. E.; Dicke, K. A.; Goldman, J. M.; Good, R. A. (1991): T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. In: *Blood* 78 (8), S. 2120–2130.
113. Masuda, K.; Hiraki, A.; Fujii, N.; Watanabe, T.; Tanaka, M.; Matsue, K.; Ogama, Y.; Ouchida, M.; Shimizu, K.; Ikeda, K.; Tanimoto, M. (2007): Loss or down-regulation of HLA class I expression at the allelic level in freshly isolated leukemic blasts. In: *Cancer Sci.* 98 (1), S. 102–108.
114. Maule, M.; Scélo, G.; Pastore, G.; Brennan, P.; Hemminki, K.; Tracey, E.; Sankila, R.; Weiderpass, E.; Olsen, J. H.; McBride, M. L.; Brewster, D. H.; Pompe-Kirn, V.; Kliwer, E. V.; Chia, K. S.; Tonita, J. M.; Martos, C.; Jonasson, J. G.; Merletti, F.; Boffetta, P. (2007): Risk of second malignant neoplasms after childhood leukemia and lymphoma: an international study. In: *J. Natl. Cancer Inst* 99 (10), S. 790–800.
115. Mayatepek, E. (2007): Pädiatrie. 1. Aufl. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.
116. McKee, M. D.; Fichera, A.; Nishimura, M. I. (2007): T cell immunotherapy. In: *Front Biosci* 12, S. 919–932.
117. Mehta, P. A.; Davies, S. M. (2007): Allogeneic transplantation for childhood ALL. In: *Bone Marrow Transplant* 41 (2), S. 133–139.
118. Mellman, I.; Coukos, G.; Dranoff, G. (2011): Cancer immunotherapy comes of age. In: *Nature* 480 (7378), S. 480–489.
119. Meyer-Wentrup, F.; Burdach, S. (2003): Efficacy of dendritic cell generation for clinical use: recovery and purity of monocytes and mature dendritic cells after immunomagnetic sorting or adherence selection of CD14+ starting populations. In: *J Hematother Stem Cell Res* 12 (3), S. 289–299.
120. Meyer-Wentrup, F.; Richter, G.; Burdach, S. (2005): Identification of an immunogenic EWS-FLI1-derived HLA-DR-restricted T helper cell epitope. In: *Pediatr Hematol Oncol* 22 (4), S. 297–308.

121. Middleton, D.; Menchaca, L.; Rood, H.; Komerofsky, R. (2003): New allele frequency database: <http://www.allelefreqencies.net>. In: *Tissue Antigens* 61 (5), S. 403–407.
122. Mitsuyasu, R. T.; Anton, P. A.; Deeks, S. G.; Scadden, D. T.; Connick, E.; Downs, M. T.; Bakker, A.; Roberts, M. R.; June, C. H.; Jalali, S.; Lin, A. A.; Pennathur-Das, R.; Hege, K. M. (2000): Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. In: *Blood* 96 (3), S. 785–793.
123. Mondino, A.; Dardalhon, V.; Hess, M. R.; Loisel-Meyer, S.; Taylor, M. (2010): Redirecting the immune response: role of adoptive T cell therapy. In: *Hum Gene Ther* 21 (5), S. 533–541.
124. Moorman, A. V.; Ensor, H. M.; Richards, S. M.; Chilton, L.; Schwab, C.; Kinsey, S. E.; Vora, A.; Mitchell, C. D.; Harrison, C. J. (2010): Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. In: *Lancet Oncol* 11 (5), S. 429–438.
125. Morgan, R. A.; Dudley, M. E.; Wunderlich, J. R.; Hughes, M. S.; Yang, J. C.; Sherry, R. M.; Royal, R. E.; Topalian, S. L.; Kammula, U. S.; Restifo, N. P.; Zheng, Z.; Nahvi, A.; Vries, C. R. de; Rogers-Freezer, L. J.; Mavroukakis, S. A.; Rosenberg, S. A. (2006): Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. In: *Science* 314 (5796), S. 126–129.
126. Mori, H.; Colman, S. M.; Xiao, Z.; Ford, A. M.; Healy, L. E.; Donaldson, C.; Hows, J. M.; Navarrete, C.; Greaves, M. (2002): Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99 (12), S. 8242–8247.
127. Moricke, A.; Reiter, A.; Zimmermann, M.; Gadner, H.; Stanulla, M.; Dordelmann, M.; Loning, L.; Beier, R.; Ludwig, W.-D.; Ratei, R.; Harbott, J.; Boos, J.; Mann, G.; Niggli, F.; Feldges, A.; Henze, G.; Welte, K.; Beck, J.-D.; Klingebiel, T.; Niemeyer, C.; Zintl, F.; Bode, U.; Urban, C.; Wehinger, H.; Niethammer, D.; Riehm, H.; Schrappe, M. (2008): Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. In: *Blood* 111 (9), S. 4477–4489.
128. Moricke, A.; Zimmermann, M.; Reiter, A.; Henze, G.; Schrauder, A.; Gadner, H.; Ludwig, W. D.; Ritter, J.; Harbott, J.; Mann, G.; Klingebiel, T.; Zintl, F.; Niemeyer, C.; Kremens, B.; Niggli, F.; Niethammer, D.; Welte, K.; Stanulla, M.; Odenwald, E.; Riehm, H.; Schrappe, M. (2010): Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. In: *Leukemia* 24 (2), S. 265–284.
129. Nagai, K.; Ochi, T.; Fujiwara, H.; An, J.; Shirakata, T.; Mineno, J.; Kuzushima, K.; Shiku, H.; Melenhorst, J. J.; Gostick, E.; Price, D. A.; Ishii, E.; Yasukawa, M. (2012): Aurora kinase A-specific T-cell receptor gene transfer redirects T lymphocytes to display effective antileukemia reactivity. In: *Blood* 119 (2), S. 368–376.
130. Nicholson, E. Ghorashian S. Stauss H. (2012): Improving TCR Gene Therapy for Treatment of Haematological Malignancies. In: *Adv Hematol* 2012, S. 404081.

131. Nijman, H. W.; Houbiers, J. G.; Vierboom, M. P.; van der Burg, S. H.; Drijfhout, J. W.; D'Amato, J.; Kenemans, P.; Melief, C. J.; Kast, W. M. (1993): Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. In: *Eur. J. Immunol* 23 (6), S. 1215–1219.
132. Ochi, T.; Fujiwara, H.; Yasukawa, M. (2010): Application of adoptive T-cell therapy using tumor antigen-specific T-cell receptor gene transfer for the treatment of human leukemia. In: *J Biomed Biotechnol* 2010, S. 521248.
133. Ochi, T.; Fujiwara H.; Okamoto S.; An, J.; Nagai, K.; Shirakata, T.; Mineno, J.; Kuzushima, K.; Shiku, H.; Yasukawa, M. (2011): Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked antileukemia reactivity and safety. In: *Blood* 118 (6), S. 1495–1503.
134. Odom, L. F.; August, C. S.; Githens, J. H.; Humbert, J. R.; Morse, H.; Peakman, D.; Sharma, B.; Rusnak, S. L.; Johnson, F. B. (1978): Remission of relapsed leukaemia during a graft-versus-host reaction. A "graft-versus-leukaemia reaction" in man? In: *Lancet* 2 (8089), S. 537–540.
135. Parker, K. C.; Bednarek, M. A.; Coligan, J. E. (1994): Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. In: *J. Immunol* 152 (1), S. 163–175.
136. Passweg, J. R.; Baldomero, H.; Gratwohl, A.; Bregni, M.; Cesaro, S.; Dreger, P.; Witte, T. de; Farge-Bancel, D.; Gaspar, B.; Marsh, J.; Mohty, M.; Peters, C.; Tichelli, A.; Velardi, A.; Elvira, C. Ruiz de; Falkenburg, F.; Sureda, A.; Madrigal, A. (2012): The EBMT activity survey: 1990–2010. In: *Bone Marrow Transplant*.
137. Peccatori, J.; Ciceri, F. (2010): Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. In: *Haematologica* 95 (6), S. 857–859.
138. Peggs, K. S. (2009): Adoptive T cell immunotherapy for cytomegalovirus. In: *Expert Opin Biol Ther* 9 (6), S. 725–736.
139. Peggs, K. S.; Mackinnon, S. (2001): Cellular therapy: donor lymphocyte infusion. In: *Curr. Opin. Hematol.* 8 (6), S. 349–354.
140. Peters, C.; Schrauder, A.; Schrappe, M.; Stackelberg, A. von; Stary, J.; Yaniv, I.; Gadner, H.; Klingebiel, T. (2005): Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukaemia: the BFM/IBFM/EBMT concepts. In: *Bone Marrow Transplant* 35, S. S9.
141. Petersen, S. L. (2007): Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. In: *Dan Med Bull* 54 (2), S. 112–139.
142. Petersen, S. L. (2007): Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. In: *Dan Med Bull* 54 (2), S. 112–139.
143. Pirson, S. (2009): Generation of autologous and allorestricted cytotoxic T cell clones directed against Ewing Tumor antigens. Dissertation. Technische Universität München, München. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt.

144. Przepiorka, D.; Weisdorf, D.; Martin, P.; Klingemann, H. G.; Beatty, P.; Hows, J.; Thomas, E. D. (1995): 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. In: *Bone Marrow Transplant* 15 (6), S. 825–828.
145. Pui, C. H.; Campana, D.; Pei, D.; Bowman, W. P.; Sandlund, J. T.; Kaste, S. C.; Ribeiro, R. C.; Rubnitz, J. E.; Raimondi, S. C.; Onciu, M.; Coustan-Smith, E.; Kun, L. E.; Jeha, S.; Cheng, C.; Howard, S. C.; Simmons, V.; Bayles, A.; Metzger, M. L.; Boyett, J. M.; Leung, W.; Handgretinger, R. Downing J.; Evans, W. E.; Relling, M. V. (2009): Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. In: *N. Engl. J. Med* 360 (26), S. 2730–2741.
146. Pui, C. H.; Carroll, W. L.; Meshinchi, S.; Arceci, R. J. (2011): Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. In: *J Clin Oncol* 29 (5), S. 551–565.
147. Pui, C. H.; Relling, M. V.; Downing, J. R. (2004): Acute lymphoblastic leukemia. In: *N Engl J Med* 350 (15), S. 1535–1548.
148. Pui, C. H.; Robison, L. L.; Look, A. T. (2008): Acute lymphoblastic leukaemia. In: *Lancet* 371 (9617), S. 1030–1043.
149. Raimondi, S. C.; Zhou, Y.; Mathew, S.; Shurtleff, S. A.; Sandlund, J. T.; Rivera, G. K.; Behm, F. G.; Pui, C. H. (2003): Reassessment of the prognostic significance of hypodiploidy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. In: *Cancer* 98 (12), S. 2715–2722.
150. Rammensee, H.; Bachmann, J.; Emmerich, N. P.; Bachor, O. A.; Stevanovic, S. (1999): SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. In: *Immunogenetics* 50 (3-4), S. 213–219.
151. Ramos, C. A.; Dotti, G. (2011): Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. In: *Expert Opin Biol Ther* 11 (7), S. 855–873.
152. Ratanatharathorn, V.; Ayash, L.; Lazarus, H. M.; Fu, J.; Uberti, J. P. (2001): Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. In: *Bone Marrow Transplant* 28 (2), S. 121–129.
153. Reiche, D. (2009): Roche Lexikon Medizin. [62.000 Stichwörter, 2.200 Abbildungen und Tabellen, 40.000 englische Übersetzungen]. 5., neu bearb. und erw. Aufl., [Sonderausg. d. Ausg. 2003]. München [u.a.]: Urban und Fischer.
154. Rezvani, K.; Barrett, A. J. (2008): Characterizing and optimizing immune responses to leukaemia antigens after allogeneic stem cell transplantation. In: *Best Pract Res Clin Haematol* 21 (3), S. 437–453.
155. Richter, G. H. S.; Plehm, S.; Fasan, A.; Rossler, S.; Unland, R.; Bennani-Baiti, I. M.; Hotfilder, M.; Lowel, D.; Luettichau, I. von; Mossbrugger, I.; Quintanilla-Martinez, L.; Kovar, H.; Staeger, M. S.; Muller-Tidow, C.; Burdach, S. (2009): EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (13), S. 5324–5329.
156. Riddell, S. R.; Bleakley, M.; Nishida, T.; Berger, C.; Warren, E. H. (2006): Adoptive transfer of allogeneic antigen-specific T cells. In: *Biol. Blood Marrow Transplant.* 12 (1 Suppl 1), S. 9–12.

157. Ringdén, O. (2007): Immunotherapy by allogeneic stem cell transplantation. In: *Adv Cancer Res* 97, S. 25–60.
158. Ringdén, O.; Karlsson, H.; Olsson, R.; Omazic, B.; Uhlin, M. (2009): The allogeneic graft- versus -cancer effect. In: *British Journal of Haematology* 147 (5), S. 614–633.
159. Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.): Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe, Berlin 2012 2012.
160. Roddie, C.; Peggs, K. S. (2011): Donor lymphocyte infusion following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In: *Expert Opin Biol Ther* 11 (4), S. 473–487.
161. Romana, S. P.; Poirel, H.; Leconiat, M.; Flexor, M. A.; Mauchauffe, M.; Jonveaux, P.; Macintyre, E. A.; Berger, R.; Bernard, O. A. (1995): High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. In: *Blood* 86 (11), S. 4263–4269.
162. Rosenberg, S. A. (2012): Raising the bar: the curative potential of human cancer immunotherapy. In: *Sci Transl Med* 4 (127), S. 127ps8.
163. Rosenberg, S. A.; Restifo, N. P.; Yang, J. C.; Morgan, R. A.; Dudley, M. E. (2008): Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. In: *Nat. Rev. Cancer* 8 (4), S. 299–308.
164. Rosenberg, S. A.; Yang, J. C.; Sherry, R. M.; Kammula, U. S.; Hughes, M. S.; Phan, G. Q.; Citrin, D. E.; Restifo, N. P.; Robbins, P. F.; Wunderlich, J. R.; Morton, K. E.; Laurencot, C. M.; Steinberg, S. M.; White, D. E.; Dudley, M. E. (2011): Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. In: *Clin Cancer Res* 17 (13), S. 4550–4557.
165. Ross, J. A.; Spector, L. G.; Robison, L. L.; Olshan, A. F. (2005): Epidemiology of leukemia in children with Down syndrome. In: *Pediatr Blood Cancer* 44 (1), S. 8–12.
166. Sadelain, M. (2009): T-cell engineering for cancer immunotherapy. In: *Cancer J* 15 (6), S. 451–455.
167. Sallusto, F.; Lenig, D.; Förster, R.; Lipp, M.; Lanzavecchia, A. (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. In: *Nature* 401 (6754), S. 708–712.
168. Salter, R. D.; Howell, D. N.; Cresswell, P. (1985): Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. In: *Immunogenetics* 21 (3), S. 235–246.
169. Samaridis, J.; Colonna, M. (1997): Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. In: *Eur J Immunol* 27 (3), S. 660–665.
170. Sánchez-Velasco, P.; Karadsheh, N. S.; García-Martín, A.; Ruíz Alegría, C. de; Leyva-Cobián, F. (2001): Molecular analysis of HLA allelic frequencies and haplotypes in Jordanians and comparison with other related populations. In: *Hum. Immunol* 62 (9), S. 901–909.
171. Schetelig, J.; Kiani, A.; Schmitz, M.; Ehninger, G.; Bornhäuser, M. (2005): T cell-mediated graft-versus-leukemia reactions after allogeneic stem cell transplantation. In: *Cancer Immunol. Immunother.* 54 (11), S. 1043–1058.

172. Schmiedel, S.; Blettner, M.; Kaatsch, P.; Schüz, J. (2010): Spatial clustering and space–time clusters of leukemia among children in Germany, 1987–2007. In: *Eur J Epidemiol* 25 (9), S. 627–633.
173. Schrappe, M.; Creutzig, U. (2008): Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie.
174. Schrappe, M.; Reiter, A.; Zimmermann, M.; Harbott, J.; Ludwig, W. D.; Henze, G.; Gadner, H.; Odenwald, E.; Riehm, H. (2000): Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Münster. In: *Leukemia* 14 (12), S. 2205–2222.
175. Schultz, K. R.; Bowman, W. P.; Aledo, A.; Slayton, W. B.; Sather, H.; Devidas, M.; Wang, C.; Davies, S. M.; Gaynon, P. S.; Trigg, M.; Rutledge, R.; Burden, L.; Jorstad, D.; Carroll, A.; Heerema, N. A.; Winick, N.; Borowitz, M. J.; Hunger, S. P.; Carroll, W. L.; Camitta, B. (2009): Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. In: *J. Clin. Oncol* 27 (31), S. 5175–5181.
176. Schumacher, T. N. M.; Restifo, N. P. (2009): Adoptive T cell therapy of cancer. In: *Current Opinion in Immunology* 21 (2), S. 187–189.
177. Schuster, I. G.; Busch, D. H.; Eppinger, E.; Kremmer, E.; Milosevic, S.; Hennard, C.; Kuttler, C.; Ellwart, J. W.; Frankenberger, B.; Nössner, E.; Salat, C.; Bogner, C.; Borkhardt, A.; Kolb, H. J.; Krackhardt, A. M. (2007): Allorestricted T cells with specificity for the FMNL1-derived peptide PP2 have potent antitumor activity against hematologic and other malignancies. In: *Blood* 110 (8), S. 2931–2939.
178. Schütt, C.; Bröker, B. (2011): Grundwissen Immunologie. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verl.
179. Shafer-Weaver, K.; Anderson, M.; Malyguine, A.; Hurwitz, A. A. (2007): T cell tolerance to tumors and cancer immunotherapy. In: *Adv Exp Med Biol* 601, S. 357–368.
180. Shafer-Weaver, K.; Sayers, T.; Strobl, S.; Derby, E.; Ulderich, T.; Baseler, M.; Malyguine, A. (2003): The Granzyme B ELISPOT assay: an alternative to the 51Cr-release assay for monitoring cell-mediated cytotoxicity. In: *J Transl Med* 1 (1), S. 14.
181. Shalet, S. M.; Brennan, B. M. D. (2002): Growth and growth hormone status after a bone marrow transplant. In: *Horm. Res* 58 Suppl 1, S. 86–90.
182. Shurtleff, S. A.; Buijs, A.; Behm, F. G.; Rubnitz, J. E.; Raimondi, S. C.; Hancock, M. L.; Chan, G. C.; Pui, C. H.; Grosveld, G.; Downing, J. R. (1995): TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. In: *Leukemia* 9 (12), S. 1985–1989.
183. Sieling, P. A.; Wang, X. H.; Gately, M. K.; Oliveros, J. L.; McHugh, T.; Barnes, P. F.; Wolf, S. F.; Golkar, L.; Yamamura, M.; Yogi, Y. (1994): IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. In: *J. Immunol.* 153 (8), S. 3639–3647.
184. Sinigaglia, R.; Gigante, C.; Bisinella, G.; Varotto, S.; Zanesco, L.; Turra, S. (2008): Musculoskeletal manifestations in pediatric acute leukemia. In: *J Pediatr Orthop* 28 (1), S. 20–28.

-
185. Slavin, S.; Nagler, A.; Naparstek, E.; Kapelushnik, Y.; Aker, M.; Cividalli, G.; Varadi, G.; Kirschbaum, M.; Ackerstein, A.; Samuel, S.; Amar, A.; Brautbar, C.; Ben-Tal, O.; Eldor, A.; Or, R. (1998): Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. In: *Blood* 91 (3), S. 756–763.
186. Slavin, S.; Naparstek, E.; Nagler, A.; Ackerstein, A.; Kapelushnik, J.; Or, R. (1995): Allogeneic cell therapy for relapsed leukemia after bone marrow transplantation with donor peripheral blood lymphocytes. In: *Exp Hematol* 23 (14), S. 1553–1562.
187. Southam, C. M.; Brunschwig, A.; Levin, A. G.; Dizon, Q. S. (1966): Effect of leukocytes on transplantability of human cancer. In: *Cancer* 19 (11), S. 1743–1753.
188. Spix, C.; Eletr, D.; Blettner, M.; Kaatsch, P. (2008): Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004. In: *Int. J. Cancer* 122 (8), S. 1859–1867.
189. Staeger, M. S.; Hattenhorst, U. E.; Neumann, U. E.; Hutter, C.; Foja, S.; Burdach, S. (2003): DNA-microarrays as tools for the identification of tumor specific gene expression profiles: applications in tumor biology, diagnosis and therapy. In: *Klin Padiatr* 215 (3), S. 135–139.
190. Staszewski, R. (1990): Murphy's law of limiting dilution cloning. In: *Stat Med* 9 (4), S. 457–461.
191. Stuber, G.; Leder, G. H.; Storkus, W. T.; Lotze, M. T.; Modrow, S.; Székely, L.; Wolf, H.; Klein, E.; Kärre, K.; Klein, G. (1994): Identification of wild-type and mutant p53 peptides binding to HLA-A2 assessed by a peptide loading-deficient cell line assay and a novel major histocompatibility complex class I peptide binding assay. In: *Eur. J. Immunol* 24 (3), S. 765–768.
192. Sun, Y.; Tawara, I.; Toubai, T.; Reddy, P. (2007): Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. In: *Translational Research* 150 (4), S. 197–214.
193. Sutton, R.; Venn, N. C.; Tolisano, J.; Bahar, A. Y.; Giles, J. E.; Ashton, L. J.; Teague, L.; Rigutto, G.; Waters, K.; Marshall, G. M.; Haber, M.; Norris, M. D. (2009): Clinical significance of minimal residual disease at day 15 and at the end of therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia. In: *Br. J. Haematol* 146 (3), S. 292–299.
194. Thiel, U.; Pirson, S.; Müller-Spahn, C.; Conrad, H.; Busch, D. H.; Bernhard, H.; Burdach, S.; Richter, G. H. S. (2011): Specific recognition and inhibition of Ewing tumour growth by antigen-specific allo-restricted cytotoxic T cells. In: *Br. J. Cancer* 104 (6), S. 948–956.
195. Thomas, E. D.; Lochte, H. L., JR; Lu W. C.; Ferrebee, J. W. (1957): Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. In: *N Engl J Med* 257 (11), S. 491–496.
196. Tomeczkowski, J.; Yakisan, E.; Wieland, B.; Reiter, A.; Welte, K.; Sykora, K. W. (1995): Absence of G-CSF receptors and absent response to G-CSF in childhood Burkitt's lymphoma and B-ALL cells. In: *Br. J. Haematol* 89 (4), S. 771–779.
197. Treviño, L. R.; Yang, W.; French, D.; Hunger, S. P.; Carroll, W. L.; Devidas, M.; Willman, C.; Neale, G.; Downing, J.; Raimondi, S. C.; Pui, C. H.; Evans, W. E.; Relling,

- M. V. (2009): Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. In: *Nat Genet* 41 (9), S. 1001–1005.
198. Tuyaeerts, S.; Aerts, J. L.; Corthals, J.; Neyns, B.; Heirman, C.; Breckpot, K.; Thielemans, K.; Bonehill, A. (2007): Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy. In: *Cancer Immunol Immunother* 56 (10), S. 1513–1537.
199. Uckert, W.; Becker, C.; Gladow, M.; Klein, D.; Kammertoens, T.; Pedersen, L.; Blankenstein, T. (2000): Efficient Gene Transfer into Primary Human CD8 + T Lymphocytes by MuLV-10A1 Retrovirus Pseudotype. In: *Human Gene Therapy* 11 (7), S. 1005–1014.
200. Vijayakrishnan, J.; Houlston, R. S. (2010): Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. In: *Haematologica* 95 (8), S. 1405–1414.
201. Wagner, J. E.; Thompson, J. S.; Carter, S. L.; Kernan, N. A. (2005): Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. In: *Lancet* 366 (9487), S. 733–741.
202. Wahn, U. (2005): Pädiatrische Allergologie und Immunologie. 4. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
203. Wang, X.; Berger, C.; Wong, C. L. W.; Forman, S. J.; Riddell, S. R.; Jensen, M. C. (2011): Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice. In: *Blood* 117 (6), S. 1888–1898.
204. Warren, E. H.; Fujii, N.; Akatsuka, Y.; Chaney, C. N.; Mito, J. K.; Loeb, K. R.; Gooley, T. A.; Brown, M. L.; Koo, K. K. W.; Rosinski, K. V.; Ogawa, S.; Matsubara, A.; Appelbaum, F.R; Riddell, S. R. (2010): Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. In: *Blood* 115 (19), S. 3869–3878.
205. Wawer, A.; Laws, H-J; Dilloo, D.; Gobel, U.; Burdach, S. (2004): Long-time survival after unrelated bone marrow transplantation in children and adolescents and targeted therapy with CD25 blockade to prevent GVHD. In: *Klin Padiatr* 216 (3), S. 169–175.
206. Weid, N. von der (2001): Late effects in long-term survivors of ALL in childhood: experiences from the SPOG late effects study. In: *Swiss Med Wkly* 131 (13-14), S. 180–187.
207. Weiden, P. L.; Flournoy, N.; Thomas, E. D.; Prentice, R.; Fefer, A.; Buckner, C. D.; Storb, R. (1979): Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. In: *N. Engl. J. Med.* 300 (19), S. 1068–1073.
208. Welsh, R. M.; Fujinami, R. S. (2007): Pathogenic epitopes, heterologous immunity and vaccine design. In: *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (7), S. 555–563.
209. Wernicke, C. M.; Richter, G. H.; Beinvogl, B. C.; Plehm, S.; Am Schlitte; Bandapalli, O. R.; Prazeres da Costa, O.; Hattenhorst, U. E.; Volkmer, I.; Staeger, M. S.; Esposito, I.; Burdach, S.; Grunewald, T. G. (2012): MondoA is highly overexpressed in acute lymphoblastic leukemia cells and modulates their metabolism, differentiation and survival. In: *Leuk Res.*

-
210. Wiemels, J. (2012): Perspectives on the causes of childhood leukemia. In: *Chem Biol Interact*.
211. Xue, S. A.; Gao, L.; Hart, D.; Gillmore, R.; Qasim, W.; Thrasher, A.; Apperley, J.; Engels, B.; Uckert, W.; Morris, E.; Stauss, H. (2005): Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT1-TCR gene-transduced human T cells. In: *Blood* 106 (9), S. 3062–3067.
212. Xue, S. A.; Gao, L.; Thomas, S.; Hart, D. P.; Xue, J. Z.; Gillmore, R.; Voss, R. H.; Morris, E.; Stauss, H. J. (2010): Development of a Wilms' tumor antigen-specific T-cell receptor for clinical trials: engineered patient's T cells can eliminate autologous leukemia blasts in NOD/SCID mice. In: *Haematologica* 95 (1), S. 126–134.
213. Yeoh, E. J.; Ross, M. E.; Shurtleff, S. A.; Williams, W. K.; Patel, D.; Mahfouz, R.; Behm, F. G.; Raimondi, S. C.; Relling, M. V.; Patel, A.; Cheng, C.; Campana, D.; Wilkins, D.; Zhou, X.; Li, J.; Liu, H.; Pui, C. H.; Evans, W. E.; Naeve, C.; Wong, L.; Downing, J. R. (2002): Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. In: *Cancer Cell* 1 (2), S. 133–143.
214. Yewdell, J. W.; Bennink, J. R. (1999): Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. In: *Annu Rev Immunol* 17, S. 51–88.
215. Yu, K.; Petrovsky, N.; Schonbach, C.; Koh, Judi J. Y. L.; Brusica, V. (2002): Methods for prediction of peptide binding to MHC molecules: a comparative study. In: *Mol Med* 8 (3), S. 137–148.
216. Zelent, A.; Greaves, M.; Enver, T. (2004): Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. In: *Oncogene* 23 (24), S. 4275–4283.
217. Zeng, R.; Spolski, R.; Finkelstein, S. E.; Oh, S. K.; Kovanen, P. E.; Hinrichs, C. S.; Pise-Masison, C. A.; Radonovich, M. F.; Brady, J. N.; Restifo, N. P.; Berzofsky, J. A.; Leonard, W. J. (2005): Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8⁺ T cell expansion and function. In: *J Exp Med* 201 (1), S. 139–148.
218. Zola, H. (2005): CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. In: *Blood* 106 (9), S. 3123–3126.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Verteilung der häufigsten Krebsdiagnosen bei Kindern.....	2
Abbildung 1-2 Genetische Abnormalitäten bei ALL im Kindesalter (nach: Pui et al., 2011).....	6
Abbildung 3-1 Durchflusszytometrische Kontrolle der CD14 ⁺ Zellfraktion.....	34
Abbildung 3-2 CD3 ⁺ und CD8 ⁺ Zellfraktionen vor und nach CD8 ⁺ Selektion.....	36
Abbildung 3-3 Reife Dendritische Zellen.....	38
Abbildung 3-4 Durchflusszytometrische Kontrolle des Reifezustands von DC.....	39
Abbildung 3-5 Pro5 MHC I Pentamer.....	44
Abbildung 3-6 ELISpot Assay.....	46
Abbildung 4-1 Bindungsaffinität des Influenzapeptids an HLA-A*0201.....	52
Abbildung 4-2 Relative Affinität von STK32B Peptiden in prozentuaem Anteil zur RA des Influenza-Peptids.....	53
Abbildung 4-3 Relative Affinität von LILRA2-Peptiden in prozentuaem Anteil zur RA des Influenza- Peptids.....	54
Abbildung 4-4 Sortierung der STK32B-186 Pentamer-PE / CD8-FITC doppeltpositiven spezifischen T-Zellen.....	56
Abbildung 4-5 IFN γ Screening alloreaktiver STK32B-186-spezifischer CTL.....	57
Abbildung 4-6 Peptidspezifität von STK32B-186-1A1 im Screening-IFN γ -ELISpot.....	58
Abbildung 4-7 Peptidspezifität von STK32B-186-1A1 im IFN γ -ELISpot mit Tumorzelllinien.....	58
Abbildung 4-8 Peptidspezifische Zytotoxizität von STK32B-186-1A1 im Granzym B-Assay.....	59
Abbildung 4-9 Peptidspezifität von STK32B-186-2A10 im initialen Screening sowie im wiederholten IFN γ -ELISpot.....	60
Abbildung 4-10 Peptidspezifische Zytotoxizität von STK32B-186-2A10 im Granzym B-ELISpot.....	60
Abbildung 4-11 Peptidspezifität von STK32B-186-3G2 im initialen Screening-IFN γ -ELISpot-Assay...	61
Abbildung 4-12 Peptidspezifische Zytotoxizität von STK32B-186-3G2 im Granzym B-ELISpot.....	62
Abbildung 4-13 Peptidspezifität von STK32B-186-2D4 im initialen Screening IFN γ -ELISpot-Assay...	63
Abbildung 4-14 Peptidspezifische und HLA-A*0201 spezifische Zytotoxizität von STK32B-186-2D4 im Granzym B-ELISpot.....	64
Abbildung 4-15 Peptidspezifität von STK32B-186-2E7 im initialen Screening-IFN γ -ELISpot-Assay...	65
Abbildung 4-16 Peptidspezifische und HLA-A*0201 spezifische Zytotoxizität von STK32B-186-2E7 im Granzym B-ELISpot.....	66
Abbildung 4-17 Sorting der LILRA2-30 Pentamer-PE / CD8-FITC doppeltpositiven, antigenspezifischen T-Zellen.....	67
Abbildung 4-18 IFN γ Screening-ELISpot alloreaktiver LILRA2-30 spezifischer CTL.....	68
Abbildung 4-19 Peptidspezifität von LILRA2-30-1G4 im initialen sowie wiederholten IFN γ -ELISpot...	69
Abbildung 4-20 Peptidspezifität und HLA-A*0201 Spezifität von LILRA2-30-1G4 im IFN γ -ELISpot mit Tumorzelllinien und Cos-7.....	70
Abbildung 4-21 Alloreaktive Zytotoxizität von LILRA2-30-1G4 im Granzym B-ELISpot.....	71

Abbildung 4-22 Peptidspezifität von LILRA2-30-1H3 im initialen Screening sowie im wiederholten IFN γ -ELISpot	72
Abbildung 4-23 Peptidspezifität und HLA-A*0201 Spezifität von LILRA2-30-1H3 im IFN γ -ELISpot mit Tumorzelllinien und Cos-7	72
Abbildung 4-24 HLA-A*0201 Alloreaktive Zytotoxizität von LILRA2-30-1H3 im Titrations-Granzym B-ELISpot.....	73
Abbildung 4-25 Peptidspezifische und HLA-A*0201 spezifische Zytotoxizität von LILRA2-30-1H3 im Granzym B-ELISpot.....	74
Abbildung 4-26 Peptidspezifität von LILRA2-30-5H4 im initialen Screening-IFN γ -ELISpot-Assay.....	74
Abbildung 4-27 Peptidspezifische und HLA-A*0201 spezifische Zytotoxizität von LILRA2-30-5H4 im Titrations-Granzym B-ELISpot.....	75
Abbildung 4-28 durchflusszytometrische Analyse der exprimierten Oberflächenantigene von STK32B-186-2D4	77
Abbildung 5-1 Relative Expression von STK32B	80
Abbildung 5-2 Relative Expression von LILRA2.....	81
Abbildung 5-3 Aufbau des TCR.....	90
Abbildung 5-4 Schematische Darstellung der CTL-Differenzierungssubgruppen und ihres Reaktionsverhaltens	92

9 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1-1 Oberflächenmarker und Zytogenetik der ALL-Subtypen.....</i>	<i>5</i>
<i>Tabelle 1-2 Prognosefaktoren der ALL</i>	<i>10</i>
<i>Tabelle 3-1 Versuchsaufbau HLA-A*0201 Peptidbindungstest</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 3-2: Zytokinkombination zur Reifungsinduktion Dendritischer Zellen</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 3-3 getestete T-Zell-Oberflächenantigene zur Charakterisierung des Immunphänotyps</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 3-4 Färbeschema Pentamer-Sortierung.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 3-5 Titrationsschema Effektorzellen : Zielzellen im Granzym B-ELISpot.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 3-6 Vβ Familien und entsprechende Fluoreszenzfarbstoffe im IOTest® BetaMark Kit</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 3-7 Reagenzienkombinationen für TCR Vβ Analyse.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 4-1 Relative Affinitäten der STK32B-Peptide im HLA-A*0201 Bindungsassay.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 4-2 Relative Affinitäten der LILRA2-Peptide im HLA-A*0201-Bindungsassay.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 4-3 Expressionsprofil der Oberflächenantigene der T-Zell-Klone</i>	<i>78</i>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Stefan Burdach, Chefarzt und Direktor der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendheilkunde München Schwabing der Technischen Universität München für das große Engagement für das Forschungszentrum für krebskranke Kinder, sowie für die Durchsicht, Korrektur und Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Günther Richter für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie für die Begleitung und die Korrektur meiner Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch für die Anregungen und die fachliche Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der AG Richter des Forschungszentrums für krebskranke Kinder für die gute Zusammenarbeit, die Einarbeitung in die experimentelle Arbeit, die gegenseitige Hilfestellung und fortwährende Unterstützung. Herzlich bedanken möchte ich mich vor allem bei Stefan Pirson für die essentiellen methodischen Vorarbeiten und die Einarbeitung in das Thema sowie bei Uwe Thiel, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinen Freunden für den Rückhalt, die hilfreichen Motivationsschübe, die notwendige Ablenkung und die solidarischen Stunden am Schreibtisch.

Meiner Familie und besonders meinen Eltern für ihr entgegengebrachtes Vertrauen, die uneingeschränkte Unterstützung meines Werdegangs und das rege Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Andreas Kirschner für die fachliche und emotionale Begleitung dieser Arbeit, für die vielen Diskussionen, Anregungen und die produktive Durchsicht der Arbeit. Herzlichen Dank für den Rückhalt, die Unterstützung und den Zuspruch.