Tumorassoziierte T-Lymphozyten: Phänotypische und funktionelle Eigenheiten in Gesunden und in Tumorpatienten

der Fakultät für Biologie

der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

vorgelegt

von

Sebastian Attig

aus Darmstadt

Dissertation

2009

Tag der mündlichen Prüfung:	29.01.2009
Dekan:	Prof. Dr. H. Mallot
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.-G. Rammensee
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. S. Stevanović

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menschengeist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von Neuem angefacht werden: die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

Max Planck (1858-1947)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis VII

Tabellenverzeichnis IX

Zusammenfassung 1

Englische Zusammenfassung 3

1 Einleitung 5

1.1 Das Immunsystem 5

1.1.1 MHC-Moleküle 7

1.2 Die T-Zellantwort 12

1.2.1 Der αβ T-Zellrezeptor 12

1.2.2 Die Entwicklung von αβ T-Zellen 16

1.2.3 T-Zellen in der Peripherie 17

1.3 Subtypen von T-Lymphozyten 20

1.4 Antigenspezifischer Nachweis von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen 24

1.5 Tumorerkrankungen und das Immunsystem 24

1.5.1 Tumore und Antigene 24

1.5.2 Tumorerkennung durch das Immunsystem 26

1.5.3 Tumorescape 26

1.6 Möglichkeiten der Immuntherapie 31

1.6.1 Antigenunabhängige Immuntherapien 31

1.6.2 Antigenabhängige Immuntherapien 32

2 Zielsetzung 35

3 Theoretischer Hintergrund der Methoden 37

3.1 Isolierung von PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation 37

3.2 Isolation von Lymphozyten aus Tumorgewebe 37

3.3 Rückfaltung von MHC Klasse I-Monomeren 38

3.4 Multimerisierung von MHC-I-Monomeren mittels Streptavidin 38

3.5 Färbung mit MHC-I-Tetrameren 39

3.6 Durchflusszytometrie 40

3.7 ELISPOT 41

4 Material und Methoden 43

4.1 Ethikanträge für die Arbeit mit Patientenproben 43

4.2 Allgemein verwendete Materialien 43

4.3 Isolation von PBMCs aus peripherem Blut 44

4.4 Isolation von Lymphozyten aus Tumorgewebe 45

4.4.1 Mechanische Isolation von Lymphozyten aus Tumorgewebe 45

4.4.2 Enzymatische Isolation von Lymphozyten aus Tumorgewebe 46

4.5 Einfrieren und Auftauen von Lymphozyten 47

4.6 Bestimmung der Lebendzelldichte 48

4.7 Rückfaltung von MHC Klasse I-Monomeren 48

4.8 Multimerisierung von MHC Klasse I-Monomeren mittels Streptavidin 50

4.9 Kryokonservierung von HLA Klasse I-Tetrameren 51

4.10 Tetramerfärbung 52

4.11 Phänotypisierung von Lymphozyten 53

4.11.1 Grundprotokoll zu Phänotypisierung von Lymphozyten 53

4.11.2 Färbung von KLRG1 auf Lymphozyten 54

4.11.3 Färbung regulatorischer T-Zellen 55

4.12 Intrazelluläre Zytokinfärbung 57

4.13 Inkubation von Lymphozyten mit LacNAc 59

4.14 TCR-Downregulation als funktioneller Test von T-Zellen 60

4.15 Proliferationstest mit CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester) 60

4.15.1 Färben von Zellen mit CFSE 60

4.15.2 Proliferationsassay mit CFSE gefärbten Zellen 61

4.16 Durchflusszytometrie 62

4.17 ELISPOT 63

4.17.1 Prästimulation von PBMCs 63

4.17.2 Vorbereitung der ELISPOT-Platte 64

4.17.3 Beladung der ELISPOT-Platte 65

4.17.4 Entwickeln der ELISPOT-Platte 66

4.18 Statistische Analyse der Messdaten 67

4.19 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebe 67

4.20 ^{3}H-Thymidin Proliferations-Assay 68

Ergebnisse 71

5 Zytokeratin 18 71

5.1 Das Zytokeratin 18-Protein 71

5.2 Zytokeratin 18 in bestimmten Erkrankungen 73

5.3 Dysfunktionelle Zytokeratin18-spezifische T-Zellen in gesunden und Kranken Individuen 74

5.4 Funktion und Manipulation Ker1-spezifischer CD8^{+} T-Zellen von gesunden Individuen 74

5.5 Ergebnisse und Diskussion 75

5.5.1 Übersicht der gesunden Spender mit Ker1-spezifischen CD8^{+} T-Zellen 75

5.5.2 Funktionelle Eigenschaften von Ker1-spezifischen CD8^{+} T-Zellen in gesunden Individuen 76

5.5.3 Manipulation von Ker1-spezifischen CD8^{+} T-Zellen gesunder Individuen mit modifizierten Peptidsequenzen 79

5.6 Zusammenfassung Zytokeratin 18 85

6 Tumorantigen-spezifische T-Zellen in Krebspatienten 87

6.1 Tumor-assoziierte Antigene (TAA) 87

6.2 TAA-spezifische T-Lymphozyten in peripherem Blut von Patienten mit Nierenzell- oder Colorektalkarzinom 88

6.3 Ergebnisse und Diskussion 90

6.3.1 Untersuchte Patienten und verwendete Peptide 90

6.3.2 Ergebnisse der RCC-Patienten 93

6.3.3 Ergebnisse der CRC-Patienten 97

6.4 Zusammenfassung Tumor-assoziierter Antigene 100

7 Tumorinfiltrierende Lymphozyten in Patienten mit RCC 103

7.1 Das Nierenzellkarzinom (RCC) 103

7.2 RCC und Immunantwort 107

7.3 Tumorinfiltrierende Lymphozyten in RCC-Patienten 107

7.4 Ergebnisse und Diskussion 108

7.4.1 Vergleich verschiedener Isolationsmethoden Tumor-infiltrierender Lymphozyten 108

7.4.2 Phänotypischer Vergleich von PBMCs und TILs der RCC-Patienten 110

7.4.3 Immunfluoreszenzfärbung von normalem und malignem Nierengewebe 126

7.4.4 Funktioneller Vergleich von PBMCs und TILs der RCC-Patienten 130

7.4.5 Untersuchung des Einflusses von LacNAc auf die Zytokinexpression von RCC TILs 139

7.5 Zusammenfassung Tumor-infiltrierender Lymphozyten 143

Abkürzungsverzeichnis a

Quellenverzeichnis A

Kooperationspartner i

Danksagungen iii

Eigene Publikationen v

I Publikationen v

II Posterpräsentationen v

Curriculum Vitae vii

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Raumstruktur von MHC-I 8

Abbildung 2 Raumstruktur von MHC-II 10

Abbildung 3 Raumstruktur des $\alpha\beta$-TCR 12

Abbildung 4 Schematische Darstellung des T-Zellrezeptorkomplexes 15

Abbildung 5 Das CD4- und CD8-Molekül in verschiedenen Darstellungen 16

Abbildung 6 Entstehung von Memory T-Zellen 20

Abbildung 7 Funktions- und Proliferationspotential in der T-Zell Differenzierung 21

Abbildung 8 Schema zur Einteilung von $CD8^+$ T-Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker 23

Abbildung 9 Hypothese des Immunoeditings 30

Abbildung 10 Herstellung von MHC-I-Tetrameren 39

Abbildung 11 Schematische Darstellung des Prinzips eines ELISPOT 42

Abbildung 12 Intermediale Keratin-Filamente 71

Abbildung 13 Darstellung des Zytoskeletts 72

Abbildung 14 ^{3}H-Thymidin-Aufnahme von Effektoren 78

Abbildung 15 Intrazelluläre IFNγ-Färbung von Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen 81

Abbildung 16 Proliferation von Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen 82

Abbildung 17 Ergebnisse der RCC-Patienten nach TAA Stimulation 95

Abbildung 18 Ergebnisse der CRC Patienten nach TAA Stimulation 99

Abbildung 19 RCC makroskopisch 103

Abbildung 20 Mechanische und enzymatische Isolation Tumor-infiltrierender Lymphozyten 109

Abbildung 21 Einfluss der Isolationstechnik auf die Färbung mit Antikörpern 110

Abbildung 22 Subpopulationen in $CD4^+$ T-Zellen 114

Abbildung 23 CD28 und CD57 Expression in $CD4^+$ T-Zellen 114

Abbildung 24 Subpopulationen in $CD8^+$ T-Zellen 115

Abbildung 25 CD28 und CD57 Expression in $CD8^+$ T-Zellen 115

Abbildung 26 FACS-Färbung der Expression von CD28 und CD57 116

Abbildung 27 Chemokinrezeptorexpression in $CD4^+$ T-Zellen 117

Abbildung 28 Anteil an $CCR4^-$ $CXCR3^+$ T-Lymphozyten in $CD4^+$ T-Zellen 117

Abbildung 29 Chemokinrezeptorexpression in $CD8^+$ T-Zellen 118

Abbildung 30 FACS-Färbung von Tregs 120

Abbildung 31 Marker regulatorischer $CD4^+$ T-Zellen 121

Abbildung 32 NK-Zell assoziierte Marker in $CD4^+$ T-Zellen 121

Abbildung 33 NK-Zell assoziierte Marker in $CD8^+$ T-Zellen 122

Abbildung 34 KLRG1-Expression in T-Zellen und NK-Zellen 123

Abbildung 35 KLRG1-Expression und Anteil an Effektorzellen in $CD8^+$ Lymphozyten 124

Abbildung 36 FACS-Färbung der KLRG1 und CD103 Expression in PBMC und TILs 125

Abbildung 37 CD103-Expression in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen 126

Abbildung 38 Immunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin 129

Abbildung 39 FACS-Färbung von Zytokinen 133

Abbildung 40 Zytokinproduktion in $CD8^+$ T-Zellen 134

Abbildung 41 Zytokinproduktion in $CD4^+$ T-Zellen 136

Abbildung 42 FACS-Färbung von T_H17-Zellen 137

Abbildung 43 Multizytokin Antworten in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen 139

Abbildung 44 IFNγ-Produktion in $CD8^+$ TILs mit und ohne LacNAc Behandlung 141

Abbildung 45 Zytokinproduktion nach Behandlung mit LacNAC 142

Abbildung 46 IFNγ-Produktion in $CD4^+$ TILs mit und ohne LacNAc Behandlung 142

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Polymorphismus der humanen MHC-Gene 7

Tabelle 2 Anzahl der Gensegmente des humanen $\alpha\beta$ TCRs 13

Tabelle 3 Oberflächenmoleküle zur Charakterisierung von T-Zellen 22

Tabelle 4 Klassen der Tumorassoziierten-Antigene (TAA) mit Beispielen 25

Tabelle 5 Verwendetes Streptavidin gekoppelt mit verschiedenen Fluorochromen 51

Tabelle 6 Verwendete Antikörper zur phänotypischen Charakterisierung 53

Tabelle 7 Antikörper zur Färbung NK-Zell assoziierter Oberflächenmarker 54

Tabelle 8 Antikörper zur Färbung regulatorischer T-Zellen 55

Tabelle 9 Antikörper zur funktionellen Charakterisierung 57

Tabelle 10 Übersicht untersuchter gesunder Spender mit Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen 76

Tabelle 11 Modifizierte Peptidsequenzen von Ker1 80

Tabelle 12 Ergebnisse der Stimulation mit modifizierten Ker1-Peptiden 83

Tabelle 13 Antikörperkombinationen zur Untersuchung von TAA-spezifischen T-Zellen 88

Tabelle 14 Tumor-assoziierte Antigene für RCC 89

Tabelle 15 Tumor-assoziierte Antigen für CRC 90

Tabelle 16 HLA-Klasse I-Peptide für die Stimulation von RCC-Patienten 91

Tabelle 17 HLA-Klasse II-Peptide für die Stimulation von RCC-Patienten 92

Tabelle 18 HLA-Klasse I-Peptide für die Stimulation von CRC-Patienten 92

Tabelle 19 HLA-Klasse II-Peptide für die Stimulation von CRC-Patienten 93

Tabelle 20 Ergebnisse der RCC-Patienten nach Stimulation mit HLA Klasse I-Peptiden 94

Tabelle 21 Ergebnisse der RCC-Patienten nach Stimulation mit HLA Klasse II-Peptiden 96

Tabelle 22 Ergebnisse der CRC-Patienten nach Stimulation mit HLA Klasse I-Peptiden 97

Tabelle 23 Ergebnisse der CRC-Patienten nach Stimulation mit HLA Klasse II-Peptiden 100

Tabelle 24 Einteilung des RCCs nach histologischen Kriterien 104

Tabelle 25 Klassifikation und Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms 105

Tabelle 26 Vergleich der Zellpopulationen nach enzymatischer und mechanischer Isolation 109

Tabelle 27 Liste der phänotypisch untersuchten RCC-Patienten (n = 30) 111

Tabelle 28 Antikörperkombinationen zur phänotypischen Analyse 112

Tabelle 29 Liste der RCC-Patienten für Gewebefärbungen 127

Tabelle 30 E-Cadherin Expression in normalem und malignem Nierengewebe 130

Tabelle 31 Antikörperkombination zur funktionellen Analyse 131

Tabelle 32 Liste der funktionell untersuchten RCC-Patienten 131

Tabelle 33 Liste der funktionell untersuchten RCC-Patienten nach LacNAc Behandlung 140

Tabelle 34 Ergebnisse der Analyse von $CD4^+$ TILs in RCC-Patienten 143

Tabelle 35 Ergebnisse der Analyse von $CD8^+$ TILs in RCC-Patienten 144

Zusammenfassung

T-Zell basierte Ansätze der Immuntherapie von Krebspatienten setzten neben der Identifikation geeigneter Tumor-assoziierter Antigene ein fundiertes Wissen über die zellulären Vorgänge des Immunsystems im Bereich des Tumors voraus. Zur Entwicklung innovativer Therapieansätze ist die phänotypische und funktionelle Charakterisierung Tumorantigen-spezifischer T-Zellen von zentraler Bedeutung.

Die Untersuchung von Zytokeratin 18-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in gesunden Individuen zeigte, dass diese seneszenten und hochdifferenzierten Lymphozyten keine detektierbare regulatorische Funktion auf andere Zellen des peripheren Blutes ausüben. Lymphozyten, welche spezifisch Ker1-Tetramere binden zeigten keine Aktivierung nach der Stimulation mit dem synthetisch hergestellten Ker1-Peptid. Es konnte jedoch erstmals die Induktion einer schwachen Proliferation dieser Zellen durch Stimulation mit einer leicht modifizierten Peptidsequenz in einem gesunden Spender gezeigt werden.

In Patienten mit Colorektalem- (CRC) und Nierenzellkarzinom (RCC) war es möglich funktionelle $CD4^+$ T-Zellen gegen HLA Klasse II-restringierte Peptide Tumor-assoziierter Antigene zu identifizieren. Hierbei konnten in RCC-Patienten zwei beschriebene Klasse II-Liganden von cMet und Zytokeratin 18 als T-Zellepitope identifiziert werden. Interessanterweise zeigten zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen in den untersuchten Krebspatienten keine Zytokinproduktion nach Stimulation mit verschiedenen Tumor-assoziierten HLA Klasse I-Peptiden.

Der Vergleich periphärer und Tumor-infiltrierender T-Lymphozyten von RCC-Patienten zeigte in Letzteren einen erhöhten Anteil von Effektorzellen, welche sowohl zytotoxische, aber auch inhibitorische Oberfächenmarker aufwiesen. Die Tumor-infiltrierenden T-Zellen zeigten zudem eine reduzierte Expression früher Aktivierungsmarker im Vergleich zu denen der Peripherie, welche sich im Falle der $CD8^+$ Lymphozyten nach Antigen-unabhängiger Stimulation in einer verminderten Produktion von TNFα, IFNγ und IL-2 widerspiegelte. Weiter konnte ein erhöhter Anteil multifunktioneller T-Zellen in der Gruppe der Tumor-infiltrierenden $CD4^+$ Lymphozyten im Vergleich zu T-Zellen aus der Peripherie beobachtet werden. Neben den Effektorzellen wurden in RCCs vermehrt tumor-infiltrierenden T-Zellen mit Markern regulatorischer Lymphozyten detektiert. Hierbei handelte es sich sowohl um regulatorische $CD4^+$ Zellen, als auch um IL-10 produzierende $CD8^+$ T-Lymphozyten.

Sollte es in der Zukunft gelingen die Inhibition von Effektorzellen aufzuheben und regulatorische T-Zellen zu kontrollieren, könnte eine effektive Bekämpfung von Tumoren durch das eigene Immunsystem des Patienten möglich werden.

Englische Zusammenfassung

T cell based approaches for the Immunotherapy of cancer patients require not only a profound knowledge of the immune system's cellular processes in areas of tumor growth, but also identification of adequate tumor associated antigens. It is essential to characterize tumor-specific T cells both phenotypically as well as functionally for the development of new and innovative therapeutical strategies.

Investigating Cytokeratin 18-specific $CD8^+$ T cells of healthy donors revealed that these senescent and highly differentiated lymphocytes have no detectable regulatory effects on peripheral blood cells. T lymphocytes specifically bound to Ker1-tetramers do not show activation after stimulation with synthetic Ker1-peptide. However, the cells of one healthy individual exhibited moderate proliferation as result of stimulation with a modified peptide sequence.

Functional $CD4^+$ T cells specific for HLA class II-restricted tumor-associated antigens could be identified in patients with colorectal (CRC) and renal cell carcinoma (RCC). It was possible to verify two published HLA class II ligands of cMet and Cytokeratin 18 as T cell epitopes. Interestingly, no cytokine production of cytotoxic $CD8^+$ T lymphocytes could be detected upon stimulation with tumor-associated HLA class I peptides.

Comparison of peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) of RCC patients showed that the latter exhibit a higher amount of T cells expressing markers associated with cytotoxic effector functions. However, a reduction of early activation markers upon unspecific stimulations such as a decreased production of TNFα, IFNγ and IL-2 could be observed in $CD8^+$ TILs in comparison to peripheral T cells. By comparing peripheral and tumor-infiltrating lymphcytes, an increased number of multifunctional $CD4^+$ T cells could be detected in the last group. The increase of effector cells in TILs was accompanied by a higher number of regulatory T cells. Thus, an increase of regulatory $CD4^+$ T lymphocytes and IL-10 producing $CD8^+$ cells were observed in TILs compared to peripheral cells.

By undermining the inhibition of effector cells and effectively controlling regulatory T cells, it may be possible to induce immune responses against tumors in cancer patients in the future.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Ein Organismus ist ein nicht völlig von der Umwelt abgeschlossenes System und steht daher im stofflichen Austausch mit seiner Umgebung. Eine Folge dieser Interaktion ist auch der Kontakt mit schädlichen Stoffen und Krankheitserregen. Um sich vor solchen negativen äußeren Einflüssen zu schützen, haben alle bekannten Lebewesen im Laufe der Evolution verschiedenste Mechanismen und Methoden entwickelt. Im Falle des Menschen kommt dem Immunsystem (lat. immunitas: Befreiung von militärischen oder öffentlichen Pflichten) diese Aufgabe zu. Die wirksamen Mechanismen lassen sich wiederum in die Bereiche des angeborenen und adaptiven (=erworbenen) Immunsystems unterteilen. Der vorhandene Schutz gegen Krankheiten und andere schädliche Einflüsse wird in diesem Zusammenhang als Immunität bezeichnet.

Der stammesgeschichtlich ältere Teil des Immunsystems zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass die Abwehrmechanismen, die hier von Bedeutung sind, nicht erst speziell vom Organismus erlernt werden müssen. Die Mechanismen des angeborenen Immunsystems sind meist gegen ganze Gruppen von Antigenen gerichtet, wirken also eher Muster-spezifisch, und es kommt zu keiner Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses.

Das angeborene Immunsystem beinhaltet im engeren Sinne Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen), phagozytische Zellen sowie Interferon α und β, des Lektin und den alternativen Signalweg des Komplementsystems. Aufgrund der eher eingeschränkten Diversität ihrer Antigenrezeptoren kann man bestimmte Unterklassen von Zellen, wie B-1 B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen des adaptiven Immunsystems eher dem angeborenen zurechnen. Im weitesten Sinne können physikalische und chemische Barrieren wie die Haut, Schleimhäute, Flimmerepithelien und die Magensäure auch dem angeborenen Immunsystem zugeschrieben werden.

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität ist das adaptive Immunsystem in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Weiter ist es diesem Teil des Immunsystems möglich, sich an verschiedene Antigene anzupassen. Diese Anpassung kann durch spezifische Rezeptoren, die Reifung der Zelle und der Rekombination von antigenerkennenden Oberflächenmolekülen, wie z.B. des T-Zell Rezeptors (TCR) geschehen. Dies ermöglicht dem Organismus im Falle eines wiederholten Kontaktes mit demselben Antigen eine schnellere Reaktion und so einen verbesserten Schutz. Die erworbene Immunität richtet sich spezifisch gegen ein Antigen, welches bei erneutem Kontakt wieder erkannt wird und so eine gerichtete Immunantwort auslöst. Das adaptive Immunsystem lässt sich weiter in die Teile der humoralen und der zellulären Immunantwort untergliedern. Letztere ist nicht über das Serum übertragbar, wohingegen die humorale über Serum weitergegeben werden kann.

Die Vielfalt der adaptiven Immunantwort und ihrer selektiven Wirkung gehen auf das Prinzip der klonalen Selektion zurück.

Bei den Zellen der humoralen Immunantwort, bei der diese Art der Selektion zum Tragen kommt, handelt es sich nur um die B-Lymphozyten, die in der Lage sind Antikörper zu sezernieren. Antikörper wiederum schützen vor extrazellulären Pathogenen und Toxinen und können das klassische Komplementsystem und dessen Signalwege aktivieren, welches auch dem humoralen Teil des Immunsystems zugeschrieben wird.

Stehen bei der humoralen Immunantwort die B-Lymphozyen im Vordergrund, so sind es auf der zellulären Seite die T-Lymphozyten. Auch bei diesen Zellen findet eine klonale Selektion statt. Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs), eine Untergruppe der T-Zellen, sind in der Lage, Antigene zu erkennen, die zytosolischen bzw. intrazellulären Ursprunges sind. Daher ist es diesen T-Zellen möglich, körperfremde Proteine, wie virale und Tumorantigene aus dem Zytosol, aufzuspüren und die Zielzelle dann zu lysieren. Durch das Phänomen der *Cross Presentation*, auf welche hier nicht weiter eingegangen werden soll, können auch extrazelluläre Antigene den CTLs präsentiert werden. Diese Zellen sind weiter in der Lage, Zytokine zu sekretieren, die sich auf andere Komponenten des Immunsystems auswirken.

Neben den zytotoxischen T-Lymphozyten gibt es die Untergruppe der T-Helferzellen (T_H1, T_H2 und T_H17). Diese Zellen sind in der Lage, neben extrazellulären auch vaskuläre und intrazelluläre Antigene zu erkennen. Die Hauptaufgabe der T-Helferzellen liegt in der Sekretion verschiedener Zytokine und nicht wie bei den CTLs der Lyse Fremdantigen präsentierender Zellen. Die von T_H1-Zellen ausgeschütteten Zytokine bewirken unter anderem eine Aktivierung von Makrophagen, CTLs, B-Zellen und anderen zellulären Teilen des Immunsystems. Im Gegensatz hierzu wirken die von T_H2-Zellen sekretierten Stoffe hauptsächlich aktivierend auf B-Zellen und stellen so ebenfalls eine Verbindung zu der Aktivierung der humoralen Immunantwort des adaptiven Immunsystems da.

Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt in der Regel über professionelle Antigenpräsentierende Zellen (APCs), zu denen neben Dendritischen Zellen (DCs) auch B-Zellen und Makrophagen zählen. Schon hieraus wird ersichtlich, dass die einzelnen Komponenten des Immunsystems aufeinander angewiesen sind und sich gegenseitig unterstützen aber auch regulieren.

Der Inhalt dieser Arbeit beschäftigt sich vor allem mit verschiedenen Subgruppen von T-Zellen. Daher soll im weiteren Verlauf der Einleitung das Hauptaugenmerk auf Aspekte gelegt werden, welche neben der Stimulation, Selektion und Funktion auch mit der Differenzierung von T-Lymphozyten in Verbindung stehen.

1.1.1 MHC-Moleküle

Körperzellen präsentieren auf ihrer Oberfläche intrazelluläre Antigene, die hier von T-Zellen ($\alpha\beta$ T-Zellen) erkannt werden. Diese T-Zellen machen die Mehrheit der T-Lymphozyten eines erwachsenen Menschen aus. Die Moleküle auf denen diese Antigene präsentiert werden sind im MHC (*Major Histocompatibility Complex*) Gencluster kodiert. Die präsentierten Antigene sind durch komplexe Vorgänge der Antigenprozessierung aus Proteinen entstanden und liegen in Form von Peptiden vor. Der polygene und extrem polymorphe MHC liegt beim Menschen auf Chromosom 6 (bei der Maus auf Chromosom 17). In der Bevölkerung gibt es viele verschiedene Allele für die meisten der einzelnen Genloki, wie Tabelle 1 zeigt. Der Polymorphismus des MHC-I ist der am stärksten ausgeprägte des menschlichen Genoms überhaupt. Der MHC spielt auch eine zentrale Rolle bei der Transplantatabstoßung, weshalb man auf ihn aufmerksam wurde [Snell, G.D.1964].

Tabelle 1 Polymorphismus der humanen MHC-Gene

Tabelle modifiziert nach [Nolan, A.2009]

	MHC Klasse I			**MHC Klasse II**					
Locus	A	B	C	DPα	DPβ	DQα	DQβ	DRα	DRβ
Anzahl der Allele	733	1115	383	27	132	34	95	3	697

Beim Menschen wird der MHC auch als HLA (*Human Leukocyte Antigen*) und bei der Maus als H-2 (*Histocompatibility-Antigene*) bezeichnet. Diese membranständigen Glykoproteine können wegen ihrer unterschiedlichen Struktur und Funktion in zwei Klassen unterteilt werden.

1.1.1.1 MHC Klasse I-Moleküle

Das MHC-I-Molekül [Bjorkman, P.J. et al. 1987] ist ein nichtkovalentes Heterodimer, welches sich aus einer schweren transmembranen α-Kette (ca. 43 kDa) und einem nicht transmembranen β_2-Mikroglobulin Molekül (ca. 12 kDa) zusammensetzt. Die schwere Kette teilt sich in drei Untereinheiten (α_1-α_3), wovon nur die α_3-Domäne die Zellmembran durchdringt. Die Struktur dieser Domäne und die des β_2-Mikroglobulins weisen eine gewisse Homologie zu der eines Immunglobulins auf. Im Gegensatz zu der polymorphen schweren Kette des Moleküls wird das invariante β_2-Mikroglobulin nicht im MHC kodiert.

Das MHC Klasse I-Molekül besitzt eine „Furche“, die aus den α_1- und α_2-Domänen gebildete wird. Hierbei formen diese Domänen durch 8 antiparallele β-Faltblätter den „Boden“ und mit zwei α-Helices die „Ränder“, welche die Bindung eines zu präsentierenden Peptides erst ermöglicht.

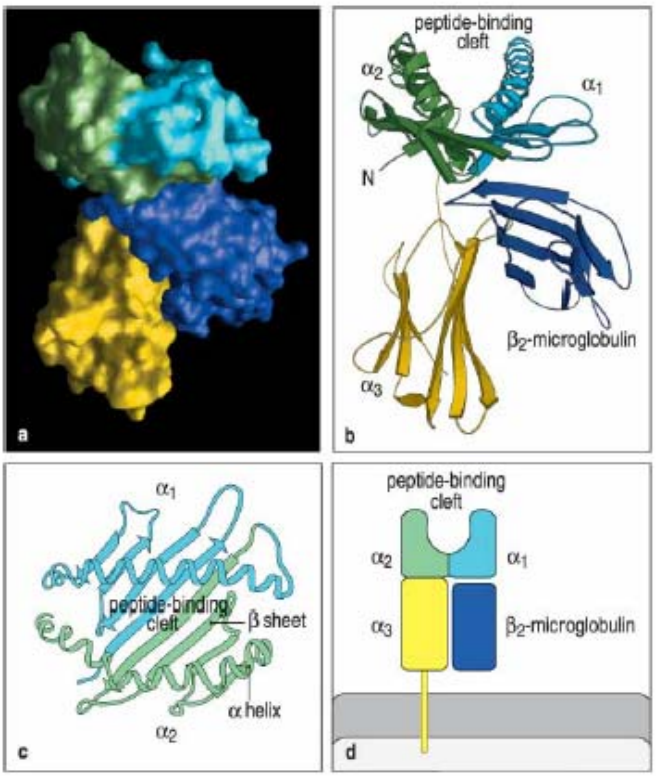


Abbildung 1 Raumstruktur von MHC-I [Janeway, C.A. et al. 2005]

Raumstruktur eines Moleküls HLA-A*0201 nach Spaltung von der Zelloberfläche mit Papain

a Darstellung der Molekülоberfläche

b Bänderdiagramm

c Aufsicht auf die Peptidbindungsfurche

d Schematische Ansicht

Die Peptidbindungsfurche ist an ihren Enden häufig geschlossen. Der Peptidligand liegt meist in gestreckter Konformation [Madden, D.R. et al. 1993] und auf 8-10 Aminosäuren beschränkter Länge vor [Bouvier, M. et al. 1994]. Die Furche des MHC-Moleküles besitzt sogenannte Bindungstaschen, die mit dem Amino- und Carboxyterminus [Bouvier, M. et al. 1994] sowie einigen der Peptidseitenketten wechselwirken [Falk, K. et al. 1991]. Diese nichtkovalenten Bindungskräfte gehen vor allem auf elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, sowie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptid und MHC-Molekül zurück. Die Enden des präsentierten Peptides interagieren mit den invarianten Positionen der Bindungstaschen. Die Interaktionsstellen der Seitenketten bindenden Aminosäuren sind hingegen oft stark polymorph [Bouvier, M. et al. 1994; Saper, M.A. et al. 1991], was zu unterschiedlichen Präferenzen der MHC-Moleküle im Bezug auf das zu präsentierende Peptid führt. Die Bindungstaschen der Seitenketten werden daher auch als „*specificity pockets*“ bezeichnet, da sie die „Ankerreste“ des Peptides binden. Es gibt also bei MHC-Molekülen bevorzugte Peptidmotive [Falk, K. et al. 1991; Rammensee, H.G. et al. 1993], so ist der Ankerrest des Carboxyterminus sehr häufig hydrophob oder basisch. Da die präsentierten Peptide gewisse Eigenschaften vereinen müssen um als Ligand in die Bindungsfurche eines MHC-Moleküles zu passen, ist es möglich, Peptidmotive für MHC Klasse I-Liganden vorherzusagen [Parker, K.C. et al. 1994]. Die Vorhersage von Peptidmotiven kann mit Hilfe eines Programms, wie z.B. SYFPEITHI erfolgen, welches einen Liganden anhand seiner wahrscheinlichen Bindungseigenschaften auf ein bestimmtes MHC Klasse-Molekül bewertet [SYFPEITHI 2008].

Viele verschiedene Peptide können auf ein Molekül des MHC-I-Allels binden. Bevor ein Ligand jedoch auf ein MHC-Molekül geladen werden kann, muss er erst durch Antigenprozessierung erzeugt werden [Pamer, E. et al. 1998].

Die auf MHC Klasse I-Molekülen präsentierten Peptide sind vorwiegend zytosolischen Ursprungs, was neben viralen Antigenen auch zytosolische Parasiten und nicht zuletzt Tumorantigene mit einschließt. Diese Peptide entstehen durch den Abbau von Proteinen mittels des Proteasoms im Zytosol [Groettrup, M. et al. 1996] und werden über den TAP-Komplex (*Transporter Associated with Antigen Processing*) in das Lumen des ERs (Endoplasmatisches Retikulum) [Neefjes, J.J. et al. 1993] transportiert. Dieser Vorgang findet aktiv, also unter ATP-Verbrauch statt. Neben Peptiden mit einer „passenden" Länge für die Bindung auf MHC Klasse I-Moleküle können auch längere Aminosäureketten in das ER transportiert werden. Diese Polypeptide werden dann, ausgehend vom aminoterminalen Ende, durch spezielle Enzyme, den *Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing* (ERAAP), auf eine passende Länge gekürzt [Serwold, T. et al. 2002]. Bei der Assoziation des β_2-Mikroglobulins an die schwere MHC-Kette ist das Chaperon Calnexin entscheidend beteiligt ist [Janeway, C.A. et al. 2005]. Die Bindung der so assoziierten Moleküle an TAP erfolgt im Komplex mit Calreticulin über das Chaperon Tapasin [Ortmann, B. et al. 1997]. Aufgrund ihrer Bindung an TAP ist anzunehmen, dass die mit TAP transportierten Peptide auf MHC-I übertragen werden. Die korrekte Faltung des MHC-Moleküles tritt erst nach seiner Beladung mit einem Peptid ein. Der hieraus entstandene MHC-Peptid-Komplex kann nun, nach dem Abdissozieren der Chaperone an die Zelloberfläche transportiert werden. Die Stabilität dieser Komplexe ist entscheidend von der Bindung zwischen dem beladenen Peptid und dem MHC-Molekül abhängig, da es sonst zu keiner stabilen Konformation kommt. Es ist bekannt, dass TAP-defiziente Zellen nur instabile MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese werden nach kurzer Zeit wieder in das Zellinnere transportiert und im Zytosol abgebaut [Hughes, E.A. et al. 1997].

Zellen des hämatopoetischen Systems exprimieren MHC Klasse I-Moleküle in großem Maße (~100.000 Moleküle pro Klasse I-Allel). Weiter findet man diese Moleküle auch auf den meisten kernhaltigen Zellen sowie den kernlosen Thrombozyten, jedoch beim Menschen nicht auf Erythrozyten. Verschiedene Zytokine wie IFNα, -β und -γ, welche während einer Immunreaktion produziert werden fördern die Expression von MHC Klasse I-Molekülen und erhöhen so die Antigenpräsentation. Weiter sind MHC Klasse I-Moleküle in Kombination mit Selbst-Peptiden bei der Selektion von T-Zellen im Thymus beteiligt, worauf in Abschnitt 1.2.2 näher eingegangen werden soll.

1.1.1.2 MHC Klasse II-Moleküle

Das MHC Klasse II-Molekül ist, ebenso wie das MHC Klasse I-Molekül, ein nichtkovalentes Heterodimer. Es setzt sich jedoch aus zwei etwa gleich schweren Ketten (α und β, ca. 34 bzw. 29 kDa) zusammen. Jede dieser Ketten unterteilt sich in verschiedene Domänen, welche α_1 und α_2 bzw. β_1 und β_2 genannt werden. Die membrandurchdringenden Abschnitte der α_2 und β_2 Domäne weißen auch bei Klasse II-Molekülen eine Homologie zu Immunglobulin-Domänen auf.

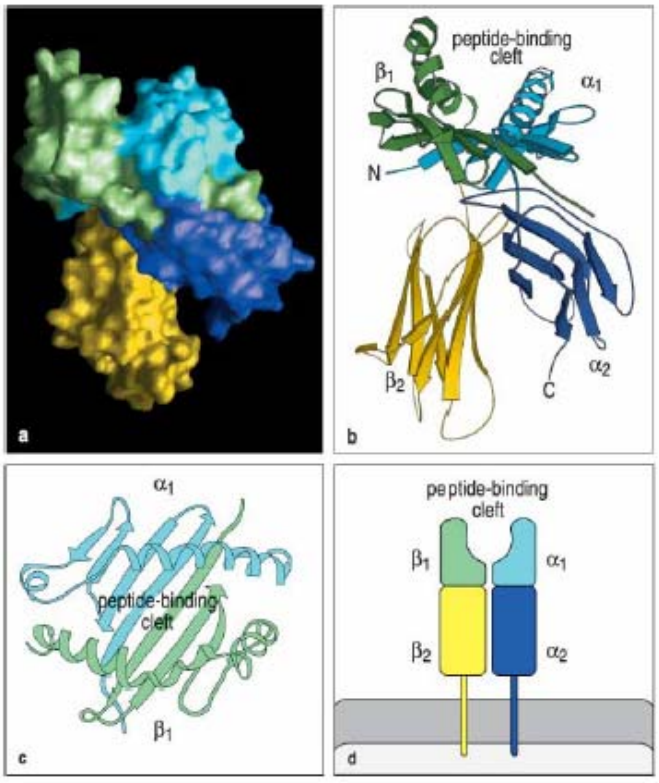


Abbildung 2 Raumstruktur von MHC-II [Janeway, C.A. et al. 2005]

Raumstruktur eines Moleküls HLA-DR1 (DRA*0101/DRB1*0101)

a Darstellung der Moleküloberfläche

b Bänderdiagramm

c Aufsicht auf die Peptidbindungsfurche

d Schematische Ansicht

Die Peptidbindungsfurche der MHC Klasse II-Moleküle ähnelt der von Klasse I-Molekülen. Hier wird der „Rand“ ebenso von α-Helices und der „Boden“ von β-Faltblättern der α_1 und β_1 Domäne gebildet.

Da die Peptidfurche von MHC Klasse II-Molekülen nicht geschlossen ist, kommt es zu keiner Bindung der Peptidtermini [Stern, L.J. et al. 1994]. Dies ermöglicht weiter die Präsentation von Peptiden mit einer durchschnittlichen Länge von 11-18 Aminosäuren, aber auch längere Sequenzen können gebunden werden [Pieters, J.1997]. Bei MHC Klasse II-Molekülen findet die Wechselwirkung mit dem Peptid (bei gestreckter Peptidkonformation) vornehmlich zwischen den invarianten Resten sowie dem Peptidrückgrat statt. Weiter sind auch Bindungen zwischen den Ankerresten des Peptides und polymorphen Taschen des MHC-Moleküles bekannt, sind jedoch im Gegensatz zu Klasse I-Molekülen degenerierter. Daher sind die Peptidmotive von MHC-II-Molekülen präsentierten Liganden nicht so scharf definiert wie im Falle der Klasse I-Moleküle.

Peptide, welche auf MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden, stammen meist aus vesikulären Kompartimenten der Zelle [Pieters, J.1997; Watts, C.1997], wodurch es möglich ist, auch extrazelluläre Antigene zu präsentieren. Diese kommen aus Vesikeln intrazellulär parasitierender Organismen oder wurden durch Endozytose aufgenommen (z.B. bakterielle Toxine). Die vesikulären Proteine werden durch saure Proteasen des Endozytosewegs, wie Cathepsin B, D, S und L, in kleine Peptide gespalten. Nach ihrer Synthese bilden die beiden Ketten des Klasse II-Moleküles unter der Beteiligung von Calnexin im ER einen Komplex mit der „Invarianten Kette“ (Ii) [Cresswell, P.1996], wodurch eine nonamere Struktur entsteht (α:β:Ii)$_3$. Die hierbei beteiligten Komponenten sind alle ER-membranständig. Die invariante Kette ist hier an verschiedenen Vorgängen beteiligt, wodurch ihr eine wichtige Stellung zukommt. So übernimmt sie Aufgabe des Chaperons bei der richtigen Faltung der Heterodimere [Anderson, M.S. et al. 1992], liefert ein Signal für den Export der Klasse II-Moleküle in andere Zellkompartimente [Bakke, O. et al. 1990] und blockiert die Peptidbindungsfurche, so dass keine Peptide des ERs binden können [Roche, P.A. et al. 1990]. Nach dem Passieren des Trans-Golgi Apparates gelangen die MHC-II-Moleküle aus dem ER in ein endosomales Kompartiment mit saurem Milieu [Geuze, H.J.1998]. Hier wird die invariante Kette durch Cathepsine enzymatisch bis auf das CLIP (*Class II-Associated Invariant-Chain Peptide*) abgebaut. Dieses kurze Fragment bleibt zunächst auf dem MHC-II-Molekül gebunden und wird erst bei der Beladung mit dem eigentlichen Peptid durch dieses ersetzt. Bei diesem Austausch kommt dem Chaperon HLA-DM, aber auch oft HLA-DO (bei der Maus H-2M bzw. H-2O) eine katalytische Funktion zu [Denzin, L.K. et al. 1995; Kropshofer, H. et al. 1998]. Als spezielles Zellkompartiment für die Vorgänge des Abbaus der invarianten Kette und des Peptidaustausches wurde das MIIC (*MHC Class II Compartment*) postuliert [Ferrari, G. et al. 1997]. Nach der Beladung mit dem zu präsentierenden Peptid wird der Komplex mit dem MHC Klasse II-Molekül an die Zelloberfläche exportiert. HLA-DO, ein Heterodimer aus einer HLA-DNα und einer HLA-DOβ-Kette, ist nur in intrazellulären Vesikeln zu finden und agiert als negativer Regulator von HLA-DM. IFNγ ist in der Lage die Expression von HLA-DM zu verstärkten, wohingegen die der HLA-DOβ-Kette durch dieses Zytokine nicht gesteigert wird. So kann eine verstärkte Produktion von IFNγ im Rahmen einer Infektion die Inhibition durch HLA-DO überwinden [Janeway, C.A. et al. 2005].

Im Gegensatz zu MHC Klasse I-Molekülen werden MHC Klasse II-Moleküle primär von professionellen APCs, wie Makrophagen, DCs und aktivierten B-Zellen sowie Thymusepithelzellen exprimiert.

1.2 Die T-Zellantwort

Die auf MHC-Molekülen präsentierten Peptide werden spezifisch durch die Interaktion mit T-Zellrezeptoren (TCRs) im Rahmen der adaptiven Immunantwort erkannt. Die Gruppe der T-Lymphozyten lässt sich anhand ihres TCRs in zwei Untergruppen gliedern, die αβ und die γδ T-Zellen. Letztere stellen die kleinere Untergruppe dar und unterscheiden sich von den αβ T-Zellen durch die Art der Antigenerkennung. Es wird vermutet, dass γδ T-Zellen Antigene, ähnlich wie Antikörper, direkt erkennen können, da Liganden für den γδ TCR nicht bekannt sind. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll daher nicht weiter auch die Untergruppe der γδ T-Zellen eingegangen werden.

1.2.1 Der αβ T-Zellrezeptor

Der T-Zellrezeptor (TCR) von T-Zellen ist in der Lage mit dem MHC-Peptid-Komplex einer Zielzelle zu interagieren und das präsentierte Peptid zu überprüfen. Bei einer spezifischen Bindung des TCRs und MHC-Peptid-Komplexes wird eine Signalkaskade innerhalb der T-Zelle induziert. Die Anzahl dieses Rezeptors beträgt auf deren Oberfläche einer T-Zelle etwa 3 x 10^5 Moleküle.

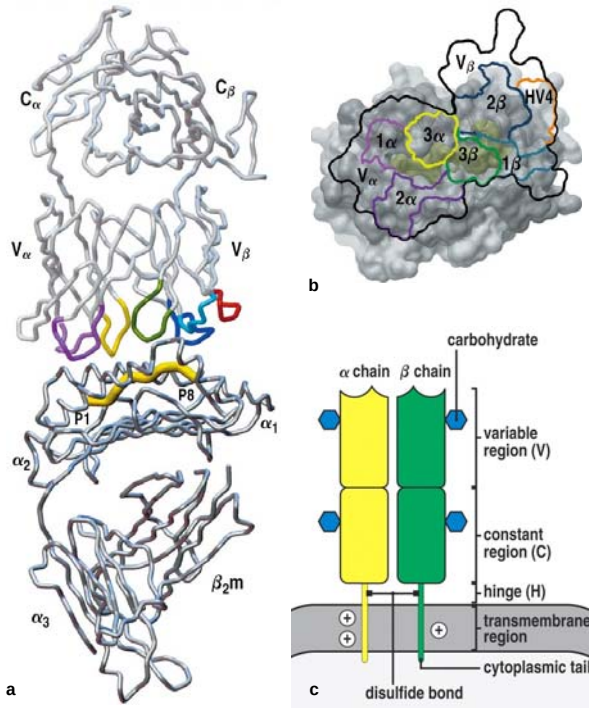


Abbildung 3 Raumstruktur des αβ-TCR [Janeway, C.A. et al. 2005]

Raumstruktur eines αβ-TCR welcher an das MHC-I-Molekül H-2K^b mit dem Peptid dEV8 gebunden ist.

a Darstellung des Peptidrückgrates beider Moleküle mit Kennzeichnung der Domänen und der Termini des gebundenen Peptids

b Kontur des TCR überlagert auf eine Darstellung der MHC-I-Oberfläche. Ansicht auf die Peptidbindungsfurche mit Angabe der CDRs (1α/1β, 2 α/2β, 3α/3β, HV4) und der Domänen des TCR (V_α/V_β, C_α/C_β)

c Schematische Darstellung des TCR

Der T-Zellrezeptor ist ein heterodimeres Glykoprotein, welches sich aus einer α-Kette (ca. 50 kDa) und der β-Kette (ca. 39 kDa) zusammensetzt. Bei $\gamma\delta$ T-Zellen besitzt der TCR, bestehend aus einer γ- und δ-Kette, eine etwas andere Struktur als bei $\alpha\beta$ T-Zellen. Bei Letzteren liegt eine strukturelle Ähnlichkeit zu membranständigen Fab-Fragmenten eines Antikörpers vor [Garboczi, D.N. et al. 1996; Pass, H.A. et al. 1998]. Die Carboxyterminale Region der α- und β-Ketten ragen in die Membran der T-Zelle und verankern so den TCR auf der Oberfläche. Der extrazelluläre Bereich unterteilt sich aufgrund seiner Faltung in je zwei Domänen. Die Homologie des TCR zu Immunglobulinen zeigt sich hier durch das Vorhandensein zweier konstanter (C_α/C_β) und zweier variabler (V_α/V_β) Regionen. Die Interaktion des TCR mit dem MHC-Peptid-Komplex kommt durch Letztere zustande.

Die V-Regionen von V_α werden auf genomischer Ebene durch V-/J-Elemente (V = variable; J = joining) kodiert. Bei V_β werden diese V- und J-Elemente durch ein Drittes, das D-Element (D = diversity) voneinander getrennt [Rowen, L. et al. 1996]. Diese Segmente werden auf genetischer Ebene durch Umlagerung, die absichtlich ungenau abläuft, miteinander verbunden. Auch bei diesem Rearrangieren ist eine starke Homologie zu der Antikörpersynthese von B-Zellen zu erkennen. Neben der Tatsache, dass es mehrere verschiedene V-, D- und J-Elemente gibt trägt die ungenaue Verknüpfung dieser Segmente entscheidend zu der großen Gesamtdiversität von etwa 10^{18} des TCR bei.

Tabelle 2 Anzahl der Gensegmente des humanen $\alpha\beta$ TCRs

Tabelle modifiziert nach [Janeway, C.A. et al. 2005]

	Gensegmente der	
	α-Kette	**β-Kette**
V-Segmente	~70	52
D-Segmente	0	2
J-Segmente	61	13

Die C-Region des TCRs interagiert bei der Antigenerkennung nicht mit dem MHC-Peptid-Komplex. Es besteht daher keine Notwendigkeit einer großen Diversität dieser Region, was sich auch auf genetischer Ebene erkennen lässt. Es gibt lediglich ein C_α-Gen und zwei C_β-Gene, welche enge Homologien aufweisen und keine bekannten funktionellen Unterschiede zeigen.

Die Diversität eines TCRs ist nach dem Rearrangement auf wenige Regionen, den so genannten CDRs (*Complementary Determining Regions*) konzentriert. Dies trifft ebenfalls für Antikörper zu. Die CDRs bildet am aminoterminalen Ende des TCRs diskrete Schleifen, welche bei der α-

und β-Kette CDR1-3 genannt werden. Die β-Kette besitzt neben diesen drei CDRs zusätzlich noch die HV4 Schleife, für welche es in Immunglobulinen kein hypervariables Gegenstück gibt.

Die Bindung zwischen einem αβ TCR und einem MHC-Peptid-Komplex findet entlang der diagonal verlaufenden CDR-Achse des TCRs statt. Die hierbei auftretenden Wechselwirkungen von Peptid und TCR finden vor allem im Bereich von CDR3 statt, welcher die höchste Diversität besitzt [Ding, Y.H. et al. 1998; Garcia, K.C. et al. 1998; Pass, H.A. et al. 1998]. Die Schleifen der CDR1 und -2 interagieren hauptsächlich mit den weniger variablen Regionen des MHC-Moleküls. Verschiedene Vorgänge sind bei der Antigenerkennung von zentraler Bedeutung. Der wohl wichtigste ist die Wechselwirkung zwischen den Seitenketten des Peptides und des TCRs. Bei unterschiedlichen Konformationen des Peptides oder des MHC-Peptid-Komplexes spielen die Interaktionen mit dem Peptidrückgrat oder dem MHC-Molekül eine entscheidende Rolle.

Der TCR ist mit weiteren Molekülen an der Zelloberfläche assoziiert. Diese Molekülgruppe wird auch CD3-Komplex genannt und ist an der Signaltransduktion sowie Oberflächenexpression des TCRs beteiligt. Der CD3-Komplex setzt sich aus CD3γ, CD3δ, CD3ε und CD3ζ zusammen, wobei letztere ein Homodimer bilden. Ein CD3γ oder ein CD3δ bilden auf der extrazellulären Seite zusammen mit einem CD3ε eine immunglobulinähnliche Domäne. Auf der intrazellulären Seite jeder dieser CD3-Untereinheiten findet sich jeweils ein ITAM (*Immunreceptor Tyrosine-Based Activation Motif*). Jede ζ-Kette eines CD3 Homodimers besitzt 3 dieser ITAMs, woraus sich die Gesamtzahl von zehn ITAMs je TCR ergibt [Kersh, E.N. et al. 1998; Malissen, B. et al. 1996]. Die Signalweiterleitung ist entscheidend von diesen ITAMs abhängig, welche hierbei phosphoriliert werden. Im Verlauf der Signaltransduktion, auf welche hier nicht im Detail eingegangen werden soll, kommt es u.a. zur Aktivierung von ZAP-70. Dies wiederum führt über verschiedene weitere Schritte zur Aktivierung der Proteinkinase C und Ras, sowie einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. Hieraus resultiert letztlich die Induktion verschiedener Gentranskriptionen, welche die Proliferation und Differenzierung der aktivierten Zelle zu Folge haben.

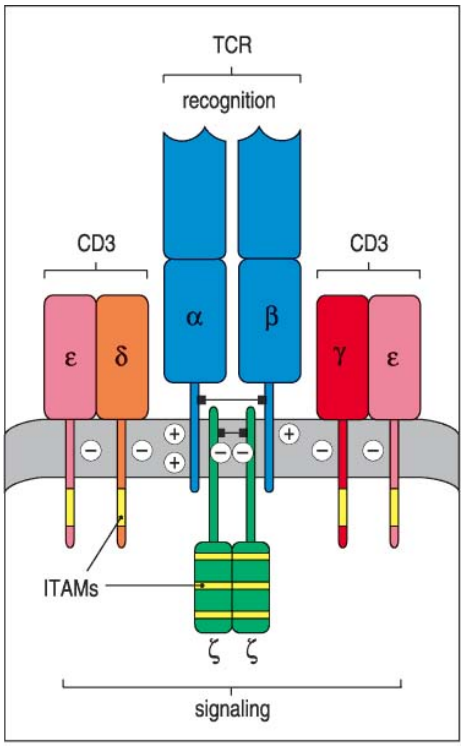


Abbildung 4 Schematische Darstellung des T-Zellrezeptorkomplexes

[Janeway, C.A. et al. 2005]

Die drei CD3-Proteine besitzen je eine extrazelluläre immunglobulinähnliche Domäne und ein einzelnes intrazelluläres Signalmotiv, das ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine–Based Activation Motif*). Darüber hinaus besitzt jede ζ-Kette drei intrazelluläre ITAMs, die eine sehr flexible Signalgebung des T-Zellrezeptors ermöglichen [Kersh, E.N. et al. 1998].

Bei der Antigenerkennung durch T-Zellen sind neben diesen Molekülen weitere Strukturen beteiligt. So finden sich die Korezeptoren CD4 bei T-Helferzellen und CD8 bei CTLs auf der Zelloberfläche, die mit dem TCR kooperieren [Janeway, C.A., Jr.1992]. Hierbei interagiert CD4 mit MHC Klasse II-Molekülen, und $CD8^+$ T-Zellen erkennen MHC-Peptid Klasse I-Komplexe auf der Zelloberfläche. Das CD8-Molekül ist ein Heterodimer aus einer α- und β-Kette, was daher eine immunglobulinähnliche Domäne bildet. Teile beider Ketten interagieren bei der Antigenerkennung mit der α_3-Domäne des MHC-I-Moleküls. Während der Antigenerkennung durch T-Helferzellen wechselwirkt die erste der vier immunglobulinähnlichen Domänen D1 des CD4-Moleküls mit der β_2-Domäne des MHC-II-Moleküls.

Bei der Aktivierung der T-Zelle durch Phosphorylierung auf der Seite des Zytosols wirken weiter CD4 und CD8 mit. Neben den bereits erwähnten Strukturen auf der Zelloberfläche können noch weitere von der Zelle exprimiert werden. Diese wirken auf die Zelle durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften ein. Eine der wohl wichtigsten ist CD28, welches ein kostimulatorisches Signal an die T-Zelle weitergibt. Dieses Molekül wird vor allem von naiven $CD8^+$ und den meisten $CD4^+$ T-Zellen exprimiert und liefert das zweite Signal zu deren Aktivierung. Weiter finden sich kostimulatorische Moleküle CD154 (CD40L) oder 4-1BB, Adhäsionsmoleküle wie CD57 oder CCR7, welche die Rückkehr in Gewebe ermöglichen, auf den T-Lymphozyten. Eine Stimulation dieser Zellen durch ein Zytokin wie z.B. IL-2 (3. Signal) wird durch die Expression eines oder mehrerer spezifischer Rezeptoren wie z.B. CD25 ermöglicht.

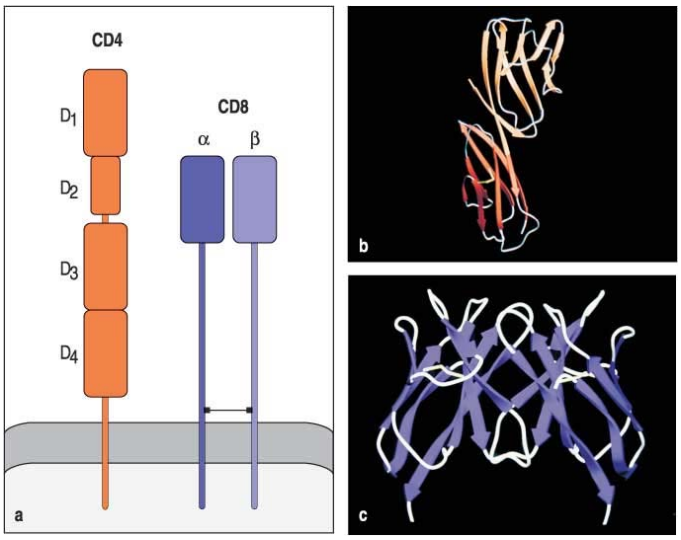


Abbildung 5 Das CD4- und CD8-Molekül in verschiedenen Darstellungen

[Janeway, C.A. et al. 2005]

a Schematische Darstellung

b Bänderdiagramm des CD4-Moleküls

c Bänderdiagramm des CD8-Moleküls

1.2.2 Die Entwicklung von αβ T-Zellen

Der Name der T-Zellen beinhaltet bereits die Ort ihrer Entwicklung, den Thymus [von Boehmer, H.1988]. Dieses Organ ist bereits bei der Geburt vollständig entwickelt. Es liegt im Mediastinum und gehört zu den primären lymphatischen Organen. Die Rückbildung des Thymus beginnt mit dem Eintritt in das Erwachsenenalter, sodass er später nur noch einen Bruchteil seiner ursprünglichen Größe besitzt. Strukturell lässt sich der Thymus in mehrere Lappen Gliedern, die sich wiederum aus bindegewebigen Trabekeln zusammensetzen. Die T-Zellen sind in ein Geflecht auch Stromazellen eingebettet, welche keinen hämatopoetischen Ursprung haben. Im histologischen Querschnitt eines Thymuslappens zeigt sich die äußere Cortex und die darunter liegende Medulla.

Die Vorläuerzellen der T-Lymphozyten wandern aus dem Knochmark in den Thymus ein [Viret, C. et al. 1999] und exprimieren bereits hier nach etwa einer Woche verschiedene Oberflächenmarker wie CD44 oder CD25. Da sie zu diesem Zeitpunkt aber weder CD4 noch CD8 exprimieren, werden sie als „doppelt-negative“ Thymozyten bezeichnet [Shortman, K. et al. 1996]. Zu diesem Zeitpunkt findet auch die Rekombination der TCR-β-Kette statt. Nach deren Abschluss exprimiert die Zelle einen aus einer β- und prä-α-Kette bestehenden Rezeptor. Nach dem Ende der Rekombination beginnen diese Zellen zu proliferieren und tragen CD4 und CD8 auf ihrer Oberfläche [MacDonald, H.R. et al. 2001]. Vor dem Rekombinieren der α-Kette stoppt die Proliferation dieser doppel-positiven Thymozyten. Im nun folgenden Verlauf der positiven und negativen Selektion sterben mehr als 95% der „doppelt-positiven“ Zellen durch Apoptose.

Zu Beginn steht die positive Selektion [Fowlkes, B.J. et al. 1995], in der nur Zellen überleben, deren TCR eine Bindung mit Selbst-MHC eingehen können. Hierbei sind Stromazellen

entscheidend beteiligt, die sich primär in der cortikalen Region des Thymus befinden. Im Verlauf der positiven Selektion werden aus den „doppel-positiven“ „einfach-positive“ T-Zellen. Diese exprimieren jetzt entweder CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche; bindet eine $CD4^+CD8^+$ Zelle an ein MHC Klasse II-Molekül verliert sie die Expression für CD8, bindet sie an ein Klasse I-Molekül die für CD4.

Die überlebenden Thymozyten der positiven Selektion gehen nach deren Abschluss in die negative Selektion über [Kruisbeek, A.M. et al. 1996]. Im Verlauf dieser Selektion wird ein Apoptosesignal in den Zellen ausgelöst, deren TCR eine hohe Affinität zu körpereigenen MHC-Peptid-Komplexen zeigt. Hierbei kommen professionelle APCs zum Einsatz, die sich am corticomedullären Übergang des Thymus befinden. Diese Epithelzellen des Thymus exprimieren mit Hilfe spezieller Transkriptionsfaktoren wie den *Autoimmune Regulator* (AIRE) nahezu alle Selbst-Antigene des Organismus und sind so in der Lage verschiedene Organe zu repräsentieren. Diese Expression von organspezifischen sowie ubiquitären Genen wird durch deren genomische Lokalisation in Clustern ermöglicht. Im Rahmen der Expression von Selbst-Antigenen werden jedoch auch Tumor-assoziierte Antigene präsentiert, wodurch es Anergie oder Apoptose spezifischer T-Lymphozyten kommt. Durch die Deletion von T-Lymphozyten, deren TCR eine hohe Affinität für Tumor-assoziierte Antigene aufweist, stehen für eine etwaige Immuntherapie nur Zellen mit einer niedrigen bis schwachen Bindungsstärke zur Verfügung. Weiter können hierdurch auch regulatorische Antigen-spezifische T-Zellen generiert werden, welche beim Auftreten eines Tumors die Immunantwort inhibieren können [Kyewski, B. et al. 2006].

Bei Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen sind jedoch auch die Vorgänge der peripheren Toleranz, die außerhalb des Thymus stattfinden von entscheidender Bedeutung.

Der Reifevorgang im Thymus dauert etwa drei Wochen, und es entstehen T-Zellen, die nur eine funktionelle Spezifität des TCRs aufweisen. Dies ist auf das Rearrangieren der Rezeptorgene auf beiden homologen Chromosomen und die Allele-Exklusion (*Allelic Exclusion*) zurückzuführen. Die entstandenen TCRs zeichnen sich durch eine Toleranz gegenüber Autoantigenen aus und sind auf die Selbst-MHC Bindung restringiert. Die T-Zellen haben somit ein Entwicklungsstadium erreicht, mit dem sie in die Peripherie des Körpers entlassen werden können.

1.2.3 T-Zellen in der Peripherie

Nach dem Übergang der T-Zellen aus dem Thymus in die Peripherie des Körpers rezirkulieren diese zwischen Blut und den peripheren Lymphorganen, wie z.B. den Lymphknoten, Tonsillen und der Milz. Bis zu ihrem ersten Kontakt mit einem Antigen werden diese T-Lymphozyten als naiv bezeichnet [Picker, L.J.1994]. In der peripheren Lymphorganen befinden sich professionelle APCs, durch welche naive T-Zellen neben dem Antigenkontakt auch

kostimulatorische Signale empfangen. Dieser Vorgang wird als Priming von T-Lymphozyten bezeichnet [Lenschow, D.J. et al. 1996]. Die so präsentierten Antigene wurden zuvor von APCs, wie DC, aufgenommen und in die peripheren Lymphorgane transportiert [Banchereau, J. et al. 1998]. Die kostimulatorischen Signale durch die APCs sind jedoch auch von entscheidender Bedeutung, da es durch das Fehlen des 2. Signals meist zur Anergie (Reaktivitätsverlust) oder zum Tod der naiven T-Zellen kommt [Guerder, S. et al. 1994].

Die erfolgreich geprimten T-Zellen beginnen mit der Proliferation und Differenzierung zu Effektor- und Gedächtnis-Zellen. Erstere sind nun in der Lage, ohne weitere Kostimulation bei Antigenerkennung Effektorfunktionen auf eine Zielzelle auszuüben.

$CD4^+$ Effektorzellen lassen sich in die Untergruppen T_H1, T_H2 und T_H17 unterteilen [Mosmann, T.R. et al. 1989; Weaver, C.T. et al. 2006]. Die Hauptaufgabe der T_H1-Zellen ist die Sekretion von Leitzytokinen wie IFNγ und IL-2, während T_H2-Zellen vor allem IL-4 und IL-5 ausschütten. Beide T-Helferzelltypen sind in der Lage, durch Ligation von CD40 auf Zielzellen Makrophagen oder B-Zellen zu aktivieren. B-Zellen werden durch die von T_H2-Zellen sezernierten Zytokine zur Produktion von neutralisierenden Antikörpern angeregt und leiten so die humorale Immunantwort ein. T_H1-Zellen fördern hingegen die Bildung opsonierender Antikörper und nehmen so über Makrophagen Einfluss auf die zelluläre Immunantwort. Da beide $CD4^+$ Subklassen durch ihre sekretierten Zytokine aber auch antagonistisch aufeinander wirken, kommt es unter normalen Bedingungen zu keiner Überreaktion des Immunsystems.

Die erst seit wenigen Jahren bekannten T_H17 Zellen zeichnen sich durch die Sekretion von IL-17 aus, wodurch sie auch ihren Namen erhalten haben. Diese $CD4^+$ T-Zelle wurden zunächst in den murinen Modellsystemen *Experimental Autoimmune Encephalitis* (EAE) und *Collagen Induced Arthritis* (CIA) für Autoimmunerkrankungen beschrieben [Weaver, C.T. et al. 2006]. Es konnte im Mausmodell weiter gezeigt werden, dass IL-23 und nicht IL-12 bei der Entstehung dieser Erkrankungen eine Rolle zu spielen scheint [Cua, D.J. et al. 2003; Murphy, C.A. et al. 2003]. Da die Kombination von IL-23 und IL-17, jedoch nicht die von IL-12 und IFNγ zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen führte [Nakae, S. et al. 2003], wurden die T_H17-Zellen für deren Entstehung verantwortlich gemacht. T_H17 Zellen produzieren neben IL-17 auch IL-6 und TNFα, jedoch kein IFNγ und weisen den Phänotyp von Effektorzellen auf [Aggarwal, S. et al. 2003; Weaver, C.T. et al. 2006]. Im Jahr 2006 konnte gezeigt werden, dass nicht IL-23 für die Entwicklung von T_H17 Zellen verantwortlich ist, sonder die Kombination von IL-6 und TGFβ [Bettelli, E. et al. 2006; Mangan, P.R. et al. 2006; Veldhoen, M. et al. 2006; Weaver, C.T. et al. 2006]. Des Weiteren wurde in diesem Jahr auch über die eigentlichen Bestimmungen dieser T-Zellen berichtet. So konnte gezeigt werden, dass T_H17 Zelle bei der Immunantwort gegen bakterielle Pathogene wie *Citrobacter rodentum* entscheidend mit beteiligt sind [Mangan, P.R. et al. 2006]. T_H17 Zellen sind, wie verschiedene Studien zeigen konnten, bei der Immunreaktion gegen mikrobielle Pathogene von wichtiger Bedeutung.

Eine weitere Gruppe der $CD4^+$ T-Zellen besitzt regulatorische Eigenschaften. Diese Tregs genannten Zellen sind in der Lage, die Effektorfunktionen von T-Helfer und zytotoxischen $CD8^+$ T-Lymphozyten zu inhibieren. Sie kontrollieren so die inflammatorische Immunantwort, nehmen Einfluss auf die Aktivierung und Entwicklung von T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen und schützen so den Organismus vor Autoimmunreaktionen [Sakaguchi, S.2000; Weaver, C.T. et al. 2006]. Aufgrund ihrer Vorläuferzellen lassen sich die regulatorischen T-Zellen in die Gruppen der natürlichen und adaptiven Tregs unterteilen. Letztere entwickeln sich wohl in der Peripherie des Organismus, wohingegen die natürlichen Tregs (nTregs) im Thymus aus speziellen Vorläuferzellen entstehen [Weaver, C.T. et al. 2006]. Die Gruppe der adaptiven Tregs (aTregs) untergliedert sich wiederum in zwei Subpopulationen. Die eine Gruppe der aTregs weisen eine sehr starke Expression von IL-10, jedoch keine des *Forkhead-Winged Helix Transkription Factors* (Foxp3) auf [Groux, H. et al. 1997; Vigouroux, S. et al. 2004; Wakkach, A. et al. 2003]. Die andere Population der aTregs lässt sich in Bezug auf die Expression von Foxp3 nicht von nTregs unterscheiden [Weaver, C.T. et al. 2006]. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 wird auch von nTregs exprimiert und scheint für deren Entwicklung notwendig zu sein [Akbari, O. et al. 2003; Coffer, P.J. et al. 2004; Fontenot, A.P. et al. 2003; Gavin, M. et al. 2003; Hori, S. et al. 2003; Khattri, R. et al. 2003; Walker, M.R. et al. 2003]. Abgesehen von Foxp3 sind Tregs durch eine erhöhte Expression von CD25, der α-Kette des IL-2-Rezeptors charakterisiert [Weaver, C.T. et al. 2006]. Die genauen Vorgänge, durch welche eine Inhibition von Effektorzellen zustande kommt, zeigen sich teilweise kontrovers. So sind aTregs in der Lage, durch die Sekretion von TGFβ oder IL-10, aber auch direkten Zell-Zell Kontakt eine Immunreaktion zu unterdrücken [Nakamura, K. et al. 2001; Nakamura, K. et al. 2004; Weaver, C.T. et al. 2006]. Die Zell-Zell vermittelte Inhibition findet sich auch bei den nTregs [Weaver, C.T. et al. 2006].

Die Lyse von Zielzellen ist die wohl wichtigste Effektorfunktion von $CD8^+$ T-Zellen (CTLs), was durch das Ausschütten von Zytotoxinen wie Perforin und Granzym und die FasL induzierte Apoptose erfolgt [Henkart, P.A.1994]. Die Zytotoxine sind intrazellulär in Vesikeln gespeichert und können über einen kalziumabhängigen Prozess freigesetzt werden. Granzyme sind eine Gruppe mit mindestens fünf Serinproteasen, die über eine enzymatische Kaskade Apoptose induzieren können. Perforine polymerisieren in der Zellmembran der Zielzelle zu Poren, was letztlich zur Lyse dieser Zelle führt. CTLs besitzen neben dieser „Killer-Funktion“ auch die Fähigkeit Zytokine wie TNFα, TNFβ und IFNγ zu sekretieren. Die beiden erstgenannten Stoffe können an TNF-Rezeptoren der Zielzelle binden und so an deren Tötung mitwirken. TNFα, TNFβ und IFNγ sind darüber hinaus in der Lage Makrophagen zu aktivieren. Neben dieser Hauptaufgabe von IFNγ bewirkt dieses Zytokin eine verstärkte Expression von MHC Klasse I-Molekülen auf Zellen und hemmt die Virusreplikation.

1.3 Subtypen von T-Lymphozyten

Die Gruppe der T-Zellen lässt sich in zwei große Hauptgruppen unterteilen, die CD4 und die CD8 positiven Zellen. Die CD4 positiven T-Zellen sind die T-Helferzellen, die CD8 positiven die zytotoxischen Killer-Zellen (siehe oben).

Zellen dieser beiden Hauptgruppen exprimieren abhängig von ihrer Entwicklungsphase und genauen Aufgabe noch eine Reihe weiterer Oberflächenmoleküle mit meist bekannter Funktion. Durch die unterschiedlichen Kombinationen dieser Moleküle, welche mit verschiedenen Eigenschaften assoziiert sind, lassen sich die T-Lymphozyten in eine Reihe verschiedener Subtypen unterteilen.

Gedächtniszellen (Memory Zellen) sind in der Regel für den Marker CD45RA negativ (siehe Abbildung 8) und können im Falle der $CD8^+$ T-Zellen über die Sekretion von IL-2, IL-4, IFNγ und TNFα mit anderen Zellen des Immunsystems interagieren [Hamann, D. et al. 1997]. Diese Gedächtniszellen lassen sich wiederum in zwei Untergruppen aufteilen. Findet sich neben dem TCR-Signal verstärkendem Molekül CD45RA noch Lymphknoten *Homing* Rezeptor CCR7 auf der Zelloberfläche so handelt es sich um sogenannte „*Central-Memory*“ (CM) T-Zellen, fehlt CCR7 dann liegen „*Effector-Memory*“ (EM) T-Zellen vor. Die CM T-Lymphozyten weisen im Vergleich mit den EM-Zellen ein größeres Proliferationspotential auf [Geginat, J. et al. 2003]. Letztere zeichnen sich jedoch durch ihr zytotoxischen Potential aus, welches bei den CM-Zellen nur schwach ausgeprägt ist [Romero, P. et al. 2007].

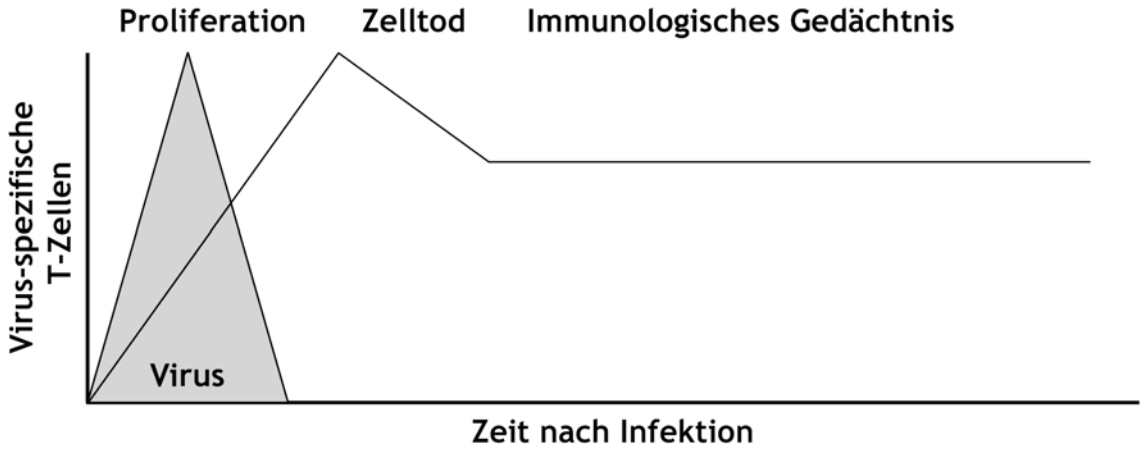


Abbildung 6 Entstehung von Memory T-Zellen

Die Abbildung zeigt am Beispiel einer viralen Infektion schematisch die Entstehung von Memory T-Zellen.

(Abb. nach [Kaech, S.M. et al. 2002; Wherry, E.J. et al. 2004])

Vor ihrer Stimulation *in vitro* besitzen CM-Zellen keine detektierbare zytotoxischen Eigenschaften. Neben den Memoryzellen finden sich auch zytotoxische Vorläufer-T-Lymphozyten unter den CD45RA positiven Zellen. Eine etwas detailliertere Beschreibung für $CD8^+$ T-Zellen soll der folgende Abschnitt zeigen.

T-Lymphozyten, die neben CD8 auch CD45RA exprimieren, lassen sich in weitere Untergruppen untergliedern. So rechnet man Zellen die CCR7 und viel CD28 auf ihrer Zelloberfläche tragen den naiven, ungeprimten T-Zellen zu, welche noch keinen Antigenkontakt hatten. Nach dem Antigenkontakt des TCR regulieren diese geprimten T-Zellen dann die Expression des CD28 Moleküls herunter und die von Fas hoch. Im Gegensatz zur Subpopulation der naiven T-Zellen zeigen die hochdifferenzierten Effektorzellen (T_{EMRA}) keine Expression des Lymphknoten Homing Rezeptors CCR7. Lymphozyten dieser Subpopulation sind in der Lage IFNγ und TNFα auszuschütten und Zielzellen durch Sekretion von Granzym B und Perforin zu lysieren. Im Bezug auf exogene Proliferationsfaktoren wie IL-2 und IL-15 sind diese T-Zellen jedoch von anderen Zellen abhängig [Hamann, D. et al. 1997]. T_{EMRA} Zellen besitzen nur noch eine geringe Proliferationsrate und sind neben CCR7 auch durch Expression des Adhäsionsmoleküls CD57 charakterisiert.

Ein Teil der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen tragen neben diesen Molekülen auch KLRG1 (*Killer Cell Lectine-Like Receptor G1*) auf ihrer Zelloberfläche [Voehringer, D. et al. 2002]. Dieser inhibitorisch wirkende Marker findet sich primär auch auf NK-Zellen, jedoch kann er auch von T-Zellen exprimiert werden, die ihr Proliferationspotential verloren haben [Voehringer, D. et al. 2002], und kann so Aufschluss über die Teilungsrate spezifischer T-Zellen geben. KLRG1 ist der Marker für T-Zellen, die bei Antigenkontakt zwar noch in der Lage sind die Zielzelle zu lysieren, jedoch nicht mehr proliferieren können und daher als seneszent bezeichnet werden [Elgert, K.D. et al. 1998; Gabrilovich, D.I. et al. 1996; Tada, T. et al. 1991; Voehringer, D. et al. 2001].

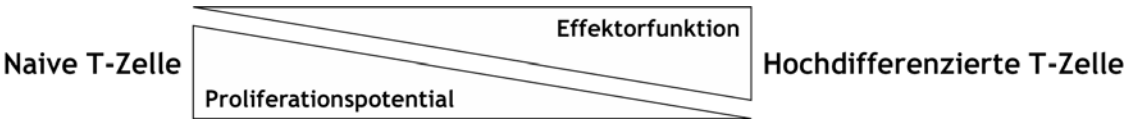


Abbildung 7 Funktions- und Proliferationspotential in der T-Zell Differenzierung

Das Schema zeigt das Funktions- und Proliferationspotential im Verlauf der T-Zell Differenzierung

Tabelle 3 Oberflächenmoleküle zur Charakterisierung von T-Zellen

Molekül	Funktion/Expression	Ligand	Referenz
CD27	Kann als Kostimulator wirken	CD70	[Hamann, D. et al. 1997; Janeway, C.A. et al. 2005]
CD28	Aktivierung naiver T-Zellen, Signal 2	B7 Familie	[Azuma, M. et al. 1993b; Azuma, M. et al. 1993a; Hamann, D. et al. 1997; Janeway, C.A. et al. 2005]
CD45RA	Verstärkung der Signalvermittlung des TCR, Phosphataseaktivität	$p56^{lck}$ $p59^{fyn}$ Src Kinase	[Geginat, J. et al. 2003; Hamann, D. et al. 1997; Janeway, C.A. et al. 2005]
CD57	Adhäsionsmolekül, Marker auf zytotoxischen T-Zellen	Selektin Laminin	[Wang, E.C.Y. et al. 1995]
CCR7	Lymphknoten Homing Rezeptor	CCL21	[Geginat, J. et al. 2003; MartIn-Fontecha, A. et al. 2003; Sallusto, F. et al. 1999b]
KLRG1	Marker für Differenzierungsgrad von T-Zellen, inhibitorischer NK-Zell Rezeptor	E-Cadherin	[Voehringer, D. et al. 2002]

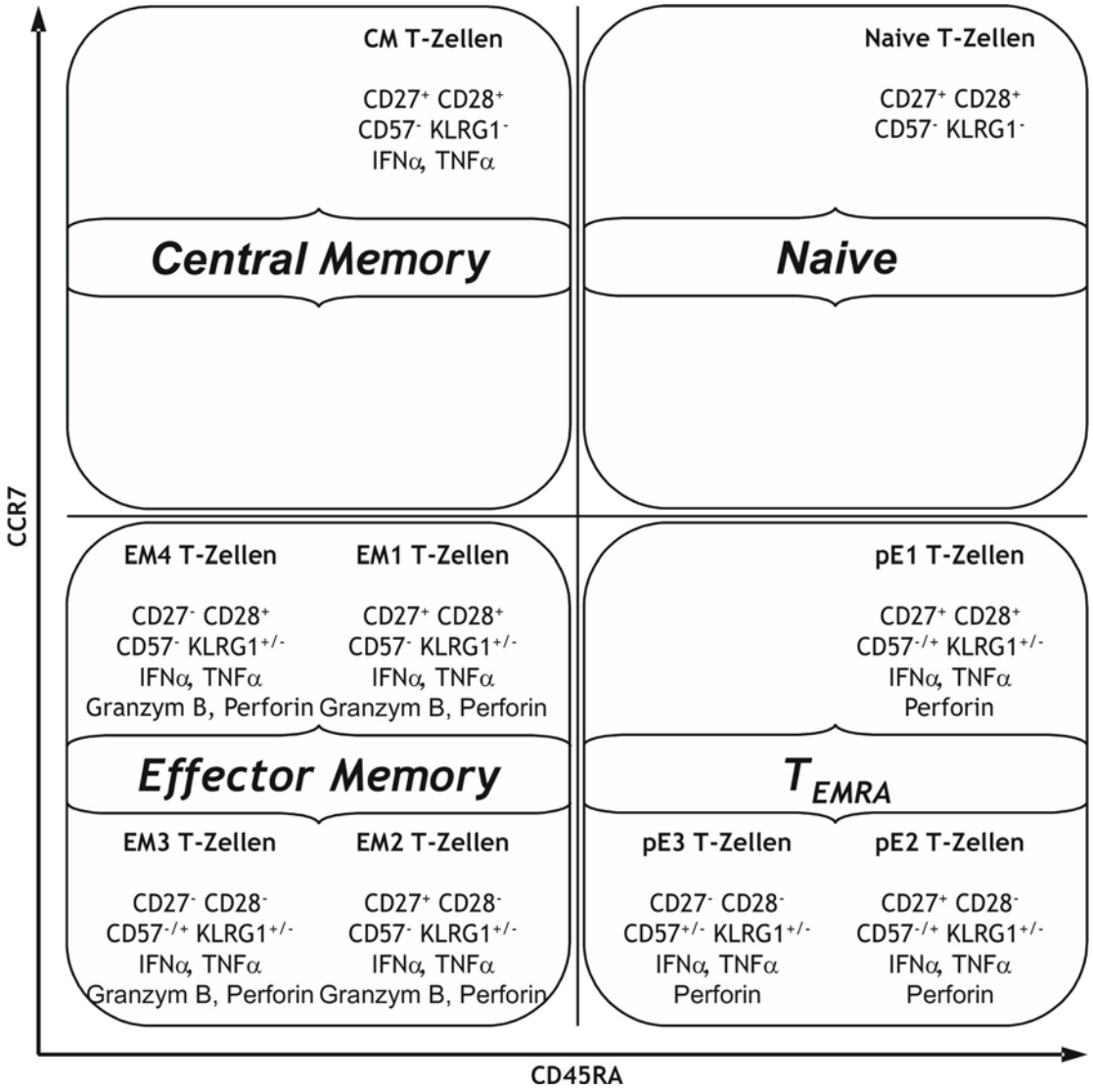


Abbildung 8 Schema zur Einteilung von $CD8^+$ T-Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker

Darstellung modifiziert nach [Elgert, K.D. et al. 1998; Gabrilovich, D.I. et al. 1996; Koch, S. et al. 2008; Romero, P. et al. 2007; Sallusto, F. et al. 2004; Voehringer, D. et al. 2002].

1.4 Antigenspezifischer Nachweis von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen

Antigenspezifische T-Zellen können prinzipiell auf zwei grundlegende Wege nachgewiesen werden. Hierzu gehören das Testen der Antigenspezifität oder der spezifischen Effektorfunktion, welche sich allerdings nur eingeschränkt bei der Untersuchung von naiven oder anergischen Zelle nutzen lässt. Als Zielzellen für *in vitro* Experimente können Zellen verwendet werden, die das Antigen von Interesse auf natürliche Weise oder nach Transfektion auf ihrer Oberfläche exprimieren. Neben dieser Art der Präsentation können die Zielzelle auch exogen mit Protein oder synthetischem Peptid beladen werden.

Eine Option des Nachweises der Spezifität von $CD8^+$ T-Zellen bietet die Färbung mittels Tetrameren, die in Abschnitt 3.5 genauer beschrieben wird. Die Effektorfunktionen können in Lyseexperimenten durch die spezifische Tötung von Zielzellen oder durch die Bestimmung der Proliferationsrate bei Antigenkontakt bestimmt werden. Weiter ist es möglich, die Synthese von Zytokinen nach Antigenkontakt z.B. durch Real-Time PCR, ELISA, ELISPOT oder intra- bzw. extrazelluläre Färbung mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen und anschließender FACS-Analyse zu bestimmen. Die funktionellen Experimente werden häufig mit limitierender Verdünnung (LDA) kombiniert. Diese Verfahren zur Bestimmung der Frequenz von antigenspezifischen T-Lymphozyten liefern jedoch nur indirekt Ergebnisse, da diese Zellen nur begrenzt teilungsfähig sind.

1.5 Tumorerkrankungen und das Immunsystem

Krebs ist mit etwa 25% heute die zweithäufigste Todesursache und in unserer Gesellschaft ein immer größer werdendes Problem. Leider fehlen aktuell noch wirksame Therapien, so dass meist nur die chirurgische Entfernung des entarteten Gewebes sowie eine Vor- und Nachbehandlung mit Chemo- und Strahlentherapie bleiben. Trotzt der Innovationen auf diesen Gebieten der letzten Jahren sind die Therapien meist mit schweren Nebenwirkungen und einer Reduktion der Lebensqualität vieler Patienten verbunden. Darüber hinaus sind sie bei bestimmten Tumorarten nur begrenzt wirksam, was die Entwicklung neuer Therapieansätze notwendig macht.

1.5.1 Tumore und Antigene

Der vielschichtige Prozess der malignen Transformation ist eine Folge von Mutationen. Diese müssen in Tumorsuppressor-Genen, Transkriptionsregulatoren, Proto-Onkogenen und weiteren Genen, die für die Regulation von Proliferation und dem Überleben der Zelle notwendig sind, stattfinden. Hierbei kommt es zu einer breiten Änderung der intrazellulären Proteine [Fearon, E.R. et al. 1990]. Die Proteome einer gesunden Zelle und einer Tumorzelle unterscheiden sich daher voneinander. Die veränderten Proteine, welche immunogene Determinanten hervorbringen, werden als Tumorantigene bezeichnet. Teile dieser Tumorantigene können dann

über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Tumorantigene lassen sich in verschiedene Klassen unterteilen [Stevanovic, S.2002].

Tabelle 4 Klassen der Tumorassoziierten-Antigene (TAA) mit Beispielen
Modifiziert nach [Jaeger, E. et al. 2003].

Klasse der Antigene	Beispiele
Differenzierungsantigene	MelanA / MART-1, Tyrosinase, gp100, CEA, NY-BR-1, rab38
Überexprimierte Antigene	Her2/neu, p53, MUC-1
Cancer Testis Antigene	MAGE, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, SSX
Punktmutationen	β-Catenin, MUM-q, CDK-4, p53, ras
Virale Antigene	HPV (E16, E17), EBV (LMP1, LMP2), HTLV-1

Differenzierungsantigene und *Cancer Testis* Antigene können von Normal- und Tumorgewebe exprimiert werden. *Cancer Testis* Antigene werden normalerweise nur von testikulären Keimzellen oder plazentaren Trophoplasten exprimiert. Da diese Zellen keine MHC Klasse I-Moleküle exprimieren, kommt es nicht zu Entstehung von antigenen Peptiden, was diese daher tumorspezifisch macht. Im Gegensatz hierzu werden Differenzierungsantigene auch auf Zellen des normalen Gewebes präsentiert, was den Einsatz im in der Immuntherapie unter der Vermeidung einer Autoimmunreaktion schwierig macht. Diese Problematik findet sich auch bei den überexprimierten Antigenen. Diese Proteine werden zwar von Tumorzellen in höherem Maße produziert und präsentiert, finden sich jedoch auch auf normalen Zellen. Da schon eine geringe Menge eines Antigens ausreichen kann um eine Immunreaktion auszulösen, können auch hier Autoimmunreaktionen bei der Verwendung solcher Antigene in der Therapie von Krebspatienten nicht ausgeschlossen werden. Mutationen in bestimmten Genen wie z.B. von *ras* können zu Krebs führen. Weiter werden auch Infektionen mit verschiedenen Viren, wie z.B. dem Epstein-Barr (EBV) oder humanen Papillomavirus (HPV) mit Entstehung von Tumoren assoziiert. Daher sind auch Proteine der beiden zuletzt genannten Gruppen als mögliche TAAs von wissenschaftlichem Interesse.

Die Induktion einer Immunreaktion gegen den Tumor durch Impfung ist eines der Ziele der experimentellen Immuntherapie. Hierbei soll dem Immunsystem der Unterschied zwischen wirklichem „Selbst“ und abnormalem „Selbst“ des Tumors gelehrt werden [Coulie, P.G. et al. 1994; Ehrlich, P. et al. 1956].

Bei vielen der bekannten Tumorantigene handelt es sich lediglich um angehäufte, also überexprimierte Produkte des Zellstoffwechsels und nicht um mutierte Proteine. Wegen der schon beschriebenen thymischen Selektion, in der das Immunsystem auf das Unterscheiden zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ geprägt wurde, besitzen diese Antigene nur eine geringe

Immunogenität. Dies hat eine nur unzureichende Aktivierung des Immunsystems zur Folge, da die überexprimierten Proteine als körpereigene erkannt werden.

1.5.2 Tumorerkennung durch das Immunsystem

Das Immunsystem ist prinzipiell in der Lage, diese Tumorantigene zu erkennen [Itoh, K.1987; Rosenberg, S.A. et al. 1988; Rosenberg, S.A. et al. 1994; van der Bruggen, P. et al. 1991]. Studien mit immundeprimierten Mäusen zeigten häufig keine erhöhte Tumorinzidenz [Stutman, O.1975]. Aus Ergebnissen dieser Art wurde gefolgert, dass es wohl keine tumorspezifischen Abwehrmechanismen gibt. Jedoch konnte in weiteren Tiermodellen eine Immunogenität von Tumoren gezeigt werden. Hierbei wurde kein Wachstum von implantierten Tumoren in den Mäusen beobachtet, welche zuvor mit Tumorzellen immunisiert wurden. In diesen Experimenten konnte auch eine Vermehrung von tumorspezifischen T-Zellen nachgewiesen werden [Klein, G. et al. 1960; Prehn, R.T. et al. 1957]. Bei der Untersuchung von Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL) konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen auch von humanen Immunzellen erkannt und zerstört werden können [Itoh, K.1987; Lee, P.P. et al. 1999; Topalian, S.L. et al. 1989]. Wie berichtet wurde, existieren in der Peripherie von Melanompatienten T-Zellen, die auch autologe Tumorzellen erkennen und lysieren können [Valmori, D. et al. 2002]. Es kommt somit nicht immer zur effizienten Eliminierung der entarteten Zellen *in vivo*, auch wenn dieses *in vitro* möglich ist.

Die Anergie und Inhibition von Effektorzellen können verschiedene Ursachen haben. So ist bekannt, dass sowohl in weiter differenzierten murinen, aber auch humanen Colonkarzinomen die Expression von Granzym B und der ζ-Kette des TCR herunterreguliert sind [Bronstein-Sitton, N. et al. 2003; Nakagomi, H. et al. 1993]. Werden isolierte TILs zusammen mit IL-2 inkubiert ,stellt sich nach kurzer Zeit jedoch wieder eine typische Expression der ζ-Kette ein [Nakagomi, H. et al. 1993; Rabinowich, H. et al. 1996]. Weiter wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass auch die Signaltransduktion von IL-2 und seinem Rezeptor CD25 gestört sein kann, was sich in einer reduzierte Expression von CD25 auf T-Zellen widerspiegeln kann [Chiou, S.H. et al. 2005; Sheu, B.C. et al. 1997].

Das unkontrollierte Wachstum und die Metastasierung von Tumorzellen ist offensichtlich stark von den Mechanismen der Immunüberwachung (*Immune Surveillance*) abhängig [Burnet, F.M.2008].

1.5.3 Tumorescape

Es gibt verschiedene Mechanismen auf Seiten des Tumors, die es ihm ermöglichen, sich dem Immunsystem zu entziehen. Die Theorie der Stromabarriere ist eine Möglichkeit des Tumors dem Immunsystem zu entgehen [Spiotto, M.T. et al. 2002]. Hierbei gibt es eine der Basalmembran ähnliche Struktur, die den Tumor umgibt, und so die Infiltration

immunkompetenter Zellen verhindert [Buckanovich, R.J. et al. 2008; Menon, A.G. et al. 2003; Valmori, D. et al. 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Expression des Endothelin B Rezeptors (ET_BR) im Blutgefäßsystem des Tumors von Patienten mit Ovarialkarzinom die Infiltration durch Lymphozyten vermindert oder sogar völlig unterdrückt [Buckanovich, R.J. et al. 2008]. Im Gegensatz hierzu konnte in anderen Studien gezeigt werden, das dieses Stroma bestimmte Oberflächenmarker und Zytokine besitzt, welche eine verstärkte Infiltration von Lymphozyten in das Tumorgewebe erlauben würden. Zu diesen Stoffen zählen der *Tumor Necrosis Factor Superfamily* wie TNFSF-14 [Yu, P. et al. 2004] oder das Glykoprotein gp33 [Spiotto, M.T. et al. 2005].

Bei Tumorzellen handelt es sich um entartete Zellen des Organismus, d.h. sie sind also körpereigenen Ursprungs. Das Genom von Tumorzellen ist aus verschiedenen Gründen mutiert, jedoch ähneln die Zellen meist noch gesunden und werden daher durch das Immunsystem nicht als fremd erkannt. Das generelle Erkennen von malignen Zellen durch das Immunsystem setzt weiter voraus, dass auf deren Zelloberfläche immunogene Determinanten vorhanden sein müssen. Aufgrund der starken genetischen Veränderungen in einer Tumorzelle verändern sich auch deren Oberflächenstrukturen ständig. So kann es zu der Auslöschung einer bereits vorhandenen Immunantwort kommen [Boon, T. et al. 1994]. Einige Tumore reduzieren auch die Präsentation von TAA, indem sie die Expression der HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche beeinflussen. Durch den Verlust von HLA-Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen oder der TAAs selbst bleibt dann auch die Präsentation von Antigenen und somit eine Aktivierung der T-Zellen aus [Ferrone, S. et al. 1995; Jager, E. et al. 1997; Yee, C. et al. 2000].

Es konnte auch gezeigt werden, dass Tumore die Expression von kostimulatorischen Molekülen verlieren und so dem Immunsystem entgehen, da mögliche reaktive T-Lymphozyten nicht aktiviert werden können [Chiou, S.H. et al. 2005; Harding, F.A. et al. 1992]. Es kommt weiter vor, dass sie weiter in der Lage auch das Reifungspotential von DCs beeinträchtigen [Gabrilovich, D. et al. 1998; Ishida, T. et al. 1998; Shurin, M.R. et al. 2002].

Die Deletion von Immunzellen kann durch Induktion von Apoptose zustande kommen [Hoffmann, T.K. et al. 2002]. Es wurde diskutiert, dass FasL von Tumorzellen exprimiert wird, was zusammen mit der dauerhaften Aktivierung der Immunzellen *Activation Induced Cell Death* (AICD) induzieren kann [Chiou, S.H. et al. 2005].

Tumorzellen können, wie berichtet wurde, ihre Umgebung über ein bestimmtes Zytokinmilieu mit Stoffen wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) [Gabrilovich, D.I. et al. 1996], *Tumor Growth Factor-*β (TGF-β) [Tada, T. et al. 1991] oder Interleukin-10 [Elgert, K.D. et al. 1998] beeinflussen. Dieses veränderte Chemokinmilieu im Bereich des Tumors kann Anergie und AICD der infiltrierenden Lymphozyten verursachen. So machen sich Tumore, wie Studien zeigen konnten, regulatorische T-Zellen (Tregs) oder *Myelid-Derived-Suppressor-Cells* (MDSC) zu

Nutze, um dem Immunsystem auszuweichen [Sutmuller, R.P. et al. 2001; van Elsas, A. et al. 2001]. Es wurde gezeigt, dass das von Krebszellen ausschütten TGF-β eine vermehrte Infiltration von regulatorischen T-Zellen in den Tumor zur Folge haben kann [Sheu, B.C. et al. 2001]. So berichteten verschiedene Gruppen über Patienten mit Pankreas- Brust-, Lungen-, Magen-, Haut- und Nierenkrebs mit einer erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen in der Peripherie aber auch im Bereich des Tumors [Cesana, G.C. et al. 2006; Griffiths, R.W. et al. 2007; Ichihara, F. et al. 2003; Liyanage, U.K. et al. 2002; Wolf, A.M. et al. 2003]. Auch bei der Untersuchung von PBMCs von RCC- und Melanom-Patienten konnte nach der Behandlung mit hohen IL-2-Dosen ein erhöhter Anteil an Tregs in den PBMCs detektiert werden [Ahmadzadeh, M. et al. 2006; Cesana, G.C. et al. 2006].

Durch den erhöhten Anteil an regulatorischen Zellen kommt es nicht nur zu einer Inhibition von Immunzellen direkten in der Umgebung des Tumors, sondern auch in den angrenzenden Lymphknoten, wodurch eine Immunantwort weiter reduziert wird [Jandus, C. et al. 2008; Siddiqui, S.A. et al. 2007]. So wurde auch über T-Zellen aus dem Bereich des Tumors oder von Tumor-benachbarten Lymphknoten berichtet, die nicht über dieses Potential zur Lyse von Tumorzellen verfügen zu scheinen [Zippelius, A. et al. 2004]. So sind beispielsweise T-Lymphozyten aus Melanom-Patienten bekannt, die spezifisch für Melanom-TAA sind, jedoch durch Antigenkontakt nicht aktiviert werden und daher keine Zytokine produzieren oder Tumorzellen lysieren [Lee, P.P. et al. 1999]. Das verstärkte Auftreten von Tregs in Krebspatienten kann sich daher negativ auf deren Überlebensprognose auswirken, wie verschiedene Untersuchungsergebnisse in der Vergangenheit zeigen konnten [Griffiths, R.W. et al. 2007; Sasada, T. et al. 2003; Siddiqui, S.A. et al. 2007].

T-Zellen in Tumorgewebe tragen mehr NK-Zell assoziierte Oberflächenmoleküle als in der Peripherie. Hierbei handelt es sich häufig um inhibitorisch wirkende Marker wie z.B. CD158b oder CD94 [Guerra, N. et al. 2000; Sheu, B.C. et al. 2005; Speiser, D.E. et al. 1997]. Wie gezeigt werden konnte, ist es möglich diesen inhibitorischen Einfluss im Falle von CD158b durch blockierende Antikörper zu eliminieren und die Effektorfunktionen so wieder herzustellen [Chiou, S.H. et al. 2005; Guerra, N. et al. 2000].

Es kommt dennoch in Patienten, wie bereits beschrieben, immer wieder vereinzelt zu Remissionen des Tumors. Dies kann mit auf das Einwirken des Immunsystems gegen den Tumor zurückgeführt werden. Die Infiltration durch das Immunsystem, speziell durch T-Zellen, wirkt sich meist auch positiv auf die Überlebensdauer der Patienten aus. So zeigten Untersuchungen von Melanom-, CRC- und Ovarialkarzinom-Patienten eine gesteigerte 5-Jahres Überlebensrate (von 30% auf 73% in CRC und von 4.5% auf 38% in Ovarialkarzinom), wenn sich eine erhöhte Anzahl an T-Zellen im Gewebe des Tumors fanden [Couzin, J.2006; Zhang, L. et al. 2003]. Auch diese T-Zellen hatten den Phänotyp von zytotoxischen Effektor- oder Memoryzellen [Galon, J. et al. 2006; Pages, F. et al. 2005]. Da sowohl die erhöhte Produktion verschiedenen Zytokine,

als auch eine verminderte Metastasierung mit der erhöhten Überlebensrate bei diversen Krebserkrankungen korrelieren, stellt das Immunsystem einen guten Ansatz zur Therapie verschiedener Tumore da [Couzin, J.2006; Galon, J. et al. 2006; Pages, F. et al. 2005; Zhang, L. et al. 2003].

Die steten Veränderungen, denen die Tumorzellen unterliegen, wirken sich über die genetische Struktur auch auf das Proteom der Zellen aus. So kommt es zu einer sich veränderten Präsentation der unterschiedlichen Proteinfragmente. Durch die Auseinandersetzung des Tumors mit dem Immunsystem werden so Zellen gefördert, die von diesem nicht mehr erkannt werden können. Der Prozess dieser Selektion wird als Immunoediting [Dunn, G.P. et al. 2002] bezeichnet. Das Erhöhen und Aufrechterhalten der Immunogenität des Tumors kann aus diesem Grund ein Ziel der Immuntherapie sein.

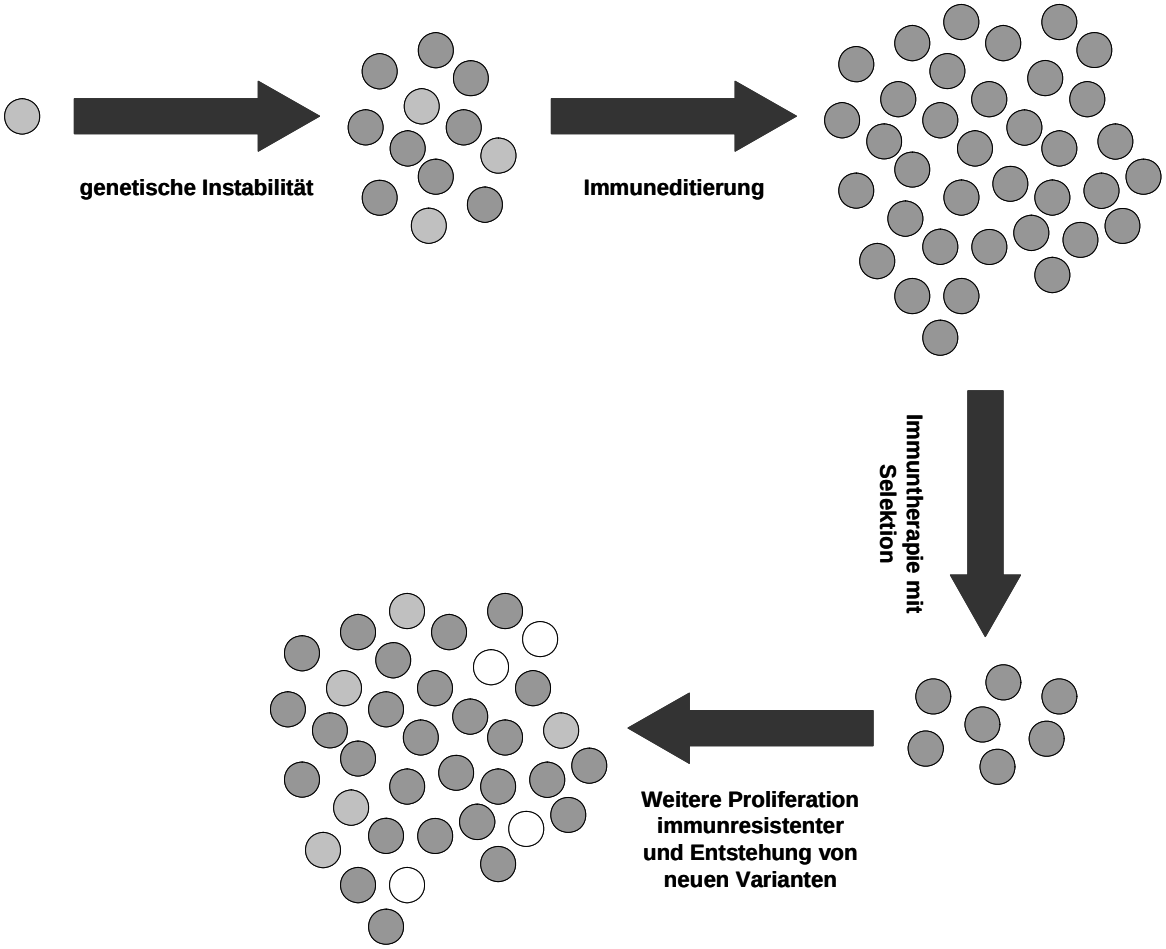


Abbildung 9 Hypothese des Immunoeditings

Die unkontrollierte Zellteilung führt zur genetischen Variabilität der Tumorzellen. Das Immunsystem eliminiert einige Klone, die nicht erkannten proliferieren jedoch weiter. Im Rahmen der Immuntherapie kommt es zur Verstärkung der Selektion, da hier nur Zellen eliminiert werden, die bestimmte Antigene tragen. Die verbleibenden Klone können dann ungehemmt weiter wachsen. Der Prozess der Resistenzbildung gegen Antibiotika ist zu diesem Mechanismus äquivalent. (Abb. Nach [Khong, H.T. et al. 2002]).

1.6 Möglichkeiten der Immuntherapie

1.6.1 Antigenunabhängige Immuntherapien

Die Behandlung von Tumoren durch die Aktivierung des Immunsystems begann schon früh. So beobachtete William Coley (1860-1918) bei Krebspatienten, die zusätzlich an einer bakteriellen Infektion litten, Remissionen solider Tumore [Coley, W.B.1893], was zu Therapieansätzen mit der Verwendung von Bakterien führte [Coley, W.B.1893]. Dieser Ansatz findet auch heute noch in einem Zweig der Immuntherapie Anwendung. Es wird hierbei in klinischen Studien, welche Dosen an Bakterien verwenden, untersucht welche Wege der Aktivierung des Immunsystems hierbei von zentraler Bedeutung sind [Engelhardt, R. et al. 1991; Fiberg, R.W. et al. 2004; Mackensen, A. et al. 1991]. Neben bakteriellen Endotoxinen kann auch mikrobielle DNA das Immunsystem durch spezielle Basensequenzen stimulieren (CpG Motive). Solche DNA stellte sich in Tiermodellen als potentes Adjuvanz zur Tumortherapie heraus, da es Immunantworten von T- und B-Zellen induzieren kann [Chu, R.S. et al. 1997; Wooldridge, J.E. et al. 1997]. Die Gründe hierfür liegen in der Stimulation von DCs über den *Toll-Like-Receptor-9* (TLR-9), welcher die CpG-Motive bindet und so die Aktivierung, Reifung und Wachstum dieser professionellen APCs bewirkt [Hartmann, G. et al. 1999]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden auch CpG-Sequenzen bereits in klinischen Studien als Adjuvanz zur Impftherapie verwendet [Speiser, D.E. et al. 2005].

Ein weiteres in der Immuntherapie verwendetes Adjuvanz ist *Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) zur Verstärkung der Antigen-spezifischen Immunantwort [Disis, M.L. et al. 1996]. Dieser Stoff ist sowohl bei der Differenzierung verschiedener Zellen, als auch der Entwicklung von Vorläuferzellen zu Makrophagen beteiligt und wirkt weiter auch auf bereits ausdifferenzierte Granulozyten und Makrophagen stimulierend ein [Hamilton, J.A. et al. 2004]. GM-CSF wird wegen dieser Eigenschaften heute in Vakzinierungsstudien eingesetzt, in denen $CD8^+$ CTLs durch DCs stimuliert und induziert werden sollen [Nencioni, A. et al. 2003].

Eine weitere Möglichkeit zur Stimulation des Immunsystems stellt der Einsatz von Zytokinen wie IL-2 [Belldegrun, A. et al. 1993; Bronte, V. et al. 1995; McLaughlin, J.P. et al. 1996; Nencioni, A. et al. 2003] oder IL-12 [Brunda, M.J. et al. 1993] dar. Diese Zytokine bewirken die Differenzierung von T-Zellen und stimulieren deren Proliferation. Es können diese Zytokine systemisch oder *in vitro* zur Stimulation von TILs, welche der Patient wieder reinfundiert bekommt, eingesetzt werden [Dudley, M.E. et al. 2002]. Jedoch berichten neuere Studien von besseren Erfolgen in diesem Arm der Immuntherapie durch die Stimulation von NK- und NKT-Zellen im Vergleich zu den zuvor genannten Behandlungsansätzen [Smyth, M.J. et al. 2005].

1.6.2 Antigenabhängige Immuntherapien

In Vakzinen gegen Krebs finden auch Antigen-spezifische Peptide verschiedener Tumor-assoziierte Antigene, wie z.B. des *Cancer-Testis Antigens* MAGE [van der Bruggen, P. et al. 1991] Verwendung. Bei dieser Form der Immuntherapie werden diese Peptide alleine [Jaeger, E. et al. 1996a], mit verschiedenen Adjuvatien oder in Kombination mit Zytokinen [Fallarino, F. et al. 1999; Jaeger, E. et al. 1996b; Jager, E. et al. 2000; Tuting, T. et al. 1998] den Krebspatienten appliziert. Neben diesen genannten Therapieansätzen, in welchen die Peptide alleine verabreicht werden, liegt ein weiteres Augenmerk auf der Nutzung von DCs als professionelle APCs. Diese Zellen sind in der Lage, T-Zellen zu primen und zu stimulieren. Sie werden daher mit Tumor-spezifischen Peptiden beladen oder Tumor-spezifischer RNA transfiziert [Brossart, P.2002] und den Patienten subkutan verabreicht. Diese Therapieformen führten in einigen Studien zur Regression des Tumors [Boon, T. et al. 2006; Nestle, F.O. et al. 1998; Rosenberg, S.A. et al. 1998; Thurner, B. et al. 1999; Wierecky, J. et al. 2006], die jedoch nicht von Dauer war. Für den begrenzten Erfolg dieser Ansätze können die Entstehung immunresistenter Mutanten oder eine unzureichende Aktivierung der T-Zellen verantwortlich sein [Yee, C. et al. 2000]. Bei der Vakzinierung mit Peptiden wurden zuweilen meist Tumor-spezifische MHC Klasse I-Epitope verwendet, wohingegen MHC Klasse II-Epitope in der Immuntherapie nur vereinzelt Anwendung fanden [Brossart, P. et al. 2000; Slingluff, C.L., Jr. et al. 2001].

Ein anderer Bereich der Immuntherapie liegt in der Verwendung von aktivierenden kostimulatorischen Signalen oder der Blockierung inhibitorischer Signale. Dies wird z.B. durch Verabreichung von Tumorzellen, die mit kostimulatorischen Molekülen transfiziert wurden [Allison, J.P. et al. 1995; Townsend, S.E. et al. 1993; Townsend, S.E. et al. 1994], in Kombination mit anti-CTLA-4 Antikörpern, welcher die inhibitorischen Signale reduzieren, erreicht [Blank, C. et al. 2005; Kwon, E.D. et al. 1997; Leach, D.R. et al. 1996; Mokyr, M.B. et al. 1998].

Neben den bisher genannten aktiven Immuntherapien gibt es auch passive Behandlungsansätze, welche meist auf der Verwendung von Antikörpern beruhen. So werden beispielsweise Antikörper wie Herceptin gegen Her2/neu-Rezeptoren bei Mammakarzinomen [McNeil, M.R.1998], Cetuximab einem EGFR-Antikörper bei soliden Tumoren [Huang, S.M. et al. 1999], CAMPATH1 gegen CD52 bei T- und B-Zelllymphomen [Hale, G. et al. 1983; Hertenstein, B. et al. 1995], oder Rituximab ebenso bei Lymphomen [Anderson, D.R. et al. 1997] zur Therapie eingesetzt.

Ein weiterer Ansatz ist der Versuch der Induktion von Tumorantigen-spezifischen T-Lymphozyten *in vivo* wird in anderen Ansätzen der Immuntherapie versucht, spezifische T-Zellen *in vitro* zu generieren. So konnten bereits funktionelle T-Zellen gegen MHC Klasse I- und Klasse II-Epitope

verschiedener Tumor-assoziierter Antigene induziert werden. Nach deren Amplifikation wurden diese Lymphozyten den Patienten im Rahmen eines adaptiven T-Zell-Transfers reinfundiert [Dudley, M.E. et al. 2002; Hunder, N.N. et al. 2008; Mackensen, A. et al. 2006; Mitchell, M.S. et al. 2002; Yee, C. et al. 2002]. Bei einigen Patienten konnten Regressionen und Remissionen der Tumore beobachtet werden [Dudley, M.E. et al. 2002; Hunder, N.N. et al. 2008; Mackensen, A. et al. 2006; Yee, C. et al. 2002], jedoch konnte auch die Entstehung von Autoimmunreaktionen beobachtet werden [Dudley, M.E. et al. 2002].

Um das volle Potential des Immunsystems für die Behandlung von Krebspatienten ausnutzen zu können, ist neben der Suche nach neuen Tumor-assoziierten Antigenen ein fortschreitendes Wissen zur Induktion und Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und der Umgehung von inhibitorischen Mechanismen in Krebspatienten notwendig.

2 Zielsetzung

Die Absolutzahlen der Personen mit Tumorerkrankungen sind in den vergangenen Jahren kontinuierlich gestiegen, was die Suche nach geeigneten Therapien stetig vorantreibt. Es ist in diesem Zusammenhang von größter Bedeutung, das Verständnis über die zellulären Vorgänge des Tumorwachstums weiter zu vertiefen. Die Forschung auf diesem Gebiet bietet somit eine notwendige Möglichkeit, neue Behandlungsmethoden zu testen und bestehende zu verbessern.

Das körpereigene Immunsystem mit seinen vielseitigen Facetten bietet eine Möglichkeit, Tumore effektiv bekämpfen zu können. Es wird bereits versucht, z.B. die zytotoxischen Eigenschaften von T-Zellen zu nutzen und diese gerichtet gegen Tumorzellen einzusetzen. Für einen solchen Therapieansatz sind ein umfangreiches Wissen und das Vorhandensein von speziellen Tumorantigenen notwendig. Damit einzelne Komponenten des Immunsystems gerichtet unterstützt oder manipuliert werden können, ist es essentiell, ein möglichst detailliertes Wissen über die Eigenschaften und Verhaltensweisen von beispielsweise T-Zellen zu besitzen.

Ziel dieser Arbeit war es, Lymphozyten von Patienten mit Tumorerkrankungen und gesunden Spendern zu charakterisieren.

Im ersten Teil der Arbeit sollten Zytokeratin 18-spezifischen T-Zellen in gesunden Individuen untersucht werden. In diesem Zusammenhang fand der bekannte Ligand ALLNIKVKL [365-373] (Ker1) [Weinschenk, T. et al. 2002] des Zytokeratin 18 Verwendung, um diese dysfunktionellen Zellen genauer zu charakterisieren. Zytokeratin 18 wird in verschiedenen Tumoren überexprimiert und findet als Tumormarker Verwendung.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Blutproben von RCC- und CRC-Patienten untersucht werden. Die hierfür verwendeten MHC-Klasse I und II-Peptide von TAA dienen zur Identifikation von spontanen Immunantworten im Bereich der T-Zellen.

Neben den beiden genannten Teilen der Arbeit stand im dritten Teil die phänotypische und funktionelle Charakterisierung der T-Zellen von RCC-Patienten im Vordergrund. In diesem Projekt sollten Lymphozyten des peripheren Blutes mit aus Tumorgewebe isolierten Zellen miteinander verglichen werden. Hierzu sind verschiedene Subpopulationen mittels Multicolor-FACS-Analyse charakterisiert worden. Weiter sollte diese Methode zur Bestimmung der funktionellen Eigenschaften dieser Zellen verwendet werden.

3 Theoretischer Hintergrund der Methoden

3.1 Isolierung von PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation

Bei PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) handelt es sich um Lymphozyten und Monozyten des peripheren Blutes. Bei dieser Art der Isolation der PBMCs werden weitere Bestandteile wie Thrombozyten, Erythrozyten und Granulozyten durch Zentrifugation über einen Stufengradienten weitgehend abgetrennt.

Verwendet wird entweder ein mit Gerinnungshemmer, wie EDTA, versetztes Blut, ein *Buffy Coat* (Lymphozyten-angereichertes Zellkonzentrat aus Blut) oder ein Leukaphereseprodukt (Lymphozyten-angereichertes Zellkonzentrat nach Dichte- oder Adhäsionsauftrennung). Nach dem Verdünnen der Zellsuspension wird Ficoll (LSM 1077, PAA) mit dieser überschichtet. Bei Ficoll handelt es sich um ein Gemisch aus iodhaltigem Metrizamid und dem Polysaccharid Ficoll, was zu einer Dichte von 1,077 g/ml führt. Die Zellgruppen werden während der Zentrifugation aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte von einander getrennt. In der entstehenden und leicht zu entfernenden Interphase befinden sich die PBMCs, während die polymorphkernigen Leukozyten und Erythrozyten pelletieren.

3.2 Isolation von Lymphozyten aus Tumorgewebe

Die Isolation von Lymphozyten aus Tumorgewebe kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. Die eine Vorgehensweise bedient sich eines Cocktails verschiedener Enzyme, wie z.B. DNase I, Aprotinin und Collagenase, in dem klein geschnittene Gewebestücke für eine bestimmte Zeit inkubiert werden. Hierbei soll die DNase I aus toten Zellen freigesetzte DNA beseitigen, um der Induktion von Apoptose entgegenzuwirken, und das zugegebene Aprotinin fungiert als Proteaseinhibitor. Durch die Collagenase wird die Gewebestruktur aufgebrochen, so dass die Lymphozyten in das Inkubationsmedium übergehen können.

Eine andere Art Lymphozyten aus Tumorgewebe zu isolieren, ist das mechanische Aufbrechen des Gewebes. Hierbei werden klein geschnittene Gewebestücke mit Hilfe z.B. der Medimachine™ (DAKO) und passender Einsätze, den Medicons (BD), zu einer Zellsuspension, welche die Lymphozyten enthält, aufgearbeitet. Nach diesem Arbeitsschritt und dem Passieren eines Nylonsiebes (BD) können die Zellen von Interesse dann, genau wie aus Blut, durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten TILs wurden nach der zweiten Methode isoliert. Der Grund hierfür wird in Abschnitt 7.4.1 dargestellt und diskutiert.

3.3 Rückfaltung von MHC Klasse I-Monomeren

Denaturierte Proteine können sich unter reduzierenden Bedingungen und bei passendem pH-Wert spontan in ihre natürliche Konformation zurückfalten. Hierbei können auch Proteinkomplexe entstehen, falls deren Untereinheiten vorhanden sind.

Um MHC-I-Peptid-Komplexe durch Rückfaltung herstellen zu können, benötigt man große Mengen an denaturierter schwerer Kette, β_2 Mikroglobulin und Peptid, da der Komplex nur in Anwesenheit aller drei Komponenten stabil vorliegen kann. Dieser Komplex ist in seiner fertig gefalteten Struktur dann sehr stabil. Ein Problem bei dieser Rückfaltung ist die Neigung der schweren MHC-Ketten Aggregate zu formen, welche dann aus der Lösung ausfallen. Um diesen Prozess unter Kontrolle zu halten, findet die Rückfaltung in einem argininhaltigen Puffer mit wenigen chaotropen Komponenten statt. Die benötigten proteinen Elemente für diese Reaktion werden in stark chaotropem, harnstoffhaltigem Puffer gelagert. Vor der Rückfaltung wird ein Azidpuffer mit einem pH-Wert von 4.2 zugegeben und die Proteinlösung dann in den sich rührenden Rückfaltungspuffer injiziert. Dies geschieht so schnell wie möglich, um eine Aggregation zu verhindern. Das Redox-Potential wird durch die Zugabe von reduziertem und oxidiertem Glutation eingestellt. Weiter erfolgt die Inhibition von Proteasen durch das Hinzufügen von PMSF, Leupeptin und Pepstatin. Die schwere MHC-Kette wird mehrmals zugegeben, um den Verlust durch Aggregatbildung zu kompensieren. Nach der Rückfaltung werden Proteine und Komplexe in einem Filtrationsschritt durch eine Membran zurückgehalten. Der Durchfluss enthält ausreichende Mengen an Peptid für die Durchführung einer weiteren Rückfaltung. Trotzdem wird in unserem System nur etwa 1% der ursprünglich eingesetzten Peptidmenge in dem MHC-I-Peptid-Komplex gebunden. Dieser Komplex wird von anderen Proteinen und Aggregaten durch eine FPLC-Separation getrennt.

3.4 Multimerisierung von MHC-I-Monomeren mittels Streptavidin

Streptavidin (aus *Streptomyces avidii*) und Avidin (aus dem Hühnerei) sind Proteine, die über je vier Bindungsstellen für Biotin verfügen. Die Bindungskonstante liegt hier bei 10^{15} mol^{-1} und ist damit eine der größten natürlich vorkommenden. Aufgrund dieser Begebenheiten ist es ein Leichtes, biotinylierte Proteine über Avidin oder Streptavidin als zentrales Molekül zu Tetrameren zu verbinden. Bei der Färbung von Zellen mit diesen Reagenzien kommt es jedoch auch zu unspezifischen Bindungen an die Zelloberfläche. Bei Streptavidin (60 kDa) sind diese geringerer, weshalb es in der Durchflusszytometrie bevorzugt wird und es als Fluoreszenz-Konjugat kommerziell erhältlich ist. Hierzu gehören u.a. die Konjugat mit R-Phykoerythrin (PE, 240 kDa, Extinktion 480 nm, Emission 575 nm) oder Allophycocyanin (APC, 104 kDa, Extinktion 650 nm, Emission 660 nm).

3.5 Färbung mit MHC-I-Tetrameren

Die Bindung des TCR von $CD8^+$ T-Zellen an den MHC-I-Peptid-Komplex wäre eine gute Grundlage, um die Frequenz von antigenspezifischen T-Zellen bestimmen zu können. Bei diesem Ansatz existiert jedoch das Problem der hohen Dissoziationsrate des MHC-I-Peptid-Komplex und des TCRs [Corr, M. et al. 1994; Matsui, K. et al. 1994].

Eine Lösung für dieses Problem ist die Bindung von mehreren TCRs an mehrere MHC-I-Peptid-Komplexe, was die Dissoziationsrate verringert und sich so zur Markierung von $CD8^+$ Zellen eignet [Altman, J.D. et al. 1996].

In der praktischen Anwendung benutzt man hierzu Tetramere aus MHC-I-Peptid-Komplexen. Einer dieser MHC-I-Peptid-Komplexe besteht aus einer rekombinant hergestellten schweren MHC-I-Kette, welche in Anwesenheit des zu bindenden Peptides zurückgefaltet wird. Anschließend wird der Komplex mit Hilfe des Enzyms Bir A und einer rekombinanten Signalsequenz biotiniliert. Die Biotinylierung ermöglicht in dem nun folgenden Schritt die Multimerisierung dieser Monomere. Hierzu werden die MHC-I-Peptid-Komplexe über einen Biotinrest an fluoreszentmarkiertes Streptavidin gebunden, wodurch letztlich Multimere (meist Tetramere) entstehen.

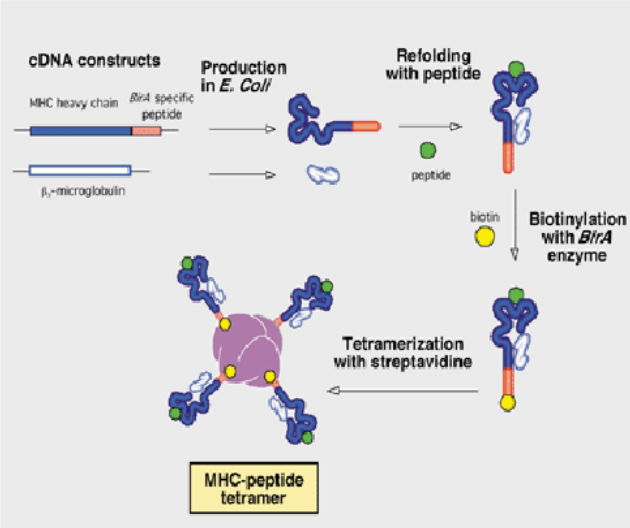


Abbildung 10 Herstellung von MHC-I-Tetrameren

[Lang, F. et al. 2001]

Die Bindung der MHC-I-Tetramere an $CD8^+$ Zellen ist hochspezifisch [Burrows, S.R. et al. 2000], jedoch auch sehr temperaturabhängig [Whelan, J.A. et al. 1999a]. So findet unter physiologischen Bedingungen die Internalisierung des Tetramers statt, wobei die Fluoreszenz intrazellulär zu beobachten ist [Whelan, J.A. et al. 1999b]. Die Bindung der Tetramere kann auch von anti-CD8 Antikörpern beeinflusst werden, was unter Umständen zu einer Verminderung oder sogar Verdrängung von bereits gebundenen Tetrameren führen kann [Daniels, M.A. et al. 2000; Denkberg, G. et al. 2001]. Bei der Durchführung ist daher darauf zu achten, welcher Typ (Klon und Isotyp) von anti-CD8 Antikörper verwendet wird und mit

welchem Fluorochrom dieser konjugiert ist. Gegebenfalls muss das Versuchsprotokoll dann abgeändert werden, damit eine ausreichende Bindung der Tetramere gewährleistet werden kann. Die Färbung von Zellen und deren durchflusszytometrische Analyse (siehe Abschnitt 3.6) ist eine sehr sensitive Nachweismethode, deren unteren Grenze bis 0.01% Tetramer positive unter den $CD8^+$-Zellen bei PBMCs reicht [He, X.S. et al. 1999]. Weitere Vorteile der Tetramermarkierung ist, dass gefärbte lebende Zellen mit FACS-Sorter [Altman, J.D. et al. 1996] aussortiert und zum Generieren von T-Zelllinien benutzt werden können [Nielsen, M.B. et al. 2000]. Weiter lässt sich diese Technik mit anderen Färbemethoden wie der Analyse von Oberflächenmarkern [Lee, P.P. et al. 1999] und intra- oder extrazelluläre Zytokinfärbungen [Appay, V. et al. 2000; Pittet, M.J. et al. 2001] kombinieren.

3.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden zuvor fluoreszent markierte Zellen aus einer Zellsuspension mit hoher Geschwindigkeit an einem oder mehreren Lasern vorbeigeführt (beim BD FACSCanto™II von Becton Dickinson: 488 nm Feststoff-, 635 nm NeHe- und 405 nm Dioden-Laser). Die dabei entstehende Lichtemission wird gemessen und mittels Photomultipliern als verschiedene optische Parameter bestimmt. Zu diesen Parametern gehören das Vorwärtsstreulicht (FSC), welches ein Maß für die relative Zellgröße darstellt, die Seitwärtsstreuung (SSC), die ein Maß für die relative Zellgranularität liefert, sowie die Fluoreszenzintensitäten für verschiedene Wellenlängen. Die Empfindlichkeit der Photomultiplier kann durch Änderung der Spannung an der Anode eingestellt werden. Da sich das Emissionslicht der verschiedenen Fluorochrome über ein gewisses Spektrum erstrecken und so mehrere Kanäle ansprechen können, ist eine Kompensation bei Mehrfachfärbungen notwendig. Diese kann in Form einer Einzelfärbung entweder mit antikörpermarkierten Zellen des Spenders oder Kügelchen (Beads) vorgenommen werden. Letztere bieten den Vorteil, eine genauere Kompensation auch von niederfrequenten Oberflächenmarkern sowie mit Tandemfarbstoffen konjugierten Antikörpern durchführen zu können.

Die neueren Generationen der Mess- und Analysesoftware, zu denen auch die BD FACSDiva™ und FlowJo 7.2 gehören, verwenden digitale Daten. Diese werden im Falle der BD FACSDiva™ auf einer Skala mit 18 Bit (262 144 Kanäle) dargestellt. Es findet keine analoge Umwandlung der Messwerte von linear in logarhytmisch statt. Die Transformation geschieht mit Hilfe der „*log look-up table*“ die neben nah-idealen mathematischen Log-Werten auch eine bessere Linearität, sowie das einfache Umschalten zwischen linearer und logarhytmischer Darstellung erlaubt. Die Skalierung dieser digitalen Messewerte kann daher auch negative Werte annehmen und wird als biexponentielle Darstellung wiedergegeben [BD Biosciences2007].

Die Färbung mehrerer extra- und intrazellulärer Marker und Zytokine wird auch „*Multicolorstaining*“ genannt. Sie ermöglicht eine differenzierte Charakterisierung und Beschreibung der Eigenschaften von untersuchten Zellen. Die Etablierung eines Multicolorstainings ist zeit- und kostenintensiv, da die verwendeten Reagenzien immer neu aufeinander abgestimmt werden müssen. So ist es von Bedeutung, auf die Konzentration, den Isotyp und Klon der verwendeten Antikörper zu achten. Bei der Planung einer Antikörperkombination für ein Multicolorstaining sollte z.B. vermieden werden, Marker mit benachbarten Fluoreszenzemissions-Wellenlängen gemeinsam auf einer Zelle zu färben. Weiter muss entschieden werden, welcher Marker durch welches Fluorochrom gefärbt werden soll, da bei ungünstiger Wahl z.B. intermediäre Expressionen nicht detektiert werden können.

3.7 ELISPOT

Diese Technik ermöglicht die Detektion der Zytokinsekretion (z.B. IFNγ) einzelner Zellen und erlaubt so einen hochspezifischen und quantitativen Nachweis von T-Zellantworten gegen ein definiertes Antigen. Das Prinzip des ELISPOTs (*Enzyme Linked Immunospot Assay*) wurde 1983 von zwei unabhängigen Gruppen entwickelt [Czerkinsky, C.C. et al. 1983; Sedgwick, J.D. et al. 1983].

Mit dem ELISPOT können *ex vivo* Analysen durchgeführt werden. Im Zusammenhang mit der niedrigen Detektionsgrenze von 1 / 10^5 PBMCs ist es so möglich Untersuchungen von Zellen durchzuführen, die *in vitro* nicht expandierbar sind [Scheibenbogen, C. et al. 2000].

Das Prinzip des IFNγ-ELISPOTs basiert auf der spezifischen Erkennung des sekretierten Zytokins durch immobilisierte Antikörper.

Bei der Durchführung eines ELISPOTS kommen Platten zum Einsatz, die einen Boden bestehend aus einer Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid-Membran besitzen. Diese wurden ursprünglich für die Sterilfiltration entwickelt. Die Verwendung einer Nitrozellulosemembran geht auf die Analogie zum Western Blot zurück, bei dem diese Verwendung findet.

Die Membran der ELISPOT-Platte wird zunächst mit einem Antikörper gegen IFNγ beschichtet. Nachdem die zu untersuchenden Zellen in die Platte gegeben wurden, können diese z.B. durch Peptidstimulation zur Sekretion von Zytokinen angeregt werden. Bei der Verwendung von PBMCs ist die alleinige Zugabe von Peptiden theoretisch ausreichend, da die in der Zellsuspension enthaltenen Monozyten deren Präsentation über MHC-Moleküle übernehmen können [Treves, A.J. et al. 1981]. Die weitere Zugabe von antigenpräsentierenden Zellen wie DCs, T2 oder K562-A2 Tumorzellen gewährleistet eine verbesserte Präsentation der Peptide [Britten, C.M. et al. 2002; Pass, H.A. et al. 1998].

Während der Inkubation über mehrere Stunden bei 37°C kommt es zu einer Aktivierung der T-Zellen, die das zugegeben Peptid spezifisch erkennen. Diese Zellen sezernieren u.a. IFNγ, welches an die immobilisierten Antikörper auf der Membran der Platte bindet. Nach dem Entfernen der Zellen wird ein zweiter, ebenfalls gegen IFNγ gerichteter Antikörper zugegeben, der enzymgekoppelt ist. Dieses Enzym katalysiert eine Farbreaktion (BCIP und NBT) an den Stellen des Plattenbodens, wo eine Bindung des ausgeschütteten Zytokins IFNγ stattfand. Hier kommt es durch Prezipitation des Substrates zur Ausbildung eines Fleckes (*Spots*), der einer aktivierten, IFNγ produzierenden Zelle entspricht. Das Ermitteln der Frequenz dieser spezifischen Zellen findet durch die Auszählung mittels eines Mikroskops oder eines automatisierten Lesegerätes statt.

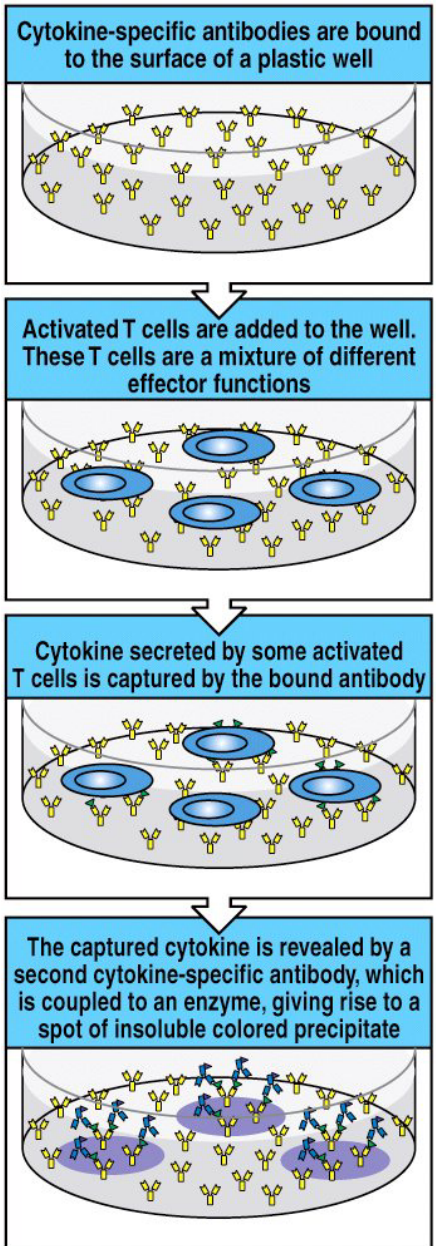


Abbildung 11 Schematische Darstellung des Prinzips eines ELISPOT

[Janeway, C.A. et al. 2005]

4 Material und Methoden

4.1 Ethikanträge für die Arbeit mit Patientenproben

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proben der Nierenzellkarzinom- und Colorektalkarzinom-Patienten wurden durch die Ethikanträge von der Tübinger Ethikkomission genehmigt.

„Tumorspezifische MHC-Liganden in gastrointestinalen Tumoren und Nierenzellkarzinomen“

Nummern der Ethikanträge: [272/2000] und [424/2007B02]

4.2 Allgemein verwendete Materialien

37°C Inkubator für Gewebekulturen (Labotect 3250) mit 5% CO_2 Begasung (Messer)

Dampfsterilisator (KSG 113)

Dampfsterilisator (Sauter 11-6-9 HS1-FD)

Densitometer GS-700 mit Software Molecular Analyst 1.4 (Biorad)

Durchflusszytometer FACSCanto™ II mit der Software Diva™ (Becton Dickinson)

Durchflusszytometer FACSCalibur™ mit Software Cell Quest™ oder Cell Quest Pro™ (Becton Dickinson)

ELISPOT-Reader Immunospot Series 5 (C.T.L.-Europe)

FlowJo 7.2 zur Analyse von FACS-Daten (Tree Star)

FPLC System ÄKTA prime (Amersham Biosciences)

Gammazelle

GraphPad Prism 4.0

Lichtmikroskop (Leica DMIL)

Micro Beta Counter 1450 Plus (Perkin Elmer)

Perfusor (Stoelting 100)

pH-Meter (Knick 765)

Rotator mit Drehteller und Klammern (Bachofer)

Sterilbank (Technoflow Integra Biosciences)

SIGMAPlot 2001

SIGMAStat

Tischkühlzentrifuge (Heraeus Biofuge fresco)

Tischkühlzentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0 und Heraeus Megafuge 2.0)

Vortexer (MS 1 IKA-Works, Inc.)

Wasserbad (Thermomix BM-S, Braun Biotech)

Zählkammer (Neubauer)

Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus mit Rotor SS 34 und SLA 3000

Zell-Harvester ICH-110-96 (Inotech Dottikon)

4.3 Isolation von PBMCs aus peripherem Blut

Materialien:

LSM1077 (PAA)

PBS

50 ml-Röhrchen (BD Falcon™)

250 ml-Gewebekulturflaschen (Greiner bio-one, 75 cm^2)

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Das heparinisierte periphere Blut wurde mit PBS 1:2 verdünnt. In 50 ml-Röhrchen wurden jeweils 10 ml LSM 1077 vorgelegt und dann mit bis zu 35 ml verdünntem Blut vorsichtig überschichtet. Die anschließende Zentrifugation fand bei 820 g für 20 min bei 20°C (2000 rpm in Megafuge 2.0) mit ausgeschalteter Bremse statt. Nach dem Abnehmen etwa eines Drittels der oberen gelblichen Phase, welche aus verdünntem Plasma und Thrombozyten besteht, wurde die weißliche Interphase vorsichtig abpipettiert. Nach zwei Waschschritten (8 min / 440 g bei 20°C, 1400 rpm in Megafuge 2.0), wobei die 50 ml-Röhrchen jeweils auf 45 ml mit PBS aufgefüllt wurden, sind die resuspendierten Pellets in 40 ml PBS vereinigt und die Gesamtzellzahl der PBMCs bestimmt worden. Die isolierten PBMCs wurden direkt weiter verwendet oder eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.4 Isolation von Lymphozyten aus Tumorgewebe

4.4.1 Mechanische Isolation von Lymphozyten aus Tumorgewebe

Materialien:

Medimachine™ (DAKO)

Medicon™ Ø 50 µm (BD)

RPMI 1640 mit L-Glutamine 25 mM Hepes (Lonza), 10% FCS (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza) und 50 µg/ml Gentamycin (Lonza)

Nylonsieb Ø 70 µm (BD Falcon™)

LSM 1077 (PAA)

PBS

50 ml-Röhrchen (BD Falcon™)

2 ml-Spritze (BD)

Durchführung:

Der Arbeitsschritt mit der Medimachine™ wurde unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle folgenden Schritte fanden unter sterilen Bedingungen statt.

Das frische Tumorgewebe wurde zunächst in kleine Stücke von etwa 8 mm^3 geschnitten und dann, Portionsweise in das zuvor mit Medium angefeuchtete Medicon™ gegeben. Nach der Zugabe von 1 ml Medium in das Medicon™ wurden die Proben für 30-40 Sekunden durch die Medimachine™ bearbeitet, um das Gewebe aufzubrechen. Anschließen konnte die entstandene Zellsuspension Mittels einer Spritze entnommen und das Medicon™ nochmals mit 2 ml Medium ausgespült werden.

Die Zellsuspension passierte, unter sterilen Bedingungen und vor der Isolation der Lymphozyten, ein Nylonsieb, um verbliebene Gewebereste und Zellaggregate zu entfernen. Die Lymphozyten wurden nun aus der so vorbereiteten Zellsuspension durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Vorgehensweise entsprach hierbei der von verdünntem peripherem Blut. Die so isolierten Lymphozyten wurden direkt eingefroren und bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.4.2 Enzymatische Isolation von Lymphozyten aus Tumorgewebe

Materialien:

RPMI 1640 mit L-Glutamin 25 mM Hepes (Lonza), 10% FCS (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza) und 50 µg/ml Gentamycin (Lonza)

DNase I (SIGMA)

Aprotinin (Roche)

Collagenase V (Gibco)

Nylonsieb Ø 70 µm (BD Falcon™)

LSM 1077 (PAA)

PBS

50 ml-Röhrchen (BD Falcon™)

Durchführung:

Der Arbeitsschritt wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Das frische Tumorgewebe wurde zunächst in ca. 5 ml Medium mit Hilfe eines Skalpells in kleine Stücke von etwa 1-3 mm^3 geschnitten und dann in ein 50 ml-Röhrchen transferiert. Nach der Zugabe von 35 ml Verdaumedium (Medium mit 3 µg/ml DNase I, 1 µg/ml Aprotinin und 20 U/ml Collagenase V) wurde das Röhrchen bei 37°C für 16-18 Stunden rotierend inkubiert.

Nach dem Verdau wurde das Röhrchen für 3 min senkrecht gestellt, damit sich verbliebene Gewebestücke absetzten konnten.

Die Zellsuspension passierte vor der Isolation der Lymphozyten, ein Nylonsieb, um etwaige Geweberest und Zellaggregate zu entfernen. Die Lymphozyten wurden nun durch Dichtegradientenzentrifugation aus der so vorbereiteten Zellsuspension isoliert. Die Vorgehensweise entsprach hierbei der von verdünntem peripherem Blut. Die so isolierten Lymphozyten wurden direkt eingefroren und bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.5 Einfrieren und Auftauen von Lymphozyten

Materialien:

Einfrierbox (Nalgene Cryo Freezing Container) mit Isopropanol (Merck)

2 ml Cryoröhrchen (Cellstar)

FCS (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C) mit 10% DMSO (Merck), sterilfiltriert

IMDM (Lonza) mit 10% HS (CC pro, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza)und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

IMDM (Lonza) mit 1% Pen/Strep (Lonza) und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

DNase I (SIGMA)

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt

Vor dem Einfrieren wurden die Lymphozyten gewaschen und bei 355 g für 8 min zentrifugiert (1300 rpm in Megafuge 2.0). Anschließend wurde das Zellpellet zügig in 1 ml je Cryoröhrchen kaltem FCS/10% DMSO resuspendiert, sofort in eine vorgekühlte Einfrierbox gestellt und bei -80°C eingefroren. Gelagert wurden die so eingefrorenen Lymphozyten bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff.

Um die Lymphozyten aufzutauen, wurde das Cryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C etwa bis zur Hälfte aufgetaut und dann sofort in 8 ml IMDM mit 2.5% HS, 1% Pen/Strep, 50 µM β-Mercaptoethanol und 3 µg/ml DNase I überführt. Nach der folgenden Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen ein weiteres Mal mit 10 ml IMDM 1% Pen/Strep, 50 µM β-Mercaptoethanol gewaschen. Nach dem Resuspendieren in 10 ml IMDM mit 10% HS, 1% Pen/Strep, 50 µM β-Mercaptoethanol dann die Lebendzelldichte bestimmt.

4.6 Bestimmung der Lebendzelldichte

Materialien:

Trypanblaulösung: 0.02% Trypanblau (Merck) und 0.02% Natriumazid (Merck) in H_2O

Durchführung:

Die Ränder der Neubauer-Zählkammer wurde leicht angefeuchtet und dann das Deckglas durch leichtes Andrücken fixiert, wobei Newtonsche Ringe sichtbar wurden. Falls Kondensationswasser eingeschlossen war wurde dieses mit Hilfe von Druckluft entfernt.

Die Zellsuspension wurde 1:2 mit Trypanblaulösung gemischt (je 30 µl) und dann in den Zwischenraum von Deckglas und Zählkammerboden pipettiert. Die Dichte der ungefärbten, vitalen Zellen konnte dann unter dem Lichtmikroskop mittels folgender Formel ermittelt:

Zelldichte der Suspension = Zellzahl in 1 Großquadrat x 2 (Verdünnung) x 10^4 Zellen/ml

4.7 Rückfaltung von MHC Klasse I-Monomeren

Material:

reduziertes Glutation (SIGMA)

oxidiertes Glutation (SIGMA)

PMSF (1000x): Methanol (Merck) mit 200 mM PMSF

Rückfaltungspuffer, pH 7.76 bei 10°C, bei 121°C sterilisiert: ddH_2O mit 6.97% l-Arginin (SIGMA), 2.38% HEPES (Roth), 2 mM EDTA (Roth)

DMSO (Merck)

Peptid

Schwere MHC-Kette von HLA-A*0201

Leichte MHC-Kette, β_2-Mikroglobulin

Ureapuffer: ddH_2O mit 8 M Urea (UBC), 10 mM Tris pH 8.0 (SIGMA), 10 mM NaH_2PO_4 (Merck), 0.1 mM EDTA (Roth)

Injektionspuffer, pH 4.2: ddH_2O mit 3 M Guaninchlorid (Fluka), 10 mM Natriumacetat (SIGMA), 10 mM EDTA (Roth)

Vakuumfilter 250 ml (Millipore)

Rührzelle NMWL 10.000 (Millipore)

Filtermembran NMWL 30.000 (Millipore)

Amicon Ultra-15 (Millipore)

Leupeptin (Roche)

Pepstatin 1000x: Methanol (Merck) mit 0.07% Pepstatin

Tris (SIGMA)

ATP (SIGMA)

D-Biotin (SIGMA)

TBS, pH 8.0, bei 121°C sterilisiert: 20 mM Tris mit 150 mM NaCl (Merck)

TBSA: TBS mit 0.03% Natriumazid (Merck)

Durchführung:

Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

Es wurden 385 mg reduziertes und 77.5 mg oxidiertes Glutation, 250 µl PMSF (1000x), 2.5-7.5 mg/ml des gewünschten Peptides (10 mg/ml in DMSO) in 250 ml Rückfaltungspuffer gelöst. Danach wurden 8 mg schwere MHC-Kette (20 mg/ml in 8 M Ureapuffer) in 700 µl Injektionspuffer aufgenommen und mit Hilfe einer Spritze und einer 26 G Nadel in den sich rührenden Rückfaltungspuffer gegeben. Die gleiche Vorgehensweise wurde im Anschluss mit 7 mg der leichten MHC-Kette, in 780 µl Injektionspuffer, durchgeführt. Die Lösung wurde nun für etwa 12 Stunden bei 10°C schüttelnd inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurden noch 2x je 8 mg schwere MHC-Kette zugegeben. Dies geschah in einem Abstand von 12 Stunden.

Jetzt wurde die Lösung mit einem 0.22 µm Vakuumfilter filtriert und anschließend in eine Rührzelle gegeben und mit 60 psi unter Druck gesetzt. Zuvor wurde die Rührzelle mit 200 ml ddH_2O gespült. Das Permeat wurde aufgesammelt und später weiter verwendet (siehe unten). Das Retentat wurde auf ein Volumen von etwa 25 ml mit Permeat aufkonzentriert. Die Membran der Rührzelle wurde in einer Petrischale bis zu ihrer späteren Verwendung in TBSA gelagert.

Zu den aufgesammelten Permeaten wurden 250 µl PMSF (1000x) gegeben und erneut 8 mg schwere MHC-Kette und 7 mg leichte MHC-Kette, wie bereits beschrieben, zugegeben. Die Inkubationszeit betrug anschließend wieder 12 Stunden.

Nach dieser Inkubation wurden noch 2x je 8 mg schwere MHC-Kette zugegeben. Dies geschah in einem Abstand von 12 Stunden.

Das Retentat und die neue Lösung wurden jetzt zusammen durch einen 0.22 µm Vakuumfilter filtriert. Das Filtrat wurde mit einer, wie bereits beschrieben, vorbereiteten Rührzelle auf ein Volumen von 25 ml aufkonzentriert. In die Rührzelle wurde die bereits verwendete Membran eingesetzt. Die 25 ml Retentate wurde mit Hilfe eines Amicon Ultra-15 und der Zentrifugation bei 3200 g für je 5 min stufenweise auf ein Finalvolumen von 5-6 ml aufkonzentriert. Hierdurch wurden entstandene Komplexe, bestehend aus der schweren MHC-Kette, entfernt.

Zur Reinigung des Monomers wurde nun ein FPLC-Lauf mit einer S75 Säule durchgeführt. Hierbei wurde das zuvor bei 3200 g für 5 min zentrifugierte Retentate auf die Säule geladen und Fraktionen von 5 ml des gesamten Laufes (100-200 ml) gesammelt. Die Fraktionen, die das Monomer enthalten wurden gepoolt und mit PMSF, Leupeptin sowie Pepstatin versetzt. Das Volumen wurde anschließend mit Hilfe eines Amicon Ultra-15 und der Zentrifugation bei 3200 rpm stufenweise auf 5 ml eingeengt.

Zur Biotinilierung der Monomere wurde zunächst 400 µl Tris-Lösung (1 M; pH 8) und 250 µl ATP (100 mM) zugegeben. Nach dem Mischen der Reagenzien wurden noch 10-20 µg BirA Enzyme und 28.5 µl Biotin-Lösung (100 mM) zugegeben. Nach wiederholtem Mischen wurde die Lösung für 12-16 Stunden bei 27°C im Wasserbad inkubiert.

Erneut wurde ein FPLC-Lauf, wie bereits beschrieben, durchgeführt und die Fraktionen mit dem biotiniliertem Monomer gesammelt. Auch hier wurden wieder PMSF, Leupeptin sowie Pepstatin zugegeben und durch NaN_3 (0.1% Finalkonzentration) und EDTA (2 mM Finalkonzentration) ergänzt. Ein mit 5 ml TBSA equilibriertes Amicon Ultra-15 wurde zum Aufkonzentrieren des Monomers auf 250-300 µl, sowie der Abtrennung von entstandenen Komplexen der schweren MHC-Kette verwendet. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde diese mit Permeat auf 2 mg/ml eingestellt. Die Monomere wurden in Aliquots von je 50 µg bei -80°C gelagert.

4.8 Multimerisierung von MHC Klasse I-Monomeren mittels Streptavidin

Materialien:

Konjugiertes Streptavidin (Tabelle 3)

Durchführung:

100 µg bei ca. 4-8°C aufgetautes MHC Klasse I-Monomer wurden im stöchometrisch molaren Verhältnis von 4:1 (HLA-A*0201:Streptavidin) mit konjugiertem Streptavidin versetzt. Dazu wurde die berechnete Menge Streptavidin in 10 Intervallen à 10% der errechneten Gesamtmenge zugegeben und jeweils für 30 min im Dunkeln bei 4°C rotiert. Die fertige Tetramerlösung wurde bei ca. 8°C im Dunkeln gelagert.

Von den Streptavidinkojugaten wurden folgende Stoffmengen je 100 µg HLA-A*0201 eingesetzt:

(HLA-A*0201 MW=45 kD, Streptavidin MW=60 kD, R-Phycoerythrin MW=240 kD, Allophycocyanin MW=104 kD)

Tabelle 5 Verwendetes Streptavidin gekoppelt mit verschiedenen Fluorochromen

Konjugat	Hersteller	Einsatz je 100 mg HLA-A*0201
Streptavidin-PE	Molecular Probes	157 µg Konjugat
Streptavidin-APC	Molecular Probes	87 µg Konjugat

4.9 Kryokonservierung von HLA Klasse I-Tetrameren

Das Protokoll zur Kryokonservierung von HLA Klasse I-Tetrameren wurde von J.Nouta vom Leiden University Medical Center zur Verfügung gestellt.

Material:

Für 1 ml 3x Einfriermedium:

HSA 75 µl einer 20%igen Stocklösung

NaN_3 6 µl einer 10%igen Stocklösung

Protease Inhibitor 1x 120 µl einer 25x Stocklösung

Glycerol 480 µl einer 100%igen Stocklösung

Tris 319 µl einer 20 mM Stocklösung

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Finalkonzentration eines Tetramers betrug 480 µg/ml im Falle eines PE- und 730 µg/ml eines APC-Konjugates. Diese Konzentrationen setzten sich aus 50 µg des Tetramers in einem Volumen von 103.5 µl bei PE-Tetrameren und 68.5 µl bei APC Tetrameren zusammen. Um die Tetramere einfrieren zu können, wurde ein Drittel des entsprechenden Volumens an Einfriermedium zugegeben und mit der Tetramerlösung gemischt. Anschließend konnten die Tetramere aliquotiert und bei -80°C eingefroren werden. Die Konzentration änderte sich durch die Zugabe des Einfriermediums bei PE-Tetrameren von 480 µg/ml auf 321 µg/ml und bei APC-Tetrameren von 730 µg/ml auf 488 µg/ml. Einmal aufgetaut wurden die Tetramere nicht wiederholt eingefroren.

4.10 Tetramerfärbung

Materialien:

FACS-Puffer: PBS mit 2% FCS (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 2 mM EDTA (Roth), 0.02% Natriumazid (Merck)

Tetramer-Puffer: PBS mit 50% FCS (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1 mM EDTA (Roth), 0.01% Natriumazid (Merck)

Fixsolution: FACS-Puffer mit 1% Formaldehyd (Fluka)

Tetramer: PE- oder APC- gekoppelt

Durchführung:

Alle Schritte wurden auf Eis und unter der Vermeidung direkten Lichtes durchgeführt. Die Waschschritte fanden bei 470 g für 5 min bei 4°C (Megafuge 2.0 1500 rpm) statt. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde durch ruckartiges Stürzen der Platte entfernt.

Die zu färbenden Zellen wurden zunächst in FACS-Puffer auf eine Zellkonzentration von 5-10 x 10^6 Zellen/ml eingestellt und 200 µl/Test dieser Suspension einer 96 Wellplatte gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt und anschließendem Entfernen des Überstandes wurden die Zellpellets in dem Antikörpercocktail (50 µl, add. FACS-Puffer) resuspendiert. Der Cocktail enthielt die entsprechenden Mengen an Antikörpern, die für das jeweilige Experiment benötigt wurden. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4°C im Dunkeln wurden die Proben mit 150 µl/Test FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl Tetramermix resuspendiert und bei 4°C für 30 min im Dunkeln inkubiert. Der Tetramermix setzte sich aus den gewünschten Tetrameren in der entsprechenden Konzentration (i. allg. 5 µg/ml Tetramerlösung) und 50 µl/Test Tetramer-Puffer zusammen. Nach dem Ansetzen des Tetramermixes wurde dieser 5 min bei 13000 rpm (Biofuge) und 4°C zentrifugiert um mögliche Präzipitate weitgehend zu pelletieren. Nach dem folgenden Waschschritt wurden die Zellen entweder in 150-200 µl/Test Fixsolution resuspendiert und bis zu ihrer Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

In den Fällen einer Kombination mit einer intrazellulären Zytokinfärbung entfiel das Resuspendieren in der Fixsolution, stattdessen wurden die Proben wie weiter untern beschrieben behandelt.

4.11 Phänotypisierung von Lymphozyten

4.11.1 Grundprotokoll zu Phänotypisierung von Lymphozyten

Materialien:

FACS-Puffer: PBS mit 2% FCS (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 2 mM EDTA (Roth), 0.02% Natriumazid (Merck)

Fixsolution: FACS-Puffer mit 1% Formaldehyd (Merck)

Monoklonale Antikörper für verschiede Färbekombinationen:

Tabelle 6 Verwendete Antikörper zur phänotypischen Charakterisierung

Antikörper/Antigen	Verdünnung	Hersteller
CCR4	1:17	R&D Systems
CCR5	1:2.5	eBioscience
CCR7	1:17	BD
CD3	1:100	Biolegend
CD4	1:100	BD
CD8	1:17	BD
CD28	1:7	BD
CD45RA	1:17	Caltag
CD56	1:20	BD
CD57	1:50	eBioscience
CD103	1:10	BD
NKG2D	1:33	BD
TCR$\gamma\delta$	1:25	BD
Vα24	1:17	BeckmanCoulter
Vδ2	1:400	BD

Durchführung:

Alle Schritte wurden auf Eis und unter der Vermeidung direkten Lichtes durchgeführt. Die Waschschritte fanden bei 470 g für 5 min bei 4°C (1500 rpm Megafuge 2.0) statt. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde durch ruckartiges Stürzen der Platte entfernt.

Die zu färbenden Zellen wurden zunächst in FACS-Puffer auf eine Zellkonzentration von 2.5-10.0 x 10^6 Zellen/ml eingestellt und 200 µl/Test dieser Suspension einer 96 Wellplatte gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt und anschließendem Entfernen des Überstandes wurden die

Zellpellets in dem Antikörpercocktail (50 µl, add. FACS-Puffer) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4°C im Dunkeln wurden zu den Tests 150 µl FACS-Puffer gegeben und die 96 Well-Platte zentrifugiert, um die Zellen zu waschen. Nach dem Entfernen des Überstandes und einem weiterem Waschschritt mit 200 µl PBS wurde die Lebend-Tot-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde die Aqua Live/Dead® Reagenz 1:400 mit PBS verdünnt und das in 200 µl dieser Lösung resuspendierte Zellpellet für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugations- und anschließendem Waschschritt wurden die Zellen in 150 µl/Test Fixsolution resuspendiert. Bis zu der Messung am gleichen Tag werden die Proben bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

4.11.2 Färbung von KLRG1 auf Lymphozyten

Materialien:

FACS-Puffer: PBS mit 2% FCS (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 2mM EDTA (Roth), 0.02% Natriumazid (Merck)

Fixsolution: FACS-Puffer mit 1% Formaldehyd (Merck)

Mausserum (CC pro, hitzeinaktiviert 30 min 56°C)

Monoklonale Antikörper diese Färbekombination:

Tabelle 7 Antikörper zur Färbung NK-Zell assoziierter Oberflächenmarker

Antikörper/Antigen	Verdünnung	Hersteller
CD3	1:100	Biolegend
CD4	1:100	BD
CD8	1:17	BD
CD56	1:20	BD
CD94	1:20	BD
CD158b	1:25	BeckmanCoulter
Goat-Anti-Mouse	1:100	JacksonImmunoReseach
KLRG1 (Klon 13A2)	1:5	H. Pircher, Universität Freiburg

Durchführung:

Alle Schritte wurden auf Eis und unter der Vermeidung direkten Lichtes durchgeführt. Die Waschschritte fanden bei 470 g für 5 min bei 4°C (Megafuge 1500 rpm) statt. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde durch ruckartiges Stürzen der Platte entfernt.

Die zu färbenden Zellen wurden zunächst in FACS-Puffer auf eine Zellkonzentration von 2.5-10.0 x 10^6 Zellen/ml eingestellt und 200 µl/Test dieser Suspension einer 96 Wellplatte gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt und anschließendem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 40 µl/Test FACS-Puffer und 10 µl/Test anti-KLRG1 Antikörper resuspendiert und bei 4°C für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 150 µl/Test FACS-Puffer gewaschen und dann in GAM-FITC (1:100) und 50 µl/Test FACS-Puffer resuspendiert. Die Inkubationszeit betrug hier 20 min bei 4°C im Dunklen. Vor der Absättigung mit Mausserum wurden die Proben wieder mit 150 µl/Test FACS-Puffer gewaschen. Zum Absättigen wurden die Zellen in Mausserum, 1:5 mit FACS-Puffer verdünnt, für 10 min bei 4°C im Dunklen inkubiert. Nach dem darauf folgendem Waschschritt mit 150 µl/Test FACS-Puffer waren die Zellen für die Färbungen mit direktmarkierten Antikörpern (Tabelle 7) vorbereitet. Diese wurden wie beschrieben durchgeführt.

4.11.3 Färbung regulatorischer T-Zellen

Materialien:

FACS-Puffer: PBS mit 2% FCS (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 2mM EDTA (Roth), 0.02% Natriumazid (Merk)

Fix/Perm-Solution: 1 Teil Konzentrat und 3 Teile Verdünner (beide eBioscience)

Permwash-Puffer: 10x Permpuffer verdünnt mit ddH_2O

Streptavidin-APC (Molecular Probes)

Monoklonale Antikörper für diese Färbekombination:

Tabelle 8 Antikörper zur Färbung regulatorischer T-Zellen

Antikörper/Antigen	Verdünnung	Hersteller
CD4	1:100	BD
CD8	1:17	BD
CD25	1:10	BD
CD45RA	1:17	Caltag
CD120b	1:5	BD
CD127	1:5	eBioscience
Foxp3	1:5	eBioscience

Durchführung:

Alle Schritte wurden auf Eis und unter der Vermeidung direkten Lichtes durchgeführt. Die Waschschritte fanden bei 470 g für 5 min bei 4°C (Megafuge 2.0 1500 rpm). Nach der Permeabilisieren wurden die Waschschritte bei 681 g (Megafuge 2.0 1800 rpm) durchgeführt. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde durch ruckartiges Stürzen der Platte entfernt.

Die Färbung der extrazellulären Marker wurde wie bei der Phänotypisierung durchgeführt. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen in 50 µl/Test FACS-Puffer mit 0.5 µg/ml Streptavidin-APC (Molecular Probes) resuspendiert und für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die Proben zunächst mit 150 µl/Test FACS-Puffer und dann mit 200 µl PBS gewaschen. Die Lebend-Tot-Färbung fand wie bei der Phänotypisierung in 200 µl PBS mit der Aqua Live/Dead® Reagenz (1:400) statt. Nach dem Waschen der Zellen wurden die Proben in je 100 µl frisch angesetzter Fix/Perm-Solution resuspendiert und bei 4°C für 45 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Tests einmal durch die Zugabe von 100 µl und ein weiteres Mal mit 200 µl Permwash-Puffer gewaschen. Nach dem die Zellen so Permeabilisiert wurden, konnten die Pellets in 100 µl/Test der Antikörperverdünnung, bestehend aus 9 Teilen Permwash-Puffer und 1 Teil anti-Foxp3 Antikörper, resuspendiert werden. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C im Dunkeln wurden die Proben erneut mit 100 µl, dann 200 µl Permwash-Puffer gewaschen und anschließend in 150 µl/Test Fixsolution resuspendiert. Bis zu der Messung am gleichen Tag wurden die Proben bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

4.12 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Materialien:

IMDM (Lonza) mit 10% HS (CC pro, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza)und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

FACS-Puffer: PBS mit 2% FCS (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 2mM EDTA (Roth), 0.02% Natriumazid (Merk)

Cytoperm/Cytofix Solution

Permwash-Puffer: PBS, 0.5% BSA (SIGMA), 2 mM EDTA (Lonza), 0.02% NaN_3 (Merck), 0.1% Saponin (SIGMA)

GolgiSTOP (BD)

BrefeldinA (SIGMA)

anti-CD3 Antikörper

anti-CD28 Antikörper

PMA (SIGMA)

Ionomycin (SIGMA)

Monoklonale Antikörper für verschiede Färbekombinationen:

Tabelle 9 Antikörper zur funktionellen Charakterisierung

Antikörper/Antigen	Verdünnung	Hersteller
CD4	1:100	BD
CD8	1:17	BD
CD107a	1:150	BD
CD154	1:3	Biolegend
IFNγ	1:300	BD
IL-2	1:120	BD
IL-5	1:40	BD
IL-10	1:120	BD
IL-17	1:200	eBioscience
TNFα	1:120	Biolegend

Durchführung:

Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Färbeschritte fanden auf Eis und unter der Vermeidung direkten Lichtes statt. Die Waschschritte wurden bei 470 g für 5 min bei 4°C (Megafuge 2.0 1500 rpm) durchgeführt. Nach dem Permeabilisieren fanden die Waschschritte bei 681 g (Megafuge 2.0 1800 rpm) statt. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde durch ruckartiges Stürzen der Platte entfernt.

Die Lymphozyten wurden aufgetaut und für ca. 16 Stunden bei 37°C in T-Zellmedium ruhen gelassen. Nach dieser Ruhephase wurden die Zellen 2x mit T-Zellmedium gewaschen und bei 355 g (Megafuge 2.0 1300 rpm) für 8 min bei RT zentrifugiert und anschließend eine Zellkonzentration von 10-200 x 10^6 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 50 µl/Test in eine 96 Well-Platte transferiert. Zu den Zellen wurden weitere 50 µl T-Zell Medium mit BrefeldinA (10 µg/ml Finalkonzentration) und GolgiSTOP (1:1500 Finalkonzentration) gegeben. Abhängig von den unterschiedlichen Bedingungen wurden die entsprechenden Ansätze im Fall der Negativkontrolle mit T-Zellmedium, der Stimulation mit Antikörpern mit anti-CD3 (10 µg/ml Finalkonzentration) und anti-CD28 (5 µg/ml Finalkonzentration) Antikörpern in T-Zellmedium, oder einer Lösung aus PMA (50 ng/ml Finalkonzentration) und Ionomycin (1 µM Finalkonzentration) in T-Zellmedium auf 150 µl/Test aufgefüllt. Den Ansätzen für die Antikörperkombination mit CD107a wurde ein CD107a-spezifischer, fluorochorm-gekoppelter Antikörper, (1:150) für die gesamte Inkubationszeit von 5 Stunden bei 37°C zugegeben.

Im Falle der Zellen, die nach einem ELISPOT für ein ICS benutzt wurden, kamen die gleichen Stimuli wie im ELISPOT zum Einsatz. Ausnahme bildeten nur die Positivkontrollen, die hier, wie beschrieben, unspezifisch mit PMA und Ionomycin stimuliert wurden. Weiter wurde auf die Verwendung von GolgiSTOP verzichtet.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Tests zunächst einmal durch Zugabe von je 50 µl und ein weiteres Mal von je 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Die Zellpellets wurden nun in einem Antikörpercocktail aus anit-CD8 (3 µl/Test) und anti-CD4 (0,5 µl/Test) sowie FACS-Puffer (50µl/Test) resuspendiert und für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem folgendem Waschschritt mit 150 µl/Test FACS-Puffer wurde das Zellpellet in 100 µl/Test Cytofix/Cytoperm resuspendiert und die Proben bei 4°C für 20 min im Dunkeln permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zunächst mit 100 µl/ Test, dann ein zweites Mal mit 200 µl/Test mit Permwash-Puffer gewaschen. Um die Proben auf die Zytokine und Aktivierungsmarker anzufärben wurden die Zellen jetzt in mit der entsprechenden Menge an Antikörpern und Permwash-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl/Test resuspendiert und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen mit 150 µl/Test Permwash-Puffer wurden die Proben in 150 µl/Test Fixsolution resuspendiert und bis zu der Messung am gleichen Tag bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Bemerkung:

Die Ergebnisse der IL-5 Produktion zeigten in den $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation einen Anstieg der Fluoreszenzintensität, welcher jedoch nicht auf die Expression von IL-5 zurückzuführen war. Während der mehrstündigen Inkubation befand sich auch der APC-Cy7 markierte CD4 Antikörper in der Kultur. Dieser wurde mit in die Kultur gegeben, um die Verschiebung der Fluoreszensintensität für CD4 auszugleichen. Diese entsteht, da die $CD4^+$ T-Zellen bei Aktivierung die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle reduzieren. Der CD4 APC-Cy7 Antikörper wurde während der spezifischen Bindung von den Lymphozyten in Vesikeln aufgenommen. Der pH-Wert in diesen Vesikeln ist für Tandemfluorochrome nicht optimal, sodass es zur Abspaltung des Cy7 gekommen sein musste, wodurch die gemessenen Zellen eine falsche Information bei der Messung des APC-Signales lieferten. Dieses Signal konnte nicht von dem des APC konjugierten anti-IL-5 Antikörpers unterschieden werden, wodurch eine Bestimmung der IL-5 Produktion unmöglich wurde. Genauer soll auf die Aufnahme des Antikörpers und die Vorgänge die zu der Spaltung des Tandemfluorochroms führten hier jedoch nicht eingegangen werden.

4.13 Inkubation von Lymphozyten mit LacNAc

Materialien:

IMDM (Lonza) mit 10% HS (CC pro, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza) und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

IMDM (Lonza) mit, 1% Pen/Strep (Lonza)und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

DNase I (SIGMA)

LacNAc (SIGMA)

15 ml-Röhrchen (BD Falcon™)

Durchführung:

Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Waschschritte fanden bei 355 g für 8 min (1300 rpm in Megafuge 2.0) statt.

Nach dem Auftauen der PBMCs oder TILs wurde die Lebendzelldichte bestimmt. Die Zellkonzentration wurde auf 5 x 10^6 Zellen/ml Medium mit 10% HS eingestellt. Dieser Zellsuspension wurden anschließend noch 1 µg/ml DNase I sowie 1 mM LacNAc zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen in den 15-ml Röhrchen für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Hierbei war darauf zu achten, dass der Deckel der Röhrchen nur angedreht und nicht völlig geschlossen wurde, um einen Gasaustausch gewährleisten zu können.

Nach der Inkubation wurden die Zellen 2x mit je 10 ml Medium ohne HS und 1x mit 10 ml Medium mit 10% HS gewaschen und dann die Lebendzelldichte bestimmt. Damit waren die Zellen für weitere Experimente vorbereitet.

4.14 TCR-Downregulation als funktioneller Test von T-Zellen

Materialien:

IMDM (Lonza) mit 10% HS (CC pro, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza)und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

Peptide von Interesse

anti-CD3 Antikörper

anti-CD28 Antikörper

96-Wellplatte, Rundboden (Greiner)

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt

Nach der Bestimmung der Lebendzelldichte der PBMCs wurden $2x10^6$ Zellen/Well mit 5 µg/ml des zu testenden Peptides in eine Finalvolumen von 150 µl/Test Medium gemischt. Der Positivkontrolle wurde statt des Peptides anti-CD3 Antikörper (5 µg/ml Finalkonzentration) zugegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Zellen resuspendiert und nach der Tetramerfärbung bis zu der Messung am gleichen Tag bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

4.15 Proliferationstest mit CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester)

4.15.1 Färben von Zellen mit CFSE

Material:

PBS

CFSE (SIGMA)

IMDM (Lonza) mit 20% FSC (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza)

IMDM (Lonza) mit 10% FSC (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza)

15 ml-Röhrchen (BD Falcon™)

Durchführung:

Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und unter Vermeidung verstärkten Lichteinfalles durchgeführt. Die Waschschritte wurden bei 355 g (Megafuge 2.0 1300 rpm) für 8 min durchgeführt.

Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese für etwa 16 Stunden bei 37°C ruhen lassen. Die Zellen wurden dann 2x mit PBS gewaschen und auf eine Dichte von 10 x 10^6 Zellen/ml eingestellt. Nun wurden 0.5-1.0 µM CFSE zugegeben, kurz gevortext und dann für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die dem Färbevolumen entsprechende Menge an Medium mit 20% FCS zugegeben und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach der folgenden Zentrifugation und weiteren 4 Waschschritten mit 10% FCS-Medium waren die Zellen für die nachfolgenden Experimente vorbereitet.

4.15.2 Proliferationsassay mit CFSE gefärbten Zellen

Material:

IMDM (Lonza) mit 10% FCS (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza)

48-Wellplatte (Greiner)

Peptide von Interesse

anti-CD3 Antikörper

IL-2 (R&D Systems)

Durchführung:

Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und unter Vermeidung verstärkten Lichteinfalles durchgeführt.

Die Zelldichte wurde auf 5 x 10^6 Zellen/ml eingestellt und 200 µl dieser Suspension zu jedem Ansatz in einer 48-Wellplatte gegeben. Die zu testenden Peptide wurden mit einer Finalkonzentration von 5 µg/ml eingesetzt und in entsprechender Konzentration in 300 µl/Test zu den entsprechenden Ansätzen gegeben. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit anti-CD3 Antikörper (5 µg/ml Finalkonzentration) stimuliert. Das Volumen je Ansatz betrug 500 µl/Well. Die 48-Wellplatte wurde in Alufolie eingeschlagen und bei 37°C für 5-6 Tage inkubiert. In manchen Experimenten betrug das Finalvolumen zunächst 400 µl/Test und wurde am Tag 1 der Stimulation durch die Zugabe von 100 µl/Test Medium mit IL-2 (2 ng/ml Finalkonzentration) ergänzt.

Die Tetramerfärbung im Anschluss wurde in der Regel mit einem APC markierten Tetramer durchgeführt. Die Messung des Fluorochroms PE wurde weitestgehend vermieden, da die Spektrale Überlappung mit CFSE sehr hoch war.

4.16 Durchflusszytometrie

Materialien:

FACS-Clean (BD)

FACS-Rinse (BD)

FACS-Puffer: PBS mit 2% FCS (PAA, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 2 mM EDTA (Roth), 0.01% Natriumazid (Merck)

Ungefärbte und gefärbte Zellen oder CompBeads in FACS-Fix

Durchführung:

Die Messungen wurden gemäß den Bedienungsanleitungen der verwendeten Hard- und Software durchgeführt. Als erstes mussten die Einstellungen zur Kompensation vorgenommen werden. Hierzu wurden einfach gefärbte Proben verwendet. Bei Messungen an dem FACScalibur wurde vor jedem Probenwechsel mit FACS-Clean, FACS-Rinse und FACS-Puffer für einige Sekunden gespült um eine mögliche Kreuzkontamination zwischen den Proben weitgehend zu verhindern. Im Falle von Messungen mit dem FACSCanto™ II entfiel dieser Schritt, da das Gerät über eine automatisierte Waschfunktion verfügt.

Die Auswertung wurde mit der Software Cell Quest bzw. Cell Quest Pro oder FlowJo 7.2 durchgeführt.

4.17 ELISPOT

4.17.1 Prästimulation von PBMCs

Material:

IMDM (Lonza) mit 10% HS (CC pro, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza)und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

48-Wellplatte (Greiner)

24-Wellplatte (Greiner)

Peptide von Interesse

IL-2 (R&D Systems)

IL-4 (Promokine)

IL-7 (Promokine)

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation der Zellen fand bei 37°C statt.

Die Zellen der zu untersuchenden Spender wurden aufgetaut, und anschließend wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Nach dem Einstellen einer Zelldichte von 10-12 x 10^6 Zellen/ml wurden entweder 250 µl/Ansatz in eine 48 Well-Platte oder 500 µl/Ansatz in eine 24 Well-Platte überführt. Den Ansätzen, welche mit HLA-Klasse I-Peptiden stimuliert werden sollten, wurden dem Medium jeweils 5 ng/ml IL-4 und IL-7 zugesetzt. Nach einer Ruhephase von etwa 16 Stunden wurde zu den Ansätzen die jeweils zu untersuchenden Peptide in 250 µl/Ansatz im Falle einer Prästimulation in einer 48 Well-Platte oder 500 µl/Ansatz in einer 24 Well-Platte gegeben. Die finale Peptidkonzentration betrug für HLA-Klasse I-restringierte Peptide 1 µg/ml und bei HLA-Klasse II-Peptiden 5 µg/ml. Den mit HLA-Klasse I-Peptiden stimulierten Ansätzen wurden IL-4 und IL-7 (jeweils 5 ng/ml Finalkonzentration) zugegeben. An Tag 3 und 5 der Stimulation wurden den Ansätzen jeweils die genannten 250 µl/Ansatz bzw. 500 µl/Ansatz Medium mit jeweils 2 ng/ml IL-2 Finalkonzentration zugegeben. Die Zellen wurden an den Tagen 5, 7, 9 und gegebenen Falles 11 mit frischem Medium und IL-2 gefüttert. Hier wurden je nach Bedarf 250-500 µl/Ansatz oder 500-1000 µl/Ansatz des Mediums aus der Kultur entfernt und durch das entsprechende Volumen frischen Mediums mit IL-2 (2 ng/ml Finalkonzentration) ersetzt.

4.17.2 Vorbereitung der ELISPOT-Platte

Material:

PBS

ELISPOT-Platte [MISIPN4B] (Millipore)

ELISPOT-Platte [MASHAN4B] (Millipore)

anti-IFNγ Erstantikörper Klon 1-D1K (MabTech)

Ethanol (Merck)

IMDM (Lonza) mit 1% Pen/Strep (Lonza)und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

IMDM (Lonza) mit 10% HS (CC pro, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza)und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die hydrophoben MISIPN4B ELISPOT-Platten wurden zuerst mit 15 µl/Well 70% Ethanol für maximal 1 min angefeuchtet und anschließend 3x mit 150 µl/Well PBS gewaschen. Nach diesem Waschschritt wurden 100 µl/Well des anti-IFNγ Erstantikörpers (1-D1K; 1:200 mit PBS verdünnt) in Wells gegeben und die Platte bis zu ihrer Verwendung in den nächsten Tagen bei 4°C gelagert.

Im Falle der MASHAN4B ELISPOT-Platten entfiel das Vorbehandeln mit Ethanol und sie wurden direkt mit der Antikörperlösung inkubiert.

Bevor die Platten mit den Zellen beladen wurden, wurden sie 2x mit 150 µl/Well Medium ohne HS gewaschen und dann 1 Stunde bei 37°C mit 50 µl/Well Medium mit 10% HS inkubiert um eine spätere unspezifische Bindung zu blocken.

4.17.3 Beladung der ELISPOT-Platte

Material:

IMDM (Lonza) mit 1% Pen/Strep (Lonza)und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

IMDM (Lonza) mit 10% HS (CC pro, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza)und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

Peptide von Interesse

SEB (SIGMA)

PHA (Roche)

15 ml-Röhrchen (BD Falcon™)

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Am Tag 12 der Prästimulation wurden die Zellen geerntet und in 15 ml Röhrchen überführt. Nach einem Waschschritt bei 355 g (Megafuge 2.0 1300 rpm) für 8 min mit 6 ml Medium ohne HS wurden die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Es wurde eine Zelldichte von 1.9-5.0 x 10^6 Zellen/ml eingestellt und 100 µl dieser Zellsuspension in die Wells der ELISPOT-Platte transferiert. Im Falle der Positivkontrolle wurde 1/3 der verwendeten Zellzahl eingesetzt. Zu diesen 100 µl wurden dann 50 µl/Test Peptidlösung gegeben. Diese hatte im Falle von HLA-Klasse I-Peptiden eine Konzentration von 15 µg/ml (5 µg/ml Finalkonzentration) und bei HLA-Klasse II-Peptiden eine Konzentration von 7,5 µg/ml (2,5 µg/ml Finalkonzentration). Für die Negativkontrolle wurde das entsprechende Volumen der Peptide einer 10%igen DMSO Lösung oder ein Peptid des HI-Virus eingesetzt. Die Zellen der Positivkontrolle wurden mit 10 µg/ml Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert. Teilweise wurde eine weitere Positivkontrolle verwendet, bei der die Zellen mit 2,5 µg/ml Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) stimuliert wurden. Nach dem Beladen der Platte wurde diese waagerecht in einem Inkubator für 24-26 Stunden bei 37°C inkubiert.

4.17.4 Entwickeln der ELISPOT-Platte

Material:

96-Wellplatte, Rundboden (Greiner)

PBS

Tween20 (Serva)

BSA (SIGMA)

ddH_2O

anti-IFNγ Zweitantikörper Klon 7-B6-1 biotinyliert (MabTech)

ExtrAvidin-Alkalinephosphatase (SIGMA)

BCIP/NBT Tablette (SIGMA)

15 ml-Röhrchen (BD Falcon™)

Durchführung:

Die Arbeitsschritte bis nach dem Überführen der Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Puffer wurden durch kräftiges Stürzen der ELISPOT-Platte entfernt.

Nach der Inkubation der beladenen ELISPOT-Platte wurden die Zellen und das Medium in eine 96-Well Platte mit runden Böden transferiert. Hierbei war darauf zu achten die Membran der ELISPOT-Platte nicht zu beschädigen. Die Zellen wurden dann bei 37°C für 10 Tage (HLA-Klasse I) oder 12 Tage (HLA-Klasse II) inkubiert. An dem Tag nach dem ELISPOT wurden die Zellen nochmals mit 50 µl/Well Medium und 2 ng/ml IL-2 gefüttert und bis zu ihrer Intrazellulären Zytokinfärbung bei 37°C kultiviert.

Anschließend wurde die ELISPOT-Platte mit 200 µl/Well Waschpuffer (PBS mit 0.05% Tween) gewaschen. Um mögliche verbliebene Zelle zu lysieren, wurden die Wells nun mit 200 µl ddH_2O gefüllt und für etwa 2 min ruhen gelassen. Nach diesem Schritt wurden die Platte weitere 5x mit je 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen. Pro Well wurden nun 100 µl des biotinylierten anti-IFNγ Zweitantikörpers (1:3000 in PBS, 0.05% BSA verdünnt) gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten anschließend wieder 5 Waschschritte mit ja 200 µl/Well Waschpuffer. Im nächsten Schritt wurden 100 µl/Well des an ExtrAvidin gekoppelten Enzyms Alkalinphosphatase (1:100 in PBS, 0.05% BSA) zu den Ansätzen gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe des Substrates erfolgte nach je 3 Waschschritten mit zunächst je 200 µl/Well Waschpuffer und dann je 200 µl/Well PBS. Die 100 µl/Well der Substratlösung (1 BCIP/NBT Tablette in 10 ml ddH_2O) wurde in die Wells gegeben und für 8 min

bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Platte dann unter fließendem Wasser abgespült und dann mit Zellstoffpapier trockengetupft.

4.18 Statistische Analyse der Messdaten

Die erhaltenen Messdaten wurden mit Hilfe des Programms SigmaStat 3.1 statistisch auf signifikante Unterschiede getestet. Das Signifikanzniveau lag immer bei 5%.

Der Vergleich von PBMCs und TILs der RCC-Patienten fand durch einen gepaarten t-Test statt. Die PBMCs gesunder Spender wurden mit einem ungepaarten t-Test mit den beiden Gruppen der RCC-Patienten verglichen.

Falls es aufgrund der zu vergleichenden Stichproben nicht möglich war, die genannten Testverfahren durchzuführen, wurde der von SigmaStat 3.1 vorgeschlagene alternative Test durchgeführt.

4.19 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebe

Material:

Cryotom Leica CM 3050s, (Leica Microsystems)

Mikroskop, Axiophot (Zeiss)

Tissue Tek (Sakura Finetek)

SuperFrost Objektträger, 25x75x1, 0 mm (R. Langenbrick)

Deckgläser (R. Langenbrick)

Super Pap-Stift (BeckmanCoulter)

anti-E-Cadherin Antikörper, Klon HECD-1 (Takara)

GAM-Cy3™ (Dianova)

DAPI (Roche)

Aceton (SIGMA)

Elvanol: 5 g Moviol (Calbiochem) in 20 ml PBS, über Nacht gerührt

10 ml Glycerin, über Nacht gerührt

bei 12 000 rpm für 15 min zentrifugiert (Lagerung bei -20°C)

vor Gebrauch 25-30 mg/ml DABACO hinzugegeben

Durchführung:

Die schockgefrorenen Gewebestücke wurden zunächst in Tissue Tek eingebettet und anschließend mit Hilfe des Cryotoms in 5-7 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger überführt, eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und bis zu ihrer Färbung bei -80°C gelagert.

Vor der Färbung wurden die Schnitte für 5 min mit -20°C kaltem Aceton in einer Coplin Kammer fixiert. Nach einer Trockenzeit von 10 min bei Raumtemperatur wurde mit einem Pap-Stift eine Umrissline um die Gewebekontur gezogen und die Schnitte dann 2x für je 5 min in PBS gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Objektträger mit einer Kante auf ein Zellstoffpapier getupft, so dass das PBS ablaufen konnte. Es war allerdings darauf zu achten, dass die Schnitte nicht austrocknen. Nun wurde der Primärantikörper (1:100 in PBS 0.1% BSA) auf die Schnitte gegeben, so dass diese völlig bedeckt waren. Die Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur fand in einer feuchten Kammer statt. Die Schnitte wurden anschließend 3x für je 5 min mit PBS wie bereits beschrieben gewaschen. Der Cy-3™ konjugierte Sekundärantikörper (1:300 in PBS 0.1% BSA) wurde zusammen mit DAPI (1µg/ml) auf die Schnitte, bis diese komplett bedeckt waren. Die Objektträger mit den Schnitten wurden jetzt für eine Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen. Zum Einbetten der Schnitte wurden 1-2 Tropfen Elvanol Lösung auf die Objektträger gegeben und dann Deckgläser unter der Vermeidung von Lufteinschlüssen daraufgelegt. Die Präparate wurden bis zu ihrer mikroskopischen Aufnahme am gleichen Tag bei 4°C im Dunkeln gelagert.

4.20 ^{3}H-Thymidin Proliferations-Assay

Material:

IMDM (Lonza) mit 10% HS (CC pro, hitzeinaktiviert 30 min 56°C), 1% Pen/Strep (Lonza) und 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck)

96-Wellplatte (Greiner)

anti-CD3 Antikörper

^{3}H-Thymidin (Hartmann Analytic)

ddH_2O

Filtermatte MeltiLex A (Perkin Elmer Wallac)

Szintillationscocktail *Ultima Gold* (Perkin Elmer)

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Jede der Bedingungen wurde wenn möglich als 6-Fachbestimmung angesetzt.

Die zu testenden Zellen (z.B. $CD4^+$ $CD25^{++}$ oder $CD8^+$ $Ker1^+$) wurden auf eine Konzentration von 0.2 x 10^6 Zellen/ml eingestellt. 75 µl dieser Zellsuspension wurden je Ansatz einer 96-Wellplatte im Verhältnis 1:1 gegeben. Anschließend wurden hiervon 25 µl in die Wells für das Verhältnis 1:0.3 überführt, in denen bereits 50 µl des Kulturmediums vorgelegt wurden. Diese Verdünnungsreihe wurde entsprechend fortgesetzt, so dass zuletzt ein Verhältnis von 1:0.03 erreicht wurde. Zu diesen 50 µl Zellsuspension wurden nun die Effektoren (PBMC oder $CD4^+$ $CD25^-$) zugegeben. Diese wurden zuvor auf eine Zelldichte von 0.2 x 10^6 Zellen/ml eingestellt und je 50 µl zu den bereits fertigen Ansätzen gegeben. Der mit 4200 cGy bestrahlte und 3x gewaschene alloMIX wurde auf eine Zellkonzentration von 1.4 x 10^6 Zellen/ml eingestellt. Zu dieser Zellsuspension wurden 3 µg/ml anti-CD3 Antikörper (Finalkonzentration dann 1 µg/ml) zugegeben. Dieser alloMIX (50 µl/Test) wurde nun zu allen Ansätzen gegeben. Als Kontrollen dienten der alloMIX alleine, die Effektoren zusammen mit dem alloMIX und die zu testenden Zellen in den verschiedenen Zellzahlen zusammen mit dem alloMIX. Das Finalvolumen jedes Ansatzes betrug 150 µl. Die Stimulationen wurden für 6 Tage bei 37°C inkubiert.

Am Tag 5 wurden 25 µl/Test Medium mit 1 µCi/Test ^{3}H-Thymidin zu den Ansätzen gegeben und die Zellen 24 Stunden geerntet.

Das Ernten der Zellen erfolgte mit einem Zell-Harvester und einer Filtermatte. Die Membran wurde zuvor mit ddH_2O angefeuchtet und nach dem Ernten der Proben zusammen mit Szintillationscocktail in einer Plastik eingeschweißt. Das Messen erfolgte anschließend mit einem Micro Beta Counter.

Ergebnisse

5 Zytokeratin 18

5.1 Das Zytokeratin 18-Protein

Die Zytokeratine gehören in die Gruppe der Zwischen-Filamente und sind zusammen mit den Mikrofilamenten und Mikrotubuli Bestandteil des Zytoskeletts. Die Zwischen-Filamente sind 10 Mal häufiger als die beiden anderen Zytoskelettbestandteile und kommen nur bei Tieren vor. Sie bilden ein Netzwerk aus Fasern und Bündeln, welche die Zelle durchziehen, tragen jedoch nicht zu deren Bewegung bei. Im Bereich der Zellmembran sind sie über Spectrinfasern mit den wurzelartigen Ausläufern der Actinfilamente verbunden und tragen so zu deren aufrechten Orientierung bei. Die Expression der verschiedenen Keratine findet nur in epithelialen Zellen statt, wo sie neben der strukturgebenden Eigenschaft auch bei der Zell-Zell Interaktion mitwirken und so Einfluss auf die Genexpression ausüben. Bei einem Defekt eines solchen zentralen Moleküls sind die Auswirkungen bedeutend.

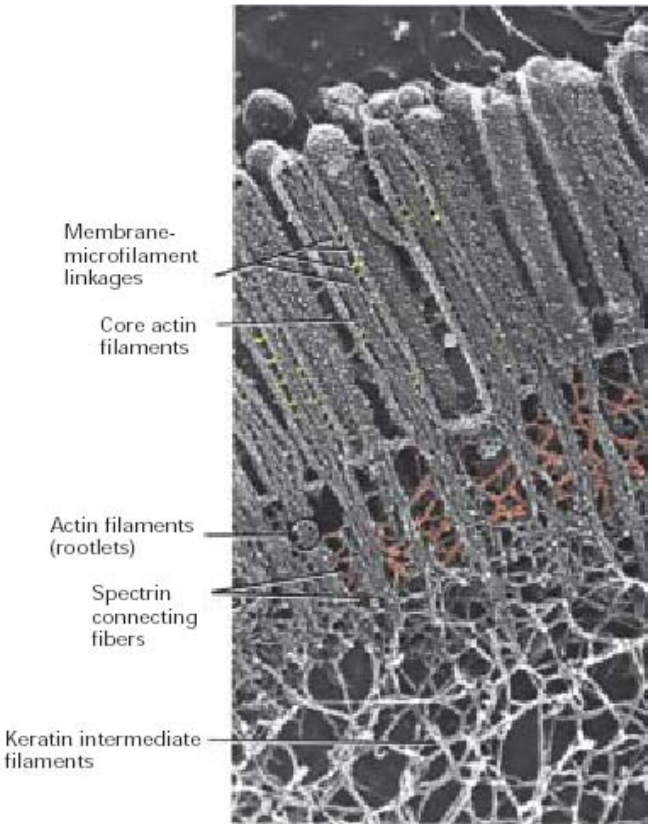


Abbildung 12 Intermediale Keratin-Filamente

Elektronenmikroskopische Aufnahme des apikalen Teils einer detergentisch-extrahierten intestinalen Epithelzelle [Scott, M.P. et al. 2004]

Die einzelnen Filamente der Zytokeratine 8 und 18 verbinden sich in einer Suspension zu Heterodimeren, welche sich selbstständig zu einem Netzwerk mit viscoelastischer Festigkeit und gel-ähnlichen Eigenschaften organisieren [Yamada, S. et al. 2003]. Die stabilisierende Struktur eines solches Netzwerkes wirkt sich nicht nur die einzelne Zelle aus, sondern trägt durch interzelluläre Interaktionen zu der des ganzen Gewebes bei.

Eine Bündelung der Filamente ist besonders im Bereich der Zell-Zell Verbindungen wie den Gap Junctions zu beobachten. Eine ausgeprägte Zell-Zell Interaktion ist bei *Singel-Layer*-Epithelien besonders wichtig, da diese meist an dem Austausch von Ionen und kleinen Molekülen wie Glukose oder Aminosäuren beteiligt sind.

Keratine sind wie die meisten zentralen und bedeutsamen zellulären Strukturen stark konserviert. Alle bekannten Keratine weisen eine α-Helix-Struktur auf, bei der lediglich die N- und C-terminalen Enden variieren [Bowden, P.E.2005]. Die Heterodimere eines Keratinfilaments setzen sich immer aus einem Typ I und einem Typ II-Keratinprotein zusammen. Die Enden der beiden Keratinproteine des Heterodimers weisen immer eine Ähnlichkeit in Bezug auf ihre Eigenschaften auf [Bowden, P.E.2005].

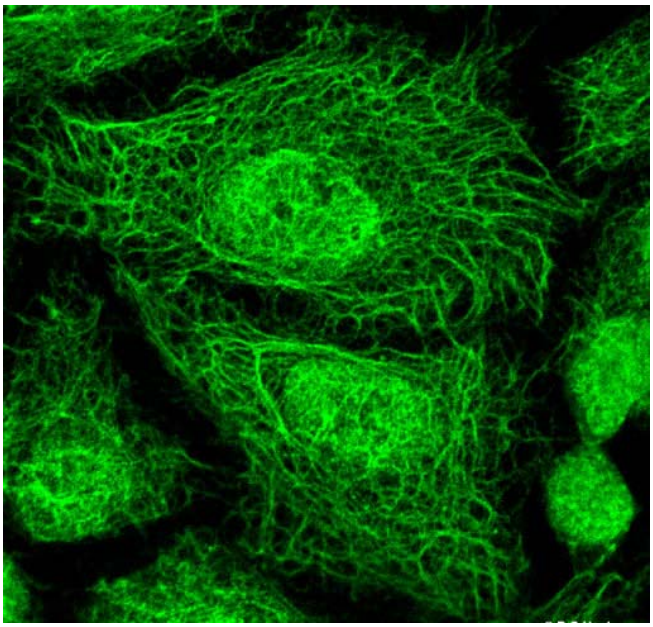


Abbildung 13 Darstellung des Zytoskeletts durch Färbung von Zytokeratin 8, 18 und 19 mit Fluorochrom markierten Antikörpern [www.ii.bham.ac.uk2005]

Die Gene der Keratine liegen auf den Chromosomen 12 in einem Gencluster (12q11-13) und auf Chromosom 17 in zwei Loci (17p11-12 und 17q11-22) [Bowden, P.E.2005; Waseem, A. et al. 1990b]. Auf Chromosom 17 liegen die Typ I Keratine in einem Cluster von 140 kb, welcher neben den neun funktionellen Genen auch ein Pseudogen (Ψ) beinhaltet. Die Typ II-Keratine liegen auf Chromosom 12 in Form von sechs funktionellen und vier Pseudogenen [Bowden, P.E.2005]. Dieses Gencluster ist mit 300 bp größer als das der Typ I-Keratine. Obwohl es sich bei Zytokeratin 18 um ein Typ I-Keratin handelt liegt das Gen auf Chromosom 12, da es mit Keratin 8 koexprimiert wird, was bisher nur von diesen beiden Keratinen bekannt ist [Waseem, A. et al. 1990a]. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass es sich um sehr ursprüngliche Keratine handelt, die nicht in höher differenzierten Geweben vorkommen und sie nach ihrer Transkription und Translation ein Heterodimer miteinander bilden. Diese beiden Keratine werden in *Single Layer*-Epithelien, wie der Niere, Blase, Leber, Brust, dem Pankreas und dem Colon exprimiert, die sich aber in den verschieden Schichten des Organs in ihrer Stärke und

Regulation unterscheiden [Waseem, A. et al. 1990a]. Eine TATA-Box ist der Minimal-Promotor des Zytokeratin 18 und das einzige essentielle Element. Die Sp1 (*Specificity Protein 1*) Bindungstelle, die etwas strangaufwärts des Promotors liegt, wirkt sich zwar bei Anlagerung von Sp1 fördernd auf die Expression aus, jedoch fehlt hier der Unterschied zwischen verschiedenen Zellen [Prochasson, P. et al. 1999].

5.2 Zytokeratin 18 in bestimmten Erkrankungen

Die Überexpression von Zytokeratin 18 in verschiedenen Tumoren kann mehrere Ursachen, wie vielleicht eines erhöhten Levels an acetylierten Histonen und/oder an Kontrollfaktoren des Transkriptionskomplexes haben [Delouis, C. et al. 2005; Prochasson, P. et al. 1999]. Es könnte sich bei der erhöhten Synthese von Keratin 8 und 18 auch um einen Escapemechanismus der Tumorgenese handeln, da aufgrund deren Expression eine Methylierung und Kondensation der DNS verhindert wird. Des Weiteren könnten beide Keratine selbst Transkriptionsfaktoren für Onkogene und auch sich selbst darstellen, oder Einfluss auf die Sensitivität der Zelle gegen Medikamente ausüben. Onkogene, die den ras-Transduktions-Signalweg stimulieren, wirken sich so auch auf eine verstärkte Expression von Zytokeratin 18 aus [Oshima, R.G. et al. 1996; Ramaekers, F.C. et al. 2004].

Die erhöhte Expression von Keratin 18 bietet für verschiedene Tumore jedoch auch die Option, als Biomarker eingesetzt werden zu können, was bei Blasenkarzinomen bereits Anwendung findet. Hierzu werden gegen Keratin gerichtete Antikörper verwendet, die es mittlerweile in einer breiten Palette auf dem Markt gibt. Auch das Verhältnis des Gesamtproteins und Fragmenten des Zytokeratin 18 im Serum kann einen Aufschluss über den Therapieerfolg z.B. bei Brust- und Prostatakrebs geben. Das Gesamtprotein wird nur von toten und nekrotischen Tumorzellen freigesetzt, während die Fragmente des Proteins durch apoptotische Zellen in das Serum gelangen. Bei einer Behandlung des Tumors steigt das Verhältnis Gesamtprotein zu Fragmenten an [Linder, S. et al. 2004]. Zytokeratin 18 lässt sich, wie verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben haben, auch im Urin von Patienten mit Blasenkarzinom feststellen und wird daher zu diagnostischen Zwecken verwendet [Starklint, H. et al. 1976]. Keratine spielen aber nicht nur im Bereich der Tumorforschung eine Rolle, sondern sind auch bei anderen Krankheitsbildern von Interesse. Es wurden Autoantikörper gegen Zytokeratin 18 bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten beschrieben. Zu diesen Krankheiten gehören u.a. die primäre Gallenzirrhose, Sklerodermie, rheumatoide Arthritis, Sclerodermie, der Systemischer Lupus erythematodes, die Autoimmunhepatitis und das nichtallergisches Asthma [Gaugler, B. et al. 1996; Murota, M. et al. 2001; Norris, D.A. et al. 1985; Vittecoq, O. et al. 2001; Youinou, P. et al. 1983; Young, B.J. et al. 1979].

5.3 Dysfunktionelle Zytokeratin18-spezifische T-Zellen in gesunden und Kranken Individuen

Vor einigen Jahren wurden in der Arbeitsgruppe erstmals in gesunden Individuen T-Zellen entdeckt, die spezifisch für ein Peptid aus dem Zytokeratin 18-Protein sind [Walter, S. et al. 2005]. Dieses Peptid mit der Aminosäuresequenz ALLNIKVKL [365-373] (Ker1) wird auf HLA-A*0201 präsentiert und wurde durch massenspektrometrische Untersuchungen als potenzielles Epitop für T-Zellen bestimmt [Weinschenk, T. et al. 2002]. Durch die Verwendung von Ker1-Tetrameren konnte gezeigt werden, dass Ker1-spezifische T-Lymphozyten den Phänotyp hochdifferenzierter Effektorzellen sowie NK-Zell-assoziierte Oberflächenmarker exprimieren. Diese Zellen sind *in vitro* jedoch nicht in der Lage Zytokine wie IFNγ oder Perforin auszuschütten, ebenso zeigen sie keine Proliferation bei antigenspezifischer Stimulation [Walter, S. et al. 2005].

In der Untersuchung weiterer gesunder Spender und Patienten mit verschiedenen Tumor- oder Autoimmunerkrankungen, wie RCC, Blasen- und Mammakarzinom, rheumatoider Arthritis, Sklerodermie und Systemischen Lupus erythematodes konnten neben T-Lymphozyten mit der oben genannten Spezifität auch erstmals Zellen spezifisch für den HLA-A2-Liganden RLASYLDRV [89-97] (Ker2) [in der Abteilung Immunologie gefunden und beschrieben] aus Keratin 18 detektiert werden [Attig, S.2005]. Ker1- und Ker2-spezifische T-Zellen in Patienten unterscheiden sich weder in Phänotyp und Funktionalität von gesunden Spendern [Attig, S.2005]. Die Häufigkeit von Ker1-spezifischen liegt über der Ker2-spezifischer T-Zellen. Für das erste Peptid unterscheiden sich gesunde und kranke Individuen in ihrer Frequenz nicht voneinander. T-Zellen spezifisch für Ker2 sind hingegen in Patienten häufiger zu finden als in gesunden Spendern [Attig, S.2005].

5.4 Funktion und Manipulation Ker1-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen von gesunden Individuen

Die verschiedenen Subpopulationen von $CD8^+$ Lymphozyten, sowie deren Eigenschaften wurden bereits in Abschnitt 1.3 erläutert. Zellen, welche Perforin exprimieren, jedoch negativ für das Kostimulatorische Molekül CD28 sind besitzen in den meisten Fällen fortgeschrittene zytotoxische Eigenschaften [Hamann, D. et al. 1997; Posnett, D.N. et al. 1999]. Der Phänotyp von $CD8^+$ Zellen wird auch durch seine Umgebung beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass abhängig von der Art einer viralen Infektion auch das Erscheinungsbild der spezifischen CTLs variiert [Appay, V. et al. 2002]. Im Falle von TAA-spezifischen T-Zellen, die z.B. gegen MelanA oder Tyrosinase gerichtet sind, unterscheidet sich der Phänotyp und das funktionelle Potential zwischen gesunden Individuen und Krebspatienten [Dunbar, P.R. et al. 2000; Valmori, D. et al. 2002]. Stehen CTLs in ständigem Kontakt zu ihrem Antigen, wie z.B. im Falle einer chronischen

Virusinfektion, und fehlen kostimulatorische Signale, wie sie z.B. durch CD28 oder CD27 übermittelt werden, so kann es zur Dysfunktion der Zellen kommen [Curtsinger, J.M. et al. 2003]. Weiter wurde von Tyrosinase-spezifischen T-Zellen in Melanom-Patienten berichtet, die Marker von Effektorzellen exprimieren ($CD27^-$ $CD28^-$ $CD45RA^+$ $CD57^+$), jedoch nicht in der Lage waren Zielzellen zu lysieren oder Zytokine wie IFNγ und TNFα zu produzieren [Lee, P.P. et al. 1999].

Ker1-spezifische T-Zellen weisen ebenso, wie die zuvor beschriebenen TAA-spezifischen Lymphozyten den Phänotyp hochdifferenzierter Effektoren ($CD28^-$ $CD57^+$ $CD45RA^+$ $CCR7^+$ $KLRG1^+$) auf [Attig, S.2005; Walter, S. et al. 2005]. Dennoch sind auch Ker1-spezifische Lymphozyten nicht in der Lage, bei antigenspezifischem Stimulus IFNγ oder Perforin zu produzieren bzw. sezernieren und Zielzellen zu lysieren [Attig, S.2005; Walter, S. et al. 2005]. Daher könnten ihnen vielleicht andere Aufgaben zukommen. So ist bekannt, dass es regulatorische $CD8^+$ T-Zellen gibt, die Einfluss auf eine Immunreaktion nehmen können [Noble, A. et al. 2006].

Das Ausbleiben einer Produktion von Zytokinen bei Antigenkontakt kann auch auf eine nicht ausreichende Aktivierung der T-Zellen zurückzuführen sein [de Visser, K.E. et al. 2001; Dutoit, V. et al. 2002]. Da es sich bei Zytokeratin 18 um ein Selbst-Antigen handelt, ist es möglich, dass Ker1-spezifische Zellen bei der Stimulation mit dem „normal“ Peptid keine Reaktion zeigen, aber vielleicht eine geringfügige Änderung des Peptides ausreichend ist, um die spezifischen T-Zellen zu aktivieren [de Visser, K.E. et al. 2001].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten dazu dienen die Funktion von Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen zu untersuchen. Weiter wurde versucht diese Zellen durch die Verwendung modifizierter Peptidsequenzen zu modulieren bzw. manipulieren und so ihre Aufgabe genauer zu charakterisieren.

5.5 Ergebnisse und Diskussion

5.5.1 Übersicht der gesunden Spender mit Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen

Die gesunden Spender B7, B37 und B296 wurden für die Experimente zur Untersuchung der Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen verwendet. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden die PBMCs von 68 gesunden Spendern auf das Vorkommen von $CD8^+$ $Ker1^+$ T-Lymphozyten untersucht. In 11 Spendern konnten mittels der Färbung durch Ker1-Tetramere diese Zellen detektiert werden. Die Verfügbarkeit der Spender, sowie die Frequenz der $Ker1^+$ T-Zellen schränkte das Feld auf die bereits genannten drei Individuen ein.

Tabelle 10 Übersicht untersuchter gesunder Spender mit Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen

Spender	Anteil an $Ker1^+$ $CD8^+$ T-Zellen
B7	0.35%
B37	0.24%
B296	0.26%

5.5.2 Funktionelle Eigenschaften von Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in gesunden Individuen

Die bisherigen Erkenntnisse zeigten, dass Ker1-spezifischen T-Zellen nach Stimulation mit synthetisch hergestelltem Peptid (Ker1) nicht in der Lage sind, Zytokine wie IFNγ oder TNFα zu produzieren [Walter, S. et al. 2005]. Aufgrund ihrer Frequenz muss es *in vivo* dennoch zu einer Expansion dieser Zellen gekommen sein. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Vorstellbar wäre, dass es in der Peripherie zur Anergie dieser Autoantigen-spezifischen T-Zellen gekommen ist [Pawelec, G. et al. 2006b]. Weiter könnte es sich um regulatorische $CD8^+$ Lymphozyten handeln, welche die Reaktionen des Immunsystems beeinflussen.

Um zu überprüfen, ob Ker1-spezifische T-Zellen suppressive Eigenschaften besitzen, wurden diese Zellen gefärbt und mit Hilfe eines FACS-Sorters separiert. In ^{3}H-Thymidin Proliferations Assays wurden diese Zellen dann mit $CD4^+$ $CD25^{high}$ Tregs verglichen, die ebenfalls durch FACS-Sortierung gewonnen wurden. Hierzu wurden $CD4^+$ $CD25^-$ Zellen oder PBMCs (Effektoren) in unterschiedlichen Anteilen mit den Tregs oder $Ker1^+$ $CD8^+$ T-Zellen koinkubiert und die Proliferation über die Aufnahme des ^{3}H-Thymidins bestimmt.

Die Kokultur von Tregs mit Effektoren (Ratio 1 : 1) zeigte eine reduzierte Proliferation letzterer, wie in Abbildung 14 für den Spender B296 beispielhaft zu sehen ist. Der Grad dieser Suppression ist vom Verhältnis zwischen Effektoren und Tregs abhängig. So zeigt sich eine geringere Aufnahme des ^{3}H-Thymidins, wenn die Effektoren und Tregs in gleicher Anzahl miteinander gemischt und kultiviert wurden. Mit sinkendem Anteil der Tregs stieg die gemessene Proliferationsrate an, da die Effektoren in ihrer Aktivierung einer sinkenden Inhibition unterlagen.

Die Ergebnisse dieser Experimente für die Koinkubation von Effektoren und $Ker1^+$ T-Zellen zeigen sich kontrovers. Im Falle des Spender B296, der einen Anteil von etwa 0.3% $Ker1^+$ $CD8^+$ T-Zellen aufweist [Attig, S.2005], scheinen diese Zellen eine anti-suppressive Wirkung auf die Effektoren auszuüben (zweites Diagramm). Dies zeigt sich in einer verstärkten Aufnahme des ^{3}H-Thymidins bei dem die gleiche Menge an Effektoren und $Ker1^+$ Zellen eingesetzt wurden. Bei reduziertem Anteil an Ker1-spezifischen Zellen reduzierte sich proportional hierzu die gemessene Proliferationsrate.

Da die Kontrollen keinen Unterschied in der Proliferation der $Ker1^+$ T-Zellen bei unterschiedlicher Zellzahl zeigten, ist davon auszugehen, dass sich diese Zellen nicht geteilt hatten. Desweiteren wäre es vorstellbar, dass die $Ker1^+$ Lymphozyten nur in der Anwesenheit der Effektoren proliferieren.

Die Ergebnisse von B7 zeigten bei der Koinkubation von Effektoren und Ker1-spezifischen T-Zellen weder eine reduzierte noch gesteigerte Aufnahme des ^{3}H-Thymidins. Wie im unteren Diagramm der Abbildung 14 zu erkennen ist, unterscheiden sich die Ansätze mit den gemischten Zellen in ihrer Proliferationsrate nicht von den Kontrollen. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Bei der Betrachtung der Proliferationsrate des alloMIX fällt auf, dass dieser hier eine gewisse Teilungsrate zeigte. Die Ursache hierfür könnte in einer nicht ausreichenden Bestrahlung dieser Zellen begründet liegen. Weiter ist es möglich, dass viele der Effektoren während der Inkubation gestorben sind und daher wenig bis kein ^{3}H-Thymidin aufgenommen wurde, sodass es sich bei der bestimmten Teilungsrate nur um den Hintergrund der Messung handelt. Es ist auch vorstellbar, dass die Zellen von B7 weniger stark auf die Stimulation durch den verwendeten alloMIX reagieren als die von B296. Wie bei B296 musste auch bei B7 in den durchgeführten Experimenten wegen der sehr geringen verfügbaren Zellzahlen an der Detektionsgrenze gearbeitet werden. Die Ergebnisse für die Bedingungen mit den Tregs zeigten die, wie bei B296 bereits erläuterte, anteilsabhängige reduzierte Proliferation (Daten nicht gezeigt).

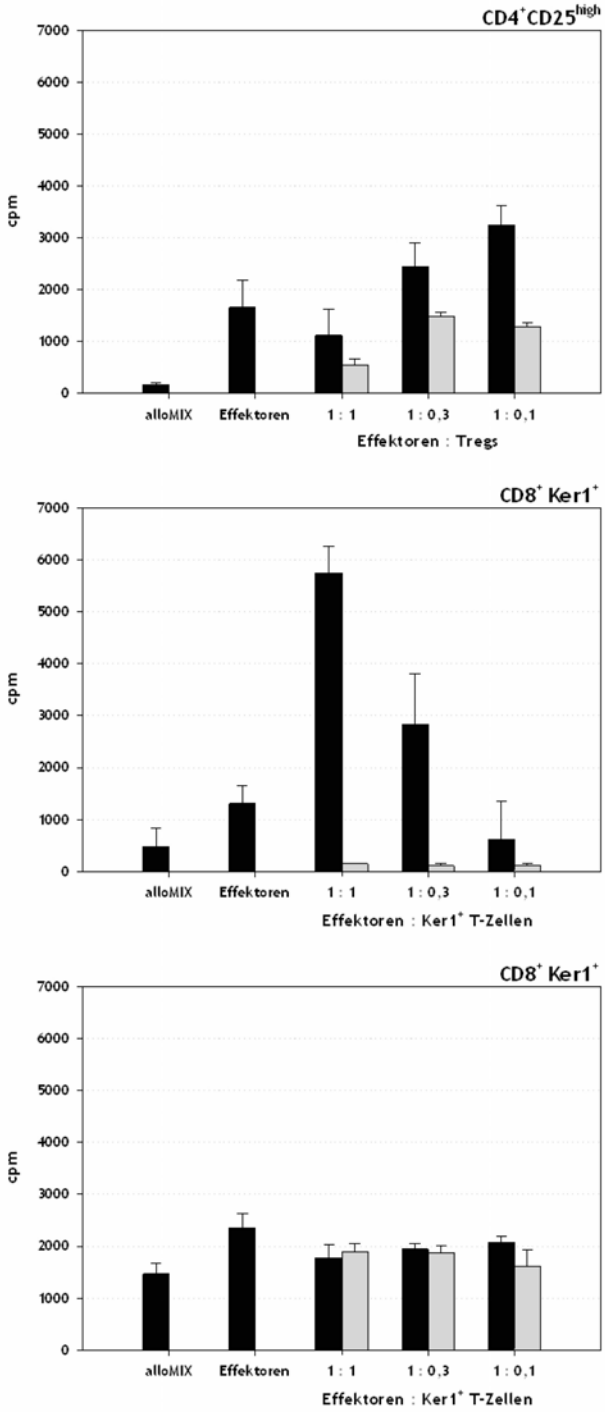


Abbildung 14 ^{3}H-Thymidin-Aufnahme von Effektoren

Die Abbildung zeigt Proliferationsrate der Effektoren durch die Aufnahme von ^{3}H-Thymidin bei der Koinkubation mit Treg oder Ker1^{+} T-Zellen. In allen Bedingungen wurden bestrahlter alloMIX und anti-CD3 Antikörper zur Stimulation der Proliferation zugegeben.

Die beiden oberen Diagramme zeigen Ergebnisse von B296, das untere Diagramm von B7.

Die grauen Balken zeigen die Aufnahme der Tregs oder Ker1^{+} Zellen ohne Effektoren.

Die gewonnen Ergebnisse können hierdurch und durch Schwankungen innerhalb der Messung beeinflusst worden sein. Anhand der Ergebnisse des Spenders B7 ist davon auszugehen, dass die Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Lymphozyten keinen Einfluss auf die Proliferation von anderen Zellen, wie hier den Effektoren, ausüben. Jedoch konnte dies nicht mit absoluter Sicherheit gezeigt werden, da die Untersuchung und experimentellen Bedingungen den beschriebenen Problemen unterworfen waren.

5.5.3 Manipulation von Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen gesunder Individuen mit modifizierten Peptidsequenzen

Die Erkennung von Autoantigenen durch spezifische T-Lymphozyten führt meist zu deren Anergie. Diese werden durch Antigenkontakt nicht aktiviert, d.h. sie zeigen keine Proliferation oder Produktion verschiedener Zytokine. Der Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb des erkannten Antigens kann, wie gezeigt wurde, zur Aufhebung der Dysfunktion führen [Carrabba, M.G. et al. 2003; de Visser, K.E. et al. 2001]. Die Veränderung einer Peptidsequenz kann sich also stark auf die spezifischen T-Zellen auswirken und agonistische oder anti-agonistische Signale induzieren [Bachmann, M.F. et al. 1998].

Wie bereits in Abschnitt 5.3 erwähnt handelt es sich bei Ker1-spezifischen T-Zellen um dysfunktionelle Zellen. Um mehr über die Eigenschaften dieser T-Lymphozyten zu erfahren und diese so zu manipulieren, wurden modifizierte Sequenzen des Ker1-Peptides synthetisiert und in verschiedenen Experimenten eingesetzt.

Die PBMCs der drei getesteten gesunden Spender B7, B37 und B296 wurden zunächst mit verschiedenen modifizierten Peptidsequenzen der Ker1-Sequenz in einem TCR-Downregulation Experiment getestet, um eine Information über die mögliche Aktivierung der $Ker1^+$ T-Zellen zu erhalten. Zeigte ein Spender eine Reaktion in diesem Test, so konnte das Peptid dieses Ansatzes in einem weiteren Experiment verwendet worden. Bei diesem Experiment handelte es sich um eine intrazelluläre IFNγ-Färbung, die eine mögliche Zytokinproduktion und somit Effektorfunktion der getesteten Zellen anzeigte.

Die Wildtyp-Sequenz von Ker1 ALLNIKVKL wurde an verschiedenen Stellen durch den Austausch von einer oder mehreren Aminosäuren modifiziert. Begonnen wurde mit einer Reihe von so genannten Peptidlibraries. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch verschiedener Peptide, die sich in einer oder mehreren Aminosäuren ihrer Sequenz unterscheiden. Die Ergebnisse (Daten nicht gezeigt) waren Grundlage für das Erstellen von Peptidensequenzen, die sich wieder nur wenig von der natürlichen Aminosäurenabfolge unterschieden.

Die so erstellen und verwendeten Sequenzen waren:

Tabelle 11 Modifizierte Peptidsequenzen von Ker1

Die modifizierten Aminosäuren sind unterstrichen hervorgehoben. Getestet wurden diese Sequenzen bei den Spendern B7, B37 und B296.

Peptidsequenz	Peptidsequenz
ALL<u>F</u>IKVKL	AL<u>D</u>NIKVKL
<u>G</u>LLNIKVKL	AL<u>A</u>NIKVKL
<u>G</u>LL<u>F</u>IKVKL	AL<u>S</u>NIKVKL
<u>F</u>LLNIKVKL	AL<u>DF</u>IKVKL
<u>F</u>LL<u>F</u>IKVKL	AL<u>AF</u>IKVKL
<u>S</u>LLNIKVKL	AL<u>SF</u>IKVKL
<u>S</u>LL<u>F</u>IKVKL	

Der Spender B7 zeigte für keines der getesteten Peptide mit modifizierter Sequenz eine Aktivierungsreaktion. Es war weder eine TCR-Downregulation, IFNγ-Produktion noch eine Proliferation der Ker1-spezifischen CTLs dieses Spenders messbar.

Die beiden anderen gesunden Spender reagierten auf unterschiedliche modifizierte Peptidsequenzen. Hierbei zeigten sich gewissen Präferenzen der getesteten Spender für bestimmte Aminosäuren an der dritten und vierten Position des Peptides. Die Zellen des Spenders B37 reagierten auf modifizierte Peptidsequenzen, die an ihrer dritten Position Alanin, Asparaginsäure oder Serin tragen. In der Position vier des Peptides ist die Aminosäure Phenylalanin von Wichtigkeit. Die PBMCs des Spenders B296 reagierten auf bestimmte Kombinationen von Aminosäuren innerhalb des modifizierten Peptides. Findet sich in der ersten und dritten Position ein Alanin, kann an der vierten Stelle ein Asparagin oder Phenylalanin stehen, um eine Aktivierung der Ker1-spezifischen Zellen zu induzieren. Steht in der ersten Position der Sequenz hingegen ein Glycin, muss die dritte Stelle ein Leucin gefolgt von einem Phenylalanin aufweisen, damit es zu einer Stimulation der Ker1-spezifischen Lymphozyten kommt.

Wie Abbildung 15 für den Spender B37 zeigt reagierte dieser u.a. auf die modifizierte Ker1-Sequenz ALSFIKVKL. Nach der Inkubation der PBMCs dieses Spenders konnte keine Population von Ker1-Tetramerbindenden $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden, was auf eine Aktivierung der Zellen hindeutete. Jedoch konnte keine IFNγ-Produktion gemessen werden, obwohl Ker1-spezifische T-Zellen prinzipiell in der Lage sind, dieses Zytokin zu synthetisieren. Dies zeigt die Positivkontrolle nach einer Stimulation mit PMA und Ionomycin klar.

Dieses Ergebnis konnte auch bei anderen Sequenzen sowie B296 beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der Stimulus zwar zu einer gewissen Aktivierung der Zellen und damit zur Downregulation des TCR führt, jedoch in seiner Intensität nicht ausreichend ist, um die Signalkaskade zur Zytokinproduktion hinreichend zu stimulieren. Dies könnte in einer reduzierten Avidität des TCR zu dem Peptid-MHC Komplex im Vergleich zu einer signal-induzierenden Peptidsequenz begründet liegen. Prinzipiell ist auch ein Defekt der intrazellulären Signaltransduktion nicht auszuschließen. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da dieses Phänomen bei verschiedenen gesunden und kranken Individuen zutreffen müsste und eine unspezifische Aktivierung der Zellen zur Produktion von Zytokinen führt. Eine weitere Erklärung könnte eine Beeinflussung der Bindung des Ker1-Tetrameres an die zuvor mit Peptid koinkubierten PBMCs sein.

Es wäre vorstellbar, dass das Tetramer durch noch an den TCR gebundenes modifiziertes Peptid im Sinne einer kompetitiven Inhibition verdrängt wird und es so zu keiner Bindung des Multimers an die $CD8^+$ T-Zellen kommt. Diese Beobachtung könnte sich jedoch auch bei der Verwendung viraler Peptide und den entsprechenden Tetrameren beobachten lassen, was jedoch nicht der Fall ist. Aufgrund unserer Erfahrung lassen die beobachteten Ergebnisse den Schluss zu, dass die Ker1-spezifischen T-Lymphozyten der getesteten Spender durch modifizierte Peptide stimuliert werden können. Die Ursache der fehlenden IFNγ-Produktion konnte nicht vollständig geklärt werden.

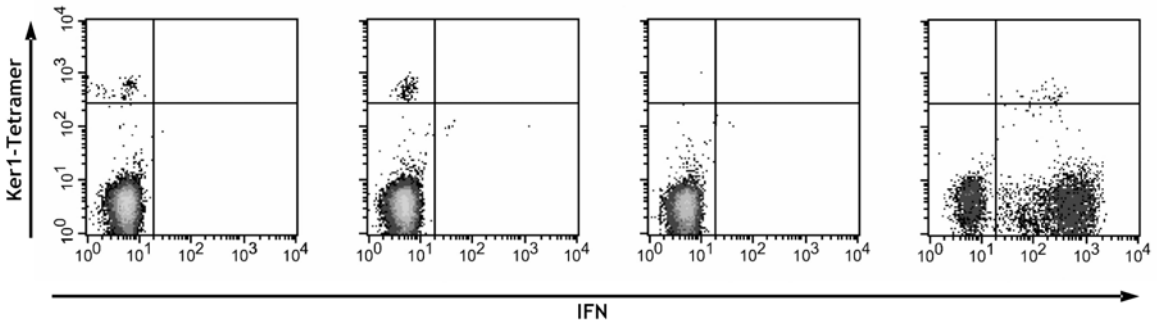


Abbildung 15 Intrazelluläre IFNγ-Färbung von Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen

Die PBMCs von B37 wurden mit verschiedenen Peptiden für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen extrazellulär mit CD8 und Ker1-Tetramer, intrazellulär für IFNγ gefärbt.

Links: Stimulation mit HIV Peptid [ILKEPVHGV]

Mitte-Links: Stimulation mit Ker1 [ALLNIKVKL] (Wildtyp)

Mitte-Rechts: Stimulation mit modifiziertem Peptid [ALSFIKVKL] (modifiziertes Peptid)

Rechts: Stimulation mit PMA und Ionomycin

Die modifizierten Ker1 Peptide wurden auch in Proliferationsexperimenten getestet. Auch wenn keine IFNγ-Produktion detektierbar war, sollte untersucht werden, ob der Stimulus durch die modifizierte Sequenz von Ker1 eine Proliferation der Ker1-spezifischen Zellen induzieren kann. Bei der Verwendung des unveränderten Peptides konnte in der Vergangenheit keine Proliferation gemessen werden. Es ist jedoch bekannt, dass eine Veränderung der Aminosäure-Sequenz eine Proliferation induzieren kann [de Visser, K.E. et al. 2001].

Im Falle der Spenders B296 konnte für drei der getesteten Peptide eine Proliferation von Ker1-Tetramer bindenden $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden. Hierbei zeigte sich eine Proliferation von etwa 26.43% der $Ker1^+$ CD8 Zellen, wenn die Proben mit einer Kombination dieser Peptide inkubiert wurden (Abbildung 16). Im Falle der Stimulation mit dem Influenza Matrix Peptid [GILGFVFTL] und der Färbung mit dem entsprechenden Tetramer zeigte sich eine Proliferation von 90.95% der Inf^+ CD8 Zellen (Abbildung 16).

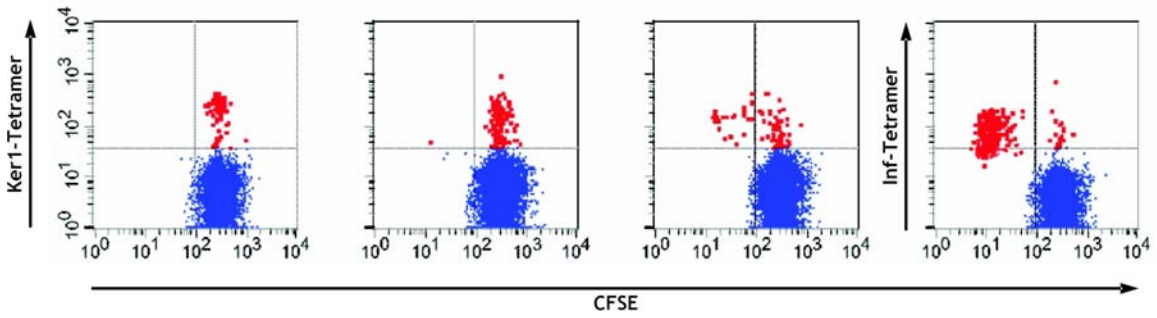


Abbildung 16 Proliferation von Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen

Die PBMCs von B296 wurden mit CFSE markiert und anschließend mit verschiedenen Peptiden für 5 Tage bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit CD8 und Tetrameren gefärbt. In Rot sind die $Tetramer^+$ T-Zellen hervorgehoben. Die verwendeten modifizierten Peptide zeigten in vorhergehenden Experimenten eine Downregulation des TCR und wurden in dem hier gezeigten Experiment gepoolt verwendet.

Links: Stimulation mit HIV Peptid [ILKEPVHGV]

Mitte-Links: Stimulation mit Ker1 [ALLNIKVKL]

Mitte-Rechts: Stimulation mit modifizierten Peptiden [ALANIKVKL, ALAFIKVKL, GLLNIKVKL]

Rechts: Stimulation mit Inf Peptid [GILGFVFTL]

Eine Proliferation konnte bei den Spendern B7 und B37 nach Koinkubation mit verschiedenen modifizierten Ker1-Peptiden jedoch nicht gemessen werden. Es ist möglich, dass der Stimulus der Peptide hier nicht ausreichte, um eine Zellteilung zu induzieren. B7 zeigte keine Reaktion in Form einer TCR-Downregulation, IFNγ-Produktion oder Proliferation nach der Stimulation mit einem der getesteten Peptide. Da bei B37 verschiedene modifizierte Peptide zwar eine Downregulation des TCR induzieren konnten, jedoch keine IFNγ-Produktion messbar war, ließ

sich hier eine etwaige Proliferationsinduktion erwarten. Trotz der leichten Aktivierung, die zu der TCR-Downregulation führte, konnte keine Proliferation bei diesem Spender beobachtet werden. Da B37 auf andere Aminosäureabfolgen des modifizierten Ker1-Peptides reagiert, ist es möglich, dass die Stärke der Aktivierung nicht ausreicht, um eine Teilung der Ker1-spezifischen Zellen zu induzieren.

Die Peptide, welche bei B296 eine Proliferation induzieren konnten, wurden in einer Stimulation mit DCs eingesetzt. Im Rahmen dieser Langzeit-Stimulation von B296 konnte jedoch keine Expansion von $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden, welche in der Lage sind, das Ker1-Tetramer zu binden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 12 Ergebnisse der Stimulation mit modifizierten Ker1-Peptiden

Spender	Peptidsequenz	TCR-Downregulation	IFNγ-Produktion	Proliferation
B7	ALLNIKVKL*	nein	nein	nein
	ALLFIKVKL	nein	nein	nein
	GLLNIKVKL	nein	nein	nein
	GLLFIKVKL	nein	nein	nein
	FLLNIKVKL	nein	nein	nein
	FLLFIKVKL	nein	nein	nein
	SLLNIKVKL	nein	nein	nein
	SLLFIKVKL	nein	nein	nein
	ALDNIKVKL	nein	nein	nein
	ALANIKVKL	nein	nein	nein
	ALSNIKVKL	nein	nein	nein
	ALDFIKVKL	nein	nein	nein
	ALAFIKVKL	nein	nein	nein
	ALSFIKVKL	nein	nein	nein

*Wildtyp-Sequenz von Ker1

Spender	Peptidsequenz	TCR-Downregulation	IFNγ-Produktion	Proliferation
B37	ALLNIKVKL*	nein	nein	nein
	ALLFIKVKL	nein	nein	nein
	GLLNIKVKL	nein	nein	nein
	GLLFIKVKL	nein	nein	nein
	FLLNIKVKL	nein	nein	nein
	FLLFIKVKL	nein	nein	nein
	SLLNIKVKL	nein	nein	nein
	SLLFIKVKL	nein	nein	nein
	ALDNIKVKL	nein	nein	nein
	ALANIKVKL	nein	nein	nein
	ALSNIKVKL	nein	nein	nein
	ALDFIKVKL	ja	nein	nein
	ALAFIKVKL	ja	nein	nein
	ALSFIKVKL	ja	nein	nein
B296	ALLNIKVKL*	nein	nein	nein
	ALLFIKVKL	nein	nein	nein
	GLLNIKVKL	nein	nein	nein
	GLLFIKVKL	ja	nein	ja
	FLLNIKVKL	nein	nein	nein
	FLLFIKVKL	nein	nein	nein
	SLLNIKVKL	nein	nein	nein
	SLLFIKVKL	nein	nein	nein
	ALDNIKVKL	nein	nein	nein
	ALANIKVKL	ja	nein	ja
	ALSNIKVKL	nein	nein	nein
	ALDFIKVKL	nein	nein	nein
	ALAFIKVKL	ja	nein	ja
	ALSFIKVKL	nein	nein	nein

*Wildtyp-Sequenz von Ker1

5.6 Zusammenfassung Zytokeratin 18

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Ker1-spezifische $CD8^+$ T-Zellen von gesunden Spendern zeigten, dass diese Zellen keine klar messbaren regulatorischen Funktionen besitzen. Die Daten wurden mit etablierten und optimierten Versuchsprotokollen durchgeführt. Aufgrund der geringen Frequenz dieser speziellen Zellen mussten die Experimente dennoch an der Detektionsgrenze durchgeführt werden. Dies könnte ein Grund darstellen, weswegen die Ergebnisse eines Spenders nicht immer reproduzierbar waren.

Es wurde versucht, die Reaktion von Ker1-spezifischen T-Lymphozyten durch die Verwendung modifizierter Sequenzen des ursprünglichen Peptides ALLNIVKL zu manipulieren. Hierfür wurden zunächst Peptidlibraries, später Einzelpeptide synthetisiert und deren Effekte auf $Ker1^+$ $CD8^+$ Zellen untersucht. Einige der getesteten Peptide zeigten eine leichte Aktivierung der Zellen, erkennbar durch das Herunterregulieren des TCR, waren jedoch nicht in der Lage eine Produktion von IFNγ zu induzieren. Bei der Verwendung der Wildtyp-Sequenz konnte keine Reaktion auf eine Aktivierung beobachtet werden.

Diese Peptide wurden auch in Experimenten eingesetzt, die es ermöglichen die Proliferation von Zellen zu bestimmen. Hierfür wurde ein Protokoll entwickelt und optimiert, welches die Verwendung von MHC-Tetrameren und CFSE-Markierung zulässt. Mit dieser sensiblen Messmethode war es erstmals möglich, die Proliferation von $Ker1^+$ T-Zellen zu detektieren. Dies konnte für einen der getesteten gesunden Spender bei Verwendung bestimmter modifizierter Ker1-Peptide gezeigt werden. Eine *in vitro* durchgeführte Expansion mit etablierten Stimulationsprotokollen und der Verwendung von DC war jedoch nicht möglich.

Bei Ker1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in gesunden Spendern handelt es sich um Zellen, die den Phänotyp von seneszenten zytotoxischen Effektorzellen ($CCR7^-$ $CD45RA^+$ $KLRG1^+$) aufweisen [Attig, S.2005]. Trotzt dieses Phänotyps sind sie widererwartens bei antigenspezifischer Stimulation nicht fähig IFNγ, TNFα oder Perforin zu sezernieren (Daten nicht gezeigt). Diese Art der Stimulation ist auch nicht ausreichend eine Proliferation dieser T-Zellen *in vitro* zu induzieren. Jedoch sind diese Zellen prinzipiell in der Lage Zytokine zu produzieren und sich zu Teilen. Dies kann bei der starken Aktivierung durch anti-CD3 Antikörper über die Signaltransduktion des TCRs oder bei der TCR-unabhängigen Stimulation mit PMA und Ionomycin beobachtet werden. Daher kann eine Kreuzreaktivität der Ker1-spezifischen Lymphozyten gegen ein nicht bekanntes Antigen nicht ausgeschlossen werden [Rubio-Godoy, V. et al. 2002].

Ob diese TAA-spezifischen T-Lymphozyten *in vivo* eine bestimmte Funktion besitzen, ist weiter nicht klar. Es wurden in der Vergangenheit von HIV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen berichtet, welche genau wie die hier untersuchten Ker1-spezifischen Lymphozyten nicht in der Lage sind, IFNγ oder ähnliche Zytokine auszuschütten [Goepfert, P.A. et al. 2000; Kostense, S. et al. 2002].

Aufgrund der Frequenz innerhalb der $CD8^+$ T-Zellen steht fest, dass die Ker1-spezifischen Zellen zu irgendeinem unbekannten Zeitpunkt proliferiert haben müssen. Der Grund hierfür ist nicht bekannt, könnte jedoch in einem chronischen Kontakt zu dem exprimierten Antigen begründet liegen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für virus-spezifische T-Zellen bei chronischen Infektionen beschrieben [Khan, N. et al. 2002; Vescovini, R. et al. 2004]. Es ist möglich, dass Ker1-spezifische Lymphozyten *in vivo* keine bestimmte Aufgabe zukommt und sie in einigen Individuen lediglich eine gewissen Raum in den $CD8^+$ T-Zellen füllen, wie es bereits für CMV-spezifische Lymphozyten beschrieben wurde [Pawelec, G. et al. 2006b; Pawelec, G. et al. 2006a].

6 Tumorantigen-spezifische T-Zellen in Krebspatienten

6.1 Tumor-assoziierte Antigene (TAA)

In Tumorzellen kommt es zu einer veränderten Expression von Genen auf qualitativer und quantitativer Ebene, was sich auch bei den auf MHC-Molekülen präsentierten Peptiden wiederspiegelt. Die Identifikation von tumorspezifischen Antigenen ist Voraussetzung, um eine gerichtete Immunreaktion induzieren zu können. Diese Antigene werden von Tumorzellen mehr oder weniger stark als in normalen Zellen exprimiert. Unter diesen Tumorantigenen sind besonders die Epitope für T-Zellen interessant, da diese eine zytotoxische T-Zellantwort induzieren können. Die ersten solcher T-Zellepitope wurden 1988 bei der Maus [De Plaen, E. et al. 1988] und kurz darauf auch beim Menschen beschrieben [van der Bruggen, P. et al. 1991].

Tumorantigene und T-Zellepitope werden unter der Verwendung verschiedener Techniken identifiziert [Ressing, M.E. et al. 1995; Stevanovic, S.2002]. Diese gehen beispielsweise von tumorreaktiven T-Zellen aus, durch diese dann Epitope der Tumorantigene selbst ermittelt werden. Weiter können Peptide von der Oberfläche bzw. den exprimierten und isolierten MHC-Molekülen eluiert und chromatographische aufgetrennt werden. Die eigentliche Identifikation geschieht dann durch massenspektrometrische Sequenzierung dieser Peptide [Cox, A.L. et al. 1994; Kruger, T. et al. 2005; Weinschenk, T. et al. 2002]. Um diese Liganden dann als Epitope zu identifizieren, werden sie weiter in verschiedenen *in vitro* Experimenten, die u.a. die Lyse von Ligand exprimierenden oder extern beladenen Zielzellen durch spezifische T-Zellen untersucht [Dengjel, J. et al. 2006; Weinschenk, T. et al. 2002]. Ein anderer Ansatz, der sich die bereits beschriebene Vorgehensweise zu Nutze macht, ist der „*Tübinger Approach*“ [Singh-Jasuja, H. et al. 2004]. Hierbei werden zunächst auch HLA Klasse I-Moleküle von der Oberfläche der Tumorzellen isoliert und dann präsentierte Peptide identifiziert. Für ausgewählte tumorassoziierter Kandidaten folgt nun die Analyse ihrer genetischen Expression. Bestätigt werden die so selektierten Peptidkandidaten dann durch Untersuchung der T-Lymphozyten Reaktion durch die Generierung spezifischer Zellen mittels DCs *in vitro* oder direkt *in vivo* durch Impfung von Tumorpatienten.

Auf Grund der Peptid-Motive ist es auch möglich HLA-Liganden von Tumorantigenen vorherzusagen und zu synthetisieren. In der als reverse Immunologie bezeichneten Vorgehensweise werden diese synthetischen Peptide dann zur *in vitro* Generierung von T-Zellen, spezifisch für dieses Epitop, genutzt [Celis, E. et al. 1994; Wentworth, P.A. et al. 1995]. Richtet sich diese T-Zellen dann auch gegen intakte Tumorzellen war der Ansatz erfolgreich [Celis, E. et al. 1994; Lee, K.H. et al. 1999]. In der Praxis werden auch tatsächlich von Tumorzellen exprimierten Peptide hierfür eingesetzt [Celis, E. et al. 1994; Weinschenk, T. et al. 2002].

6.2 TAA-spezifische T-Lymphozyten in peripherem Blut von Patienten mit Nierenzell- oder Colorektalkarzinom

Ziel dieses Teiles der Arbeit war die Suche nach TAA-spezifischen T-Zellen in Patienten mit Nierenzell- oder Colorektalkarzinom (RCC bzw. CRC). Es sollte untersucht werden, ob in PBMCs der Krebspatienten eine T-Zellantwort gegen verschiedene HLA-Klasse I- und II-Peptide detektierbar ist. Die getesteten Peptide stammen aus tumorassoziierten Proteinen, welche in RCC oder CRC überexprimiert sind (siehe Tabelle 14 und 15). Die getesteten Peptide wurden anhand verschiedener Publikationen und in der Abteilung beschriebener Kandidaten ausgewählt. Die Zellen von HLA-A2 positiven Spendern wurden mit den verschiedenen Peptiden präinkubiert und anschließend mittels IFNγ-ELISPOT und intrazellulärer Zytokinfärbung untersucht. Für letzteres wurden folgende Antikörperkombinationen aus Tabelle 13 verwendet.

Tabelle 13 Antikörperkombinationen zur Untersuchung von TAA-spezifischen T-Zellen

Fluorochrom **Zelltyp** **und Stimulation**	**FITC**	**PE**	**PerCP**	**PE-Cy7**	**APC**	**APC-Cy7**	**Pacific Blue**
CTLs, nach Stimulation MHC Klasse I-Peptiden	CD107a	IL-2	CD8	IFNγ	-	CD4	TNFα
	IFNγ	IL-2	-	CD8	IL-5	CD4	TNFα
T_H1, T_H2, T_H17 und Tregs, nach Stimulation MHC Klasse II-Peptiden	IL-17	IL-10	CD8	IFNγ	IL-5	CD4	TNFα
	IFNγ	IL-2	-	CD8	IL-10	CD4	TNFα

Tabelle 14 Tumor-assoziierte Antigene für RCC

Name und Abkürzung des Antigens	Expression des Quellproteins	Funktion des Quellproteins	Überexpression in RCC*
Survivin	ubiquitär	negativer Regulator von Apoptose	31%
Melanom Antigen Familie A3 (MageA3)	in Testikeln	nicht bekannt	21%
Carbonische Anhydrase 9 (G250, CA9)	Magen, Leber, Pankreas	Reversible Hydratation von CO_2. Kontrolle der Zellproliferation und -transformation	76%
Onkofetales Antigen (TPBG, 5T4)	Ovarial-, Mage- und Colonkarzinome	nicht bekannt	31%
Adipophilin	Adipozyten, Makrophagen	Hauptbestandteil der globulären Oberflächen	72%
Mesenchymal-Epithelialer Transitionsfaktor (MET, cMet)	Epithelzellen, Hepatozyten	Wachstumsfaktor, beteiligt in der Embriogenese und Wundheilung	97%
Regulator des G-Protein Signals (RGS5)	Herz, Skelettmuskulatur, Perizyten	Regulation des G-Protein Signalweges, GPTase Aktivator	86%
CyclinD1	ubiquitär	Regulation und Steuerung des Zellzyklus	59%
Apolipoprotein L 1 (APOL1)	Leber, Plazenta, Plasma	Transport von Fettmolekülen	93%
Zytokeratin 18 (Ker)	Single layer Epithelien, Niere, Blase, Leber, Brust, Pankreas, Colon	Teil des Zytoskeletts	28%

* nach RNA Genchipanalysen der Abteilung für Immunologie; positiv wenn ≥ 2x als Nierengewebe

Tabelle 15 Tumor-assoziierte Antigen für CRC

Name und Abkürzung des Antigens	Expression des Quellproteins	Funktion des Quellproteins	Überexpression in CRC*
Survivin	ubiquitär	negativer Regulator von Apoptose	10%
Carcinoembryonic antigen (CEA)	Darmkrebs	Adhäsionsmolekül	80%
Carbonische Anhydrase 9 (G250, CA9)	Magen, Leber, Pankreas	Reversible Hydratation von CO_2. Kontrolle der Zellproliferation und -transformation.	70%
Trophoblast Glykoprotein (TPBG, 5T4)	Ovarial-, Mage- und Colonkarzinome	nicht bekannt	80%
Mesenchymal-Epithelialer Transitionsfaktor (MET, cMet)	Epithelzellen, Hepatozyten	Wachstumsfaktor, beteiligt in der Embriogemese und Wundheilung	100%
CyclinD1	ubiquitär	Regulation und Steuerung des Zellzyklus	20%

* nach RNA Genchipanalysen der Abteilung für Immunologie; positiv wenn ≥ 2x als Colongewebe

6.3 Ergebnisse und Diskussion

6.3.1 Untersuchte Patienten und verwendete Peptide

Um Reaktionen von antigenspezifischen T-Zellen mit niedriger Frequenz detektieren zu können, ist es notwendig, diese zuvor durch spezifische Peptidstimulation zu amplifizieren. Hierzu wurden die Zellen abends aufgetaut und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die Zugabe der Peptide. Nach einer Kultivierung von 12 Tagen wurde zur Bestimmung einer spezifischen Peptidreaktion ein IFNγ-ELISPOT durchgeführt. Im Anschluss an diese Messmethode wurden die Zellen transferiert und für weitere 10 Tage im Falle der Ansätze mit MHC Klasse I-Peptiden bzw. 12 Tage bei MHC Klasse II-Peptiden bei 37°C kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die analogen Ansätze eines Spenders aus dem ELISPOT (Duplikate oder Triplikate) gepoolt und in der intrazellulären Zytokinfärbung eingesetzt. Hierbei wurden dieselben Peptide wie bereits im ELISPOT verwendet.

Getestet wurden die PBMCs von 16 HLA-$A2^+$ RCC- sowie 12 HLA-$A2^+$ CRC-Patienten. Es wurde für beide Patientengruppen sowohl HLA-A2 Klasse I- als auch HLA-Klasse II-Peptide eingesetzt, die aus tumorassoziierten Proteinen stammen. Als Positivkontrolle wurden die Zellen im ELISPOT mit PHA, im ICS mit PMA und Ionomycin stimuliert.

Tabelle 16 HLA-Klasse I-Peptide für die Stimulation von RCC-Patienten

Quelle des Antigens	HLA	Sequenz	Position	Referenz
Survivin	A*0201	ELTLGEFLKL	*95-104*	[Schmitz, M. et al. 2000]
MageA3	A*0201	FLWGPRALV	*271-279*	[Kawashima, H. et al. 1998; van der, B.P. et al. 1994]
G250	A*0201	HLSTAFARV	*254-262*	[Vissers, J.L. et al. 1999]
5T4	A*0201	GAFEHLPSL	*107-115*	[Smyth, L.J. et al. 2006]
Adipophilin	A*0201	SVASTITGV	*129-137*	[Schmidt, S.M. et al. 2004]
cMet	A*0201	YVDPVITSI	*654-662*	[Schag, K. et al. 2004]
RGS5	A*0201	LAALPHSCL	*5-13*	[Boss, C.N. et al. 2007]
CyclinD1	A*0201	LLGATCMFV	*101-109*	[Sadovnikova, E. et al. 1998]
APOL1	A*0201	FLGENISNFL	*242-251*	[Weinschenk, T. et al. 2002]
APOL1	A*0201	ALADGVQKV	*176-184*	[Weinschenk, T. et al. 2002]
Ker1	A*0201	ALLNIKVKL	*365-373*	[Weinschenk, T. et al. 2002]
Ker2	A*0201	RLASYLDRV	*89-97*	persönliche Mitteilung, Stevanovic, S.

Tabelle 17 HLA-Klasse II-Peptide für die Stimulation von RCC-Patienten

Quelle des Antigens	HLA	Sequenz	Position	Referenz
Survivin	mehrere	TLGEFLKLDRERAKN	*97-111*	SYFPEITHI-Vorhersage durch Stevanovic, S.
MageA3	DR4 DR7	VIFSKASSSLQL	*146-160*	[Kobayashi, H. et al. 2001]
G250	DR4	EIHVVHLSTAFARVDEALGR	*249-268*	[Vissers, J.L. et al. 2002]
5T4	DR4	YVSFRNTHLESLHL	*222-236*	[Elkord, E. et al. 2008]
cMet	DR2	EHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKV	*59-81*	[Chicz, R.M. et al. 1993]
CyclinD1	DR4	NPPSMVAAGSVVAAV	*198-212*	[Dengjel, J. et al. 2004]
Zytokeratin18	DR4	SHYFKIIEDLRAQI	*127-140*	[Dengjel, J. et al. 2004]

Tabelle 18 HLA-Klasse I-Peptide für die Stimulation von CRC-Patienten

Quelle des Antigens	HLA	Sequenz	Position	Referenz
Survivin	A*0201	ELTLGEFLKL	*95-104*	[Schmitz, M. et al. 2000]
CEA	A*0201	GVLVGVALI	*694-702*	[Alves, P.M. et al. 2007]
G250	A*0201	HLSTAFARV	*254-262*	[Vissers, J.L. et al. 1999]
5T4	A*0201	GAFEHLPSL	*107-115*	[Smyth, L.J. et al. 2006]
cMet	A*0201	YVDPVITSI	*654-662*	[Schag, K. et al. 2004]
CyclinD1	A*0201	LLGATCMFV	*101-109*	[Sadovnikova, E. et al. 1998]

Tabelle 19 HLA-Klasse II-Peptide für die Stimulation von CRC-Patienten

Quelle des Antigens	HLA	Sequenz	Position	Referenz
Survivin	mehrere	TLGEFLKLDRERAKN	*97-111*	SYFPEITHI-Vorhersage durch Stevanovic, S.
CEA	DR1, DR3, DR7	TYLWWVNNQSLPVSP	*175-189*	[Campi, G. et al. 2003; Ullenhag, G.J. et al. 2004]
G250	DR4	EIHVVHLSTAFARVDEALGR	*249-268*	[Vissers, J.L. et al. 2002]
5T4	DR4	YVSFRNTHLESLHL	*222-236*	[Elkord, E. et al. 2008]
cMet	DR2	EHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKV	*59-81*	[Chicz, R.M. et al. 1993]
CyclinD1	DR4	NPPSMVAAGSVVAAV	*198-212*	[Dengjel, J. et al. 2004]

6.3.2 Ergebnisse der RCC-Patienten

Die PBMCs der RCC-Patienten (n = 16) wurden wie beschrieben aufgetaut und vor der Durchführung des ELISPOTs prästimuliert. Vor dem Entwickeln des ELISPOTS wurden die Zellen transferiert und für 10 bzw. 12 Tage weiter kultiviert. Nach diesem zweiten Antigenkontakt *in vitro* wurde eine intrazellulare Zytokinfärbung mit Fluorochrom markierten Antikörpern durchgeführt. Bei der Analyse der ELISPOTs mussten folgende Kriterien erfüllt werden, damit eine Reaktion als positiv angenommen wurde:

Mittelwert der Spotzahl eines Dupli- oder Triplikates muss 3 x größer sein als die der Negativkontrolle und mindestens den Wert 10 haben.

Im Falle der intrazellulären Zytokinfärbungen mussten sich die Fluoreszenzintensitäten der getesteten Ansätze von denen der Negativkontrolle klar unterscheiden um als positiv gerechnet zu werden. Konnten die Ergebnisse einer positiven Reaktion eines Patienten in unabhängigen Experimenten reproduziert werden, wurde dies als definitiv positive Reaktion gewertet. Die nach diesen Kriterien als positiv betrachteten Ergebnisse finden sich für die CRC- und RCC-Patienten in den Tabellen 20-23.

Ergebnisse der ELISPOTs und der Zytokinfärbungen zeigten interessanter Weise keine positiven Reaktionen bei der Stimulation der PBMCs mit HLA Klasse I-restringierten Peptiden. Eine mögliche Erklärung ist das Fehlen von TAA-spezifischen CTLs. Weiter ist es vorstellbar, dass die Frequenz dieser spezifischer $CD8^+$ T-Zellen wesentlich geringer als die virus-spezifische ist. Da dies bekannt ist, wurde der ELISPOT nicht *ex vivo*, sondern erst nach einer Prästimulation durchgeführt. Diese sollte dazu dienen, die niedrige Frequenz an TAA-spezifischen T-Zellen zu

amplifizieren, sodass diese Zellen auch im Rahmen der verwendeten Messsysteme detektiert werden können. Da jedoch nach der Amplifikation keine positiven Reaktionen, d.h. eine Produktion und Sekretion von Zytokinen, gemessen werden konnte, kommen verschiedene Erklägungsmöglichkeiten in Frage. Zum einen ist es möglich, dass keine T-Zellen mit der benötigten Spezifität in den PBMCs der getesteten Patientenproben vorhanden waren oder deren Frequenz unter der Detektionsgrenze lagen. Zum anderen kann es sein, dass die T-Zellen das Antigen zwar erkennen, jedoch nicht aktiviert werden. Um die Präsenz antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen zu überprüfen, bietet sich die Untersuchung mittels Tetrameren mit entsprechenden Peptiden an. Dies wurde für einige der Patienten durchgeführt (Daten nicht gezeigt), doch es konnten keine $Tetramer^+$ T-Zellen detektiert werden. Das Fehlen der Aktivierung kann auf die vorangegangene Selektion im Thymus und der Peripherie zurückgehen. Hierbei kommt es zur Deletion oder Anergie von autoreaktiven T-Zellen. Da es sich bei den meisten TAAs auch um Autoantigene handelt, kann dies eine mögliche Erklärung darstellen. Es ist weiter möglich, dass diese T-Lymphozyten über eine nur schwach ausgeprägte Proliferationsrate verfügen und daher die 12-tägige Präkultur nicht ausreichend ist, um diese Zellen stark genug zu amplifizieren.

Im Falle des Kontrollpeptides (Matrixproteins von Influenza GILGFVFTL (Inf)) konnte in beiden Messmethoden eine positive Reaktion detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 20 Ergebnisse der RCC-Patienten nach Stimulation mit HLA Klasse I-Peptiden

Peptid	Sequenz	Position	Anzahl positiv getestet		Prozent positiv getestet	
			ELISPOT	ICS	ELISPOT	ICS
Survivin	ELTLGEFLKL	*95-104*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
MageA3	FLWGPRALV	*271-279*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
G250	HLSTAFARV	*254-262*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
5T4	GAFEHLPSL	*107-115*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
Adipophilin	SVASTITGV	*129-137*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
cMet	YVDPVITSI	*654-662*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
RGS5	LAALPHSCL	*5-13*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
CyclinD1	LLGATCMFV	*101-109*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
APOL1	FLGENISNFL	*242-251*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
APOL1	ALADGVQKV	*176-184*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
Ker1	ALLNIKVKL	*365-373*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
Ker2	RLASYLDRV	*89-97*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
Inf	GILGFVFTL	*58-66*	14 / 14	14 / 14	100.00%	100.00%

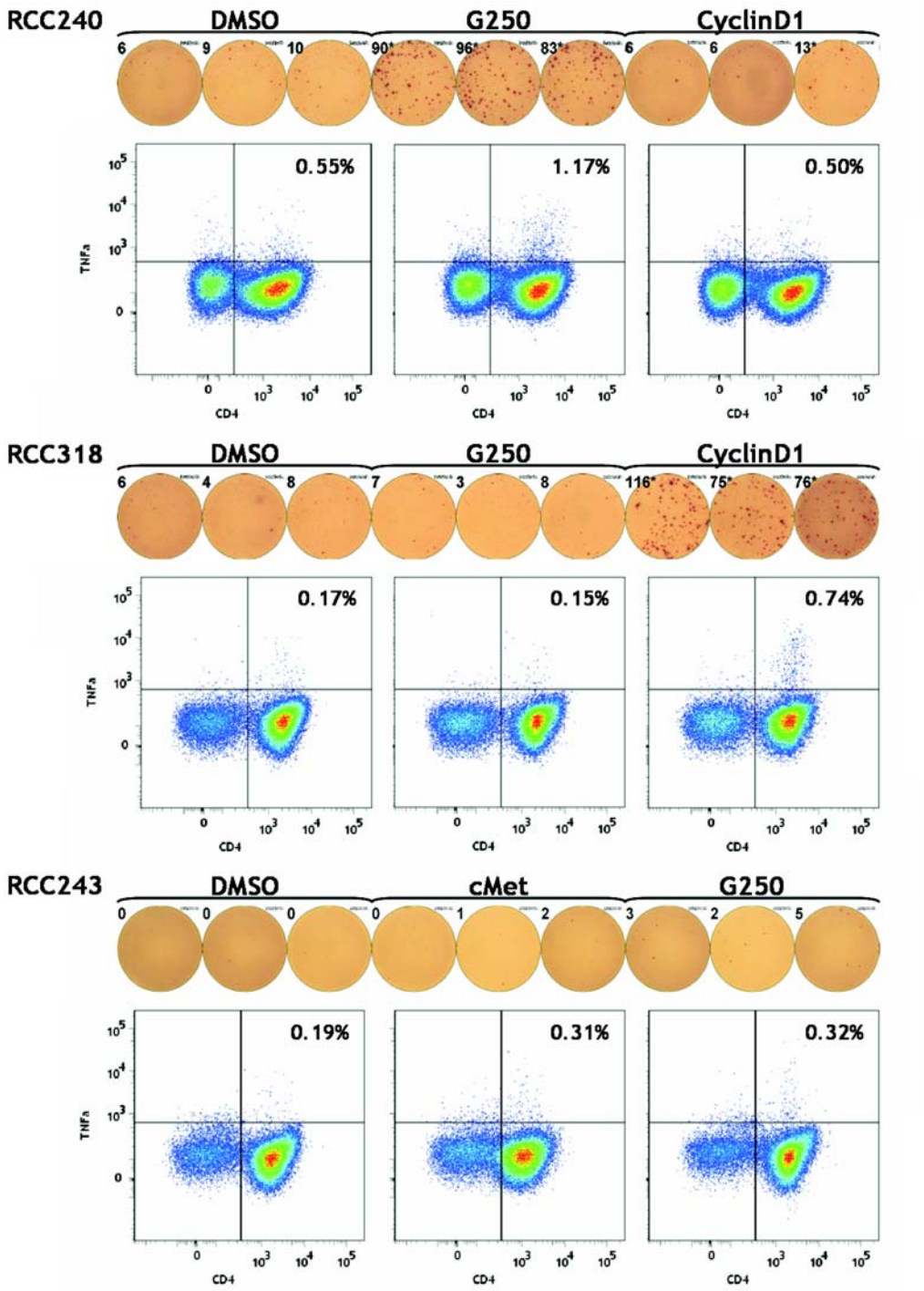


Abbildung 17 Ergebnisse der RCC-Patienten nach TAA Stimulation

Die Abbildung zeigt beispielhaft einen Teil der Ergebnisse von Patienten RCC240, RCC318 und RCC243 nach TAA Stimulation. RCC240 und RCC318 zeigen eine positive Reaktion im ELISPOT und ICS gegen verschiedene Petide. RCC243 ist ein Beispiel für einen Patienten, der keine Zytokinproduktion zeigt.

Im Gegensatz zu dem Fehlen von Reaktionen bei der Stimulation mit MHC Klasse I-Antworten konnten bei der für MHC Klasse II-Peptiden einiger TAAs in verschiedenen Patienten eine T-Zellantwort gemessen werden. So konnten vor allem Antworten im ELISPOT und ICS nach der Stimulation mit den MHC Klasse II-Epitopen von G250 (ELISPOT 18.75% bzw. ICS 12.50%) und CyclinD1 (ELISPOT 20.00% bzw. ICS 13.33%) beobachtet werden. Vereinzelt wurde auch die Produktion von Zytokinen (IFNγ bzw. TNFα) nach der Inkubation mit den Peptiden von cMet, 5T4 und Keratin18 gemessen. Die beiden letzten Peptide führten allerdings nur in jeweils einem Spender zu einer positiven Reaktion. Durch die Zytokinproduktion der T-Zellen nach der Stimulation mit den Klasse II-Liganden von cMet und Keratin konnten diese Peptide erstmals als Epitope identifiziert werden. Wie in Tabelle 21 zu sehen ist, lag die Frequenz der positiv getesteten Patienten im ICS teilweise unter der des ELISPOTs. Dies könnte durch den Verlust von Zellen während des Transfers nach dem ELISPOT erklärt werden. Weiter ist nicht auszuschließen, dass ein Teil der Lymphozyten im Verlauf der zweiten Kulturphase gestorben sind und so die im ICS gemessene Anzahl der Zellen nicht mehr ausreichend ist, um niederfrequente Antworten zu detektieren. Eine weitere Erklärung wäre, dass sich die aktivierte T-Zellen noch in einer Refraktärphase befinden und daher für einen erneuten antigenspezifischen Stimulus noch nicht empfänglich waren [Demotte, N. et al. 2008].

Tabelle 21 Ergebnisse der RCC-Patienten nach Stimulation mit HLA Klasse II-Peptiden

Peptid	Sequenz	Position	Anzahl positiv getestet		Prozent positiv getestet	
			ELISPOT	ICS	ELISPOT	ICS
Survivin	TLGEFLKLDRERAKN	*97-111*	0 / 9	0 / 9	0.00%	0.00%
MageA3	VIFSKASSSLQL	*146-160*	0 / 14	0 / 14	0.00%	0.00%
G250	EIHVVHLSTAFARVDEALGR	*249-268*	3 / 16	2 / 16	18.75%	12.50%
5T4	YVSFRNLTHLESLHL	*222-236*	1 / 15	1 / 15	6.67%	6.67%
cMet	EHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKV	*59-81*	2 / 16	1 / 16	12.50%	6.25%
CyclinD1	NPPSMVAAGSVVAAV	*198-212*	3 / 15	2 / 15	20.00%	13.33%
Keratin	SHYFKIIEDLRAQI	*127-140*	1 / 11	1 / 11	9.09%	9.09%

6.3.3 Ergebnisse der CRC-Patienten

Die PBMCs der CRC-Patienten (n = 12) wurden wie die der RCC-Patienten vor der Analyse im ELISPOT und intrazellulärer Zytokinfärbung durch Stimulation mit den oben genannten Peptiden der TAAs amplifiziert. Die Kontrollen entsprachen denen der Experimente bei RCC-Patienten, ebenso die Bewertung der Messdaten.

Bei den analysierten Daten der CRC-Patienten konnten, ebenso wie bei den RCC-Patienten, keine positiven Antworten gegen HLA Klasse I-TAA detektiert werden. Mögliche Gründe hierfür wurden bereits angesprochen. Es kann sich jedoch auch in diesem Falle nicht um ein Problem in dem Protokoll oder der der Durchführung handeln, da die Ansätze mit dem Kontrollpeptid die erwarteten Reaktionen gezeigt hatten.

Tabelle 22 Ergebnisse der CRC-Patienten nach Stimulation mit HLA Klasse I-Peptiden

Peptid	Sequenz	Position	Anzahl positiv getestet		Prozent positiv getestet	
			ELISPOT	ICS	ELISPOT	ICS
Survivin	ELTLGEFLKL	*95-104*	0 / 5	0 / 5	0.00%	0.00%
CEA	GVLVGVALI	*694-702*	0 / 5	0 / 5	0.00%	0.00%
G250	HLSTAFARV	*254-262*	0 / 3	0 / 3	0.00%	0.00%
5T4	GAFEHLPSL	*107-115*	0 / 3	0 / 3	0.00%	0.00%
cMet	YVDPVITSI	*654-662*	0 / 3	0 / 3	0.00%	0.00%
CyclinD1	LLGATCMFV	*101-109*	0 / 8	0 / 8	0.00%	0.00%
Inf	GILGFVFTL	*58-66*	9 / 9	9 / 9	100.00%	100.00%

Im Falle der Analyse von Antworten bei der Stimulation mit HLA Klasse II-Peptiden konnten, genau wie bei der RCC-Patienten, auch bei den CRC-Patienten positive Reaktionen detektiert werden. Bei der Untersuchung der PBMCs von CRC-Patienten wurden positive Antworten für HLA Klasse II-Peptide von G250, CyclinD1 und CEA detektiert. Die Frequenzen der positiven Antworten innerhalb der CRC-Patienten unterschieden sich im Vergleich der verwendeten Messmethoden nicht voneinander.

Die PBMCs verschiedener CRC-Patienten reagierten bei der Stimulation der TAA von CEA, G250 und CyclinD1 mit der Produktion und Sekretion der Zytokine IFNγ und TNFα. Letzteres wurde in den ICS der Proben detektiert, wohingegen ersteres vor allem in den durchgeführten ELISPOTS detektiert werden konnte. Häufig war es nicht möglich eine Produktion von IFNγ im Rahmen des ICS zu detektieren, was verschiedene Ursachen haben kann. Neben der Frequenz an spezifischen T-Zellen spielt auch die untersuchte Gesamtzellzahl eine entscheidende Rolle. So

ist es möglich, dass einige Zellen durch das Transferieren, der weiteren Tage Inkubation und im Verlauf der Färbeschritte verloren gegangen sind. Es ist außerdem möglich, dass einige der spezifischen T-Zellen nach dem zweiten Antigenkontakt *in vitro* so ausgezehrt waren, dass sie nicht in der Lage waren, erneut Zytokine zu produzieren, oder sie apoptotisch wurden.

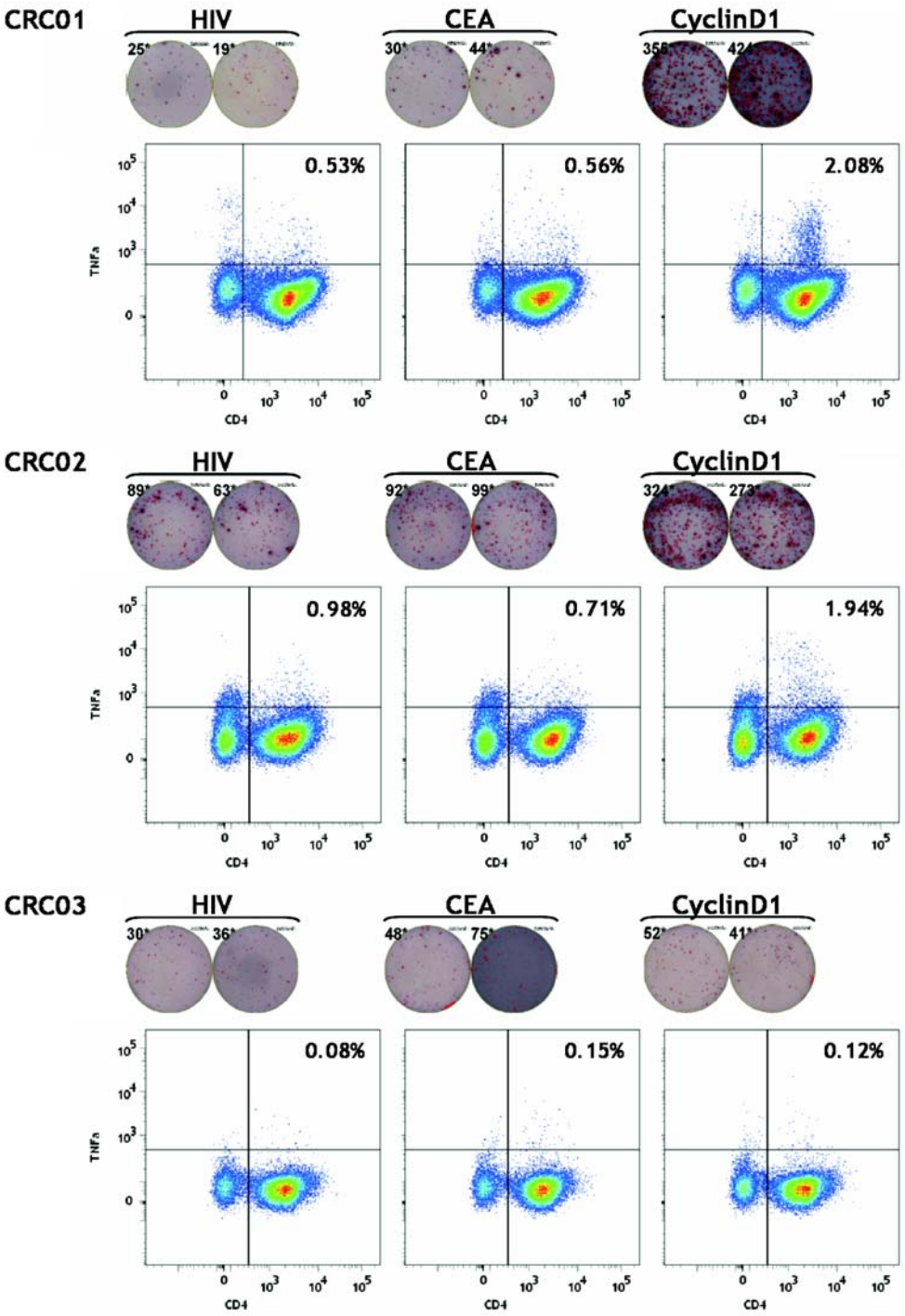


Abbildung 18 Ergebnisse der CRC Patienten nach TAA Stimulation

Die Abbildung zeigt beispielhaft einen Teil der Ergebnisse der Patienten CRC01, CRC02 und CRC03 nach TAA Stimulation. CRC01 und CRC02 zeigen eine positive Reaktion im ELISPOT und ICS gegen verschiedene Peptide. CRC03 ist ein Beispiel für einen Patienten, der keine Zytokinproduktion zeigt.

Tabelle 23 Ergebnisse der CRC-Patienten nach Stimulation mit HLA Klasse II-Peptiden

Peptid	Sequenz	Position	Anzahl positiv getestet		Prozent positiv getestet	
			ELISPOT	ICS	ELISPOT	ICS
Survivin	TLGEFLKLDRERAKN	*97-111*	0 / 8	0 / 8	0.00%	0.00%
CEA	TYLWWVNQSLPVSP	*175-189*	1 / 12	1 / 12	8.33%	8.33%
G250	EIHVVHLSTAFARVDEALGR	*249-268*	1 / 4	1 / 4	25.00%	25.00%
5T4	YVSFRNLTHLESLHL	*222-236*	0 / 5	0 / 5	0.00%	0.00%
cMet	EHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKV	*59-81*	0 / 4	0 / 4	0.00%	0.00%
CyclinD1	NPPSMVAAGSVVAAV	*198-212*	3 / 12	3 / 12	30.00%	30.00%

6.4 Zusammenfassung Tumor-assoziierter Antigene

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen von PBMCs aus RCC- und CRC-Patienten zeigte das Existieren einer T-Zellantwort gegen TAA. Eine Reaktion in Form einer Zytokinproduktion konnte jedoch bei keiner der Stimulationen mit HLA Klasse I-Peptiden detektiert werden. Gründe hierfür könnten in der Toleranzentwicklung durch den chronischen Kontakt der $CD8^+$ T-Zellen mit Tumorantigenen in den Krebspatienten zu finden sein. Wie bekannt ist, kann dies zur Anergie von Effektorzellen führen. Weiter wäre vorstellbar, dass sich die isolierten CTLs durch den ständigen Antigenkontakt *in vivo* noch in einer Art Refraktärphase bzgl. ihrer Effektorfunktionen befinden. Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass die Frequenzen der TAA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen unterhalb der Detektionsgrenze lagen. Auch die Abwesenheit dieser spezifischen Lymphozyten in den PBMCs der Krebspatienten stellt einen wahrscheinlichen Grund für das Ausbleiben einer positiven Antwort nach Klasse I-Stimulation dar. Die Ergebnisse und die genannten Gründe lassen den Schluss zu, dass nur selten mit spontanen Reaktivitäten der T-Zellen gegen die untersuchten HLA Klasse I-Epitope und –Liganden in Patienten zu rechnen ist.

Im Gegensatz zu den Reaktionen gegen Klasse I-Peptide konnten in beiden Patientengruppen die Produktion und Sekretion von IFNγ und TNFα nach Stimulation mit Klasse II-Peptiden beobachtet werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, besitzen Krebspatienten immunkompetente $CD4^+$ T-Zellen, welche gegen unterschiedliche TAAs gerichtet sind. In den untersuchten Patientenproben konnten erstmals sowohl bei RCC- als auch CRC-Patienten vermehrt Antworten gegen synthetisch hergestellte Epitope von G250 und CyclinD1 detektiert werden. Generell konnten in beiden Patientengruppen vermehrt Antworten gegen die bekannten Epitope beobachtet werden. Einige der untersuchten RCC-Patienten zeigten darüber hinaus auch eine T-Zellantwort nach der Stimulation der PBMCs mit den Klasse II-Liganden von

cMet und Keratin 18, wodurch diese, wie bereits erwähnt, als Epitope für $CD4^+$ T-Zellen identifiziert werden konnten.

Die im Rahmen der durchgeführten Untersuchung verwendeten Peptide dieser TAAs scheinen damit von immunologischer Relevanz zu sein. Um diese Relevanz auf physiologischer Ebene bestätigen zu können, müssen die Peptide nach natürlicher Prozessierung, z.B. in entsprechend transfizierten Zelllinien, ebenfalls von $CD4^+$ Lymphozyten erkannt werden können. Die hierfür benötigten Zelllinien sollten nur ein bestimmtes HLA Klasse II-Allel exprimieren.

Die in dieser Arbeit gefundenen überraschenden Ergebnisse werfen neue Fragen auf. Es wäre interessant, mehr über die Gründe zu erfahren, weswegen in beiden Patientengruppen keine Antworten gegen HLA Klasse I-TAAs zu detektieren waren. In der Vergangenheit wurden, im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, von spontanen Antworten von $CD8^+$ Lymphozyten aus Krebspatienten gegen TAAs berichtet [Dittmann, J. et al. 2005]. Aus Impfstudien im Rahmen der Behandlung von Tumoren ist bekannt, dass spezifische $CD8^+$ T-Zellen gegen verschiedene TAA induziert werden können. Ob es sich hierbei um eine Induktion dieser Zellen oder ein gezieltes Proliferieren von Gedächtniszellen handelt, ist nicht klar auszusagen. In den meisten Fällen dieser Impfpatienten lassen [Connerotte, T. et al. 2008; Jager, D. et al. 2005] sich jedoch vor Therapiebeginn nur wenige oder keine TAA-spezifische T-Zellen detektieren. Da die Ergebnisse in dieser Arbeit klar das Vorhandensein von $CD4^+$ T-Zellen mit Spezifitäten für TAAs in Patienten zeigen konnten, wäre es für die Zukunft interessant, HLA Klasse II-Peptide in Impfstudien zur Therapie gegen Tumore einzusetzen.

7 Tumorinfiltrierende Lymphozyten in Patienten mit RCC

7.1 Das Nierenzellkarzinom (RCC)

In der Bundesrepublik Deutschland liegt das Nierenzellkarzinom bei Männern an 10. und bei Frauen an 14. Stelle der Tumorerkrankungen, wobei das Geschlechterverhältnis Männer : Frauen 2 : 1 beträgt [Wechsel, H.W. et al. 2000]. Jährlich erkranken etwa 12.200 Menschen an einem RCC, was einer Inzidienz von 6-7 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner pro Jahr entspricht. Auch für diese Form der Tumorerkrankung ist die Tendenz steigend [Wunderlich, H. et al. 1998].

Für die Entstehung eines RCCs können unter anderem folgende Risikofaktoren genannt werden: Phenacetinabusus [Outzen, H.C. et al. 1983], Nikotinabusus [Asal, N.R. et al. 1988] und der Genuss entkoffeiniertem Kaffees [Goodman, M.T. et al. 1986]. Diese Ergebnisse wurden in Tierexperimenten beobachtet, konnten bislang jedoch nicht am Menschen verifiziert werden. Neben Umweltfaktoren spielen allerdings auch genetische Determinanten bei der Entstehung eines RCC eine entscheidende Rolle. Beispiele hierfür sind die polyzystische Nierendegeneration und das Hippel-Lindau Syndrom [Goodman, M.D. et al. 1990].

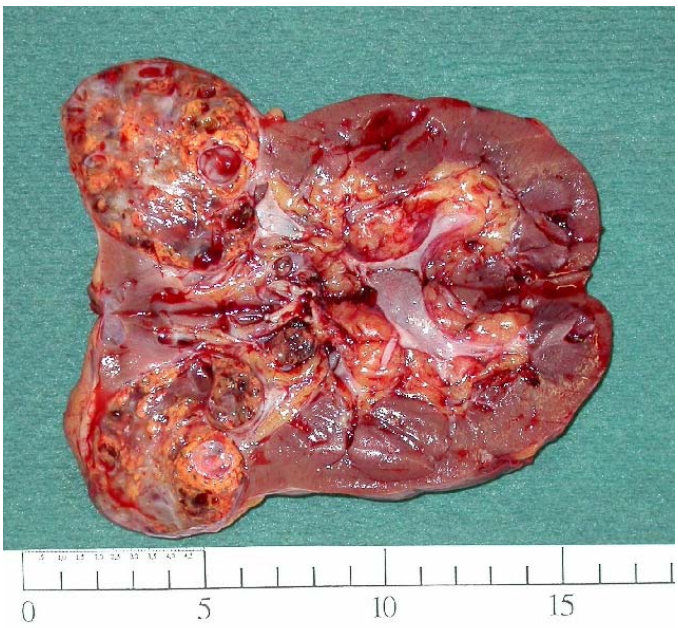


Abbildung 19 RCC makroskopisch

© Jörg Hennenlotter, Universitätsklinik für Urologie, Tübingen

Die Patienten sind meist beschwerdefrei und die Diagnose ist daher häufig ein Zufallsbefund. Symptomatisch sind meist erst die Metastasen, wobei auf der Suche nach dem Primärtumor erst die Diagnose eines RCCs gestellt wird. Da die bildgebenden Verfahren aussagekräftig genug sind ist eine Biopsie nicht notwendig. Die Methode der Wahl zur Behandlung eines RCCs ist die primäre Resektion des Tumors. Im Verlauf der Operation kann die Diagnose per Schnellschnitt bestätigt werden. Weiter spricht die Heterogenität der RCCs gegen die Durchführung einer Biopsie, so dass keine sichere Aussage erwartet werden kann [Wechsel, H.W. et al. 2000].

Da zuverlässige Tumormarker fehlen, kann die Frühdiagnose eines RCCs nur über eine regelmäßige renale Sonographieuntersuchung gestellt werden. Diese Art der Untersuchung ist heute allerdings noch nicht Teil der Vorsorge. Die weite Verbreitung von Ultraschallgeräten trägt jedoch bereits jetzt zu einer erhöhten Diagnoserate bei, die aktuell bei 48% liegt [Sweeney, J.P. et al. 1996].

Bei den erst in höherem Tumorstadium auftretenden Symptomen ist eine Trias klassisch: Flankenschmerz, Hämtourie und tastbare Raumforderung der Niere. Diese Trias ist allerdings nur in 3-10% der Fälle vollständig ausgebildet. Mindestens eines der Symptome findet sich in 70% der Fälle. Die Symptome sind meist unspezifisch und äußern sich in Gewichtsverlust, Fieber oder Hypertonie [Wechsel, H.W. et al. 2000].

Ein lokalisiertes Stadium liegt in etwa 40% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose vor. Je weitere 30% befinden sich in einem scheinbar lokalisierten Stadium mit metachroner Metastasierung oder weisen bereits Fernmetastasen auf [Chan, D.Y. et al. 1998; Thrasher, J.B. et al. 1993].

Die Einteilung des RCCs erfolgt nach histologischen Kriterien, wie Tabelle 24 zeigt.

Tabelle 24 Einteilung des RCCs nach histologischen Kriterien

Modifiziert nach [Thoenes, W. et al. 1991; Wechsel, H.W. et al. 2000]. 5% der Nierentumore sind Onkozytome, die nicht als maligner Nierentumor angesehen werden.

Subtyp	Häufigkeit	Beschreibung
Klarzelliges RCC	75%	Helles, transparentes Zytoplasma im HE-Schnitt
Chromophilzelliges RCC	11%	Geht im Wesentlichen vom proximalen Tubulus aus, ebenso wie klarzellige Karzinome
Chromophobzelliges RCC	5%	Dieses in erster Linie vom distalen Tubulus bzw. dem Verbindungsstück zwischen Metanephros und Ureterknospe ausgehende Karzinom zeigt sich im HE-Schnitt ebenfalls mit hellen und transparenten Zytoplasmen, die elektronenmikroskopisch auf der Ansammlung zahlreicher membranöser Vesikel im Zytoplasma beruht. Im Gegensatz dazu zeigt das klarzellige RCC elektronenmikroskopisch als Ursache der Transparenz des Zytoplasmas die Herauslösung von Glykogen und Fett.
Duct-Bellini-Karzinom	1%	Dieser insgesamt seltene Tumor geht von Hauptzellen, insbesondere des medullären Sammelrohrs aus.

Die Metastasierung eines RCCs erfolgt in 55% der Fälle pulmonal, in 34% in lymphogen und 33% in der Leber zu finden. Weiter kommen Metastasen in der kontralateralen Niere (11%), des Herzens (5%), des Nervensystems (6%) und der Knochen (32%) vor [Wechsel, H.W. et al. 2000].

Die Klassifikation des RCCs wird nach dem TNM-System und Robson vorgenommen:

Tabelle 25 Klassifikation und Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms

Aus [Wechsel, H.W. et al. 2000], nach [Robson, C.J. et al. 1969] und [Holland, J.M.1973]

Robson	TNM	Beschreibung
I	T1, N0, M0	Tumor ≤ 2 cm (Robson) bzw. ≤ 4 cm (TNM) in seiner größten Ausdehnung, begrenzt auf eine Niere.
		Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.
	T2, N0 M0	Tumor ≤ 2 cm (Robson) bzw. 4-7 cm (TNM) in seiner größten Ausdehnung, begrenzt auf eine Niere.
		Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.
II	T3a, N0, M0	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe (Fettkapsel), aber nicht über die *Faszie von Gerota* hinaus.
		Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.
IIIa	T3b, N0, M0	Tumor mit Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells.
		Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.
	T3c, N0, M0	Tumor mit Ausbreitung in *Vena cava* oberhalb des Zwerchfells.
		Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.
	T4, N0, M0	Tumor infiltriert über *Faszie von Gerota* hinaus (Robson: ohne Beteiligung von Nachbarorganen).
		Keine regionären Lymphknoten-, keine Fernmetastasen.
IIIb	T1-3a, N1-2, M0	Metastase in einem oder mehreren regionären Lymphknoten.
		Keine Fernmetastasen.
IIIc	T3b-4, N1-2, M0	Veneninvasion zusammen mit regionären Lymphknotenmetastasen.
		(Kombination von Robson IIIa und IIIb)
IVa	T4, N1-2, M0	Organüberschreitendes Tumorwachstum mit Infiltration in Nachbarorgane.
IVb	T1-4, N1-2, M1	Fernmetastasen

Eine Ursache für die genetische Entstehung eines klarzelligen RCCs ist der Verlust genetischen Materials auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 (Chromosom 3p25). Hier befindet sich das von Hippel-Lindau beschriebene Gen, das bei der Entstehung eines Tumors der Niere beteiligt sein

könnte. Eine Mutation dieses Gens findet sich in 75% der sporadischen klarzelligen RCCs [van Houwelingen, K.P. et al. 2005]. Das Hippel-Lindau-Gen (VLH) gehört zu den Tumorsuppressorgenen und kodiert ein Protein, das den Transkriptionsfaktor HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor*) in seiner Expression überwacht. Dieser Transkriptionsfaktor selbst nimmt Einfluss auf die Produktion von Erythropoetin und VEGF. Bei einer Dysfunktion des von Hippel-Lindau-Proteins kann HIF-1 nicht durch Degradieren abgebaut werden. Der Überschuss des Transkriptionsfaktors führt zu einer verstärkten Produktion an VEGF, was ein Tumorwachstum fördert [Corn, P.G. et al. 2003; Genbacev, O. et al. 2001; Maranchie, J.K. et al. 2002].

In der Diskussion für weitere genetische Ursachen, die für das Entstehen von RCCs verantwortlich sind, stehen neben dem Verlust des Y-Chromosoms auch Trisomien der Chromosomen 7, 8, 12 und 17 [Feil, G. et al. 1999b; Feil, G. et al. 1999a; Kovacs, G. et al. 1991; Mirghomizadeh, F. et al. 1999]. Das Durchführen einer genetischen Diagnose empfiehlt sich allerdings nur bei einer nachgewiesenen genetischen Belastung wie dem gehäuftem Auftreten von RCCs innerhalb einer Familie. Die Risikoabschätzung ist aber auch hier nicht einfach, da kein bestimmtes Gen für die Entstehung eines RCCs verantwortlich gemacht werden kann [Wechsel, H.W. et al. 2000].

Therapien wie die präoperative Behandlung mit neoadjuvanter Chemotherapie, Bestrahlung oder Embolisation der *Arteria renalis* zeigen bei RCCs keinen operativen oder klinischen Vorteil. Daher wir als Standardtherapie bei RCCs eine radikale Tumornephrektomie durchgeführt, falls die kontralaterale Niere gesund ist. Im Verlauf der Resektion werden neben der befallenen Niere auch deren Fettkapsel sowie die Nebenniere entfernt [Kozak, W. et al. 1996]. Bei Tumorgrößen von 3-5 cm kann im Falle eines soliden und auf die Niere aufsitzenden Tumors auch nur eine Tumorenukleation durchgeführt werden. Dies ist auch bei dem Vorhanden sein einer gesunden contralateralen Niere durchführbar, wenn ein ausreichend großer Sicherheitsabstand eingehalten werden kann.

Eine postoperative Strahlentherapie wirkt sich, nach einigen Studien, bei fortgeschrittenen RCCs (pT3) positiv auf die Überlebenszeit der Patienten aus [Kao, G.D. et al. 1994; Stein, M. et al. 1992]. Als lindernde Behandlungen werden auch Nierenarterienembolisationen und Strahlenbehandlungen eingesetzt [Wechsel, H.W. et al. 2000], auf welche hier aber nicht weiter eingegangen werden soll.

7.2 RCC und Immunantwort

Beim Menschen gilt das RCC neben dem malignen Melanom als der meist immunogene Tumor. Hierin liegt die Vermutung für diese Ursache, dass es in einem kleinen Teil der Betroffenen zu einer Spontanremission kommt. Weiter kann dies auch die Therapieerfolge durch die Behandlung mit IFNα und IL-2 einer anderen kleinen Gruppe vom 3-5% der so behandelten Patienten erklären [Bukowski, R.M.2000]. Zellen des Immunsystems sind in der Lage, einen Nierentumor zu infiltrieren. Bei diesen Zellen handelt es sich bekannterweise um $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten mit den Eigenschaften aktivierter Zellen [Angevin, E. et al. 1997; Bukowski, R.M.2000; Elsasser-Beile, U. et al. 2000; Jantzer, P. et al. 1998].

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Tumorantigene, die von RCCs exprimiert werden, beschrieben. Einige dieser Antigene, wie z.B. Her2/neu, PRAME und RAGE-1 sind nicht für Tumore der Niere spezifisch, wohingegen G250 als ein spezifisches Antigen für ein RCCs beschrieben wurde [Grabmaier, K. et al. 2000; Neumann, E. et al. 1998; Vissers, J.L. et al. 1999]. Spezifische Antworten gegen diese Tumorantigene existieren bereits *in vivo*. Hierbei handelt es sich um Antigen-spezifische Zellen, die sich in peripheren Blut [Gaugler, B. et al. 1996; Kawagoe, N. et al. 2000] oder in TILs finden lassen [Gaugler, B. et al. 1996; Kawagoe, N. et al. 2000; Probst-Kepper, M. et al. 2001].

Weiter konnte bereits gezeigt werden, dass viele der Patienten über Antikörper verfügen, die gegen Strukturen der Tumorantigene gerichtet sind [Gaugler, B. et al. 1996; Scanlan, M.J. et al. 1999].

Wegen der genannten Gründe kann eine Immuntherapie bei RCCs als potentiell erfolgversprechend angesehen werden.

7.3 Tumorinfiltrierende Lymphozyten in RCC-Patienten

Die Anwesenheit von TILs in Tumorgewebe ist ein Hinweis für die Erkennung durch das Immunsystem, jedoch bei Wachstum des Tumors gleichzeitig auch für das Ausbleiben einer Immunantwort. Wie bereits erwähnt können hierfür die Ursachen in der Anergie, der Deletion oder Inhibition von aktivierten Effektorzellen liegen. Ein weiterer Grund für eine reduzierte Effektorfunktion der infiltrierenden Lymphozyten ist eine verstärke Expression von inhibitorischen NK-Zell assoziierten Oberflächenmolekülen wie CD158b oder CD94. Dies konnte in der Vergangenheit für TILs von Cervix-Karzinom- und RCC-Patienten gezeigt werden [Guerra, N. et al. 2000; Sheu, B.C. et al. 2005]. Im Falle von CD158b konnte, wie berichtet wurde, die inhibitorische Wirkung dieses Markers durch die Verwendung blockierender Antikörper aufgehoben werden [Chiou, S.H. et al. 2005; Guerra, N. et al. 2000].

Der erhöhte Anteil von regulatorischen Zellen im peripheren Blut, welcher in verschiedenen Gruppen von Tumorpatienten beschrieben wurde (siehe Abschnitt 1.5.3), konnte auch bei RCC-Patienten beobachtet werden [Cesana, G.C. et al. 2006; Griffiths, R.W. et al. 2007]. Dieses Phänomen wurde, wie bereits erwähnt, auch nach der Behandlung von RCC-Patienten mit hohen IL-2- Dosen beobachtet [Cesana, G.C. et al. 2006]. Ob sich diese Therapieform jedoch negativ auf den Patienten auswirken kann, ist nicht bekannt. Wie Cesana et al. in ihrer Studie 2006 zeigen konnten, steigt der Anteil an Tregs bei einer IL-2-Therapie zwar zunächst an, fällt jedoch bei Patienten mit einer objektiv erkennbaren, klinischen Antwort wieder auf ein „normales“ Niveau ab. Patienten mit einem progredientem Verlauf zeigen diesen Abfall hingegen nicht [Cesana, G.C. et al. 2006]. Jedoch zeigten verschiedene Studien auch für RCC-Patienten eine reduzierte Überlebensprognose, im Falle eines verstärkten Auftretens von Tregs [Griffiths, R.W. et al. 2007; Siddiqui, S.A. et al. 2007].

7.4 Ergebnisse und Diskussion

7.4.1 Vergleich verschiedener Isolationsmethoden Tumor-infiltrierender Lymphozyten

Das Tumorgewebe wurde wie beschrieben aufgearbeitet, um die infiltrierenden Lymphozyten zu isolieren. Für zwei Patientenproben wurde ein Teil des Gewebes „klassisch“ mit der Hilfe von verschiedenen Enzymen oder mechanisch mit der Medimachine™ aufgearbeitet. Nach der folgenden Färbung verschiedener Oberflächenmarker wurden die Proben mittels FACS-Analyse ausgewertet. Als Referenz zu den isolierten TILs wurden PBMCs des jeweiligen Spenders mit der gleichen Antikörperkombination gefärbt.

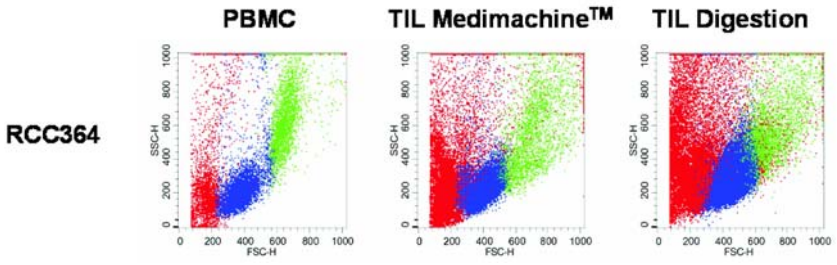
Bei der enzymatischen Isolation von TILs fällt eine größere Menge Debris und toten Zellen, die sich auf der linken Seite im der Darstellung befinden (Abbildung 20, rote Ereignisse), auf. Die Population der Lymphozyten (Abbildung 20, blaue Ereignisse) erscheint in der Darstellung der enzymatischen Isolation größer zu sein als die der mechanisch aufgearbeiteten Probe. In dieser größeren Population befinden sich jedoch auch apoptotische Zellen, die sich an dem linken und oberen Rand des Ereignisclusters befinden, welche durch Lebend/Tot-Färbung identifiziert werden können. Diese Zellen können zwar durch die Antikörper angefärbt werden, sind jedoch bei einer differenzierteren Analyse verschiedener Zellpopulationen hinderlich, da sie hier den Hintergrund der Messung erhöhen. Der Anteil an Monozyten (Abbildung 20, grüne Ereignisse) in der Darstellung des FSC vs. SSC zeigt keine klaren Unterschiede zwischen den beiden Isolationsmethoden. Dies könnte in einer generell reduzierten Anzahl dieser Zellen innerhalb des Tumorgewebes begründet liegen.

Tabelle 26 Vergleich der Zellpopulationen nach enzymatischer und mechanischer Isolation

In der Tabelle sind die Mittelwerte für verschiedene Zellpopulationen der beiden getesteten RCC-Patienten in Abhängigkeit von der Isolationsmethode aufgeführt.

	PBMCs	TILs Medimachine™	TILs Digestion
Lymphozyten	41.82%	49.82%	57.15%
Monozyten	40.62%	13.37%	13.24%
Debris und tote Zellen	17.56%	26.13%	36.94%

Im Gegensatz zu der enzymatischen Isolation der Zellen werden bei der mechanischen Vorgehensweise verschiedene Oberflächenmoleküle nicht beeinflusst. Da die Epitope der Antigenbindungstellen durch die verwendeten Enzyme mehr oder weniger stark degradiert werden können, verändert sich auch die Darstellung bei der Färbung mit Antikörpern, wie Abbildung 21 zeigt. Die Populationen für verschiedene Zelltypen verschwimmen und werden diffuser, was für die Marker CD8, CD25, CD45RA und CD56 beobachtet werden konnte. Dies liegt daran, dass die Zellen einer Population nicht mehr so homogen in ihrer Oberflächenmolekülexpression sind. Da die Fluoreszenzintensität von der Menge an gebundenem Antikörper abhängt und dieser wiederum von der Expression des entsprechenden Antigens, verändert sich die Darstellung bei Beeinflussungen der beiden zuletzt genannten Parameter.



rot: Debris und tote Zellen

blau: Lymphozyten

grün: Monozyten

Abbildung 20 Mechanische und enzymatische Isolation Tumor-infiltrierender Lymphozyten

Die Abbildung zeigt in einem FSC-SSC Dotplot PBMCs und mechanisch bzw. enzymatisch isolierte TILs von RCC364.

PBMCs der RCC-Patienten in der linke Spalte

mechanisch isolierte TILs in der mittleren Spalte

enzymatisch isolierte TILs in der rechten Spalte

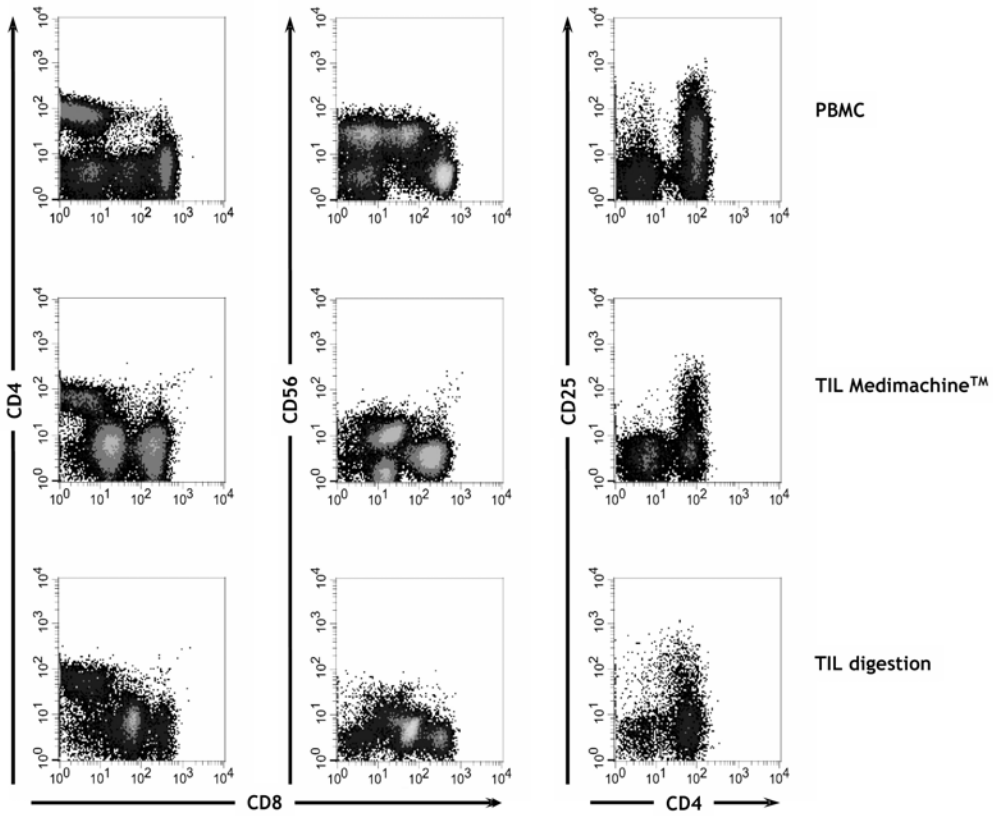


Abbildung 21 Einfluss der Isolationstechnik auf die Färbung mit Antikörpern

Oben: PBMCs der RCC-Patienten

Mitte: mechanisch isolierte TILs

Unten: enzymatisch isolierte TILs

7.4.2 Phänotypischer Vergleich von PBMCs und TILs der RCC-Patienten

Die isolierten Lymphozyten der Patienten wurden ohne Kultivierung nach dem Auftauen der Proben in Multicolorstainings gefärbt. Hierbei kamen verschiedene Kombinationen von Antikörpern zur genaueren Charakterisierung verschiedener Zelltypen wie z.B. regulatorischer T-Zellen und CTLs oder der Expression von NK-Zell-assoziierten Oberflächenmolekülen und Chemokinrezeptoren zum Einsatz.

Tabelle 27 Liste der phänotypisch untersuchten RCC-Patienten (n = 30)

Patienten Kodierung	Alter	Geschlecht	Tumortyp	Tumorstadium
402	47	w	chromophob	pT1b G2 cN0 cM0
409	56	m	klarzellig	pT1b G2 cN0 cM0 R0
410	61	w	klarzellig	pT1b pN0 M0 L0 V0 R0
412		w	chromophob	pT1a G2 cN0 cM0 L0 V0 R0
417	65	m	klarzellig	1. pT1a G2 Nx M0 L0 V0 pR0
				2. pT1a G1/2 Nx M0 L0 V0 pR0
419	74	m	klarzellig	pT1b G2 cN0 cM0 R0
421	67	m	klarzellig	G3
424	51	w	klarzellig	pT1a G2 cN0 cM0 R0
425	57	m	klarzellig	pT3b G3 pN0 cM0 L0 V1 R0
426	73	m	klarzellig	pT3a G3 cN0 cM1 L0 V0 R0
429	73	w	sarkomoid	pT1b G1 cN0 cM0 L0 V0 R0
430	80	w	klarzellig	pT1a G1 cN0 cM0 L0 V0 R0
433	78	m	klarzellig	pT1b G1-2 cN0 cM0 L0 V0 R0
442	62	m	chromophob	pT1b G1-2 cN0 cM0
444	73	w	klarzellig	pT3b G2 cN0 cM0 L0 V1 R0
445	62	w	klarzellig	pT1b G2 pN2 M1 L1 V0 R1
449	75	w	klarzellig	pT3b G3 pN1 pM1 L1 V1 R1
451	65	w	klarzellig	pT2 G2 Nx cM0
452	75	w	klarzellig	pT1b G1 cN0 cM0 L0 V0 R0
458	73	w	klarzellig	pT3b G2 pNx cM0 V1 R0
460	89	w	klarzellig	pT3b G2 cN0 cM0 L0 V1 R0
464	63	w	klarzellig	pT1b G3 pN0 M0
467	80	m	klarzellig	pT3b pN1 G1 Rx
468	43	m	klarzellig	pT3b pN0 R0
478	49	w	papillär	pT1a G2 cN0 pM0 R0
479	78	m	klarzellig	pT1b G2-3 cN0 cM0 L0 V0 R0
482	74	w	klarzellig	pT1b G3 cN0 cM0 L0 V0 R0
483	77	m	papillär	pT1a G2 cN0 cM0 L0 V0 R0
484	55	w	klarzellig	pT1a G2 cN0 cM0 L0 V0 R0
486	66	m	klarzellig	pT3a G2 L0 V0 Rx

Tabelle 28 Antikörperkombinationen zur phänotypischen Analyse

Fluorochrom Zelltyp	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	Pacific Blue	Aqua Blue
Tregs	CD127	Foxp3	CD8	CD25	CD120b	CD4	CD45RA	Lebend /Tot
CTLs, CMs, EMs	CD57	NKG2D	CD8	CCR7	CD28	CD4	CD45RA	Lebend /Tot
γδ T-Zellen, NKT-Zellen	Vδ2	Vα24	CD8	CD56	TCRγδ	CD4	CD3	Lebend /Tot
NK-Zellen, T-Zellen	KLRG1	CD94	CD8	CD56	CD158b	CD4	CD3	Lebend /Tot
$CD8^+$-Tregs	CD103	NKG2D	CD8	CD56	TCRγδ	CD4	CD3	Lebend /Tot
Chemokin-rezeptoren	CCR4	CCR5	CD8	CD56	CXCR3	CD4	CD3	Lebend /Tot

7.4.2.1 Auswertung des phänotypischen Vergleiches von PBMCs und TILs der RCC-Patienten

Die verschiedenen analysierten Anteile der Zellpopulationen wurden, wie Abbildung 22 exemplarisch zeigt, für die PBMCs und TILs der RCC-Patienten, sowie die PBMCs der gesunden Spender in Form eines Punktediagrammes dargestellt. Hierbei repräsentiert jeder der Punkte einen Spender der jeweiligen Gruppe. Unterhalb der Grafik findet sich die Angabe über den Umfang der Gruppe, z.B. n = x / y / z (x = Anzahl der RCC-Patienten (PBMCs), y = Anzahl der RCC-Patienten (TILs) und z = Anzahl der gesunden Spender (PBMCs)).

7.4.2.1.1 Effektorzellen in RCC-TILs

Die Gruppe der gesunden Spender wurde in zwei Subgruppen unterteilt, die sich im Bezug auf ihr Alter unterscheiden. Diese Unterteilung wurde durchgeführt, da mit zunehmendem Alter gewisse Verschiebungen der Anteile zwischen den Subpopulationen von T-Zellen auftreten [Koch, S. et al. 2008]. Das Durchschnittsalter der RCC-Patienten liegt mit 67 Jahren zwar dennoch über dem der älteren gesunden Spender (Durchschnittsalter 50.36 Jahre), was den signifikanten Unterschied zwischen den PBMCs der RCC-Patienten und denen der gesunden Spender für die $CD8^+$ Zellen mit dem Phänotyp der T_{EMRA} Subpopulation ($CD45RA^+$ $CCR7^-$) erklären könnte (Abbildung 24). Der signifikant verringerte Anteil an T_{EMRA} Zellen in den $CD8^+$

TILs im Vergleich zu den PBMCs der Krebspatienten liegt wohl in dem großen Anteil der EM-Zellen der TILs begründet.

Die PBMCs und TILs der RCC-Patienten weisen signifikant weniger naive $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen ($CD45RA^+$ $CCR7^+$) auf als die des peripheren Blutes gesunder Spender. Die Ursache für den Unterschied zwischen den Gruppen der PBMCs liegt möglicherweise in dem höheren Durchschnittsalter der Krebspatienten. Die Kohorte der TILs weist einen noch geringeren Anteil dieser Zellpopulation auf.

Durch den stark erhöhten Anteil der EM-Zellpopulation resultiert im Falle der $CD4^+$ CM-Zellen ($CD45RA^-$ $CCR7^+$) wohl der signifikante Unterschied zwischen den Gruppen der PBMCs im Vergleich zu den TILs der RCC-Patienten.

Bei dem Vergleich von PBMC und TILs in RCC-Patienten fällt auf, dass sich signifikant mehr EM T-Zellen in der Gruppe der TILs finden als in der der PBMCs. Diese Zellpopulation ist durch einen Phänotyp gekennzeichnet, bei dem weder CD45RA als auch CCR7 auf der Zelloberfläche zu finden ist [Appay, V. et al. 2008]. Weiter ist ein signifikanter Unterschied zwischen den TILs der Tumorpatienten und den PBMCs der gesunden Spender zu erkennen. Die beobachteten signifikanten Unterschiede treffen sowohl für $CD4^+$ als auch für $CD8^+$ T-Lymphozyten zu und decken sich mit Ergebnissen anderer Studien von Krebspatienten [Couzin, J.2006; Galon, J. et al. 2006; Zhang, L. et al. 2003]. Der Vergleich innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen zeigte weiter einen signifikant erhöhten Anteil an EM-Zellen in den PBMCs der Patienten verglichen zu den Zellen der gesunden Spender.

Die erhöhte Menge an EM-Zellen in der CD4 und CD8 T-Zellpopulation spiegelt sich auch in der Expression des Adhäsionsmoleküls CD57 wieder (Abbildung 23, 25 und 26), welches sich auf zytotoxischen T-Zellen findet [Appay, V. et al. 2008].

In den $CD4^+$ T-Zellen finden sich signifikante Unterschiede für diesen Marker zwischen TILs und deren peripheren Vergleichsgruppen. Die PBMCs der Patienten und der gesunden Spender unterscheiden sie hierbei jedoch nur leicht, so dass dieser Unterschied nicht signifikant ist. Es ist zwischen diesen Gruppen auch kein Unterschied in der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD28 zu erkennen. Für diesen Marker zeigt sich im Vergleich aller drei Gruppen lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen TILs und den PBMCs der gesunden Spender. Letztere weisen hierbei eine im Mittel höhere Expression auf.

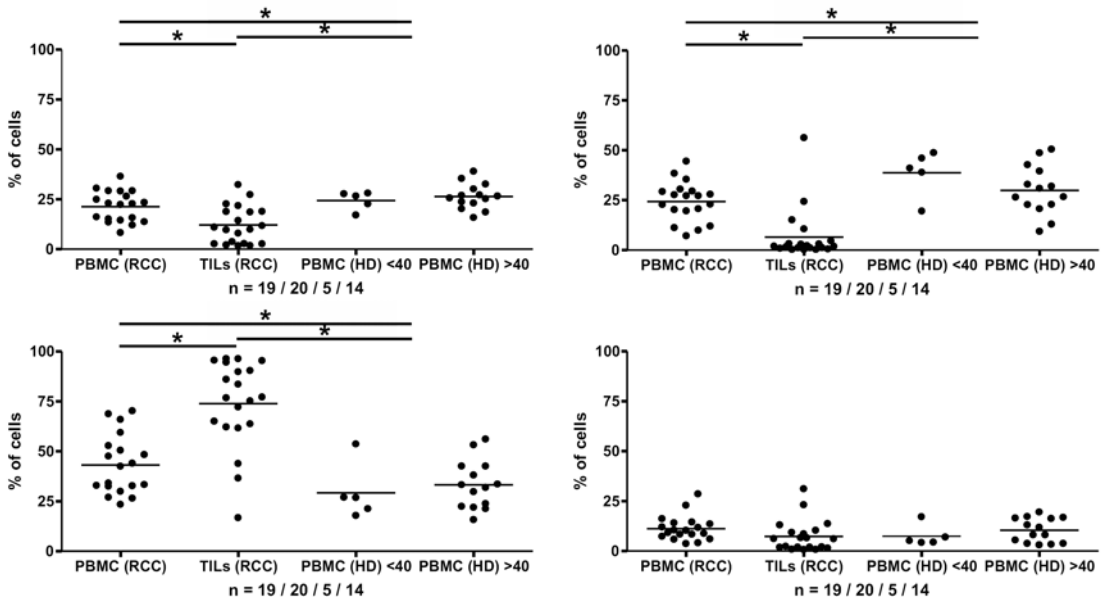


Abbildung 22 Subpopulationen in $CD4^+$ T-Zellen

Die Abbildung zeigt die Anteile von $CD4^+$ T-Zellen mit naiven (oben rechts), CM (oben links), EM (unten links) und T_{EMRA} Phänotyp in RCC-Patienten und gesunden Spendern.

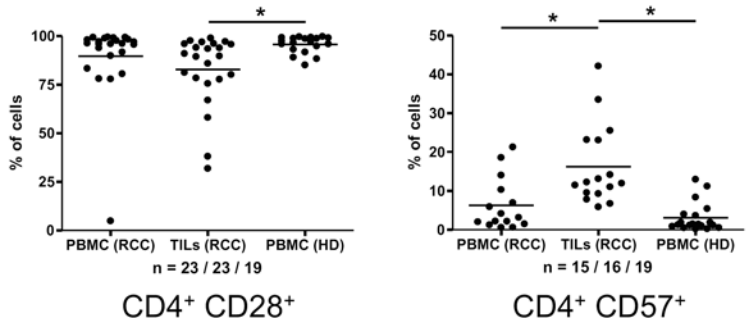


Abbildung 23 CD28 und CD57 Expression in $CD4^+$ T-Zellen

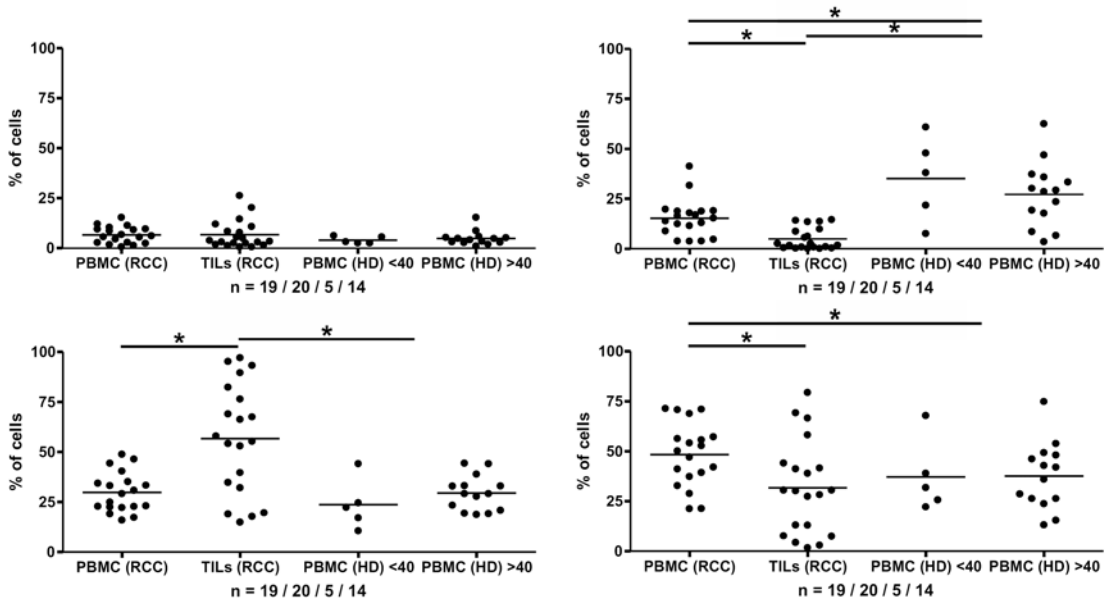


Abbildung 24 Subpopulationen in $CD8^+$ T-Zellen

Die Abbildung zeigt die Anteile von $CD8^+$ T-Zellen mit naiven (oben rechts), CM (oben links), EM (unten links) und T_{EMRA} Phänotyp in RCC-Patienten und gesunden Spendern.

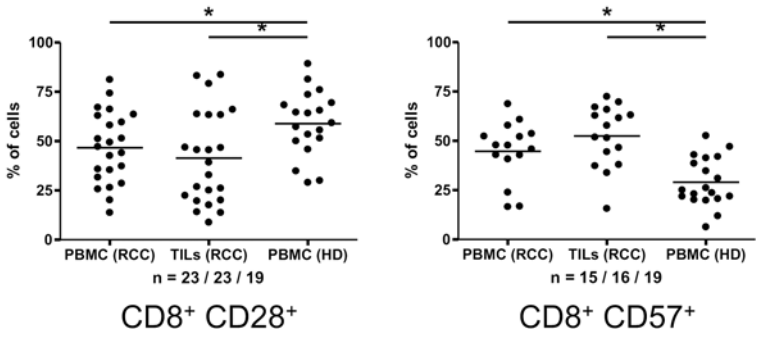


Abbildung 25 CD28 und CD57 Expression in $CD8^+$ T-Zellen

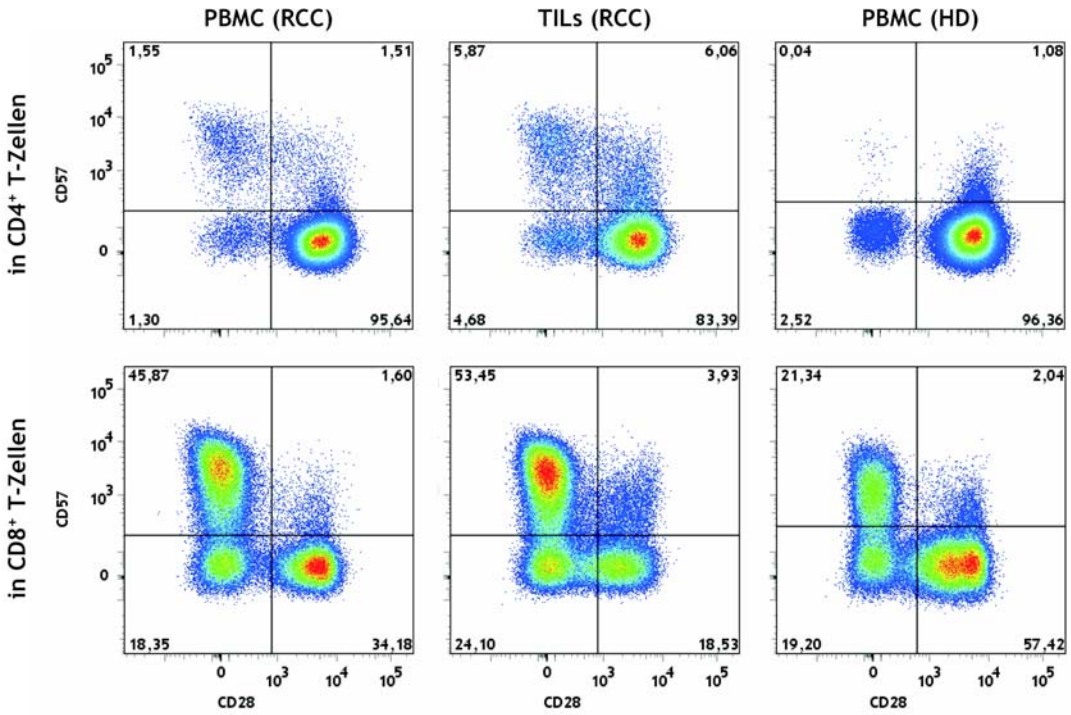


Abbildung 26 FACS-Färbung der Expression von CD28 und CD57

Die Abbildung zeigt die CD28 und CD57 Expression in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen von RCC429 und HD2.

Der bereits beschriebene Anstieg an $CD8^+$ T-Lymphozyten, welche Marker von EM-Zellen exprimieren, zeigt sich auch in Bezug auf die Expression der Oberflächenmoleküle CD28 und CD57. Für Letzteres zeigen $CD8^+$ T-Zellen in RCC-Patienten sowohl für PBMCs als auch für TILs einen signifikanten Unterschied zu Zellen von gesunden Spendern (Abbildung 25 und 26). In den untersuchten Krebspatienten zeigte sich im Mittel eine verstärkte Expression von CD57 im Vergleich zu gesunden Spendern. Die Analyse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zeigt im Gegenteil zu den Beobachtungen von Kopecky O. et al. keine reduzierte Frequenz von $CD57^+$ $CD8^+$ T-Lymphozyten, sondern ein tendenziell verstärktes Auftreten dieser Zellen in der Gruppe der TILs im Vergleich zu den PBMCs der RCC-Patienten [Kopecky, O. et al. 2007]. Genau wie bei den $CD4^+$ T-Zellen zeigt sich auch in der $CD8^+$ Zellpopulation eine verminderte Expression von CD28 in den TILs verglichen mit Zellen des peripheren Blutes (Abbildung 23 bzw. 25 und 26). Ebenso wie für CD57 zeigen $CD8^+$ Lymphozyten signifikante Unterschiede für den Anteil CD28 positiver Zellen von Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Individuen. Im Falle der $CD8^+$ Zellen lässt sich ein inverses Expressionsprofil zwischen den Frequenzen an $CD57^+$ und $CD28^+$ T-Zellen erkennen, welches zu dem vorherrschenden Effektorphänotyp passt [Appay, V. et al. 2008].

7.4.2.1.2 Expression von Chemokinrezeptoren in RCC-TILs

Die Ergebnisse der Färbungen verschiedenen Chemokinrezeptoren zeigt in allen Fällen eine signifikant erhöhte Expression in $CD4^+$ TILs verglichen zu den PBMCs der Krebspatienten und gesunden Spendern. Bei die $CD8^+$ T-Zellen trifft die jedoch nur für CCR5 und CXCR3 zu.

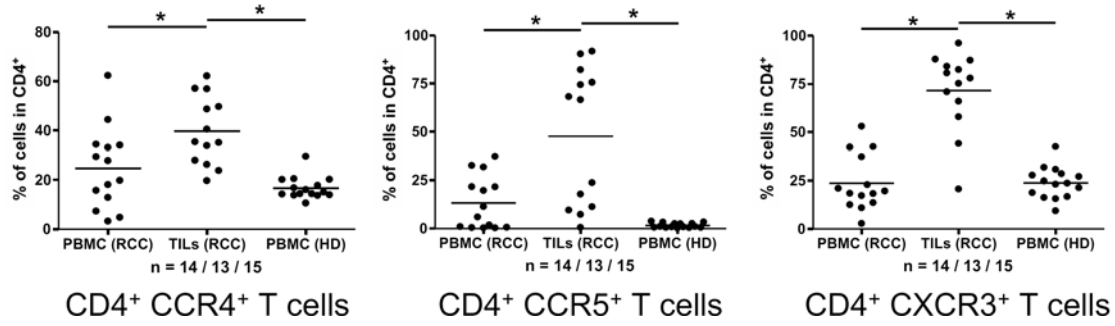


Abbildung 27 Chemokinrezeptorexpression in $CD4^+$ T-Zellen

Das linke Schaubild zeigt die Expression von CCR4 in $CD4^+$ T-Zellen

Das mittlere Schaubild zeigt die Expression von CCR5 in $CD4^+$ T-Zellen

Das rechte Schaubild zeigt die Expression von CXCR3 in $CD4^+$ T-Zellen

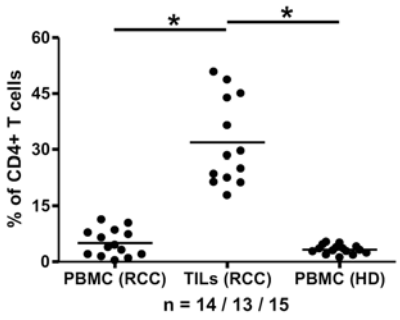


Abbildung 28 Anteil an $CCR4^-$ $CXCR3^+$ T-Lymphozyten in $CD4^+$ T-Zellen

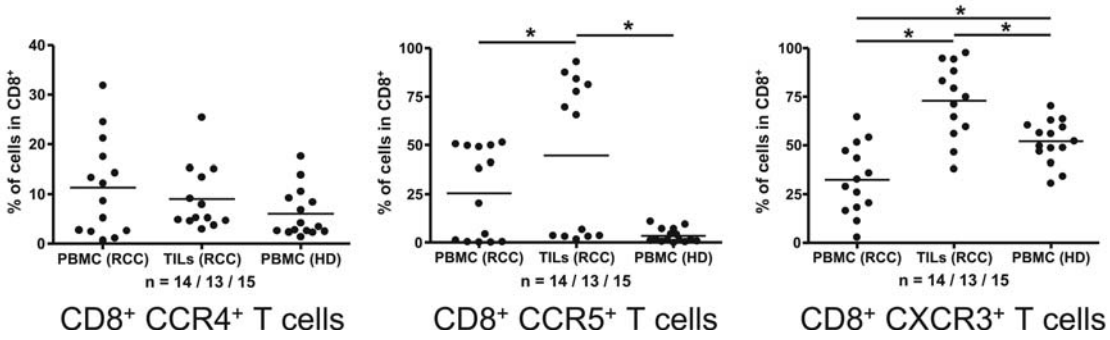


Abbildung 29 Chemokinrezeptorexpression in $CD8^+$ T-Zellen

Das linke Schaubild zeigt die Expression von CCR4 in $CD8^+$ T-Zellen

Das mittlere Schaubild zeigt die Expression von CCR5 in $CD8^+$ T-Zellen

Das rechte Schaubild zeigt die Expression von CXCR3 in $CD8^+$ T-Zellen

Der Chemokinrezeptor CCR4 wird vor allem von T_H2 Zellen exprimiert, findet sich aber auch auf regulatorischen T-Zellen [Appay, V. et al. 2008; Iellem, A. et al. 2001; Lim, H.W. et al. 2008; Sallusto, F. et al. 1999b]. Da diese T-Zelle vermehrt in TILs von RCC-Patienten zu finden sind (siehe Abschnitt 7.4.2.1.3), kann dies eine Erklärung für die erhöhte Frequenz in den $CD4^+$ T-Zellen darstellen. Das Vorkommen von T_H2 Zellen lässt sich anhand dieser Daten jedoch nicht ausschließen, auch wenn in den meisten untersuchten Patienten die TILs eine verstärkte Expression von CXCR3 zeigen. Dieser Marker ist kaum auf T_H2 Zellen zu finden [Appay, V. et al. 2008; Geginat, J. et al. 2003; Sallusto, F. et al. 1999b]. Die Expression von CCR4 in $CD8^+$ T-Zellen unterscheidet sich zwischen PBMCs der Krebspatienten und gesunden Individuen sowie den TILs nicht signifikant voneinander. Dieser Rezeptor findet sich auf einer Subpopulation von CM-Zellen innerhalb der $CD8^+$ Lymphozyten [Geginat, J. et al. 2003; Sallusto, F. et al. 1999a]. Da Zellen dieser Subpopulation nicht vermehrt in der Gruppe der TILs zu finden waren, kann dies die Beobachtung bzgl. der CCR4-Expression in den $CD8^+$ T-Zellen erklären.

Die Daten für CCR5 zeigen in den $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen jeweils eine Auftrennung in zwei Gruppen. Dies ist jedoch auf die einzelnen Spender zurückzuführen, da Patienten mit einer höheren CCR5-Expression in den PBMCs auch ein Anstieg von $CCR5^+$ Zellen in den TILs zeigten (Daten nicht gezeigt). In den $CD8^+$ T-Zellen ist der Unterschied für die Expression von CCR5 zwischen den PBMCs und den TILs nicht so stark ausgeprägt wie bei den CD4-Zellen. Der Anstieg der Expression dieses Chemokinrezeptors zeigt dennoch das vermehrte Vorkommen von EM-Zellen auf [Appay, V. et al. 2008; Kobayashi, N. et al. 2006], worin sich diese und die bereits in Abbildung 22 gezeigten phänotypischen Merkmale decken.

In den $CD4^+$ T-Zellen ist der Unterschied zwischen peripheren und tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Bezug auf den Anteil an $CCR5^+$ Zellen stärker ausgeprägt. Dies könnte durch ein vermehrtes Vorkommen von T_H1 Zellen im Bereich des Tumors zurückzuführen sein, was sich

auch mit den Daten der CXCR3-Expression decken würde. Beide Chemokinrezeptoren sind auf dieser $CD4^+$ Subpopulation zu finden [Appay, V. et al. 2008; Lim, H.W. et al. 2008; Sallusto, F. et al. 1999b]. Die gleichzeitig erhöhte Koexpression von CCR5 und CXCR3 konnte jedoch nicht bei allen Patientenproben festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Erklärung für den Anstieg der CCR5 Expression in den TILs der RCC-Patienten könnte auch das verstärke Auftreten von Tregs sein (siehe Abschnitt 7.4.2.1.3) [Lim, H.W. et al. 2008].

In den TILs war ein starker Anstieg der CXCR3-Expression in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu beobachten. Dieser Chemokinrezeptor hilft T-Zellen bei der Einwanderung in Entzündungsgebiete und Tumorgewebe [Na, I.K. et al. 2007] und wird von aktivierten T-Lymphozyten verstärkt exprimiert [Kobayashi, N. et al. 2006; Langenkamp, A. et al. 2003]. Dies kann die signifikanten Unterschiede der TILs sowohl zu PBMCs der gesunden Spender, aber auch Tumorpatienten für $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten erklären. Im Falle von $CD4^+$ T-Zellen findet sich CXCR3 vor allem auf T_H1-Zellen [Appay, V. et al. 2008; Na, I.K. et al. 2007]. Dieser Typ der T-Helferzellen unterstützt die zelluläre Immunantwort und fördert die Aktivierung der $CD8^+$ CTL. Dieser signifikante Unterschied war auch bei weiterer Analyse der Expression der Chemokinrezeptoren zu finden. So findet sich ein Anstieg von $CCR4^-$ $CXCR3^+$ $CD4^+$ T-Zellen in den TILs, jedoch nicht in den peripheren Vergleichsgruppen. Diese Daten zeigen somit die Infiltration des Tumors durch aktivierte T_H1 Zellen auf.

Die Gruppe der TILs zeigte eindeutig das Vorhandensein von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, die den Phänotyp von Effektorzellen ($CD45RA^-$, $CCR7^-$, $CXCR3^+$) besitzen und weiter Marker auf ihrer Zelloberfläche tragen, die mit zytotoxischen Eigenschaften ($CD57^+$) assoziiert sind. Dennoch scheinen diese Zellen nicht in der Lage zu sein, das Wachstum des Tumors in den Patienten einzudämmen oder dessen Wachstum stoppen zu können. Ein möglicher Grund hierfür könnten vorhandene regulatorische Zellen wie *Myeloid-Derived-Suppressor-Cells* (MDSC) oder regulatorische T-Zellen sein. Letztere sind in der Lage durch Zell-Zell Kontakt oder der Ausschüttung von supprimierenden Zytokinen die Aktivität von Effektorzellen zu inhibieren.

7.4.2.1.3 Regulatorische T-Zellen in RCC-TILs

Wie Abbildung 31 zeigt, war der Anteil an $CD4^+$ $CD25^{high}$ $Foxp3^+$ Tregs in TILs im Vergleich zu den PBMCs der Krebspatienten, aber auch der gesunden Individuen signifikant erhöht. Ein erhöhtes Vorkommen von Tregs in TILs bei RCC-Patienten wurde bereits beschrieben [Griffiths, R.W. et al. 2007]. Griffiths untersuchte in der Studie nur eine kleine Anzahl an TILs-Proben, jedoch decken sich diese Ergebnisse für die Expression von Foxp3 in den $CD4^+$ T-Zellen in den Krebspatienten mit den hier beobachteten. Die PBMCs der gesunden Spender (n = 20) und Krebspatienten (n = 15) unterschieden sich in unseren Experimenten in ihrem Anteil von $CD25^{high}$ und $Foxp3^+$ T-Zellen nicht voneinander. Diese Ergebnisse stehen genau wie der nicht vorhandene Unterschied für $CD25^{high}$ $Foxp3^+$ CD4-Zellen zwischen den Kohorten der peripheren

Zellen im Widerspruch zu den Ergebnissen in Griffiths Arbeit, der 14 RCC-Patienten und 8 gesunde Spender untersuchte. Signifikante Differenzen wurden in unserer Arbeit für die Einzel- oder Koexpression von CD25 und Foxp3 nur zwischen den TILs und den peripheren Lymphozyten der beiden anderen untersuchten Gruppen festgestellt. Eine mögliche Erklärung für die verschiedenen Ergebnisse der beiden Arbeiten kann in einer unterschiedlichen Vorgehensweise bei der Auswertung der FACS-Daten liegen. Diese ist keinen festen Regeln unterworfen, und somit unterliegt sie einem mehr oder weniger starken subjektiven Einfluss. Desweiteren könnten die unterschiedlichen Ergebnisse auch durch die getesteten Patienten beeinflusst worden sein. So ist es möglich, dass sich die Tumorstadien der getesteten Patienten zwischen den beiden Arbeiten unterscheiden und hierin die Ursache für die abweichenden Ergebnisse begründet liegen. Weiter könnten auch die Bereiche der Tumorgewebe, aus welchen die Zellen isoliert wurden, zwischen den beiden Studien voneinander abweichen. Abhängig von der Lokalisation des untersuchten Areals sind Unterschiede bzgl. der Frequenz verschiedener Immunzelltypen nicht auszuschließen.

Da Tregs innerhalb der TILs in vielen der Patienten stark erhöht waren, könnten diese Zellen bei der Inhibition der Immunantwort mit verantwortlich sein. Ganz klar ist dies jedoch nicht zu sagen, da im Rahmen dieser Arbeit keine Experimente durchgeführt wurden um die regulatorische Kapazität dieser T-Zellen zu bestimmen.

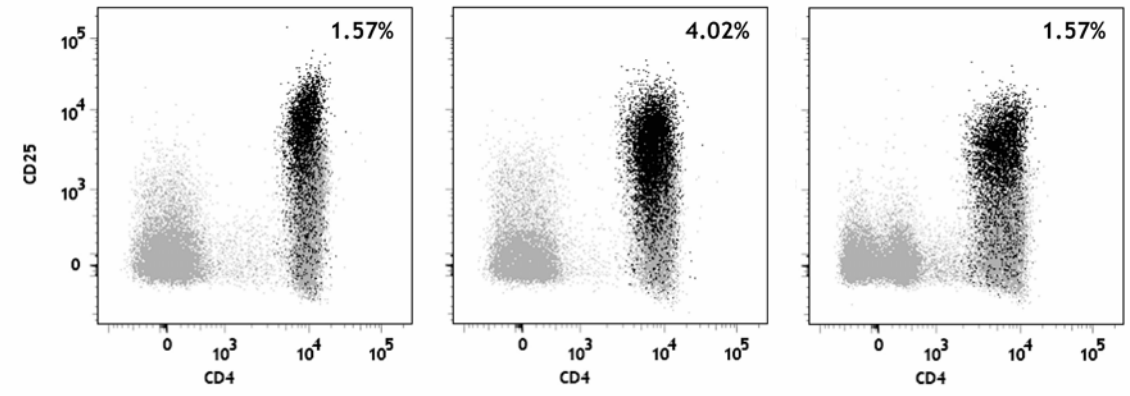


Abbildung 30 FACS-Färbung von Tregs

Die Bilder zeigen die Marker CD4 gegen CD25 innerhalb der Lymphozyten. In schwarz sind $Foxp3^+$ Zellen hervorgehoben. Der Prozentwert gibt den Anteil der $CD25^{high}$ $Foxp3^+$ Zellen in den $CD4^+$ T-Lymphozyten an.

Das linke Schaubild zeigt die PBMCs von RCC402

Das mittlere Schaubild zeigt die TILs von RCC402

Das rechte Schaubild zeigt die PBMCs des gesunden Spenders HD01

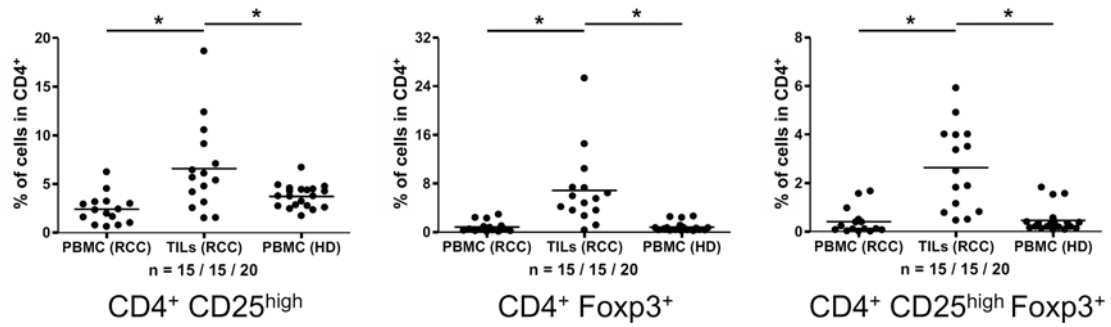


Abbildung 31 Marker regulatorischer $CD4^+$ T-Zellen

Das linke Schaubild zeigt den Anteil von $CD25^{high}$ $CD4^+$ T-Zellen

Das mittlere Schaubild zeigt den Anteil von $Foxp3^+$ $CD4^+$ T-Zellen

Das rechte Schaubild zeigt den Anteil von $CD25^{high}$ $Foxp3^+$ $CD4^+$ T-Zellen

Einige der Patientenproben wurden auch auf die Präsenz von MDSCs untersucht. Diese Zellen konnten jedoch unter der Verwendung weiterer spezifischer Marker (CD14, CD15, CD11b, CD11c) nicht identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

7.4.2.1.4 Expression von NK-Zell assoziierten Rezeptoren in RCC-TILs

Wie bereits erwähnt wurde finden sich in den TILs vermehrt T-Zellen, die Marker von zytotoxischen Effektorzellen tragen. Neben verschiedenen dieser Marker finden sich auf der Oberfläche von T-Lymphozyten auch NK-Zell assoziierte Rezeptoren. Diese sind in der Lage aktivierend, aber auch inhibierend auf Zellen einzuwirken. Die Expression verschiedener dieser Rezeptoren wurde untersucht.

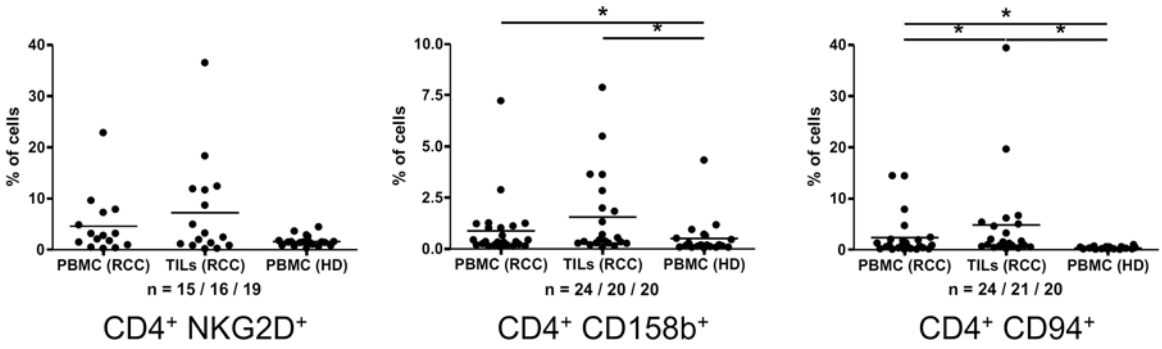


Abbildung 32 NK-Zell assoziierte Marker in $CD4^+$ T-Zellen

Das linke Schaubild zeigt den Anteil von $CD4^+$ $NKG2D^+$ T-Zellen

Das mittlere Schaubild zeigt den Anteil von $CD8^+$ $CD158b^+$ T-Zellen

Das rechte Schaubild zeigt den Anteil von $CD4^+$ $CD94^+$ NK-Zellen

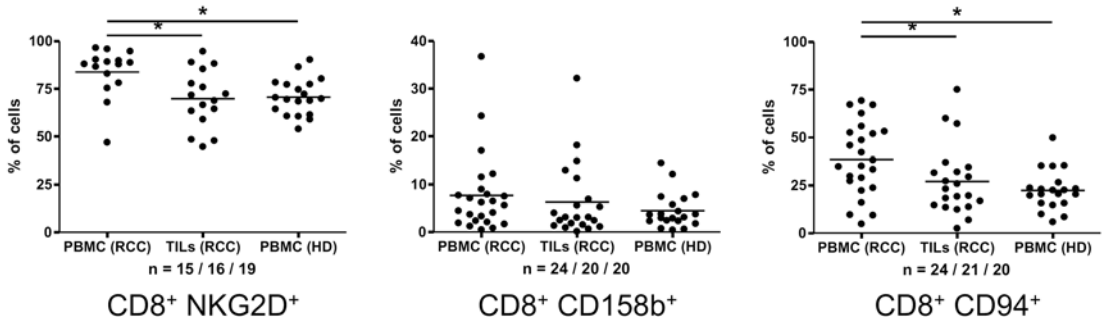


Abbildung 33 NK-Zell assoziierte Marker in $CD8^+$ T-Zellen

Das linke Schaubild zeigt den Anteil von $CD8^+$ $NKG2D^+$ T-Zellen

Das mittlere Schaubild zeigt den Anteil von $CD8^+$ $CD158b^+$ T-Zellen

Das rechte Schaubild zeigt den Anteil von $CD8^+$ $CD94^+$ NK-Zellen

Die Analyse des aktivierenden NK-Zell assoziierten Rezeptors NKG2D ergab für $CD4^+$ T-Zelle in seiner Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen, die den Tumor infiltrierten, und den beiden Gruppen der PBMCs (Abbildung 32). Der Anteil an $NKG2D^+$ Zellen innerhalb der $CD8^+$ Lymphozyten zeigte keinen Unterschied zwischen den PBMCs gesunder Individuen und den untersuchten TILs. Dieser Rezeptor konnte jedoch auf einem signifikant höheren Anteil der $CD8^+$ PBMCs von RCC-Patienten im Vergleich zu den beiden zuvor genannten Gruppen gefunden werden. Diese Unterschiede zwischen den PBMCs der Tumor-Patienten und den TILs bzw. PBMCs der gesunden Spender konnten auch für den Anteil an $CD94^+$ CD8 T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 33). Hierbei handelt es sich um einen Rezeptor, der meist inhibitorische Eigenschaften besitzt, auf die hier jedoch nicht weiter eingegangen werden soll. Der Anteil an CD94 exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen war in der Gruppe der TILs im Vergleich zu den beiden Gruppen der peripheren Lymphozyten signifikant erhöht. Weiter konnte ein signifikanter Anstieg dieser T-Zellen in den PBMC der Krebspatienten im Vergleich zu der PBMCs der gesunden Spender beobachtet werden (Abbildung 32). Ein weiterer untersuchter inhibitorischer Rezeptor war CD158b. Dieser wurde auf $CD4^+$ T-Zellen in beiden Gruppen der Lymphozyten von RCC-Patienten in signifikant erhöhtem Anteil zu den PBMCs der gesunden Individuen gefunden. Die Gruppe der TILs zeigte im Mittel auch einen leicht erhöhten Anteil an $CD158b^+$ Zellen, der sich jedoch nicht signifikant von den peripheren $CD4^+$ Lymphozyten unterschied (Abbildung 32). Im Gegensatz zu den CD4 Zellen konnten im Vergleich der Expression von CD158b zwischen den verschiedenen Gruppen der $CD8^+$ Lymphozyten keine Unterschiede gefunden werden.

7.4.2.1.5 Expression von KLRG1 und CD103 in RCC-TILs

Neben den bereits genannten NK-Zell assoziierten Rezeptoren wurde auch der Anteil von KLRG1$^+$ Lymphozyten untersucht. Dieser inhibitorische Rezeptor wird von NK-Zellen und Effektor-T-Zellen exprimiert [Appay, V. et al. 2008]. KLRG1$^+$ CTLs besitzen ein nur geringes Proliferationspotential, zeichnen sich jedoch durch starke zytotoxische Eigenschaften aus [Voehringer, D. et al. 2002]. Daher wird KLRG1 auch als Marker für seneszente Zellen angesehen. Die Ergebnisse des Anteils an KLRG1 exprimierenden CD4$^+$ T-Zellen zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der TILs im Vergleich zu den PBMCs gesunder Spender. Ein Grund für diesen Anstieg könnte ein ständiger Antigenkontakt innerhalb des Tumors sein. Wie bekannt ist, findet sich eine verstärkte Expression dieses Rezeptors auch auf CD8$^+$ T-Zellen bei chronischen Infektionen [Thimme, R. et al. 2005]. Es wäre daher möglich, dass dies hier auch für die CD4$^+$ Lymphozyten zutrifft. Die PBMCs der gesunden und kranken Individuen unterschieden sich hingegen nicht signifikant voneinander. Die Gruppe der PBMCs von Krebspatienten zeigte jedoch die Tendenz einer leicht erhöhten KLRG1-Expression. Dieser schwache Anstieg war wohl auch für den nicht signifikanten Unterschied zwischen den Lymphozyten aus der Peripherie und dem Tumorgewebe verantwortlich.

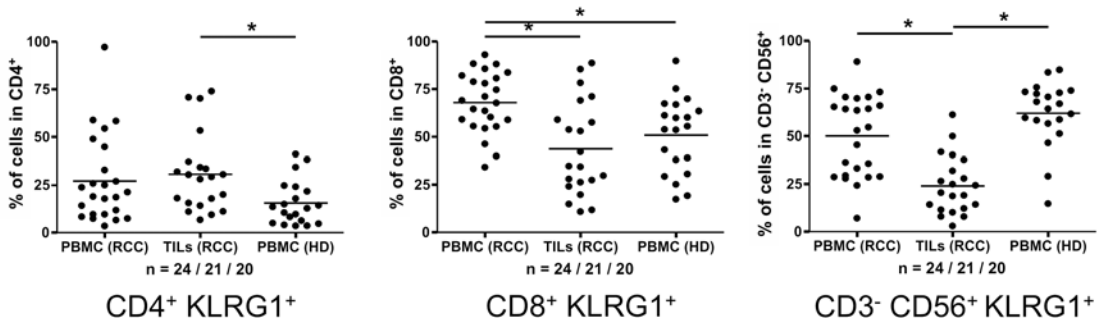


Abbildung 34 KLRG1-Expression in T-Zellen und NK-Zellen

Das linke Schaubild zeigt den Anteil von CD4$^+$ KLRG1$^+$ T-Zellen

Das mittlere Schaubild zeigt den Anteil von CD8$^+$ KLRG1$^+$ T-Zellen

Das rechte Schaubild zeigt den Anteil von CD3$^-$ CD56$^+$ KLRG1$^+$ NK-Zellen

In den CD8$^+$ Lymphozyten zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den PBMCs der RCC-Patienten im Vergleich zu denen gesunder Spender, aber auch den TILs. Die Differenz zwischen den beiden Gruppen der PBMCs findet sich auch im Anteil der hochdifferenzierten T_{EMRA}-Zellen wieder (Daten nicht gezeigt). Wie bereits erwähnt findet sich KLRG1 vermehrt auf dieser Subpopulation [Appay, V. et al. 2008; Voehringer, D. et al. 2002]. Der Anteil dieser Zellpopulation nimmt mit fortschreitendem Lebensalter zu [Koch, S. et al. 2008]. Da das Durchschnittsalter der Krebspatienten (67 Jahre) über dem der gesunden Spender (50.36 Jahre) liegt, kann dies den Unterschied erklären. Das höhere Durchschnittsalter sowie der ständige

Antigenkontakt und das vermehrte Vorkommen von Effektorzellen sollten einem Anstieg der KLRG1$^+$ T-Zellen in der Gruppe der TILs erwarten lassen. Die Ergebnisse zeigen, wie bereits angesprochen, jedoch einen geringeren Anteil dieser Zellen innerhalb der TILs. Weiter konnte beobachtet werden, dass sich die Patienten in zwei Untergruppen unterteilen ließen (siehe hierzu auch Abschnitt 7.4.3.1). Wie Abbildung 35 zeigt kommt es zu Bildung zweier Subgruppen in der Kohorte der TILs. In TILs der RCC-Patienten mit einem hohen Anteil an CD8$^+$ Effektorzellen war Widererwartens eine reduzierte Expression von KLRG1 zu beobachten. Die TILs, in denen weniger KLRG1 exprimiert wird, zeigten keinen Unterschied zu den Kohorten der PBMCs bezüglich dieser Parameter.

Die Analyse der Messergebnisse zeigt weiter eine im Durchschnitt signifikant reduzierte Expression von KLRG1 von NK-Zellen (CD3$^-$ CD56$^+$), die aus Tumorgewebe isoliert werden konnten (Abbildung 34 und 36). Im Bezug auf die Häufigkeit von NK-Zellen innerhalb der Lymphozyten konnte kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die niedrigere Expression von KLRG1 in den NK-TILs könnte auf eine gesteigerte Aktivität dieser Zellen schließen lassen, da dieser Marker inhibitorisch auf die Zelle einwirkt. Als weitere Erklärung wäre die Wechselwirkung zwischen KLRG1 und einem seiner Liganden, E-Cadherin, möglich. E-Cadherin wird in von normalem, aber auch malignem Nierengewebe exprimiert. Kommt es zu einer Interaktion zwischen einem Rezeptor und dessen Liganden führt dies häufig zu einer reduzierten Rezeptorexpression. Dieses Phänomen könnte auch hier den Grund für die verminderte KLRG1-Expression darstellen und so diese Subgruppe in den CD8$^+$ TILs erklären.

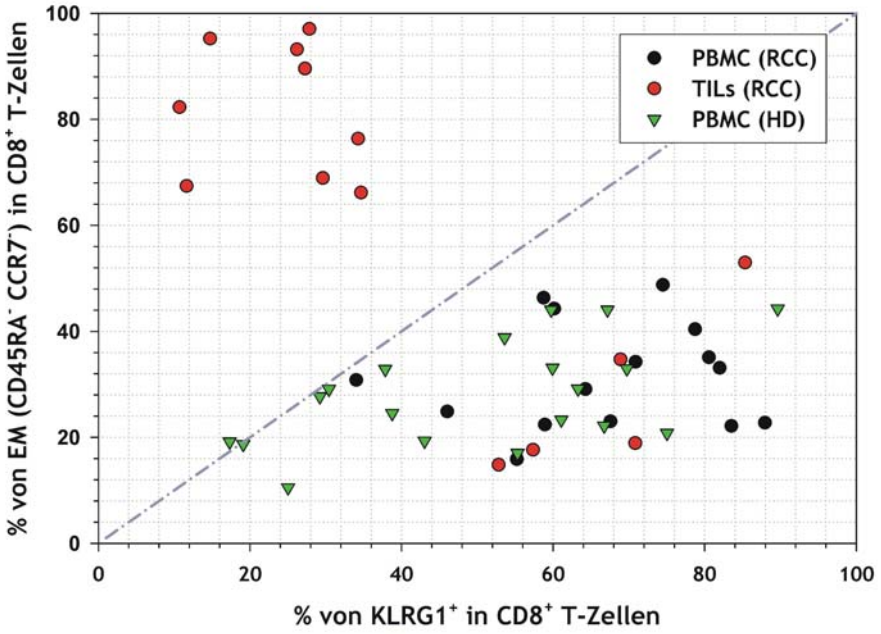


Abbildung 35 KLRG1-Expression und Anteil an Effektorzellen in CD8$^+$ Lymphozyten

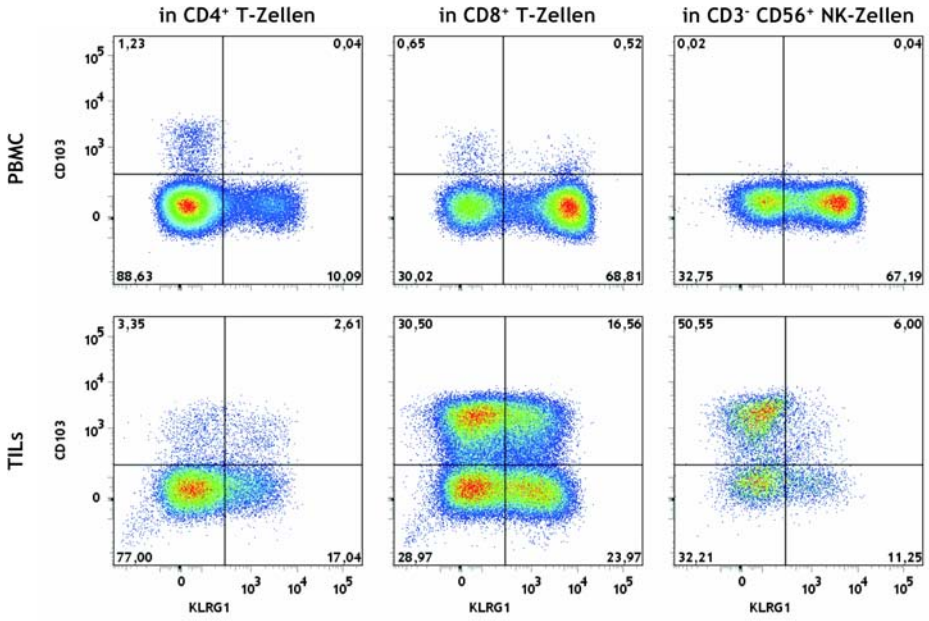


Abbildung 36 FACS-Färbung der KLRG1 und CD103 Expression in PBMC und TILs

Die Abbildung zeigt die Expression von KLRG1 und CD103 in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie NK-Zellen des Patienten RCC479.

Ein weiterer Rezeptor von E-Cadherin ist das Integrin CD103 [Uss, E. et al. 2006]. Dieses Oberflächenmolekül wird unter anderem von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften exprimiert und kennzeichnet weiter Lymphozyten mit einem reduzierten zytotoxischen Kapazitäten [Noble, A. et al. 2006; Uss, E. et al. 2006]. Wie Abbildung 32 exemplarisch zeigt, konnte eine erhöhte Expression von CD103 auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie auf NK-Zellen, die aus Tumorgewebe isoliert wurden, beobachtet werden. Die Tatsache dieses Anstiegs in $CD4^+$ TILs könnte mit dem bereits beschriebenen verstärkten Auftreten von Tregs in Verbindung stehen. $CD103^+$ T-Zellen produzieren große Mengen an IL-10 [Uss, E. et al. 2006], worauf in Abschnitt 7.4.4.1 noch näher eingegangen werden soll. Die dort beobachteten Daten lassen sich mit dem signifikanten Anstieg der CD103-Expression der $CD4^+$ und $CD8^+$ TILs zu einem Bild verknüpfen.

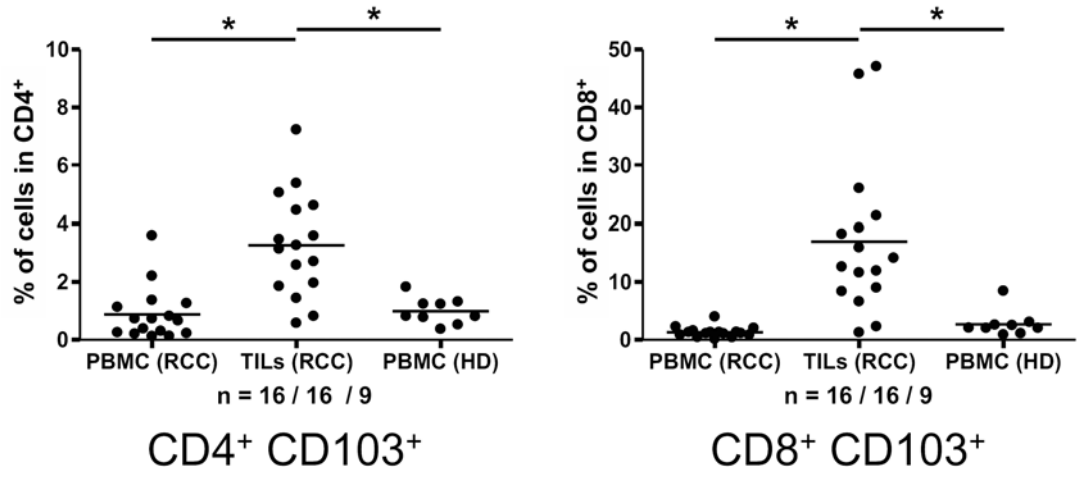


Abbildung 37 CD103-Expression in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen

7.4.3 Immunfluoreszenzfärbung von normalem und malignem Nierengewebe

Die Beobachtung von $KLRG1^{high}$ und $KLRG1^{low}$ exprimierenden T-Zellen in den $CD8^+$ Lymphozyten, sowie der erhöhte Anteil an $CD103^+$ Zellen in den TILs führt zu der Frage nach der Ursache dieser Ergebnisse. Die Einteilung in die $KLRG1^{low}$ und $KLRG1^{high}$ orientierte sich an dem Mittelwert des prozentualen Anteils der positiven Zellen aller gemessenen Färbungen von KLRG1. Die Mittelwerte der Zellen lagen in den $CD4^+$ TILs bei 30.07% und im Falle der $CD8^+$ TILs bei 43.65%. Proben, in denen die Expression von KLRG1 unterhalb des Mittelwertes lag, wurden als „*low*“, die über dem Mittelwert als „*high*“ definiert. Diese Unterteilung wurde für $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen vorgenommen.

Wie bereits erwähnt, könnte eine Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung für die beobachteten Ergebnisse der Antikörperfärbung verantwortlich sein. Ein Ligand von KLRG1 bzw. CD103 ist E-Cadherin, das u.a. von normalem und auch malignem Nierengewebe exprimiert wird [Grundemann, C. et al. 2006; Schwartzkopff, S. et al. 2007; Uss, E. et al. 2006]. Um diese Hypothese zu prüfen wurde die Expression von E-Cadherin in benignem und malignem Nierengewebe durch Immunfluoreszenz Färbung von Gewebeschnitten untersucht.

Die Färbungen von E-Cadherin wurden mit Tumorgewebe und autologem normalen Nierengewebe durchgeführt. Das kryokonservierte Gewebe wurde in 5-7 µm Scheiben geschnitten, die nach der Fixierung durch Aceton mit Antikörpern gegen E-Cadherin angefärbt wurden. Die acht hierfür verwendeten Patienten-Material-Proben wurden anhand ihrer Expression von KLRG1 in $CD4^+$ und $CD8^+$ TILs ausgewählt. Eine Bewertung der Färbung von E-Cadherin wurde im Bezug auf CD103 nicht vorgenommen, da die Lymphozyten der in diesem Abschnitt verwendeten Patientenproben nicht auch auf dessen Expression untersucht wurden.

Tabelle 29 Liste der RCC-Patienten für Gewebefärbungen

Patienten Kodierung	Tumorstadium	KLRG1-Expression in $CD4^+$ TILs	KLRG1-Expression in $CD8^+$ TILs
424	pT1a G2 cN0 cM0 R0	low	high
429	pT1b G1 cN0 cM0 L0 V0 R0	low	high
433	pT1b G1-2 cN0 cM0 L0 V0 R0	high	high
444	pT3b G2 cN0 cM0 L0 V1 R0	high	high
449	pT3b G3 pN1 pM1 L1 V1 R1	low	low
458	pT3b G2 pNx cM0 V1 R0	high	low
460	pT3b G2 cN0 cM0 L0 V1 R0	low	low
464	pT1b G3 pN0 M0	high	low

7.4.3.1 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen von normalem und malignem Nierengewebe

Die Färbung des Normalgewebes zeigte in allen Fällen eine positive Färbung für E-Cadherin. Dieses Adhäsionsmolekül wird von den Zellen der distalen Tubuli der gesunden Niere exprimiert [Nouwen, E.J. et al. 1993]. Dies lässt sich beispielhaft für zwei RCC-Patienten in der Abbildung 39 erkennen. Es wird davon ausgegangen, dass klarzellige RCCs ihren Ursprung in dem Gewebe der proximalen Tubuli haben, welche in der normalen Niere kein E-Cadherin exprimieren [Nouwen, E.J. et al. 1993; Thedieck, C. et al. 2005]. Wie aus verschiedenen Studien bekannt ist, kann es dennoch zu einer aberranten Expression dieses Cadherins in RCC-Zelllinien sowie dem Tumorgewebe von Patienten mit klarzelligem RCC kommen [Nouwen, E.J. et al. 1993; Shimazui, T. et al. 1996]. Bei der Expression von E-Cadherin konnte ein Unterschied in der Stärke der Signalintensität nach Fluoreszenzfärbung zwischen den verschiedenen malignen Patientengeweben festgestellt werden. Einige der untersuchten Proben zeigten eine gesteigerte, andere eine reduzierte Intensität für das angefärbte E-Cadherin im Vergleich zu dem normalen Nierengewebe des gleichen Patienten, was in Abbildung 39 zu sehen ist.

Die Messergebnisse zeigten sowohl eine stärkere als auch schwächere Färbung des untersuchen Cadherins der Tumorgewebe von Patienten, deren $CD8^+$ TILs $KLRG1^{high}$ oder $KLRG1^{low}$ exprimierten. Die Daten der Gewebefärbungen konnten somit nicht in direkte Verbindung mit der in einigen Spendern beobachteten reduzierten Expression von KLRG1 in den $CD8^+$ Lymphozyten gebracht werden.

Die Unterschiede der Expression von E-Cadherin zwischen normalem und malignem Nierengewebe werden anhand zweier repräsentativer Patienten in Abbildung 38 gezeigt. Beide RCC-Patienten fanden sich in der $KLRG1^{low}$ Subgruppe der CD4 Lymphozyten. Bei RCC424 war,

wie in Abbildung 38 dargestellt, kein Unterschied in dem Anteil an $CD4^+$ $KLRG1^+$ Zellen der PBMCs und TILs zu beobachten. Im Gegensatz hierzu konnte ein Anstieg dieser Zellen in den TILs RCC429 gemessen werden. Für die $CD4^+$ TILs mit einer niedrigen Expression von KLRG1 zeigte sich in zwei von vier untersuchten Spendern für E-Cadherin eine stärkere Färbung des Tumorgewebes. Die beiden Patienten aus Abbildung 38 besitzen im Vergleich mit dem Mittel aller eine niedrige KLRG1-Expression, jedoch zeigte sich ein klarer Unterschied in der Färbung von E-Cadherin. Ob jedoch die niedrigere Expression von KLRG1 in RCC424 durch die Wechselwirkung mit E-Cadherin in Verbindung steht, kann bislang nicht ausgesagt werden. Weiter konnte eine verminderte Expression von E-Cadherin in Tumorzellen weder mit dem Anstieg der $KLRG1^+$ T-Zellen in einem RCC-Patienten noch der Gesamtheit aller $KLRG1^{high}$ $CD4^+$ TILs in Zusammenhang gebracht werden.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer Wechselwirkung der Moleküle KLRG1 und E-Cadherin kommt. Um dies prüfen zu können, müsste die Stichprobe der getesteten RCC-Patienten vergrößert werden. Eine andere Option zur besseren Quantifizierung der Expression von E-Cadherin könnte auch durch FACS-Analyse von frisch isolierten Tumorzellen gegeben werden. Ob die mögliche Interaktion von KLRG1 und E-Cadherin einen Einfluss auf das Verhalten und die Eigenschaften der Lymphozyten hat, konnte anhand der hier vorliegenden Daten nicht beurteilt, sollte aber durch weitere Experimente verfolgt werden.

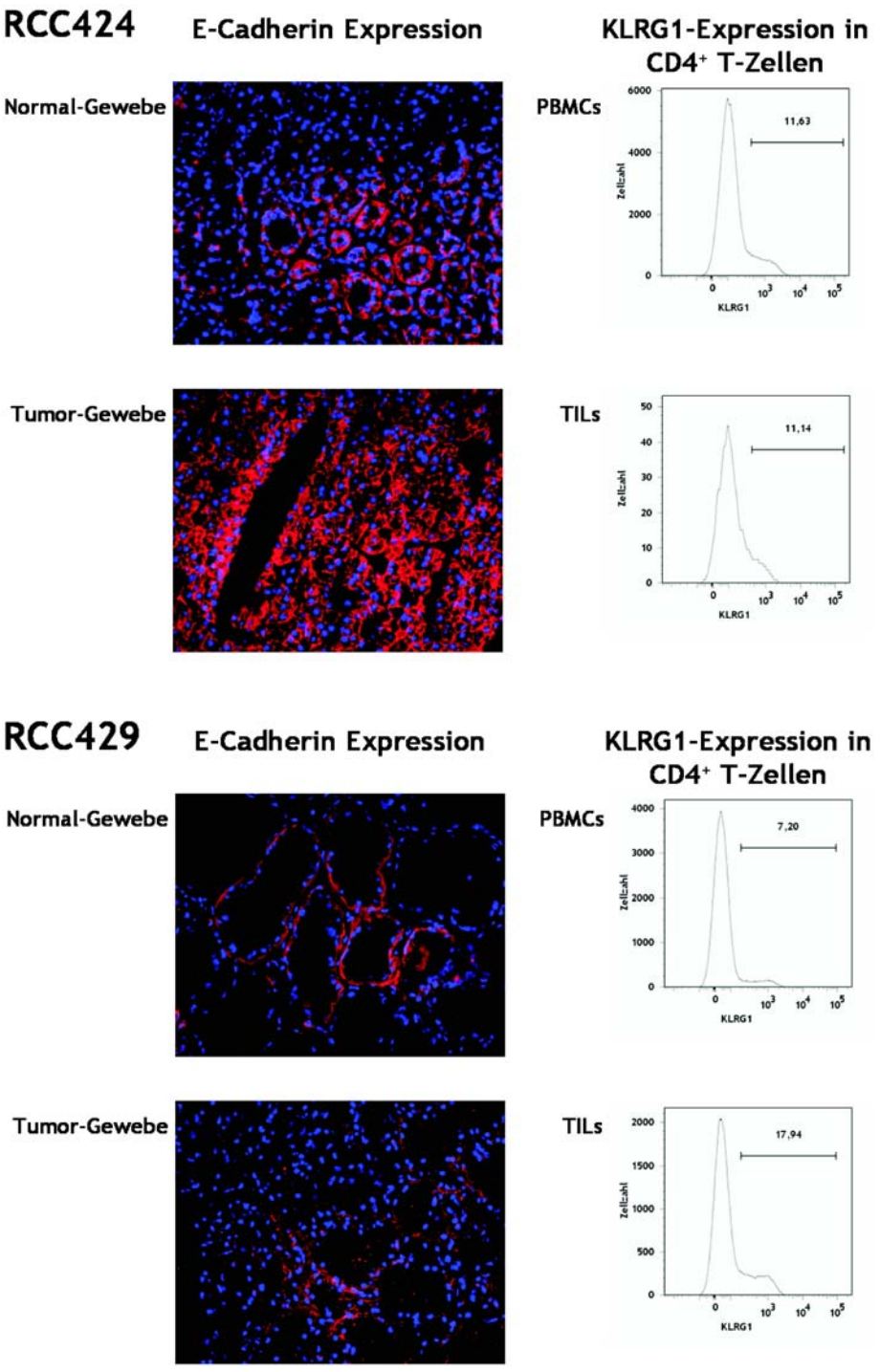


Abbildung 38 Immunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin

Die Darstellungen in der linken Spalte zeigen die Expression von E-Cadherin in normalem und malignem Nierengewebe des gleichen RCC-Patienten. Die Färbung von E-Cadherin ist rot, die der Zellkerne blau dargestellt. In der rechten Spalte ist die KLRG1-Expression in $CD4^+$ T-Zellen für PBMCs und TILs des entsprechenden Patienten zu sehen.

Tabelle 30 E-Cadherin Expression in normalem und malignem Nierengewebe

Die Bewertung der Expressionsstärke von E-Cadherin des Tumorgewebes erfolgte in Relation zu der des renalen Normalgewebes. Die Expression von E-Cadherin in normalem Gewebe wurde immer mit „++“ gewertet. War eine im Verhältnis hierzu stärkere Färbung zu des Tumorgewebes zu erkennen wurde dieser mit „+++“, bei einer schwächeren mit „+“ gewertet.

Patienten Kodierung	KLRG1-Expression in $CD4^+$ T-Zellen	KLRG1-Expression in $CD8^+$ T-Zellen	E-Cadherin Expression	
			benigne	maligne
424	low	high	++	+++
429	low	high	++	+
433	high	high	++	+
444	high	high	++	++
449	low	low	++	+++
458	high	low	++	++
460	low	low	++	+
464	high	low	++	+

7.4.4 Funktioneller Vergleich von PBMCs und TILs der RCC-Patienten

Die Untersuchung der funktionellen Kapazitäten von PBMC und TILs der RCC-Patienten sowie den PBMCs gesunder Individuen fand wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben statt. Nach dem Auftauen der Zellen und der folgenden Ruhephase wurden die Ansätze entweder mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern oder PMA und Ionomycin für fünf Stunden stimuliert. Eine Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern hatte eine Aktivierung über den TCR- und Kostimulatorischen-Signalweg zur Folge. Der Stimulus über PMA und Ionomycin induzierte ein sehr starkes Signal, das unabhängig vom TCR zu einer maximalen Aktivierung und damit Zytokin- und Aktivierungsmarkerexpression führte. Als Referenz und Negativkontrolle wurden die Zellen im Medium, also ohne Stimulus inkubiert. Nach der Inkubation wurden die verschiedenen Ansätze dann mit folgenden Antikörperkombinationen gefärbt.

Tabelle 31 Antikörperkombination zur funktionellen Analyse

Fluorochrom Zelltyp	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	Pacific Blue	Aqua Blue
EMs, CTLs, Aktivierungs-marker	CD107a	IL-2	CD8	IFNγ	CD154	CD4	TNFα	Lebend /Tot
T_H1, T_H2, T_H17, Tregs	IL-17	IL-10	CD8	IFNγ	IL-5	CD4	TNFα	Lebend /Tot

Tabelle 32 Liste der funktionell untersuchten RCC-Patienten

Patienten Kodierung	Alter	Geschlecht	Tumortyp	Tumorstadium
445	62	w	klarzellig	pT1b G2 pN2 M1 L1 V0 R1
471	45	w	klarzellig	pT3b, G2
478	49	w	papillär	pT1a G2 cN0 pM0 R0
479	78	m	klarzellig	pT1b G2-3 cN0 cM0 L0 V0 R0
482	74	w	klarzellig	pT1b G3 cN0 cM0 L0 V0 R0
486	66	m	klarzellig	pT3a G2 L0 V0 Rx
535	56	w	klarzellig	pT3b G3 pNx cM1 L0 V1 Rx

Tabelle 32 zeigt die funktionell untersuchten RCC-Patienten (n = 7). Es wurden drei weitere Patienten untersucht, deren Proben jedoch nicht in die Analyse mit einbezogen, da die Daten aufgrund einer zu geringen gemessenen Zellzahl oder dem Fehlen eines Referenzwertes keine klar interpretierbaren Ergebnisse lieferten.

Die statistische Bewertung der Daten fand immer zwischen den PBMCs und TILs der RCC-Patienten statt. Ein Vergleich mir den PBMCs der gesunden Spender wurde wegen der kleinen Stichprobengröße nicht durchgeführt.

7.4.4.1 Auswertung des funktionellen Vergleiches von PBMCs und TILs der RCC-Patienten

Bei der Stimulation mit PMA und Ionomycin zeigten sich weitere signifikante Unterschiede für die Expression der Marker für frühe Aktivierung (CD154) sowie Degranulation (CD107a) zwischen den PBMCs und TILs der getesteten RCC-Patienten. Bei CD107a kann bei der Degranulation verschiedener Zytotoxine wie beispielsweise Perforin oder Granzym B auf Zellen nachgewiesen werden. Die genannten Zytotoxine befinden sich in Granula, welche bei der Freisetzung dieser Stoffe mit der Zellmembran verschmelzen. Hierbei wird das auf der Innenseite befindliche Molekül CD107a für die Bindung durch den spezifischen Antikörper zugänglich. Daher wird eine positive Färbung von CD107a mit der Zytotoxizität einer Zelle assoziiert. Auch wenn sich kein Unterschied zwischen den PBMCs und TILs der RCC-Patienten bei der Stimulation mit CD3 und CD28 zu erkennen war, zeigte sich dieser bei stärkerer Stimulation deutlich. Es war ein Anstieg an $CD107a^+$ CD8 Zellen in den TILs verglichen mit deren peripheren Äquivalenten zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen auf ein verstärktes Vorkommen von EM-Zellen mit zytotoxischen Eigenschaften schließen und passen somit zu dem beschriebenen phänotypischen Erscheinungsbild.

Der andere schon genannte Aktivierungsmarker CD154 findet sich signifikant niedriger exprimiert auf $CD8^+$ T-Zellen der TILs im Vergleich zu den PBMCs der Krebspatienten. Meist wird CD154 als Marker der frühen Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen verwendet [Meier, S. et al. 2008], findet sich allerdings auch auf $CD8^+$ Zellen. Der Vergleich beider Lymphozytengruppen der RCC-Patienten zeigte eine signifikant reduzierte Expression dieses Moleküls nach Stimulation mit PMA und Ionomycin in der Kohorte der TILs in Gegensatz zu der der PBMCs. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die TILs nicht in der Weise wie die PBMCs aktiviert werden konnten. Gründe für die verringerte Aktivierung könnten die TCR-CD8 Translokation durch den kontinuierlichen Antigenkontakt im Tumorgewebe sein [Demotte, N. et al. 2008]. Diese Frage wird in dem Abschnitt 7.4.5 genauer adressiert. Weiter wäre das Vorkommen verschiedener Liganden innerhalb des Tumors vorstellbar, welche sich auf die Expression von Markern wie CD154 auswirken.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen für CD107a ließen sich keine Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen für die Anteile an IFNγ oder TNFα produzierenden Zellen detektieren. Dies lässt sich jedoch wie folgt erklären: Diese beiden Zytokine liegen nur in geringen Konzentrationen in zytosolischen Vesikeln vor und werden zum größten Teil erst nach erfolgter positiver Stimulation synthetisiert und sekretiert. Weiter ist bekannt das $CD103^+$ $CD8^+$ T-Zellen zwar große Mengen an IL-10 ausschütten können, jedoch produzieren sie nur wenig IFNγ [Noble, A. et al. 2006]. Weiter kann die Zytokinsynthese durch die Inhibition der Effektorzellen reduziert worden sein.

Es konnte beobachtet werden, dass die Produktion von IL-2 in $CD8^+$ TILs bei der Stimulation mit PMA und Ionomycin unter der der PBMCs von RCC-Patienten lag. Die Produktion dieses Zytokins kann in Abhängigkeit der Spezifität bei $CD8^+$ T-Zellen variieren [Mallard, E. et al. 2004]. Da IL-2 jedoch meist von Memoryzellen produziert wird, kann dies eine Erklärung für die leichte Verminderung des Anteils an produzierenden Zellen in der Gruppe der TILs verglichen mit PBMCs der Krebspatienten darstellen. Dennoch muss bemerkt werden, dass es sich um einen kleinen Stichprobenumfang (n = 7) handelte und sich der leichte Unterschied durch die Analyse mehrerer Proben relativiert.

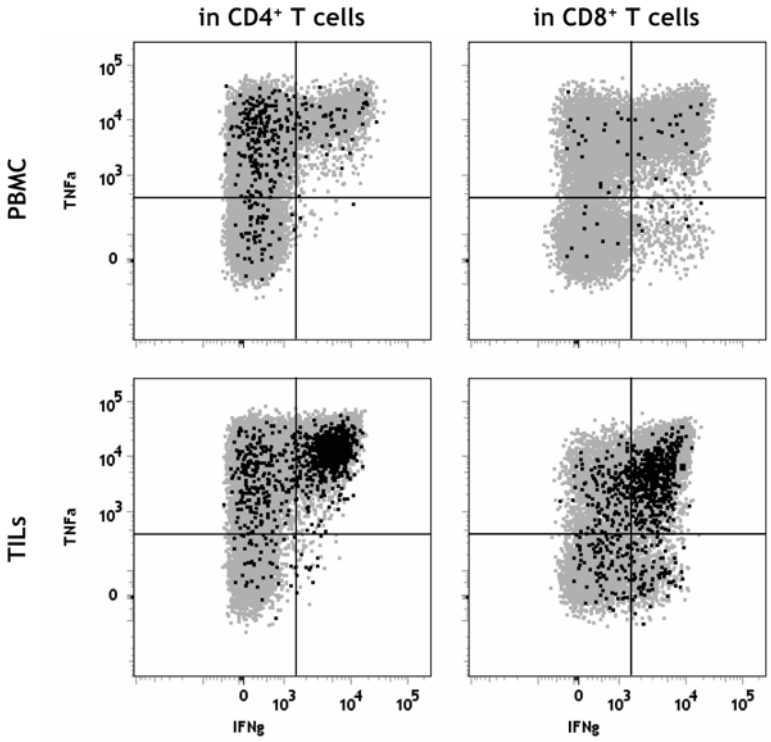


Abbildung 39 FACS-Färbung von Zytokinen

PBMCs und TILs von RCC482. Die FACS-Plots zeigen die Expression von IFNγ und TNFα nach Stimulation mit PMA und Ionomycin. In schwarz hervorgehoben die $IL\text{-}10^+$ T-Zellen.

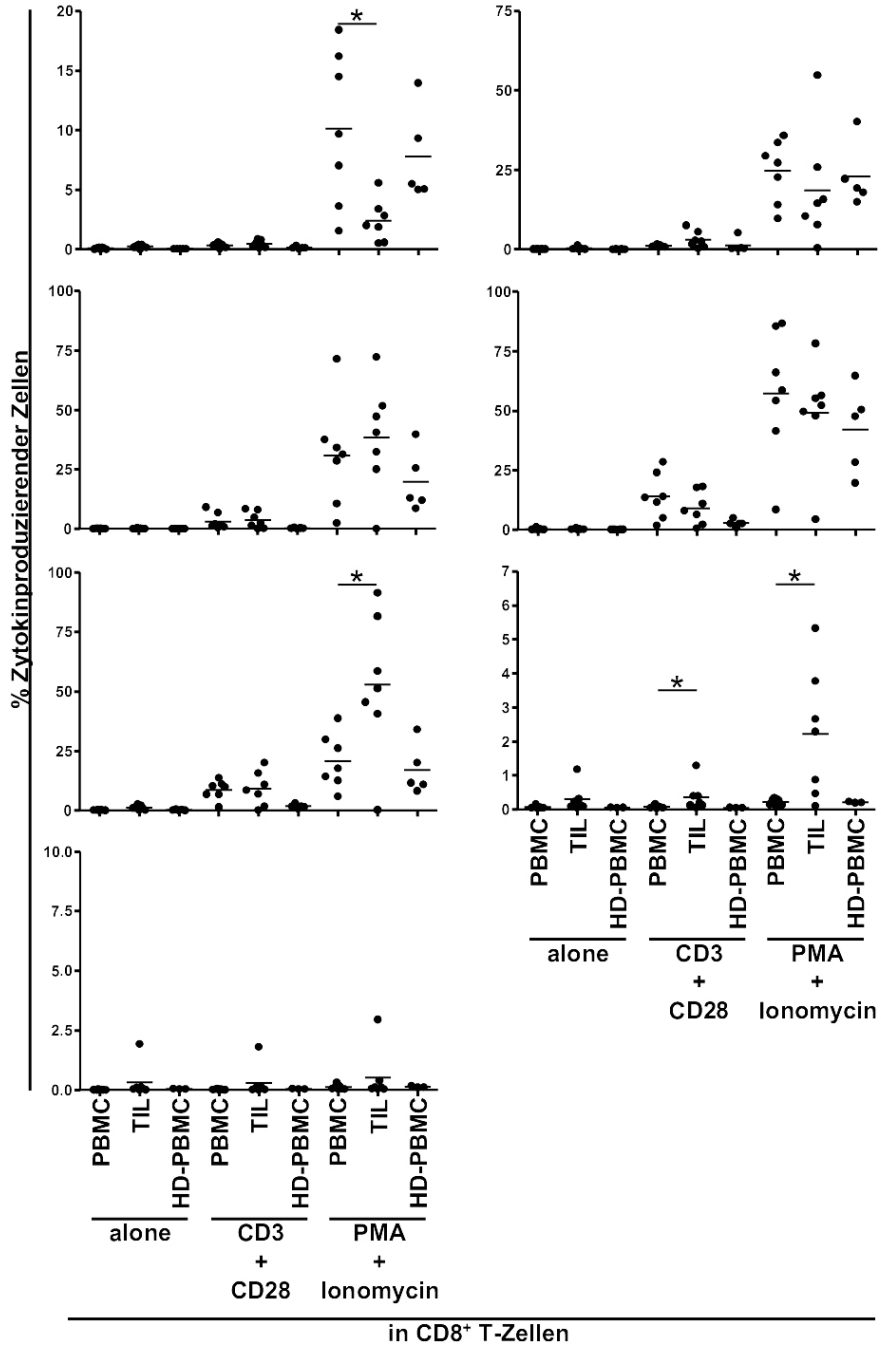


Abbildung 40 Zytokinproduktion in $CD8^+$ T-Zellen

Die Zellen wurden für fünf Stunden entweder mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern oder mit PMA und Ionomycin inkubiert.

Linke Spalte von oben nach unten die Expression von CD154, IFNγ, CD107a, IL-17

Rechte Spalte von oben nach unten IL-2, TNFα, IL-10

Die $CD8^+$ TILs zeigten bei der Produktion von IL-10 einen signifikanten Unterschied nach der Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Die Produktion dieses suppressiven Zytokins IL-10 in $CD8^+$ Zellen war überraschend und war bei der Stimulation mit PMA und Ionomycin noch deutlicher ausgeprägt. Die Produktion von IL-10 in $CD8^+$ Zellen passt zu dem bereits beschriebenen starken Anstieg von $CD103^+$ Lymphozyten in den meisten der untersuchten TILs-Proben [Uss, E. et al. 2006]. Diese $CD8^+$ Zellen produzieren große Mengen an IL-10 und nur geringe an IFNγ [Noble, A. et al. 2006; Uss, E. et al. 2006]. Die Inhibition von CTLs sowie $CD4^+$ Effektorzellen durch regulatorische $CD8^+$ T-Zellen findet über Zell-Zell-Kontakte statt [Noble, A. et al. 2006]. Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit die suppressive Eigenschaft nicht direkt untersucht wurde, lassen die Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung und die detektierte Produktion von IL-10 den Schluss zu, dass in den TILs von RCC-Patienten ein erhöhtes Vorkommen von CD8-Tregs zu finden ist. Diese Zellen geben eine weitere mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer effektiven Immunreaktion durch T-Helferzellen und CTLs gegen den Tumor.

Eine Produktion von IL-17 konnte in keiner der Kohorten von $CD8^+$ Zellen detektiert werden.

Die Daten der Zytokin- und Aktivierungsmarkerexpression der $CD4^+$ T-Zellen zeigten häufiger signifikante Unterschiede im Vergleich zu den $CD8^+$ Lymphozyten. Genau wie bei den zuletzt genannten Zellen konnte eine signifikante Reduktion von CD154 auf den $CD4^+$ TILs verglichen mit den autologen PBMCs der Krebs-Patienten beobachtet werden. Dies ist genau wie bei der Gruppe der CD8 T-Zellen ein Indiz für ein reduziertes Aktivierungspotential [Meier, S. et al. 2008]. Dies kann durch den schon beschriebenen erhöhten Anteil der Tregs erklärt werden. Der Marker für Degranulation (CD107a) wurde nach der Stimulation mit PMA und Ionomycin, aber auch der mit CD3 und CD28 signifikant erhöht in den $CD4^+$ TILs gemessen und deutet auf die Präsenz von EM-Zellen hin [Casazza, J.P. et al. 2006; Gauduin, M.C. et al. 2006; Vescovini, R. et al. 2007]. Diese Ergebnisse decken sich hierin mit denen der phänotypischen Analyse. Der Stimulus mit CD3 und CD28 führte auch zur signifikant höheren Expression von IL-2, TNFα und IL-10 in den TILs verglichen zu den peripheren T-Zellen der RCC-Patienten. Diese gesteigerte Produktion könnte ein Grund für den erhöhten Anteil an $CD107a^+$ $CD4^+$ TILs sein [Casazza, J.P. et al. 2006; Gauduin, M.C. et al. 2006]. Der Anteil an IFNγ^+ T-Zellen innerhalb der TILs lag nach Stimulation mit PMA und Ionomycin signifikant über dem der autologen PBMCs. Auch wenn sich bei diesem Stimulus die beiden Zellgruppen der Patienten für die Expression von IL-2 und TNFα nicht signifikant unterschieden, lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die Gruppe der $CD4^+$ TILs eine im Mittel klar erhöhte Menge an Effektorzellen im Vergleich zu der Peripherie aufweist [Casazza, J.P. et al. 2006; Gauduin, M.C. et al. 2006; Vescovini, R. et al. 2007]. Die gemessenen Daten der Zytokinexpression decken sich also mit denen der phänotypischen Analyse. Beide verwendeten Stimuli führten zu einem signifikanten Anstieg an IL-10^+ T-Zellen in

den $CD4^+$ TILs. Dies wies auch hier auf das vermehrte Vorkommen von regulatorischen Lymphozyten hin [Uss, E. et al. 2006; Vigouroux, S. et al. 2004].

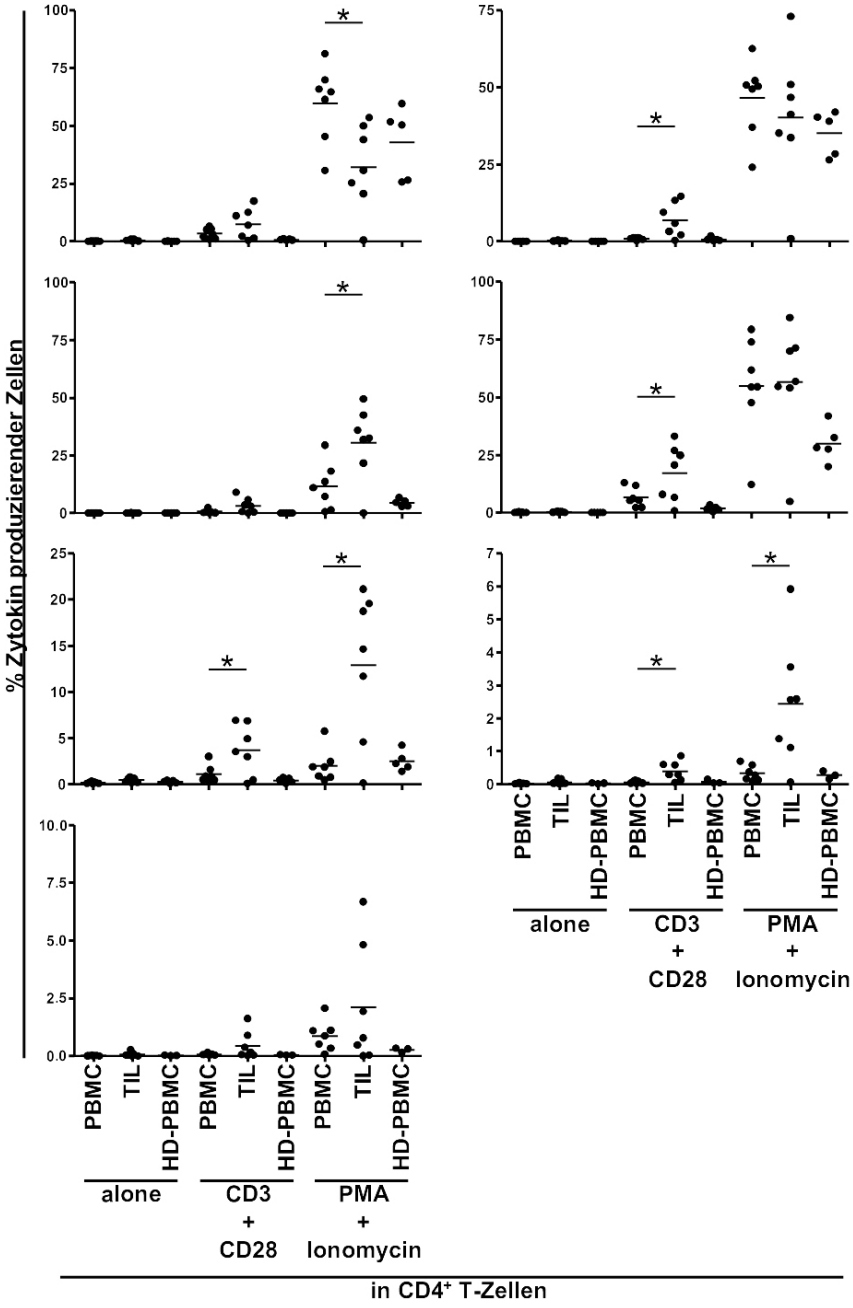


Abbildung 41 Zytokinproduktion in $CD4^+$ T-Zellen

Die Zellen wurden für fünf Stunden entweder mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern oder mit PMA und Ionomycin inkubiert.

Linke Spalte von oben nach unten die Expression von CD154, IFNγ, CD107a, IL-17

Rechte Spalte von oben nach unten IL-2, TNFα, IL-10

In zwei RCC-Patienten konnte ein erhöhter Anteil an IL-17 produzierenden $CD4^+$ Lymphozyten, wahrscheinlich T_H17-Zellen, innerhalb der TILs beobachtet werden (Abbildung 42). Die Ursache hierfür ist nicht klar. Es wurde von einem suppressiven Einfluss durch IL-10 auf T_H17 Zellen berichtet [Gu, Y. et al. 2008]. Der Anteil der IL-17 produzierenden $CD4^+$ TILs zeigte jedoch keine eindeutig negative Korellation zu der von $IL\text{-}10^+$ $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen (Daten nicht gezeigt). Dennoch lässt sich eine Beeinflussung der IL-17 produzierenden Zellen innerhalb des Tumorgewebes durch dort vorhandenes IL-10 nicht ausschließen. Es wurde in der Vergangenheit auch von murinen T_H17-Zellen berichtet, welche Melanomantigene erkennen und entscheidend an der Tumorbekämpfung beteiligt waren [Muranski, P. et al. 2008]. Ob den Zellen hier spezielle Funktionen bei der Bekämpfung von Tumoren zukommen ist nicht bekannt, da der Zusammenhang zwischen diesen Zellen und Krebs bisher nur schwach erforscht ist. Im Mittel konnte jedoch kein signifikanter Unterschied für diese Subpopulation der $CD4^+$ T-Zellen detektiert werden.

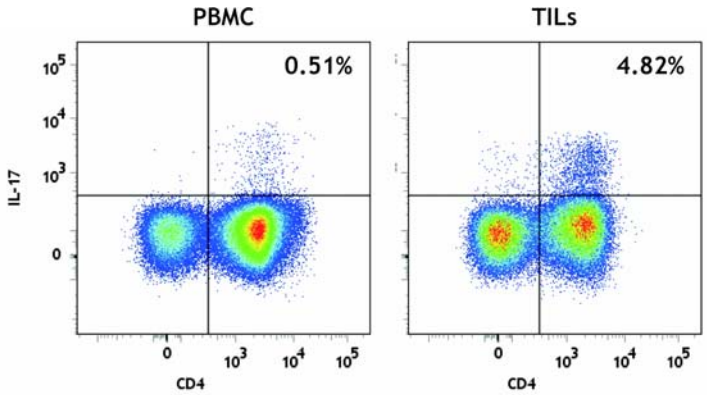


Abbildung 42 FACS-Färbung von T_H17-Zellen

Die Abbildung zeigt Produktion von IL-17 in Zellen von RCC482 nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.

Die Ergebnisse der Produktion von IL-5 zeigten keine Unterschiede in drei untersuchten Krebspatienten, bei denen die in Material und Methoden angesprochene Problematik nicht zutraf. Aufgrund der sehr kleinen Anzahlen ananalysierten Proben kann jedoch keine gesicherte Aussage über mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen getroffen werden (Daten nicht gezeigt).

Die untersuchten Lymphozyten der RCC-Patienten und gesunden Spender wurden weiter auf die Präsenz von multifunktionellen T-Zellen überprüft. Hierzu wurde für jede dieser Gruppen der Anteil an $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Zellen bestimmt, die nur einen und bis zu fünf der Untersuchten Parameter (CD107a, IL-2, IFNγ, TNFα und CD154) exprimierten.

Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, konnte in den TILs der RCC-Patienten im Vergleich zu den PBMCs der beiden anderen Gruppen ein erhöhter Anteil an $CD4^+$ T-Zellen detektiert werden, die vier oder fünf der untersuchten Parameter aufwiesen.

In den untersuchten PBMCs und TILs der RCC-Patienten war insgesamt ein erhöhter Anteil von multifunktionellen T-Zellen verglichen mit den gesunden Spendern zu beobachten. Die PBMCs und TILs der Krebspatienten zeigten einen vergleichbaren Anteil an $CD4^+$ Lymphozyten welche drei der Parameter exprimierten. Das verstärkte Vorkommen multifunktioneller T-Zellen in den TILs kann durch den erhöhten Anteil an Effektorzellen erklärt werden [Seder, R.A. et al. 2008]. Es ist u.a. von virus-spezifischen T-Zellen bekannt, dass das Potential zur Produktion mehrerer Zytokine wie IL-2, IFNγ und TNFα mit einem besseren Schutz gegen Infektionen einhergeht [Precopio, M.L. et al. 2007; Seder, R.A. et al. 2008]. Dies liegt an dem verstärkten Effektorfunktionen dieser T-Zellen, welche sich auch in einer verstärkten Zytokinproduktion äußert. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die multifunktionellen T-Lymphozyten meist den Phänotyp von frühen Effektorzellen besitzen [Seder, R.A. et al. 2008].

Die Analyse des multifunktionellen Potentials der $CD8^+$ T-Zellen zeigte nur geringe Unterschiede bei dem Vergleich der PBMCs von gesunden Spendern mit den Lymphozyten der Krebspatienten. Es zeigte sich lediglich ein leichter Anstieg an T-Zellen in der Gruppe der TILs, welche in der Lage waren, vier der gemessenen Parameter zu exprimieren. Wie bereits beschrieben konnte in den TILs der RCC-Patienten ein erhöhter Anteil an Effektorzellen gefunden werden. Diese Zellen sollten in der Lage sein, verschiedene Zytokine wie IFNγ oder TNFα zu produzieren, was im Falle der untersuchten TILs jedoch nicht beobachtet werden konnte. Die Ursachen hierfür könnten in dem ständigen Antigenkontakt der TILs liegen. Hierbei kann es, wie in Abschnitt 1.5.3 bereits erläutert, durch den Kontakt mit Selbst-Antigenen zur Anergie der T-Zellen kommen, was sich in einer verminderten Aktivierung und Zytokinproduktion äußern kann [Chiou, S.H. et al. 2005; de Visser, K.E. et al. 2001; Demotte, N. et al. 2008; Nakagomi, H. et al. 1993].

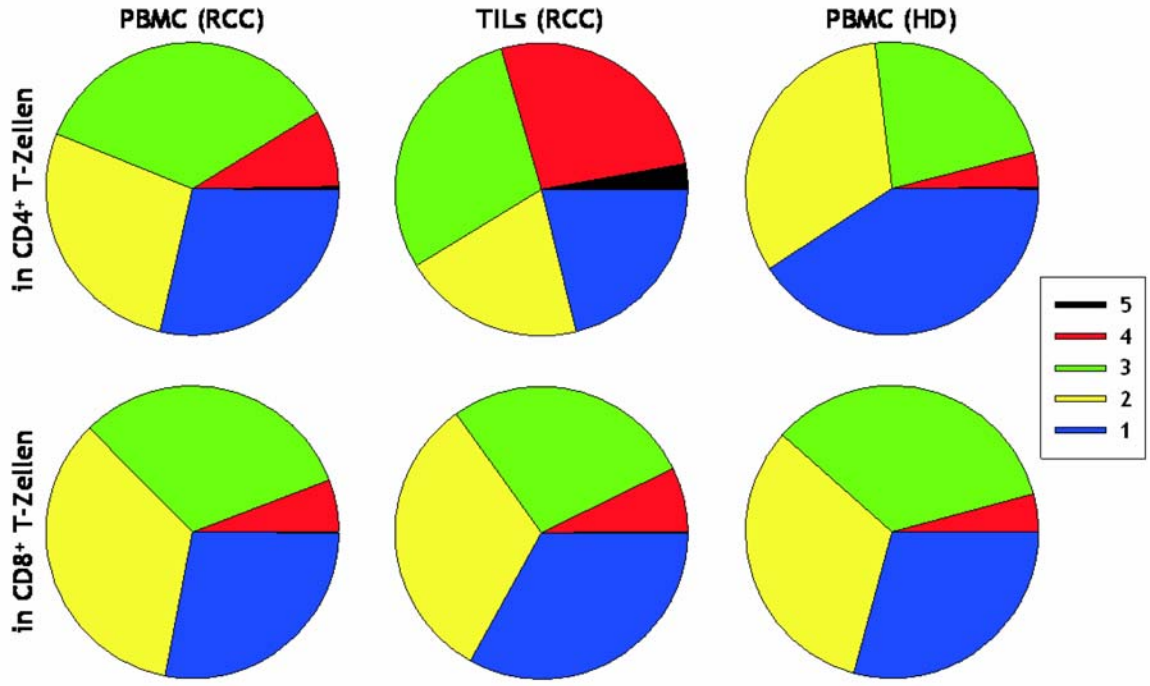


Abbildung 43 Multizytokin Antworten in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen

Die Diagramme zeigen die Anteile von multifunktionellen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in PBMCs und TILs von RCC-Patienten sowie gesunden Spendern. Die mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen wurden auf die Expression von CD107a, CD154, IL-2, IFNγ und TNFα analysiert. Die Teilstücke der Diagramme geben die mittleren Anteile der Zellen wieder, welche 1-5 der untersuchten Parameter aufwiesen.

7.4.5 Untersuchung des Einflusses von LacNAc auf die Zytokinexpression von RCC TILs

Die Erkennung eines Antigens durch $CD8^+$ T-Zellen erfolgt über die Bindung des TCR und den MHC-Peptid-Komplex der antigenpräsentierenden Zelle. Hierbei bindet auch das CD8-Molekül der T-Zelle an das MHC-Molekül, wodurch die Affinität um den Faktor 10 verstärkt wird [Arcaro, A. et al. 2001; Holler, P.D. et al. 2003]. Bei sehr starker oder chronischer Stimulation von T-Zellen können diese ihre zytolytischen und -toxischen Eigenschaften verlieren. Dieser Verlust ist nicht auf die verminderte Expression von CD8 oder TCR zurückzuführen, sondern auf eine räumliche Trennung der beiden genannten Moleküle an der Zelloberfläche [Altman, J.D. et al. 1996; Demotte, N. et al. 2002]. Da Lymphozyten bei der Infiltration von Tumorgewebe einer ständigen Antigenstimulation ausgesetzt sind, kann das beschriebene Phänomen die nicht ausreichende Immunantwort erklären.

Demotte et al. konnten in ihrer Publikation im März 2008 zeigen, wie die räumliche Trennung des CD8- und TCR-Moleküls nach Antigenstimulation rückgängig oder sogar verhindert werden kann [Demotte, N. et al. 2008]. Galectin-3 ist für die Verhinderung einer Kolokalisation des TCR mit dem CD8-Molekül verantwortlich. LacNAc bindet mit sehr hoher Affinität an Galectin-3, wodurch die Colokalisation des CD8- und TCR-Moleküls wieder möglich ist [Demotte, N. et al. 2008]. Demotte et al. konnten durch LacNAc-Zugabe die Effektorfunktionen (IFNγ-Sekretion) von TILs aus Ovarial- und Endometriumkarzinomen wieder herstellen.

Tabelle 33 Liste der funktionell untersuchten RCC-Patienten nach LacNAc Behandlung

Patienten Kodierung	Alter	Geschlecht	Tumortyp	Tumorstadium
463	69	m	papillär	pT1a pN0 G1-2 R0 cM0
467	80	m	klarzellig	pT3b pN1 G1 Rx
468	43	m	klarzellig	pT3b pN0 R0
471	45	w	klarzellig	pT3b, G2
482	74	w	klarzellig	pT1b G3 cN0 cM0 L0 V0 R0
486	66	m	klarzellig	pT3a G2 L0 V0 Rx
535	56	w	klarzellig	pT3b G3 pNx cM1 L0 V1 Rx

7.4.5.1 Auswertung der Ergebnisse von LacNAC auf die Zytokinexpression von RCC TILs

Die Zellen der RCC-Patienten wurden aufgetaut und in der Anwesenheit von LacNAc für 16 Stunden inkubiert. Nachdem die Zellen gewaschen worden waren, fand eine Stimulation mit CD3 und CD28 Antikörpern oder PMA und Ionomycin für 5 Stunden statt. Diese Stimulation sowie die Vorgehensweise bei der folgenden Färbung mit verschiedenen fluorochrom-gekoppelten Antikörpern fanden wie bei der Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von PBMCs und TILs statt. Um eine Aussage über den Effekt von LacNAc auf die Zellen treffen zu können, wurden entsprechende Analysen mit autologen Zellen ohne dessen Zugabe durchgeführt.

Die Ergebnisse für die getesteten Proben von RCC-Patienten zeigten für die $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen der PBMCs keinen Unterschied in der Menge und Expressionsstärke der untersuchten Zytokine (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis war zu erwarten da diese Zellen in der Peripherie nicht ständig Kontakt mit dem von ihnen erkanntem Antigen haben. Da keine dauerhafte Stimulation dieser T-Zellen stattfindet kommt es zu keiner bleibenden Trennung des TCRs und CD8-Moleküls. Hieraus resultiert eine nicht reduzierte Kapazität der Effektorfunktionen [Demotte, N. et al. 2008].

Die $CD8^+$ TILs der sieben getesteten Tumorpatienten zeigten im Mittel keine gesteigerte Zytokinproduktion nach der Behandlung mit LacNAC verglichen zu nicht behandelten Zellen. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 44 beispielhaft für IFNγ dargestellt. Bei nur zwei Patienten konnte eine gewisse Zunahme der Zytokinexpression detektiert werden. Diese war sowohl Patienten- als auch Stimulus-abhängig und wurde hier auch nicht für jedes der untersuchen Zytokine beobachtet. So konnte beispielsweise eine leichte Zunahme der $IFN\gamma^+$ $CD8^+$ TILs nach der Behandlung mit LacNAc und der Stimulation mit CD3 und CD28 bei RCC463 gemessen werden (ohne LacNAc 4.30%; mit LacNAc 6.52% der $CD8^+$ T-Zellen), die sich jedoch bei der Stimulation mit PMA und Ionomycin nicht mehr zeigte (ohne LacNAc 51.84%; mit LacNAc 47.89% der $CD8^+$ T-Zellen). Umgekehrt konnte dies z.B. für RCC468 (ohne LacNAc 33.08%; mit LacNAc 42.93% der $CD8^+$ T-Zellen) oder RCC535 (ohne LacNAc 32.35%; mit LacNAc 38.24% der $CD8^+$ T-Zellen) beobachtet werden.

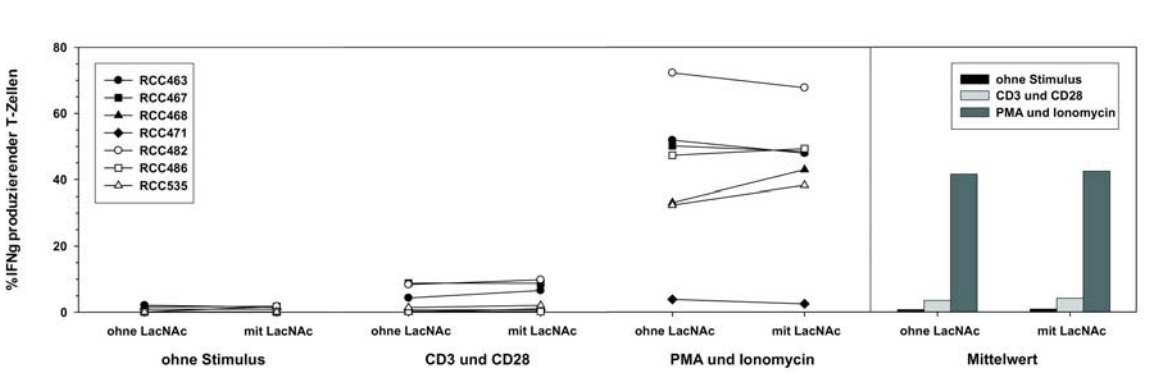


Abbildung 44 IFNγ-Produktion in $CD8^+$ TILs mit und ohne LacNAc Behandlung

Die TILs der RCC-Patienten wurden mit oder ohne LacNAc inkubiert. Nach einer Stimulation mit CD3 und CD28 oder PMA und Ionomycin wurde die Expression verschiedener Zytokine gemessen.

Ebenso wie bei den $CD8^+$ TILs zeigte sich innerhalb der $CD4^+$ TILs im Mittel auch keine Steigerung der Zytokinproduktion durch die Behandlung mit LacNAc, wie Abbildung 46 zeigt. Auch hier konnte nur in zwei Patienten eine leichte Steigerung der Zytokinproduktion gemessen werden. Weiter war diese, genau wie bei den $CD8^+$ TILs, vom Patient und Art der Stimulation abhängig. So zeigte RCC468 beispielhaft eine gesteigerte Zytokinproduktion von IFNγ (ohne LacNAc 0.23%; mit LacNAc 0.92% der $CD4^+$ T-Zellen) und TNFα (ohne LacNAc 8.48%; mit LacNAc 16.84% der $CD4^+$ T-Zellen) nach Stimulation mit CD3 und CD28 der mit LacNAc behandelten Zellen im vergleich zu unbehandelten (Abbildung 45).

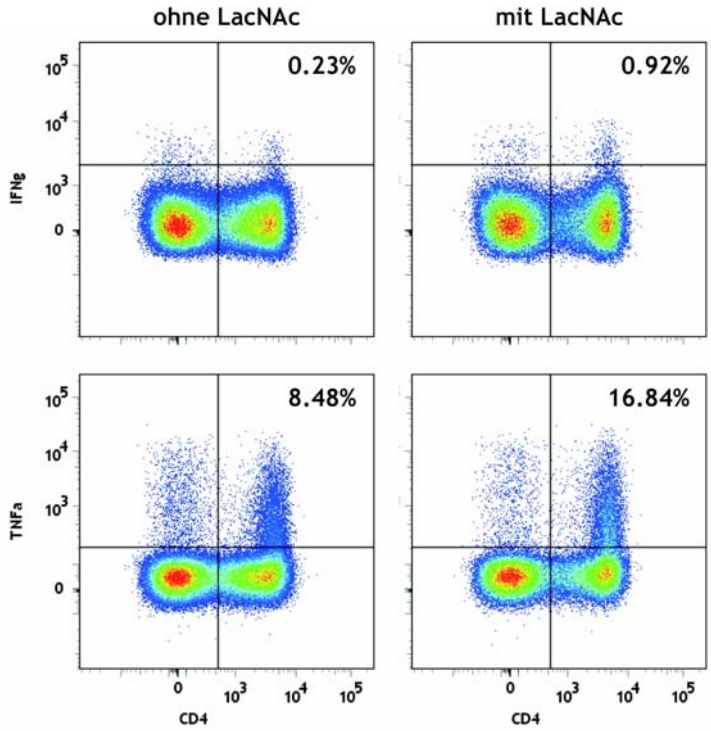


Abbildung 45 Zytokinproduktion nach Behandlung mit LacNAC

Die Abbildung zeigt die Produktion von IFNγ und TNFα in den CD8 negativen TILs des Patienten RCC468. Die Zellen wurden mit oder ohne LacNAc inkubiert. Nach einer Stimulation mit CD3 und CD28 wurde die Expression verschiedener Zytokine gemessen.

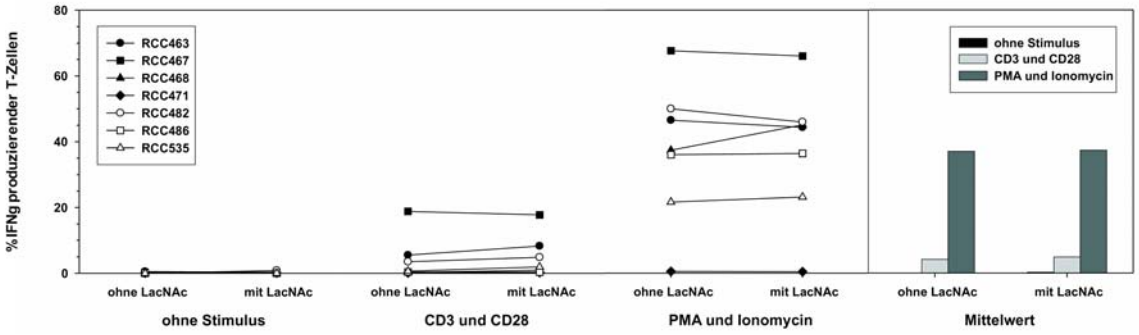


Abbildung 46 IFNγ-Produktion in $CD4^+$ TILs mit und ohne LacNAc Behandlung

Die TILs der RCC-Patienten wurden mit oder ohne LacNAc inkubiert. Nach einer Stimulation mit CD3 und CD28 oder PMA und Ionomycin wurde die Expression verschiedener Zytokine gemessen.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten sowie getesteten Zytokine zeigten keine generelle Steigerung der Zytokinproduktion nach der Präinkubation mit LacNAc. Diese Beobachtungen decken sich nicht mit denen von N. Demotte, welcher von einer

Wiederherstellung des Effektorpotentials in den mit LacNAc behandelten TILs berichtete [Demotte, N. et al. 2008]. Eine mögliche Erklärung hierfür kann in der Quelle der TILs zu finden sein. Demotte, N. et al. verwendeten TILs aus Ovarialkarzinomen und Ascites von Endometriumkarzinomen. Da sich um unterschiedliche Arten von Tumoren handelt, kann sich das jeweilig vorherrschende Mikromilieu vor der Isolation der TILs *in vivo* unterschiedlich auf deren Eigenschaften auswirken. So ist es vorstellbar, dass sich die Anteile der verschiedenen Subpopulationen voneinander unterscheiden, wodurch es z.B. zu einer stärkeren Inhibition der Effektorzellen gekommen ist.

7.5 Zusammenfassung Tumor-infiltrierender Lymphozyten

Tabelle 34 Ergebnisse der Analyse von $CD4^+$ TILs in RCC-Patienten

Zellsubpopulation	Exprimierten Moleküle	Expressionverhältnis (TILs vs. PBMCs)	Signifikanter Unterschied
$CD4^+$ naive Zellen	$CD28^+$ $CD45RA^+$ $CCR7^+$	↙	ja
$CD4^+$ CM-Zellen	$CD28^+$ $CD45RA^-$ $CCR7^+$	↙	ja
$CD4^+$ EM-Zellen	$CD28^{-/+}$ $CD45RA^-$ $CCR7^-$	↗	ja
$CD4^+$ T_{EMRA}-Zellen	$CD28^-$ $CD45RA^+$ $CCR7^+$	=	
zytotoxische $CD4^+$ Zellen	$CD57^+$	↗	ja
T_H1 Zellen	$CD4^+$ $CCR5^+$ $CXCR3^+$	↗	ja
Degranulations-, Aktivierungsmarker und Zytokine in $CD4^+$ Zellen	CD107a	↗	ja
	CD154	↙	ja
	TNFα	=	
	IFNγ	↗	ja
	IL-2	=	
	IL-17	=	
regulatorische T-Zellen	$CD4^+$ $CD25^{high}$ $Foxp3^+$	↗	ja
	$CD4^+$ $CD25^{high}$ $IL\text{-}10^+$	↗	ja
NK-Zell Rezeptoren in $CD4^+$ Zellen	NKG2D	=	
	CD94	↗	
	CD158b	↗	
Liganden von E-Cadherin in $CD4^+$ Zellen	KLRG1	=	
	CD103	↗	ja

Tabelle 35 Ergebnisse der Analyse von $CD8^+$ TILs in RCC-Patienten

Zellsubpopulation	Exprimierte Moleküle	Expressionverhältnis (TILs vs PBMCs)	Signifikanter Unterschied
$CD8^+$ naive Zellen	$CD28^+$ $CD45RA^+$ $CCR7^+$	↙	ja
$CD8^+$ CM-Zellen	$CD28^+$ $CD45RA^-$ $CCR7^+$	=	
$CD8^+$ EM-Zellen	$CD28^{-/+}$ $CD45RA^-$ $CCR7^-$	↗	ja
$CD8^+$ T_{EMRA}-Zellen	$CD28^-$ $CD45RA^+$ $CCR7^+$	↙	ja
zytotoxische $CD8^+$ Zellen	$CD57^+$	↗	ja
aktivierte $CD8^+$ Zellen	CXCR3	↗	ja
Degranulations-, Aktivierungsmarker und Zytokine in $CD8^+$ Zellen	CD107a	↗	ja
	CD154	↙	ja
	TNFα	=	
	IFNγ	=	
	IL-2	=	
regulatorische T-Zellen	$CD8^+$ $IL\text{-}10^+$ $CD103^+$	↗	ja
NK-Zell Rezeptoren in $CD8^+$ Zellen	NKG2D	↙	
	CD94	=	
	CD158b	↙	
Liganden von E-Cadherin in $CD8^+$ Zellen	KLRG1	=	
	CD103	↗	ja

Die Ergebnisse der untersuchten RCC-Patienten konnten einen erhöhten Anteil an $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen mit dem phänotypischen Erscheinungsbild von aktivierten Effektorzellen in Lymphozyten aus Tumorgewebe im Vergleich zu peripherem Blut zeigen. Diese Zellen charakterisieren sich durch die erhöhte Expression von CD57 und eine Reduktion von CD45RA, CCR7 sowie CD28 [Appay, V. et al. 2008]. Der Anstieg von Chemokinrezeptor CXCR3 in der Kohorte der TILs ist ebenfalls ein Indiz für ein erhöhtes Vorkommen von CTLs und T_H1-Zellen [Appay, V. et al. 2008; Kobayashi, N. et al. 2006; Langenkamp, A. et al. 2003; Na, I.K. et al. 2007]. Bei der Analyse der Zytokinproduktion konnte jedoch bei $CD8^+$ TILs kein Anstieg der Produktion von TNFα, IFNγ oder IL-2 gemessen werden. Diese Ergebnisse lassen sich durch „Ermüdung“ oder Inhibition der Effektorzellen erklären. Die Inhibition kann entweder durch den Tumor selbst, aber auch das erhöhte Vorkommen von regulatorischen T-Zellen hervorgerufen worden sein [Groux, H. et al. 1997; Jandus, C. et al. 2008]. Hinweise für den zweiten Grund konnten auch in den analysierten Proben der Krebspatienten gefunden werden. So lag der Anteil an $CD25^{high}$ $Foxp3^+$ Tregs in den TILs bei 2.64% der CD4 Zellen und somit etwa 6x höher als in den PBMCs der Patienten und gesunden Spendern. Neben einem Anstieg dieser

natürlichen Tregs konnte weiter eine verstärkte Produktion von IL-10 in den T-Zellen aus Tumorgeweben gemessen werden. Im Falle der $CD4^+$ Zellen scheint es sich daher um adaptive regulatorischen T-Lymphozyten zu handeln [Groux, H. et al. 1997; Sakaguchi, S.2004; Siddiqui, S.A. et al. 2007]. Die $CD8^+$ Zellen, die dieses inhibitorische Zytokin produzieren, sind in der Lage eine Immunantwort durch Zell-Zell-Kontakt zu unterdrücken [Noble, A. et al. 2006]. Weiter sind regulatorische T-Zellen durch eine verstärkte Expression von CD103 charakterisiert [Uss, E. et al. 2006]. Die Ergebnisse von RCC-Patienten und gesunden Spendern zeigten einen Anstieg von CD103, sowie eine erhöhte Produktion von IL-10 nicht nur in den bereits erwähnten $CD4^+$, sondern auch $CD8^+$ TILs verglichen mit den PBMCs von Krebspatienten und gesunden Spendern. Ob die $CD4^+$ sowie die $CD8^+$ T-Zellen, mit dem Phänotyp regulatorischer Lymphozyten, tatsächlich in der Lage sind eine Immunantwort zu inhibieren, sollte in weiteren *in vitro* Experimenten geklärt werden.

Es konnte für die $CD4^+$ TILs weiter eine Zunahmen der Expression verschiedener inhibitorischer NK-Zell-assoziierter Rezeptoren (CD94 und CD158b) gemessen werden. KLRG1, ein weiterer inhibitorischer Rezeptor, wird vornehmlich von Effektorzellen exprimiert [Appay, V. et al. 2008; Voehringer, D. et al. 2002]. In der Gruppe der TILs wurde eine Zweiteilung der Patienten bezüglich des Anteils an $KLRG1^+$ Zellen in $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten beobachtet. Patienten, die tendenziell sehr viele EM-Zellen in den $CD8^+$ TILs aufwiesen, zeigten nur einen niedrigen Anteil an $KLRG1^+$ Zellen. Diese interessante Entdeckung in Bezug auf die $CD8^+$ TILs, sowie die unterschiedlich starke Expression für KLRG1 in den $CD4^+$ Zellen führte zu der Frage nach der Ursache dieser Phänomene. Die Untersuchung eines Liganden von KLRG1 und CD103 [Grundemann, C. et al. 2006; Schwartzkopff, S. et al. 2007; Uss, E. et al. 2006], E-Cadherin, zeigte in Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten unterschiedliche Signalintensitäten der Cadherin-Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe der Niere. Es konnte allerdings keine Korrelation zwischen der Expressionsstärke von E-Cadherin und dem Anteil an $KLRG1^+$ $CD8^+$ T-Zellen beobachtet werden. Im Falle der $CD4^+$ T-Lymphozyten zeigte die Hälfte der Untersuchten Patienten mit einem erhöhten Anteil an $KLRG1^+$ Zellen eine im Vergleich zum Normalgewebe reduzierte Färbung des Tumorgewebes für E-Cadherin. Eine klare Verbindung konnte hier jedoch auch nicht festgestellt werden.

Trotz der verstärkten Expression der zuvor genannten inhibitorischen Rezeptoren und dem vermehrten Auftreten von T-Zellen mit regulatorischem Potential zeigten die T-Helferzellen ein im Vergleich zu den Zellen des peripherem Blutes von Krebspatienten und gesunden Spendern erhöhtes Produktionspotential für IL-2 und $TNF\alpha$ nach Stimulation mit CD3 und CD28 Antikörpern, sowie für $IFN\gamma$ nach PMA und Ionomycin Stimulation. Diese $CD4^+$ TILs sind meist in der Lage, mehrerer dieser Zytokine gleichzeitig zu produzieren was auf eine gute Effektorfunktion hinweist [Seder, R.A. et al. 2008]. Desweiteren konnte ein erhöhter Degranulation der $CD4^+$ aber auch $CD8^+$ TILs im Vergleich zu den PBMCs der beiden

Vergleichsgruppen detektiert werden. Allerdings zeigte sich für die Lymphozyten aus dem Tumorgewebe eine verminderte Aktivierung, welche sich in einer reduzierten Expression von CD154 ausdrückte.

Die isolierten TILS der RCC-Patienten sollten auf Grund ihres Phänotyps, des prinzipiellen Potentials der Produktion mehrerer Zytokine wie IFNγ, IL-2 und TNFα gemeinsam mit einer gesteigerten Degranulation in der Lage sein, den Tumor effizient zu bekämpfen. Der massiv erhöhte Anteil an Tregs und IL-10 produzierenden T-Zellen scheinen dies jedoch verhindern zu können. Desweiteren ist auch von einer IL-10 Produktion bei RCC-Patienten durch Tumorzellen berichtet worden [Abe, H. et al. 2008; Wittke, F. et al. 1999]. So nimmt auch das Mikromilieu im Bereich des Tumors Einfluss auf die infiltrierenden Lymphozyten, indem es zytotoxische T-Zellen in ihrer Funktion unterdrückt [Elgert, K.D. et al. 1998; Gabrilovich, D.I. et al. 1996; Tada, T. et al. 1991].

Abkürzungsverzeichnis

AICD	*Activation Induced Cell Death*
AIRE	*Autoimmune Regulator*
APC	Antigen Presenting Cell oder Allophycocyanin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
aTreg	adaptive regulatorische T-Zelle
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basen-Paare
BSA	*Bovine Serum Albumin*
Camp	Chloramphenicol
CCR	*Chemokine Receptor*
CD	*Cluster of Differentiation*
cDNA	*Complementary DNA*
CDR	*Complementary Determining Region*
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
cGy	*Centi Gray*
Chi	Chiri
CIA	*Collagen Induced Arthritis*
CLIP	*Class II-associated Invariant-chain Peptide*
CM	*Central Memory Cell*
cpm	C*ounts Per Minute*
CRC	*Colorectal Cancer*
CTL	*Cytotoxic T Lymphocyte*
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	*Dendritic Cell*

ddH_2O	doppelt-destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*Desoxyribonucleic Acid*
EAE	*Experimental Autoimmune Encephalitis*
EBV	Epstein-Barr-Virus
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	*Enzym Linked ImmunoSorbent Assay*
ELISPOT	*Enzym Linked ImmunoSPOT Assay*
EM	*Effector Memory Cell*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	*Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing*
FACS	*Fluorescence Activated Cell Sorting*
FasL	Fas-Ligand
FCS	*Fetal Calf Serum*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	*Forkhead-Winged Helix Transkription Factors*
FPLC	*Fast Protein Liquid Chromatography*
FSC	*Forward Scatter*
GAM	*Goat Anti Mouse*
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor*
H-2	*Histocompatibility Antigen 2*
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HIF	*Hypoxia Inducible Factor*
HIV	*Human Immundefency Virus*
HLA	*Human Leucocyte Antigen*

HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	*Horseradish Peroxidase*
HS	Humanes Serum
HSA	Humanes Serumalbumin
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämievirus
ICS	*Intracellular Cytokine Staining*
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactosid
ITAM	*Immunreceptor Tyrosine-based Activation Motif*
IU	*International Unit*
Kb	Kilo Basen
Ker1	erster HLA-A*02 Ligand von Cytokeratin 18 [365-373]
Ker2	zweiter HLA-A*02 Ligand von Cytokeratin 18 [89-97]
Keratin 18	Zytokeratin 18
kDa	Kilodalton
KLRG1	*Killer Lectin-Like Receptor G1*
LacNAc	N-Acetyllactosamine
LDA	*Limiting Dilution Assay*
MACS	*Magnet Assisted Cell Sorting*
MDSC	*Myeloid-Derived-Suppressor-Cell*
MHC	*Major Histocompatibility Complex*
MIIC	*MHC Class II Compartment*
min	Minute

m-RNA	*Messenger RNA*
MS	Massen-Spektrometrie
MSC	*Myeloide Supressor Cell*
MW	*Molecular Weight*
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
n.t.	*Not Tested*
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PBL	*Peripheral Blood Lymphocyte*
PBMC	*Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PE	R-Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
pH	*Potentia Hydrogenii*
PHA	Phytohemagglutinin
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	*Pounds Per Square Inch*
RCC	*Renal Cell Cancer*
RNA	*Ribonucleic Acid*
rpm	*Revolutions Per Minute*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RT	Raumtemperatur
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B

SSC	*Sideward Scatter*
Strep	Streptomycin
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	*Transporter Associated with Antigen Processing*
TCR	*T Cell Receptor*
TGF	*Tumor Growth Factor*
TIL	Tumor-infiltrierender Lymphozyt
TLR	*Toll-Like-Receptor*
TNF	*Tumor Necrosis Factor*
TNFSF	*Tumor Necrosis Factor Superfamily*
Treg	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*

Quellenverzeichnis

Abe, H., Yamanishi, T., Mashidori, T., Arai, K., and Kamai, T.(2008). **Significant association of interleukin 10 receptor mRNA levels with renal cell carcinoma metastasis**. Biomed.Res *29*, 19-25.

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L.(2003). **Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17**. J Biol.Chem. *278*, 1910-1914.

Ahmadzadeh, M. and Rosenberg, S.A.(2006). **IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients**. Blood *107*, 2409-2414.

Akbari, O., Stock, P., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T.(2003). **Role of regulatory T cells in allergy and asthma**. Curr Opin.Immunol. *15*, 627-633.

Allison, J.P., Hurwitz, A.A., and Leach, D.R.(1995). **Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses**. Curr Opin.Immunol. *7*, 682-686.

Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., and Davis, M.M.(1996). **Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes**. Science *274*, 94-96.

Alves, P.M., Viatte, S., Fagerberg, T., Michielin, O., Bricard, G., Bouzourene, H., Vuilleumier, H., Kruger, T., Givel, J.C., Levy, F., Speiser, D.E., Cerottini, J.C., and Romero, P.(2007). **Immunogenicity of the carcinoembryonic antigen derived peptide 694 in HLA-A2 healthy donors and colorectal carcinoma patients**. Cancer Immunol.Immunother. *56*, 1795-1805.

Anderson, D.R., Grillo-Lopez, A., Varns, C., Chambers, K.S., and Hanna, N.(1997). **Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma**. Biochem.Soc.Trans. *25*, 705-708.

Anderson, M.S. and Miller, J.(1992). **Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules**. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *89*, 2282-2286.

Angevin, E., Kremer, F., Gaudin, C., Hercend, T., and Triebel, F.(1997). **Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization to type 1-like differentiation pattern, clonal T-cell expansion and tumor-specific cytotoxicity**. Int.J.Cancer *72*, 431-440.

Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., Little, S., Havlir, D.V., Richman, D.D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., McMichael, A.J., and Rowland-Jones, S.L.(2002). **Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections**. Nat.Med *8*, 379-385.

Appay, V., Nixon, D.F., Donahoe, S.M., Gillespie, G.M., Dong, T., King, A., Ogg, G.S., Spiegel, H.M., Conlon, C., Spina, C.A., Havlir, D.V., Richman, D.D., Waters, A., Easterbrook, P., McMichael, A.J., and Rowland-Jones, S.L.(2000). **HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function**. J.Exp.Med. *192*, 63-75.

Appay, V., van Lier, R.A., Sallusto, F., and Roederer, M.(2008). **Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues**. Cytometry A

Arcaro, A., Gregoire, C., Bakker, T.R., Baldi, L., Jordan, M., Goffin, L., Boucheron, N., Wurm, F., van der Merwe, P.A., Malissen, B., and Luescher, I.F.(2001). **CD8beta endows CD8 with efficient coreceptor function by coupling T cell receptor/CD3 to raft-Passociated CD8/p56(lck) complexes**. J Exp.Med *194*, 1485-1495.

Asal, N.R., Risser, D.R., Kadamani, S., Geyer, J.R., Lee, E.T., and Cherng, N.(1988). **Risk factors in renal cell carcinoma: I. Methodology, demographics, tobacco, beverage use, and obesity**. Cancer Detect.Prev. *11*, 359-377.

Attig, S.(2005). **Charakterisierung von dysfunktionellen Cytokeratin 18-spezifischen, CD8-positiven T-Zellen in gesunden und kranken Individuen**.

Azuma, M., Cayabyab, M., Phillips, J.H., and Lanier, L.L.(1993a). **Requirements for CD28-dependent T cell-mediated cytotoxicity**. J Immunol. *150*, 2091-2101.

Azuma, M., Phillips, J.H., and Lanier, L.L.(1993b). **CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties**. J Immunol.

Bachmann, M.F., Speiser, D.E., Zakarian, A., and Ohashi, P.S.(1998). **Inhibition of TCR triggering by a spectrum of altered peptide ligands suggests the mechanism for TCR antagonism**. Eur.J Immunol. *28*, 3110-3119.

Bakke, O. and Dobberstein, B.(1990). **MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments**. Cell *63*, 707-716.

Banchereau, J. and Steinman, R.M.(1998). **Dendritic cells and the control of immunity**. Nature *392*, 245-252.

BD Biosciences(2007). **Trainingshandbuch: Duchflusszytometrie BD FACSCanto II**. Trainingshandbuch: Duchflusszytometrie BD FACSCanto II

Belldegrun, A., Tso, C.L., Sakata, T., Duckett, T., Brunda, M.J., Barsky, S.H., Chai, J., Kaboo, R., Lavey, R.S., McBride, W.H., and .(1993). **Human renal carcinoma line transfected with interleukin-2 and/or interferon alpha gene(s): implications for live cancer vaccines**. J Natl Cancer Inst *85*, 207-216.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K.(2006). **Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells**. Nature *441*, 235-238.

Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C.(1987). **Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2**. Nature *329*, 506-512.

Blank, C., Gajewski, T.F., and Mackensen, A.(2005). **Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy**. Cancer Immunol.Immunother. *54*, 307-314.

Boon, T., Cerottini, J.C., Van den, E.B., van der, B.P., and Van Pel, A.(1994). **Tumor antigens recognized by T lymphocytes**. Annu.Rev.Immunol. *12*, 337-365.

Boon, T., Coulie, P.G., van den Eynde, B.J., and van der, B.P.(2006). **Human T cell responses against melanoma**. Annu.Rev.Immunol. *24*, 175-208.

Boss, C.N., Grunebach, F., Brauer, K., Hantschel, M., Mirakaj, V., Weinschenk, T., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Brossart, P.(2007). **Identification and characterization of T-cell epitopes deduced from RGS5, a novel broadly expressed tumor antigen**. Clin.Cancer Res *13*, 3347-3355.

Bouvier, M. and Wiley, D.C.(1994). **Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules**. Science *265*, 398-402.

Bowden, P.E.(2005). **The human type II keratin gene cluster on chromosome 12q13.13: Final count or hidden secrets?** Journal of Investigative Dermatology *124*, XV-XVII.

Britten, C.M., Meyer, R.G., Kreer, T., Drexler, I., Wolfel, T., and Herr, W.(2002). **The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting Pcells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays**. J Immunol.Methods *259*, 95-110.

Bronstein-Sitton, N., Cohen-Daniel, L., Vaknin, I., Ezernitchi, A.V., Leshem, B., Halabi, A., Houri-Hadad, Y., Greenbaum, E., Zakay-Rones, Z., Shapira, L., and Baniyash, M.(2003). **Sustained exposure to bacterial antigen induces interferon-gamma-dependent T cell receptor zeta down-regulation and impaired T cell function**. Nat.Immunol. *4*, 957-964.

Bronte, V., Tsung, K., Rao, J.B., Chen, P.W., Wang, M., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P.(1995). **IL-2 enhances the function of recombinant poxvirus-based vaccines in the treatment of established pulmonary metastases**. J Immunol. *154*, 5282-5292.

Brossart, P.(2002). **Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases**. Transfus.Apher.Sci. *27*, 183-186.

Brossart, P., Wirths, S., Stuhler, G., Reichardt, V.L., Kanz, L., and Brugger, W.(2000). **Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells**. Blood *96*, 3102-3108.

Brunda, M.J., Luistro, L., Warrier, R.R., Wright, R.B., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.F., and Gately, M.K.(1993). **Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors**. J Exp.Med *178*, 1223-1230.

Buckanovich, R.J., Facciabene, A., Kim, S., Benencia, F., Sasaroli, D., Balint, K., Katsaros, D., O'Brien-Jenkins, A., Gimotty, P.A., and Coukos, G.(2008). **Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy**. Nat.Med *14*, 28-36.

Bukowski, R.M.(2000). **Cytokine combinations: therapeutic use in patients with advanced renal cell carcinoma**. Semin.Oncol. *27*, 204-212.

Burnet, F.M.(2008). **The clonal selection theory of acquired immunity**. London Cambridge University Press

Burrows, S.R., Kienzle, N., Winterhalter, A., Bharadwaj, M., Altman, J.D., and Brooks, A.(2000). **Peptide-MHC class I tetrameric complexes display exquisite ligand specificity**. J.Immunol. *165*, 6229-6234.

Campi, G., Crosti, M., Consogno, G., Facchinetti, V., Conti-Fine, B.M., Longhi, R., Casorati, G., Dellabona, P., and Protti, M.P.(2003). **CD4(+) T cells from healthy subjects and colon cancer patients recognize a carcinoembryonic antigen-specific immunodominant epitope**. Cancer Res *63*, 8481-8486.

Carrabba, M.G., Castelli, C., Maeurer, M.J., Squarcina, P., Cova, A., Pilla, L., Renkvist, N., Parmiani, G., and Rivoltini, L.(2003). **Suboptimal activation of CD8(+) T cells by melanoma-derived altered peptide ligands: role of Melan-A/MART-1 optimized analogues**. Cancer Res *63*, 1560-1567.

Casazza, J.P., Betts, M.R., Price, D.A., Precopio, M.L., Ruff, L.E., Brenchley, J.M., Hill, B.J., Roederer, M., Douek, D.C., and Koup, R.A.(2006). **Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation**. J Exp.Med *203*, 2865-2877.

Celis, E., Tsai, V., Crimi, C., DeMars, R., Wentworth, P.A., Chesnut, R.W., Grey, H.M., Sette, A., and Serra, H.M.(1994). **Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes**. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *91*, 2105-2109.

Cesana, G.C., DeRaffele, G., Cohen, S., Moroziewicz, D., Mitcham, J., Stoutenburg, J., Cheung, K., Hesdorffer, C., Kim-Schulze, S., and Kaufman, H.L.(2006). **Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma**. J.Clin.Oncol. *24*, 1169-1177.

Chan, D.Y. and Marshall, F.F.(1998). **Surgery in advanced and metastatic renal cell carcinoma**. Curr Op in Urol *8*, 369-373.

Chicz, R.M., Urban, R.G., Gorga, J.C., Vignali, D.A., Lane, W.S., and Strominger, J.L.(1993). **Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles**. J Exp.Med *178*, 27-47.

Chiou, S.H., Sheu, B.C., Chang, W.C., Huang, S.C., and Hong-Nerng, H.(2005). **Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies**. J.Reprod.Immunol. *67*, 35-50.

Chu, R.S., Targoni, O.S., Krieg, A.M., Lehmann, P.V., and Harding, C.V.(1997). **CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity**. J Exp.Med *186*, 1623-1631.

Coffer, P.J. and Burgering, B.M.(2004). **Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system**. Nat.Rev.Immunol. *4*, 889-899.

Coley, W.B.(1893). **The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases.** Clin.Orthop.Relat Res. 3-11.

Connerotte, T., Van Pel, A., Godelaine, D., Tartour, E., Schuler-Thurner, B., Lucas, S., Thielemans, K., Schuler, G., and Coulie, P.G.(2008). **Functions of Anti-MAGE T-cells induced in melanoma patients under different vaccination modalities**. Cancer Res *68*, 3931-3940.

Corn, P.G., McDonald, E.R., III, Herman, J.G., and El Deiry, W.S.(2003). **Tat-binding protein-1, a component of the 26S proteasome, contributes to the E3 ubiquitin ligase function of the von Hippel-Lindau protein**. Nat.Genet. *35*, 229-237.

Corr, M., Slanetz, A.E., Boyd, L.F., Jelonek, M.T., Khilko, S., al Ramadi, B.K., Kim, Y.S., Maher, S.E., Bothwell, A.L., and Margulies, D.H.(1994). **T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity**. Science *265*, 946-949.

Coulie, P.G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P., Renauld, J.C., and Boon, T.(1994). **A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas**. J.Exp.Med. *180*, 35-42.

Couzin, J.(2006). **T Cells a Boon for Colon Cancer Prognosis**. Science "News of the Week" *313*, 1868-1869.

Cox, A.L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R.A., Darrow, T.L., Shabanowitz, J., Engelhard, V.H., Hunt, D.F., and Slingluff, C.L., Jr.(1994). **Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines**. Science *264*, 716-719.

Cresswell, P.(1996). **Invariant chain structure and MHC class II function**. Cell *84*, 505-507.

Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A., and Sedgwick, J.D.(2003). **Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain**. Nature *421*, 744-748.

Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F.(2003). **Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function**. J Exp.Med *197*, 1141-1151.

Czerkinsky, C.C., Nilsson, L.A., Nygren, H., Ouchterlony, O., and Tarkowski, A.(1983). **A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells**. J Immunol.Methods *65*, 109-121.

Daniels, M.A. and Jameson, S.C.(2000). **Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers**. J.Exp.Med. *191*, 335-346.

De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., Szikora, J.P., Wolfel, T., Sibille, C., Chomez, P., and Boon, T.(1988). **Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation**. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *85*, 2274-2278.

de Visser, K.E., Cordaro, T.A., Kessels, H.W., Tirion, F.H., Schumacher, T.N., and Kruisbeek, A.M.(2001). **Low-avidity self-specific T cells display a pronounced expansion defect that can be overcome by altered peptide ligands**. J Immunol. *167*, 3818-3828.

Delouis, C., Prochasson, P., Laithier, M., and Brison, O.(2005). **Use of adenoviral E1A protein to analyze K18 promoter deregulation in colon carcinoma cells discloses a role for CtBP1 and BRCA1**. BMC.Mol.Biol. *6*, 8.

Demotte, N., Colau, D., Ottaviani, S., Godelaine, D., Van Pel, A., Boon, T., and van der Bruggen, P.(2002). **A reversible functional defect of CD8+ T lymphocytes involving loss of tetramer labeling**. Eur.J Immunol. *32*, 1688-1697.

Demotte, N., Stroobant, V., Courtoy, P.J., Van Der, S.P., Colau, D., Luescher, I.F., Hivroz, C., Nicaise, J., Squifflet, J.L., Mourad, M., Godelaine, D., Boon, T., and van der Bruggen, P.(2008). **Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes**. Immunity *28*, 414-424.

Dengjel, J., Decker, P., Schoor, O., Altenberend, F., Weinschenk, T., Rammensee, H.G., and Stevanovic, S.(2004). **Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry**. Eur.J Immunol. *34*, 3644-3651.

Dengjel, J., Nastke, M.D., Gouttefangeas, C., Gitsioudis, G., Schoor, O., Altenberend, F., Muller, M., Kramer, B., Missiou, A., Sauter, M., Hennenlotter, J., Wernet, D., Stenzl, A., Rammensee, H.G., Klingel, K., and Stevanovic, S.(2006). **Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas**. Clin.Cancer Res *12*, 4163-4170.

Denkberg, G., Cohen, C.J., and Reiter, Y.(2001). **Critical role for CD8 in binding of MHC tetramers to TCR: CD8 antibodies block specific binding of human tumor-specific MHC-peptide tetramers to TCR**. J.Immunol. *167*, 270-276.

Denzin, L.K. and Cresswell, P.(1995). **HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading**. Cell *82*, 155-165.

Ding, Y.H., Smith, K.J., Garboczi, D.N., Utz, U., Biddison, W.E., and Wiley, D.C.(1998). **Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids**. Immunity *8*, 403-411.

Disis, M.L., Bernhard, H., Shiota, F.M., Hand, S.L., Gralow, J.R., Huseby, E.S., Gillis, S., and Cheever, M.A.(1996). **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines**. Blood *88*, 202-210.

Dittmann, J., Keller-Matschke, K., Weinschenk, T., Kratt, T., Heck, T., Becker, H.D., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Gouttefangeas, C.(2005). **CD8+ T-cell response against MUC1-derived peptides in gastrointestinal cancer survivors**. Cancer Immunol.Immunother. *54*, 750-758.

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., Robinson, M.R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C.A., Rogers-Freezer, L., Morton, K.E., Mavroukakis, S.A., White, D.E., and Rosenberg, S.A.(2002). **Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes**. Science *298*, 850-854.

Dunbar, P.R., Smith, C.L., Chao, D., Salio, M., Shepherd, D., Mirza, F., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Evans, A., Russell-Jones, R., Harris, A.L., and Cerundolo, V.(2000). **A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response**. J Immunol. *165*, 6644-6652.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D.(2002). **Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape**. Nat.Immunol. *3*, 991-998.

Dutoit, V., Guillaume, P., Cerottini, J.C., Romero, P., and Valmori, D.(2002). **Dissecting TCR-MHC/peptide complex interactions with A2/peptide multimers incorporating tumor antigen peptide variants: crucial role of interaction kinetics on functional outcomes**. Eur.J Immunol. *32*, 3285-3293.

Ehrlich, P. and Pergamon, L.(1956). **"On immunity with special reference to cell life: Cronian lecture."**. The collected papers of Paul Ehrlich *II: Immunology and Cancer Research*, 148-192.

Elgert, K.D., Alleva, D.G., and Mullins, D.W.(1998). **Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection**. J Leukoc.Biol. *64*, 275-290.

Elkord, E., Burt, D.J., Drijfhout, J.W., Hawkins, R.E., and Stern, P.L.(2008). **CD4+ T-cell recognition of human 5T4 oncofoetal antigen: implications for initial depletion of CD25+ T cells**. Cancer Immunol.Immunother. *57*, 833-847.

Elsasser-Beile, U., Rindsfuser, M., Grussenmeyer, T., Schultze-Seemann, W., and Wetterauer, U.(2000). **Enhanced expression of IFN-gamma mRNA in CD4(+)or CD8(+)tumour-infiltrating lymphocytes compared to peripheral lymphocytes in patients with renal cell cancer**. Br.J Cancer *83*, 637-641.

Engelhardt, R., Mackensen, A., and Galanos, C.(1991). **Phase I trial of intravenously administered endotoxin (Salmonella abortus equi) in cancer patients**. Cancer Res *51*, 2524-2530.

Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H.G.(1991). **Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules**. Nature *351*, 290-296.

Fallarino, F., Uyttenhove, C., Boon, T., and Gajewski, T.F.(1999). **Improved efficacy of dendritic cell vaccines and successful immunization with tumor antigen peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells by coadministration of recombinant murine interleukin-12**. Int.J Cancer *80*, 324-333.

Fearon, E.R. and Vogelstein, B.(1990). **A genetic model for colorectal tumorigenesis**. Cell *61*, 759-767.

Feil, G., Leipoldt, M., Nelde, H.J., Wunderer, A., Wechsel, H.W., Kaiser, P., and Bichler, K.H.(1999a). **Loss of chromosomes in clear cell renal cell carcinoma and in corresponding renal parenchyma**. Anticancer Res *19*, 1477-1482.

Feil, G., Mittermuller, B., Bichler, K.H., Wunderer, A., Wechsel, H.W., Nelde, H.J., and St Krause, F.(1999b). **DNA cytophotometry in renal cell carcinoma: a significant prognostic factor?** Anticancer Res *19*, 1483-1486.

Ferrari, G., Knight, A.M., Watts, C., and Pieters, J.(1997). **Distinct intracellular compartments involved in invariant chain degradation and antigenic peptide loading of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules**. J.Cell Biol. *139*, 1433-1446.

Ferrone, S. and Marincola, F.M.(1995). **Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance**. Immunol.Today *16*, 487-494.

Fiberg, R.W., Re, F., Popova, L., Golenbock, D.T., and Kurt-Jones, E.A.(2004). **Cell activation by Toll-like receptors: role of LBP and CD14**. J.Endotoxin Res. *10*, 413-428.

Fontenot, A.P., Gharavi, L., Bennett, S.R., Canavera, S.J., Newman, L.S., and Kotzin, B.L.(2003). **CD28 costimulation independence of target organ versus circulating memory antigen-specific CD4+ T cells**. J.Clin.Invest *112*, 776-784.

Fowlkes, B.J. and Schweighoffer, E.(1995). **Positive selection of T cells**. Curr.Opin.Immunol. *7*, 188-195.

Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., and Carbone, D.P.(1998). **Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo**. Blood *92*, 4150-4166.

Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P.(1996). **Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells**. Nat.Med. *2*, 1096-1103.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H., and Pages, F.(2006). **Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome**. Science *313*, 1960-1964.

Garboczi, D.N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q.R., Biddison, W.E., and Wiley, D.C.(1996). **Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2**. Nature *384*, 134-141.

Garcia, K.C., Degano, M., Pease, L.R., Huang, M., Peterson, P.A., Teyton, L., and Wilson, I.A.(1998). **Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen**. Science *279*, 1166-1172.

Gauduin, M.C., Yu, Y., Barabasz, A., Carville, A., Piatak, M., Lifson, J.D., Desrosiers, R.C., and Johnson, R.P.(2006). **Induction of a virus-specific effector-memory CD4+ T cell response by attenuated SIV infection**. J Exp.Med *203*, 2661-2672.

Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J.P., van der Spek, C.W., Patard, J.J., Boon, T., Schrier, P., and van den Eynde, B.J.(1996). **A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma**. Immunogenetics *44*, 323-330.

Gavin, M. and Rudensky, A.(2003). **Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells**. Curr.Opin.Immunol. *15*, 690-696.

Geginat, J., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F.(2003). **Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines**. Blood *101*, 4260-4266.

Genbacev, O., Krtolica, A., Kaelin, W., and Fisher, S.J.(2001). **Human cytotrophoblast expression of the von Hippel-Lindau protein is downregulated during uterine invasion in situ and upregulated by hypoxia in vitro**. Dev.Biol. *233*, 526-536.

Geuze, H.J.(1998). **The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning**. Immunol.Today *19*, 282-287.

Goepfert, P.A., Bansal, A., Edwards, B.H., Ritter, G.D., Jr., Tellez, I., McPherson, S.A., Sabbaj, S., and Mulligan, M.J.(2000). **A significant number of human immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes detected by tetramer binding do not produce gamma interferon**. J Virol. *74*, 10249-10255.

Goodman, M.D., Goodman, B.K., Lubin, M.B., Braunstein, G., Rotter, J.I., and Schreck, R.R.(1990). **Cytogenetic characterization of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau syndrome**. Cancer *65*, 1150-1154.

Goodman, M.T., Morgenstern, H., and Wynder, E.L.(1986). **A case-control study of factors affecting the development of renal cell cancer**. Am.J Epidemiol. *124*, 926-941.

Grabmaier, K., Vissers, J.L., De Weijert, M.C., Oosterwijk-Wakka, J.C., Van Bokhoven, A., Brakenhoff, R.H., Noessner, E., Mulders, P.A., Merkx, G., Figdor, C.G., Adema, G.J., and Oosterwijk, E.(2000). **Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250**. Int.J Cancer *85*, 865-870.

Griffiths, R.W., Elkord, E., Gilham, D.E., Ramani, V., Clarke, N., Stern, P.L., and Hawkins, R.E.(2007). **Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival**. Cancer Immunol.Immunother. *56*, 1743-1753.

Groettrup, M., Soza, A., Kuckelkorn, U., and Kloetzel, P.M.(1996). **Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency**. Immunol.Today *17*, 429-435.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G.(1997). **A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis**. Nature *389*, 737-742.

Grundemann, C., Bauer, M., Schweier, O., von Oppen, N., Lassing, U., Saudan, P., Becker, K.F., Karp, K., Hanke, T., Bachmann, M.F., and Pircher, H.(2006). **Cutting edge: identification of E-cadherin as a ligand for the murine killer cell lectin-like receptor G1**. J Immunol. *176*, 1311-1315.

Gu, Y., Yang, J., Ouyang, X., Liu, W., Li, H., Yang, J., Bromberg, J., Chen, S.H., Mayer, L., Unkeless, J.C., and Xiong, H.(2008). **Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells**. Eur.J Immunol. *38*, 1807-1813.

Guerder, S., Meyerhoff, J., and Flavell, R.(1994). **The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen**. Immunity *1*, 155-166.

Guerra, N., Guillard, M., Angevin, E., Echchakir, H., Escudier, B., Moretta, A., Chouaib, S., and Caignard, A.(2000). **Killer inhibitory receptor (CD158b) modulates the lytic activity of tumor-specific T lymphocytes infiltrating renal cell carcinomas**. Blood *95*, 2883-2889.

Hale, G., Bright, S., Chumbley, G., Hoang, T., Metcalf, D., Munro, A.J., and Waldmann, H.(1983). **Removal of T cells from bone marrow for transplantation: a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement**. Blood *62*, 873-882.

Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., and van Lier, R.A.(1997). **Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells**. J.Exp.Med. *186*, 1407-1418.

Hamilton, J.A. and Anderson, G.P.(2004). **GM-CSF Biology**. Growth Factors *22*, 225-231.

Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., and Allison, J.P.(1992). **CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones**. Nature *356*, 607-609.

Hartmann, G., Weiner, G.J., and Krieg, A.M.(1999). **CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells**. Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A *96*, 9305-9310.

He, X.S., Rehermann, B., Lopez-Labrador, F.X., Boisvert, J., Cheung, R., Mumm, J., Wedemeyer, H., Berenguer, M., Wright, T.L., Davis, M.M., and Greenberg, H.B.(1999). **Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers**. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *96*, 5692-5697.

Henkart, P.A.(1994). **Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules**. Immunity *1*, 343-346.

Hertenstein, B., Wagner, B., Bunjes, D., Duncker, C., Raghavachar, A., Arnold, R., Heimpel, H., and Schrezenmeier, H.(1995). **Emergence of CD52-, phosphatidylinositolglycan-anchor-deficient T lymphocytes after in vivo application of Campath-1H for refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma**. Blood *86*, 1487-1492.

Hoffmann, T.K., Dworacki, G., Tsukihiro, T., Meidenbauer, N., Gooding, W., Johnson, J.T., and Whiteside, T.L.(2002). **Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance**. Clin.Cancer Res *8*, 2553-2562.

Holland, J.M.(1973). **Proceedings: Cancer of the kidney--natural history and staging**. Cancer *32*, 1030-1042.

Holler, P.D. and Kranz, D.M.(2003). **Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation**. Immunity *18*, 255-264.

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S.(2003). **Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3**. Science *299*, 1057-1061.

Huang, S.M., Bock, J.M., and Harari, P.M.(1999). **Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck**. Cancer Res *59*, 1935-1940.

Hughes, E.A., Hammond, C., and Cresswell, P.(1997). **Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome**. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *94*, 1896-1901.

Hunder, N.N., Wallen, H., Cao, J., Hendricks, D.W., Reilly, J.Z., Rodmyre, R., Jungbluth, A., Gnjatic, S., Thompson, J.A., and Yee, C.(2008). **Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1**. N.Engl.J Med *358*, 2698-2703.

Ichihara, F., Kono, K., Takahashi, A., Kawaida, H., Sugai, H., and Fujii, H.(2003). **Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers**. Clin.Cancer Res *9*, 4404-4408.

Iellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F., and D'Ambrosio, D.(2001). **Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells**. J.Exp.Med. *194*, 847-853.

Ishida, T., Oyama, T., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I.(1998). **Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors**. J Immunol. *161*, 4842-4851.

Itoh, K.(1987). **Tumor infiltrating lymphocytes from human metastatic melanoma**. Gan To Kagaku Ryoho *14*, 2119-2126.

Jaeger, E., Bernhard, H., Romero, P., Ringhoffer, M., Arand, M., Karbach, J., Ilsemann, C., Hagedorn, M., and Knuth, A.(1996a). **Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens**. Int.J Cancer *66*, 162-169.

Jaeger, E., Jaeger, D., and Knuth, A.(2003). **A genetic model for colorectal tumorigenesis**. Int.J.Cancer *106*, 817-820.

Jaeger, E., Ringhoffer, M., Dienes, H.P., Arand, M., Karbacher, J., Jaeger, D., Ilsemann, M., Hagedorn, F., Oesch, F., and Knuth, A.(1996b). **Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo**. Int.J Cancer *67*, 54-62.

Jager, D. and Knuth, A.(2005). **Antibodies and vaccines--hope or illusion?** Breast *14*, 631-635.

Jager, E., Maeurer, M., Hohn, H., Karbach, J., Jager, D., Zidianakis, Z., Bakhshandeh-Bath, A., Orth, J., Neukirch, C., Necker, A., Reichert, T.E., and Knuth, A.(2000). **Clonal expansion of Melan A-specific cytotoxic T lymphocytes in a melanoma patient responding to continued immunization with melanoma-associated peptides**. Int.J Cancer *86*, 538-547.

Jager, E., Ringhoffer, M., Altmannsberger, M., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Oesch, F., and Knuth, A.(1997). **Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma**. Int.J Cancer *71*, 142-147.

Jandus, C., Bioley, G., Speiser, D.E., and Romero, P.(2008). **Selective accumulation of differentiated FOXP3(+) CD4 (+) T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood**. Cancer Immunol.Immunother.

Janeway, C.A., Jr.(1992). **The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation**. Annu.Rev.Immunol. *10*, 645-674.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.(2005). **Immunbiology: The immune system in healthy and disease**. *6th*,

Jantzer, P. and Schendel, D.J.(1998). **Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo**. Cancer Res. *58*, 3078-3086.

Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R.(2002). **Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development**. Nat.Rev.Immunol. *2*, 251-262.

Kao, G.D., Malkowicz, S.B., Whittington, R., D'Amico, A.V., and Wein, A.J.(1994). **Locally advanced renal cell carcinoma: low complication rate and efficacy of postnephrectomy radiation therapy planned with CT**. Radiology *193*, 725-730.

Kawagoe, N., Shintaku, I., Yutani, S., Etoh, H., Matuoka, K., Noda, S., and Itoh, K.(2000). **Expression of the SART3 tumor rejection antigen in renal cell carcinoma**. J Urol *164*, 2090-2095.

Kawashima, H., Watanabe, N., Hirose, M., Li, Y.F., Hirose, J., and Miyasaka, M.(1998). **Vascular and non-vascular ligands for L-selectin**. Cell Adhes.Commun. *6*, 135-139.

Kersh, E.N., Shaw, A.S., and Allen, P.M.(1998). **Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation**. Science *281*, 572-575.

Khan, N., Shariff, N., Cobbold, M., Bruton, R., Ainsworth, J.A., Sinclair, A.J., Nayak, L., and Moss, P.A.(2002). **Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals**. J Immunol. *169*, 1984-1992.

Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F.(2003). **An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells**. Nat.Immunol. *4*, 337-342.

Khong, H.T. and Restifo, N.P.(2002). **Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes**. Nat.Immunol. *3*, 999-1005.

Klein, G., SJOGREN, H.O., Klein, E., and HELLSTROM, K.E.(1960). **Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host**. Cancer Res. *20*, 1561-1572.

Kobayashi, H., Song, Y., Hoon, D.S., Appella, E., and Celis, E.(2001). **Tumor-reactive T helper lymphocytes recognize a promiscuous MAGE-A3 epitope presented by various major histocompatibility complex class II alleles**. Cancer Res *61*, 4773-4778.

Kobayashi, N., Kondo, T., Takata, H., Yokota, S., and Takiguchi, M.(2006). **Functional and phenotypic analysis of human memory CD8+ T cells expressing CXCR3**. J Leukoc.Biol. *80*, 320-329.

Koch, S., Larbi, A., Derhovanessian, E., Ozcelik, D., Naumova, E., and Pawelec, G.(2008). **Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people**. Immun.Ageing *5*, 6.

Kopecky, O., Lukesova, S., Vroblova, V., Vokurkova, D., Moravek, P., Safranek, H., Hlavkova, D., and Soucek, P.(2007). **Phenotype analysis of tumour-infiltrating lymphocytes and lymphocytes in peripheral blood in patients with renal carcinoma**. Acta Medica.(Hradec.Kralove) *50*, 207-212.

Kostense, S., Vandenberghe, K., Joling, J., Van Baarle, D., Nanlohy, N., Manting, E., and Miedema, F.(2002). **Persistent numbers of tetramer+ CD8(+) T cells, but loss of interferon-gamma+ HIV-specific T cells during progression to AIDS**. Blood *99*, 2505-2511.

Kovacs, G., Emanuel, A., Neumann, H.P., and Kung, H.F.(1991). **Cytogenetics of renal cell carcinomas associated with von Hippel-Lindau disease**. Genes Chromosomes.Cancer *3*, 256-262.

Kozak, W., Holtl, W., Pummer, K., Maier, U., Jeschke, K., and Bucher, A.(1996). **Adrenalectomy--still a must in radical renal surgery?** Br.J Urol *77*, 27-31.

Kropshofer, H., Vogt, A.B., Thery, C., Armandola, E.A., Li, B.C., Moldenhauer, G., Amigorena, S., and Hammerling, G.J.(1998). **A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules**. EMBO J. *17*, 2971-2981.

Kruger, T., Schoor, O., Lemmel, C., Kraemer, B., Reichle, C., Dengjel, J., Weinschenk, T., Muller, M., Hennenlotter, J., Stenzl, A., Rammensee, H.G., and Stevanovic, S.(2005). **Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy**. Cancer Immunol.Immunother. *54*, 826-836.

Kruisbeek, A.M. and Amsen, D.(1996). **Mechanisms underlying T-cell tolerance**. Curr.Opin.Immunol. *8*, 233-244.

Kwon, E.D., Hurwitz, A.A., Foster, B.A., Madias, C., Feldhaus, A.L., Greenberg, N.M., Burg, M.B., and Allison, J.P.(1997). **Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer**. Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A *94*, 8099-8103.

Kyewski, B. and Klein, L.(2006). **A central role for central tolerance**. Annu.Rev.Immunol. *24*, 571-606.

Lang, F. and Bodinier, M.(2001). **MHC-peptide multimers: tools of choice for detecting and sorting antigen-specific T-cells**. Transfusion *41*, 687-690.

Langenkamp, A., Nagata, K., Murphy, K., Wu, L., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F.(2003). **Kinetics and expression patterns of chemokine receptors in human CD4+ T lymphocytes primed by myeloid or plasmacytoid dendritic cells**. Eur.J.Immunol. *33*, 474-482.

Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P.(1996). **Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade**. Science *271*, 1734-1736.

Lee, K.H., Wang, E., Nielsen, M.B., Wunderlich, J., Migueles, S., Connors, M., Steinberg, S.M., Rosenberg, S.A., and Marincola, F.M.(1999). **Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression**. J.Immunol. *163*, 6292-6300.

Lee, P.P., Yee, C., Savage, P.A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J.S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P.D., Roederer, M., and Davis, M.M.(1999). **Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients**. Nat.Med. *5*, 677-685.

Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A.(1996). **CD28/B7 system of T cell costimulation**. Annu.Rev.Immunol. *14*, 233-258.

Lim, H.W., Lee, J., Hillsamer, P., and Kim, C.H.(2008). **Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3+ regulatory T cells**. J Immunol. *180*, 122-129.

Linder, S., Havelka, A.M., Ueno, T., and Shoshan, M.C.(2004). **Determining tumor apoptosis and necrosis in patient serum using cytokeratin 18 as a biomarker**. Cancer Lett. *214*, 1-9.

Liyanage, U.K., Moore, T.T., Joo, H.G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J.A., Strasberg, S.M., Eberlein, T.J., Goedegebuure, P.S., and Linehan, D.C.(2002). **Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma**. J Immunol. *169*, 2756-2761.

MacDonald, H.R., Radtke, F., and Wilson, A.(2001). **T cell fate specification and alphabeta/gammadelta lineage commitment**. Curr.Opin.Immunol. *13*, 219-224.

Mackensen, A., Galanos, C., and Engelhardt, R.(1991). **Treatment of cancer patients with endotoxin induces release of endogenous cytokines**. Pathobiology *59*, 264-267.

Mackensen, A., Meidenbauer, N., Vogl, S., Laumer, M., Berger, J., and Andreesen, R.(2006). **Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma**. J Clin.Oncol. *24*, 5060-5069.

Madden, D.R., Garboczi, D.N., and Wiley, D.C.(1993). **The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2**. Cell *75*, 693-708.

Malissen, B. and Malissen, M.(1996). **Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation**. Curr.Opin.Immunol. *8*, 383-393.

Mallard, E., Vernel-Pauillac, F., Velu, T., Lehmann, F., Abastado, J.P., Salcedo, M., and Bercovici, N.(2004). **IL-2 production by virus- and tumor-specific human CD8 T cells is determined by their fine specificity**. J Immunol. *172*, 3963-3970.

Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T.(2006). **Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage**. Nature *441*, 231-234.

Maranchie, J.K., Vasselli, J.R., Riss, J., Bonifacino, J.S., Linehan, W.M., and Klausner, R.D.(2002). **The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma**. Cancer Cell *1*, 247-255.

MartIn-Fontecha, A., Sebastiani, S., Hopken, U.E., Uguccioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F.(2003). **Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming**. J.Exp.Med. *198*, 615-621.

Matsui, K., Boniface, J.J., Steffner, P., Reay, P.A., and Davis, M.M.(1994). **Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness**. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *91*, 12862-12866.

McLaughlin, J.P., Schlom, J., Kantor, J.A., and Greiner, J.W.(1996). **Improved immunotherapy of a recombinant carcinoembryonic antigen vaccinia vaccine when given in combination with interleukin-2**. Cancer Res *56*, 2361-2367.

McNeil, M.R.(1998). **The case of the lawyer's lugubrious language: dysarthria plus primary progressive aphasia or dysarthria plus dementia?** Semin.Speech Lang *19*, 49-57.

Meier, S., Stark, R., Frentsch, M., and Thiel, A.(2008). **The influence of different stimulation conditions on the assessment of antigen-induced CD154 expression on CD4(+) T cells**. Cytometry A

Menon, A.G., Fleuren, G.J., Alphenaar, E.A., Jonges, L.E., Janssen van Rhijn, C.M., Ensink, N.G., Putter, H., Tollenaar, R.A., van de Velde, C.J., and Kuppen, P.J.(2003). **A basal membrane-like structure surrounding tumour nodules may prevent intraepithelial leucocyte infiltration in colorectal cancer**. Cancer Immunol.Immunother. *52*, 121-126.

Mirghomizadeh, F., Kupka, S., and Blin, N.(1999). **Assessing genetic heterogeneity of renal cell tumors**. Anticancer Res *19*, 1467-1470.

Mitchell, M.S., Darrah, D., Yeung, D., Halpern, S., Wallace, A., Voland, J., Jones, V., and Kan-Mitchell, J.(2002). **Phase I trial of adoptive immunotherapy with cytolytic T lymphocytes immunized against a tyrosinase epitope**. J Clin.Oncol. *20*, 1075-1086.

Mokyr, M.B., Kalinichenko, T., Gorelik, L., and Bluestone, J.A.(1998). **Realization of the therapeutic potential of CTLA-4 blockade in low-dose chemotherapy-treated tumor-bearing mice**. Cancer Res *58*, 5301-5304.

Mosmann, T.R. and Coffman, R.L.(1989). **TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties**. Annu.Rev.Immunol. *7*, 145-173.

Muranski, P., Boni, A., Antony, P.A., Cassard, L., Irvine, K.R., Kaiser, A., Paulos, C.M., Palmer, D.C., Touloukian, C.E., Ptak, K., Gattinoni, L., Wrzesinski, C., Hinrichs, C.S., Kerstann, K.W., Feigenbaum, L., Chan, C.C., and Restifo, N.P.(2008). **Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma**. Blood *112*, 362-373.

Murota, M., Nishioka, M., Fujita, J., Dobashi, N., Wu, F., Ohtsuki, Y., Hojo, S., Takahara, J., and Kuriyama, S.(2001). **Anti-cytokeratin antibodies in sera of the patients with autoimmune hepatitis**. Clin.Exp.Immunol. *125*, 291-299.

Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., and Cua, D.J.(2003). **Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation**. J Exp.Med *198*, 1951-1957.

Na, I.K., Keilholz, U., Letsch, A., Bauer, S., Asemissen, A.M., Nagorsen, D., Thiel, E., and Scheibenbogen, C.(2007). **Addition of GM-CSF to a peptide/KLH vaccine results in increased frequencies of CXCR3-expressing KLH-specific T cells**. Cancer Immunol.Immunother. *56*, 391-396.

Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y.(2003). **Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice**. J Immunol. *171*, 6173-6177.

Nakagomi, H., Petersson, M., Magnusson, I., Juhlin, C., Matsuda, M., Mellstedt, H., Taupin, J.L., Vivier, E., Anderson, P., and Kiessling, R.(1993). **Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma**. Cancer Res *53*, 5610-5612.

Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H., and Strober, W.(2004). **TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice**. J Immunol. *172*, 834-842.

Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W.(2001). **Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta**. J Exp.Med *194*, 629-644.

Neefjes, J.J., Momburg, F., and Hammerling, G.J.(1993). **Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter**. Science *261*, 769-771.

Nencioni, A., Muller, M.R., Grunebach, F., Garuti, A., Mingari, M.C., Patrone, F., Ballestrero, A., and Brossart, P.(2003). **Dendritic cells transfected with tumor RNA for the induction of antitumor CTL in colorectal cancer**. Cancer Gene Ther. *10*, 209-214.

Nestle, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D.(1998). **Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells**. Nat.Med *4*, 328-332.

Neumann, E., Engelsberg, A., Decker, J., Storkel, S., Jaeger, E., Huber, C., and Seliger, B.(1998). **Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies?** Cancer Res *58*, 4090-4095.

Nielsen, M.B., Monsurro, V., Migueles, S.A., Wang, E., Perez-Diez, A., Lee, K.H., Kammula, U., Rosenberg, S.A., and Marincola, F.M.(2000). **Status of activation of circulating vaccine-elicited CD8+ T cells**. J.Immunol. *165*, 2287-2296.

Noble, A., Giorgini, A., and Leggat, J.A.(2006). **Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage**. Blood *107*, 4475-4483.

Nolan, A.(2009).**http://www.antonynolan.or.uk/research/hlainformaticsgroup/** Hompage The Antony Nolan Trust

Norris, D.A. and Lee, L.A.(1985). **Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus**. Clin.Dermatol. *3*, 20-35.

Nouwen, E.J., Dauwe, S., van, d.B., I, and De Broe, M.E.(1993). **Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM, and L-CAM in the kidney**. Kidney Int. *44*, 147-158.

Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P.J., Sadasivan, B., Herberg, J.A., Grandea, A.G., Riddell, S.R., Tampe, R., Spies, T., Trowsdale, J., and Cresswell, P.(1997). **A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes**. Science *277*, 1306-1309.

Oshima, R.G., Baribault, H., and Caulin, C.(1996). **Oncogenic regulation and function of keratins 8 and 18**. Cancer Metastasis Rev. *15*, 445-471.

Outzen, H.C. and Maguire, H.C., Jr.(1983). **The etiology of renal-cell carcinoma**. Semin.Oncol. *10*, 378-384.

Pages, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., Meatchi, T., Bruneval, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H., and Galon, J.(2005). **Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer**. N.Engl.J.Med. *353*, 2654-2666.

Pamer, E. and Cresswell, P.(1998). **Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing**. Annu.Rev.Immunol. *16*, 323-358.

Parker, K.C., Bednarek, M.A., and Coligan, J.E.(1994). **Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains**. J.Immunol. *152*, 163-175.

Pass, H.A., Schwarz, S.L., Wunderlich, J.R., and Rosenberg, S.A.(1998). **Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay**. Cancer J Sci.Am. *4*, 316-323.

Pawelec, G. and Gouttefangeas, C.(2006a). **T-cell dysregulation caused by chronic antigenic stress: the role of CMV in immunosenescence?** Aging Clin.Exp.Res *18*, 171-173.

Pawelec, G., Koch, S., Gouttefangeas, C., and Wikby, A.(2006b). **Immunorejuvenation in the elderly**. Rejuvenation.Res *9*, 111-116.

Picker, L.J.(1994). **Control of lymphocyte homing**. Curr.Opin.Immunol. *6*, 394-406.

Pieters, J.(1997). **MHC class II restricted antigen presentation**. Curr.Opin.Immunol. *9*, 89-96.

Pittet, M.J., Zippelius, A., Speiser, D.E., Assenmacher, M., Guillaume, P., Valmori, D., Lienard, D., Lejeune, F., Cerottini, J.C., and Romero, P.(2001). **Ex vivo IFN-gamma secretion by circulating CD8 T lymphocytes: implications of a novel approach for T cell monitoring in infectious and malignant diseases**. J.Immunol. *166*, 7634-7640.

Posnett, D.N., Edinger, J.W., Manavalan, J.S., Irwin, C., and Marodon, G.(1999). **Differentiation of human CD8 T cells: implications for in vivo persistence of CD8+ CD28- cytotoxic effector clones**. Int.Immunol. *11*, 229-241.

Precopio, M.L., Betts, M.R., Parrino, J., Price, D.A., Gostick, E., Ambrozak, D.R., Asher, T.E., Douek, D.C., Harari, A., Pantaleo, G., Bailer, R., Graham, B.S., Roederer, M., and Koup, R.A.(2007). **Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses**. J Exp.Med *204*, 1405-1416.

Prehn, R.T. and Main J.M.(1957). **Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas**. J Natl Cancer Inst *18*, 769-778.

Probst-Kepper, M., Stroobant, V., Kridel, R., Gaugler, B., Landry, C., Brasseur, F., Cosyns, J.P., Weynand, B., Boon, T., and van den Eynde, B.J.(2001). **An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes**. J Exp.Med *193*, 1189-1198.

Prochasson, P., Gunther, M., Laithier, M., Fossar, N., Lavialle, C., and Brison, O.(1999). **Transcriptional mechanisms responsible for the overexpression of the keratin 18 gene in cells of a human colon carcinoma cell line**. Exp.Cell Res. *248*, 243-259.

Rabinowich, H., Banks, M., Reichert, T.E., Logan, T.F., Kirkwood, J.M., and Whiteside, T.L.(1996). **Expression and activity of signaling molecules in T lymphocytes obtained from patients with metastatic melanoma before and after interleukin 2 therapy**. Clin.Cancer Res *2*, 1263-1274.

Ramaekers, F.C. and Bosman, F.T.(2004). **The cytoskeleton and disease**. J.Pathol. *204*, 351-354.

Rammensee, H.G., Falk, K., and Rotzschke, O.(1993). **MHC molecules as peptide receptors**. Curr.Opin.Immunol. *5*, 35-44.

Ressing, M.E., Sette, A., Brandt, R.M., Ruppert, J., Wentworth, P.A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H.M., Melief, C.J., and Kast, W.M.(1995). **Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides**. J.Immunol. *154*, 5934-5943.

Robson, C.J., Churchill, B.M., and Anderson, W.(1969). **The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma**. J Urol. *101*, 297-301.

Roche, P.A. and Cresswell, P.(1990). **Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding**. Nature *345*, 615-618.

Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M.J., Touvrey, C., Iancu, E.M., Corthesy, P., Devevre, E., Speiser, D.E., and Rufer, N.(2007). **Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes**. J.Immunol. *178*, 4112-4119.

Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M., Solomon, D., Topalian, S.L., Toy, S.T., Simon, P., Lotze, M.T., Yang, J.C., Seipp, C.A., and .(1988). **Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report**. N.Engl.J Med. *319*, 1676-1680.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Dudley, M.E., Schwarz, S.L., Spiess, P.J., Wunderlich, J.R., Parkhurst, M.R., Kawakami, Y., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., and White, D.E.(1998). **Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma**. Nat.Med *4*, 321-327.

Rosenberg, S.A., Yannelli, J.R., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Weber, J.S., Parkinson, D.R., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., and White, D.E.(1994). **Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2**. J Natl Cancer Inst *86*, 1159-1166.

Rowen, L., Koop, B.F., and Hood, L.(1996). **The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus**. Science *272*, 1755-1762.

Rubio-Godoy, V., Dutoit, V., Zhao, Y., Simon, R., Guillaume, P., Houghten, R., Romero, P., Cerottini, J.C., Pinilla, C., and Valmori, D.(2002). **Positional scanning-synthetic peptide library-based analysis of self- and pathogen-derived peptide cross-reactivity with tumor-reactive Melan-A-specific CTL**. J Immunol. *169*, 5696-5707.

Sadovnikova, E., Jopling, L.A., Soo, K.S., and Stauss, H.J.(1998). **Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules**. Eur.J Immunol. *28*, 193-200.

Sakaguchi, S.(2000). **Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance**. Cell *101*, 455-458.

Sakaguchi, S.(2004). **Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses**. Annu.Rev.Immunol. *22*, 531-562.

Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A.(2004). **Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance**. Annu.Rev.Immunol. *22*, 745-763.

Sallusto, F., Kremmer, E., Palermo, B., Hoy, A., Ponath, P., Qin, S., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A.(1999a). **Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells**. Eur.J.Immunol. *29*, 2037-2045.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A.(1999b). **Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions**. Nature *401*, 708-712.

Saper, M.A., Bjorkman, P.J., and Wiley, D.C.(1991). **Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 A resolution**. J.Mol.Biol. *219*, 277-319.

Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M., and Takabayashi, A.(2003). **CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression**. Cancer *98*, 1089-1099.

Scanlan, M.J., Gordan, J.D., Williamson, B., Stockert, E., Bander, N.H., Jongeneel, V., Gure, A.O., Jager, D., Jager, E., Knuth, A., Chen, Y.T., and Old, L.J.(1999). **Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma**. Int.J Cancer *83*, 456-464.

Schag, K., Schmidt, S.M., Muller, M.R., Weinschenk, T., Appel, S., Weck, M.M., Grunebach, F., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Brossart, P.(2004). **Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes**. Clin.Cancer Res *10*, 3658-3666.

Scheibenbogen, C., Romero, P., Rivoltini, L., Herr, W., Schmittel, A., Cerottini, J.C., Woelfel, T., Eggermont, A.M., and Keilholz, U.(2000). **Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFNgamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial**. J Immunol.Methods *244*, 81-89.

Schmidt, S.M., Schag, K., Muller, M.R., Weinschenk, T., Appel, S., Schoor, O., Weck, M.M., Grunebach, F., Kanz, L., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Brossart, P.(2004). **Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis**. Cancer Res *64*, 1164-1170.

Schmitz, M., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Schmachtenberg, F., Stevanovic, S., Ockert, D., Rammensee, H.G., and Rieber, E.P.(2000). **Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides**. Cancer Res *60*, 4845-4849.

Schwartzkopff, S., Grundemann, C., Schweier, O., Rosshart, S., Karjalainen, K.E., Becker, K.F., and Pircher, H.(2007). **Tumor-associated E-cadherin mutations affect binding to the killer cell lectin-like receptor G1 in humans**. J Immunol. *179*, 1022-1029.

Scott, M.P., Matsudaira, P., Lodish, H., Darnell, J., Zipursky, L., Keaiser, C.A., Berk, A., and Krieger, M.(2004). **Molecular Cell Biology**.

Seder, R.A., Darrah, P.A., and Roederer, M.(2008). **T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design**. Nat.Rev.Immunol. *8*, 247-258.

Sedgwick, J.D. and Holt, P.G.(1983). **A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells**. J Immunol.Methods *57*, 301-309.

Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N.(2002). **ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum**. Nature *419*, 480-483.

Sheu, B.C., Chiou, S.H., Lin, H.H., Chow, S.N., Huang, S.C., Ho, H.N., and Hsu, S.M.(2005). **Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human cervical carcinoma**. Cancer Res *65*, 2921-2929.

Sheu, B.C., Hsu, S.M., Ho, H.N., Lien, H.C., Huang, S.C., and Lin, R.H.(2001). **A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression**. Cancer Res. *61*, 237-242.

Sheu, B.C., Lin, R.H., Ho, H.N., and Huang, S.C.(1997). **Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma**. Hum.Immunol. *56*, 39-48.

Shimazui, T., Giroldi, L.A., Bringuier, P.P., Oosterwijk, E., and Schalken, J.A.(1996). **Complex cadherin expression in renal cell carcinoma**. Cancer Res *56*, 3234-3237.

Shortman, K. and Wu, L.(1996). **Early T lymphocyte progenitors**. Annu.Rev.Immunol. *14*, 29-47.

Shurin, M.R., Yurkovetsky, Z.R., Tourkova, I.L., Balkir, L., and Shurin, G.V.(2002). **Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10**. Int.J Cancer *101*, 61-68.

Siddiqui, S.A., Frigola, X., Bonne-Annee, S., Mercader, M., Kuntz, S.M., Krambeck, A.E., Sengupta, S., Dong, H., Cheville, J.C., Lohse, C.M., Krco, C.J., Webster, W.S., Leibovich, B.C., Blute, M.L., Knutson, K.L., and Kwon, E.D.(2007). **Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma**. Clin.Cancer Res. *13*, 2075-2081.

Singh-Jasuja, H., Emmerich, N.P., and Rammensee, H.G.(2004). **The Tubingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy**. Cancer Immunol.Immunother. *53*, 187-195.

Slingluff, C.L., Jr., Yamshchikov, G., Neese, P., Galavotti, H., Eastham, S., Engelhard, V.H., Kittlesen, D., Deacon, D., Hibbitts, S., Grosh, W.W., Petroni, G., Cohen, R., Wiernasz, C., Patterson, J.W., Conway, B.P., and Ross, W.G.(2001). **Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100(280-288) peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: immunologic and clinical outcomes**. Clin.Cancer Res *7*, 3012-3024.

Smyth, L.J., Elkord, E., Taher, T.E., Jiang, H.R., Burt, D.J., Clayton, A., van Veelen, P.A., de Ru, A., Ossendorp, F., Melief, C.J., Drijfhout, J.W., Dermime, S., Hawkins, R.E., and Stern, P.L.(2006). **CD8 T-cell recognition of human 5T4 oncofetal antigen**. Int.J Cancer *119*, 1638-1647.

Smyth, M.J., Wallace, M.E., Nutt, S.L., Yagita, H., Godfrey, D.I., and Hayakawa, Y.(2005). **Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer**. J Exp.Med *201*, 1973-1985.

Snell, G.D.(1964). **METHODS FOR STUDY OF HISTOCOMPATIBILITY GENES AND ISOANTIGENS**. Methods Med Res *10*, 1-7.

Speiser, D.E., Lienard, D., Rufer, N., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Lejeune, F., Krieg, A.M., Cerottini, J.C., and Romero, P.(2005). **Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909**. J Clin.Invest *115*, 739-746.

Speiser, D.E., Miranda, R., Zakarian, A., Bachmann, M.F., McKall-Faienza, K., Odermatt, B., Hanahan, D., Zinkernagel, R.M., and Ohashi, P.S.(1997). **Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy**. J Exp.Med *186*, 645-653.

Spiotto, M.T. and Schreiber, H.(2005). **Rapid destruction of the tumor microenvironment by CTLs recognizing cancer-specific antigens cross-presented by stromal cells**. Cancer Immun. *5*, 8.

Spiotto, M.T., Yu, P., Rowley, D.A., Nishimura, M.I., Meredith, S.C., Gajewski, T.F., Fu, Y.X., and Schreiber, H.(2002). **Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells**. Immunity *17*, 737-747.

Starklint, H., Kjaergaard, J., and Jensen, N.K.(1976). **Types of metaplasia in forty urothelial bladder carcinomas. A systematic histological investigation**. Acta Pathol.Microbiol.Scand.[A] *84*, 137-142.

Stein, M., Kuten, A., Halpern, J., Coachman, N.M., Cohen, Y., and Robinson, E.(1992). **The value of postoperative irradiation in renal cell cancer**. Radiother.Oncol. *24*, 41-44.

Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L., and Wiley, D.C.(1994). **Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide**. Nature *368*, 215-221.

Stevanovic, S.(2002). **Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development**. Nat.Rev.Cancer *2*, 514-520.

Stutman, O.(1975). **Immunodepression and malignancy**. Cancer Research *22*, 261-422.

Sutmuller, R.P., van Duivenvoorde, L.M., van Elsas, A., Schumacher, T.N., Wildenberg, M.E., Allison, J.P., Toes, R.E., Offringa, R., and Melief, C.J.(2001). **Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses**. J Exp.Med. *194*, 823-832.

Sweeney, J.P., Thornhill, J.A., Graiger, R., McDermott, T.E., and Butler, M.R.(1996). **Incidentally detected renal cell carcinoma: pathological features, survival trends and implications for treatment**. Br.J Urol. *78*, 351-353.

SYFPEITHI (2008). **http://www.syfpeithi.de/**. Abteilung für Immunologie der Universität Tübingen

Tada, T., Ohzeki, S., Utsumi, K., Takiuchi, H., Muramatsu, M., Li, X.F., Shimizu, J., Fujiwara, H., and Hamaoka, T.(1991). **Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state**. J Immunol. *146*, 1077-1082.

Thedieck, C., Kuczyk, M., Klingel, K., Steiert, I., Muller, C.A., and Klein, G.(2005). **Expression of Ksp-cadherin during kidney development and in renal cell carcinoma**. Br.J Cancer *92*, 2010-2017.

Thimme, R., Appay, V., Koschella, M., Panther, E., Roth, E., Hislop, A.D., Rickinson, A.B., Rowland-Jones, S.L., Blum, H.E., and Pircher, H.(2005). **Increased expression of the NK cell receptor KLRG1 by virus-specific CD8 T cells during persistent antigen stimulation**. J.Virol. *79*, 12112-12116.

Thoenes, W. and Stoerlel, S.(1991). **Pathology of benign and malignant renal cell tumors**. Urologe A *30*, W41-W50.

Thrasher, J.B. and Paulson, D.F.(1993). **Prognostic factors in renal cancer**. Urol.Clin.North Am. *20*, 247-262.

Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den, D.P., Brocker, E.B., Steinman, R.M., Enk, A., Kampgen, E., and Schuler, G.(1999). **Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma**. J Exp.Med *190*, 1669-1678.

Topalian, S.L., Solomon, D., and Rosenberg, S.A.(1989). **Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas**. J Immunol. *142*, 3714-3725.

Townsend, S.E. and Allison, J.P.(1993). **Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells**. Science *259*, 368-370.

Townsend, S.E., Su, F.W., Atherton, J.M., and Allison, J.P.(1994). **Specificity and longevity of antitumor immune responses induced by B7-transfected tumors**. Cancer Res *54*, 6477-6483.

Treves, A.J., Tal, T., Barak, V., and Fuks, Z.(1981). **Antigen presentation and regulatory functions of human monocytes in the in vitro response of lymphocytes against purified protein derivative of tuberculin (PPD)**. Eur.J Immunol. *11*, 487-492.

Tuting, T., Wilson, C.C., Martin, D.M., Kasamon, Y.L., Rowles, J., Ma, D.I., Slingluff, C.L., Jr., Wagner, S.N., van der, B.P., Baar, J., Lotze, M.T., and Storkus, W.J.(1998). **Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro: enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN-alpha**. J Immunol. *160*, 1139-1147.

Ullenhag, G.J., Fagerberg, J., Strigard, K., Frodin, J.E., and Mellstedt, H.(2004). **Functional HLA-DR T cell epitopes of CEA identified in patients with colorectal carcinoma immunized with the recombinant protein CEA**. Cancer Immunol.Immunother. *53*, 331-337.

Uss, E., Rowshani, A.T., Hooibrink, B., Lardy, N.M., van Lier, R.A., and ten Berge, I.J.(2006). **CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8+ T cells**. J Immunol. *177*, 2775-2783.

Valmori, D., Scheibenbogen, C., Dutoit, V., Nagorsen, D., Asemissen, A.M., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Guillaume, P., Romero, P., Schadendorf, D., Lipp, M., Dietrich, P.Y., Thiel, E., Cerottini, J.C., Lienard, D., and Keilholz, U.(2002). **Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity**. Cancer Res *62*, 1743-1750.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den, E.B., Knuth, A., and Boon, T.(1991). **A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma**. Science *254*, 1643-1647.

van der, B.P., Bastin, J., Gajewski, T., Coulie, P.G., Boel, P., De Smet, C., Traversari, C., Townsend, A., and Boon, T.(1994). **A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3**. Eur.J Immunol. *24*, 3038-3043.

van Elsas, A., Sutmuller, R.P., Hurwitz, A.A., Ziskin, J., Villasenor, J., Medema, J.P., Overwijk, W.W., Restifo, N.P., Melief, C.J., Offringa, R., and Allison, J.P.(2001). **Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy**. J Exp.Med. *194*, 481-489.

van Houwelingen, K.P., van Dijk, B.A., Hulsbergen-van de Kaa CA, Schouten, L.J., Gorissen, H.J., Schalken, J.A., van den Brandt, P.A., and Oosterwijk, E.(2005). **Prevalence of von Hippel-Lindau gene mutations in sporadic renal cell carcinoma: results from The Netherlands cohort study**. BMC.Cancer *5*, 57.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B.(2006). **TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells**. Immunity *24*, 179-189.

Vescovini, R., Biasini, C., Fagnoni, F.F., Telera, A.R., Zanlari, L., Pedrazzoni, M., Bucci, L., Monti, D., Medici, M.C., Chezzi, C., Franceschi, C., and Sansoni, P.(2007). **Massive load of functional effector CD4+ and CD8+ T cells against cytomegalovirus in very old subjects**. J Immunol. *179*, 4283-4291.

Vescovini, R., Telera, A., Fagnoni, F.F., Biasini, C., Medici, M.C., Valcavi, P., di Pede, P., Lucchini, G., Zanlari, L., Passeri, G., Zanni, F., Chezzi, C., Franceschi, C., and Sansoni, P.(2004). **Different contribution of EBV and CMV infections in very long-term carriers to age-related alterations of CD8+ T cells**. Exp.Gerontol. *39*, 1233-1243.

Vigouroux, S., Yvon, E., Biagi, E., and Brenner, M.K.(2004). **Antigen-induced regulatory T cells**. Blood *104*, 26-33.

Viret, C. and Janeway, C.A., Jr.(1999). **MHC and T cell development**. Rev.Immunogenet. *1*, 91-104.

Vissers, J.L., De Vries, I.J., Engelen, L.P., Scharenborg, N.M., Molkenboer, J., Figdor, C.G., Oosterwijk, E., and Adema, G.J.(2002). **Renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a naturally processed epitope presented by human leukocyte antigen-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes**. Int.J Cancer *100*, 441-444.

Vissers, J.L., De Vries, I.J., Schreurs, M.W., Engelen, L.P., Oosterwijk, E., Figdor, C.G., and Adema, G.J.(1999). **The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes**. Cancer Res *59*, 5554-5559.

Vittecoq, O., Salle, V., Jouen-Beades, F., Krzanowska, K., Menard, J.F., Gayet, A., Fardellone, P., Tauveron, P., Le, L., X, and Tron, F.(2001). **Autoantibodies to the 27 C-terminal amino acids of calpastatin are detected in a restricted set of connective tissue diseases and may be useful for diagnosis of rheumatoid arthritis in community cases of very early arthritis**. Rheumatology.(Oxford) *40*, 1126-1134.

Voehringer, D., Blaser, C., Brawand, P., Raulet, D.H., Hanke, T., and Pircher, H.(2001). **Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells**. J Immunol. *167*, 4838-4843.

Voehringer, D., Koschella, M., and Pircher, H.(2002). **Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1)**. Blood *100*, 3698-3702.

von Boehmer, H.(1988). **The developmental biology of T lymphocytes**. Annu.Rev.Immunol. *6*, 309-326.

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J.P., Cottrez, F., and Groux, H.(2003). **Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo**. Immunity *18*, 605-617.

Walker, M.R., Kasprowicz, D.J., Gersuk, V.H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J.H., and Ziegler, S.F.(2003). **Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+**. J Clin.Invest *112*, 1437-1443.

Walter, S., Bioley, G., Buhring, H.J., Koch, S., Wernet, D., Zippelius, A., Pawelec, G., Romero, P., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Gouttefangeas, C.(2005). **High frequencies of functionally impaired cytokeratin 18-specific CD8+ T cells in healthy HLA-A2+ donors**. Eur.J Immunol. *35*, 2876-2885.

Wang, E.C.Y., Moss, P.A., Frodaham, P., Lehner, P.J., Bell, J.I., and Borysiewicz, L.K.(1995). **CD8high CD57+ T lymphocytes in normal, healthy individuals are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus**. J.Immunol.

Waseem, A., Alexander, C.M., Steel, J.B., and Lane, E.B.(1990a). **Embryonic simple epithelial keratins 8 and 18: chromosomal location emphasizes difference from other keratin pairs**. New Biol. *2*, 464-478.

Waseem, A., Gough, A.C., Spurr, N.K., and Lane, E.B.(1990b). **Localization of the gene for human simple epithelial keratin 18 to chromosome 12 using polymerase chain reaction**. Genomics *7*, 188-194.

Watts, C.(1997). **Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules**. Annu.Rev.Immunol. *15*, 821-850.

Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., and Murphy, K.M.(2006). **Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties**. Immunity *24*, 677-688.

Wechsel, H.W., Becker, G., Bichler, K.H., Bokemeyer, C., Feil, G., Kortmann, R.D., Loeser, W., Pfannenberg, C., Pressler, H., and Sökler, M.(2000). **Nierenzellkarzinom - Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge**. Tuebingen Interdisziplinaeres Tumorzentrum

Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., Schirle, M., Obermayr, F., Walter, S., Schoor, O., Kurek, R., Loeser, W., Bichler, K.H., Wernet, D., Stevanovic, S., and Rammensee, H.G.(2002). **Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines**. Cancer Res. *62*, 5818-5827.

Wentworth, P.A., Celis, E., Crimi, C., Stitely, S., Hale, L., Tsai, V., Serra, H.M., Del Guercio, M.F., Livingston, B., Alazard, D., Fikes, J., Kubo, R.T., Grey, H.M., Chesnut, R.W., Chisari, F.V., and Sette, A.(1995). **In vitro induction of primary, antigen-specific CTL from human peripheral blood mononuclear cells stimulated with synthetic peptides**. Mol.Immunol. *32*, 603-612.

Whelan, J.A., Dunbar, P.R., Price, D.A., Purbhoo, M.A., Lechner, F., Ogg, G.S., Griffiths, G., Phillips, R.E., Cerundolo, V., and Sewell, A.K.(1999a). **Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent**. J.Immunol. *163*, 4342-4348.

Wherry, E.J. and Ahmed, R.(2004). **Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection**. J Virol. *78*, 5535-5545.

Wierecky, J., Mueller, M., and Brossart, P.(2006). **Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1**. Cancer Immunol.Immunother. *55*, 63-67.

Wittke, F., Hoffmann, R., Buer, J., Dallmann, I., Oevermann, K., Sel, S., Wandert, T., Ganser, A., and Atzpodien, J.(1999). **Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma**. Br.J Cancer *79*, 1182-1184.

Wolf, A.M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E., and Grubeck-Loebenstein, B.(2003). **Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients**. Clin.Cancer Res *9*, 606-612.

Wooldridge, J.E., Ballas, Z., Krieg, A.M., and Weiner, G.J.(1997). **Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma**. Blood *89*, 2994-2998.

Wunderlich, H., Schumann, S., Jantitzky, V., Moravek, P., Podhola, M., Kosmehl, H., and Schubert, J.(1998). **Increase of renal cell carcinoma incidence in central Europe**. Eur.Urol. *33*, 538-541.

www.ii.bham.ac.uk(2005). **http://www.ii.bham.ac.uk/clinicalimmunology/CISimagelibrary/Cytoplasmic%20fibres.htm**. Cytokeratin 8, 18 and 19

Yamada, S., Wirtz, D., and Coulombe, P.A.(2003). **The mechanical properties of simple epithelial keratins 8 and 18: discriminating between interfacial and bulk elasticities**. J.Struct.Biol. *143*, 45-55.

Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E., and Greenberg, P.D.(2002). **Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells**. Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A *99*, 16168-16173.

Yee, C., Thompson, J.A., Roche, P., Byrd, D.R., Lee, P.P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M.M., Riddell, S.R., and Greenberg, P.D.(2000). **Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo**. J Exp.Med. *192*, 1637-1644.

Youinou, P., Miossec, P., Pennec, Y., Boles, J.M., Le Goff, P., and Le Menn, G.(1983). **[Antiperinuclear and antikeratin antibodies in liver diseases]**. Sem.Hop. *59*, 589-592.

Young, B.J., Mallya, R.K., Leslie, R.D., Clark, C.J., and Hamblin, T.J.(1979). **Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis**. Br.Med.J. *2*, 97-99.

Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Chin, R.K., Wang, J., Wang, Y., Schietinger, A., Philip, M., Schreiber, H., and Fu, Y.X.(2004). **Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors**. Nat.Immunol. *5*, 141-149.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., Rubin, S.C., and Coukos, G.(2003). **Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer**. N.Engl.J Med *348*, 203-213.

Zippelius, A., Batard, P., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Lienard, D., Lejeune, F., Rimoldi, D., Guillaume, P., Meidenbauer, N., Mackensen, A., Rufer, N., Lubenow, N., Speiser, D., Cerottini, J.C., Romero, P., and Pittet, M.J.(2004). **Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance**. Cancer Res. *64*, 2865-2873.

Kooperationspartner

Prof. Dr. Stefan Stevanović und Patricia Hrstić

Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung für Immunologie, Eberhard Karls Universität, Tübingen, Deutschland

Prof. Dr. Arnulf Stenzl und Jörg Hennenlotter

Urologische Klinik, Eberhard Karls Universität, Tübingen, Deutschland

Prof. Dr. Graham Pawelec

Zentrum für Medizinische Forschung, Eberhard Karls Universität, Tübingen, Deutschland

Sven Koch

Akademisches Medizinisches Zentrum, Experimentelle Immunologie, Universität von Amsterdam, Amsterdam, Niederlande

Prof. Dr. Gerd Klein

Zentrum für Medizinische Forschung Eberhard Karls Universität, Tübingen, Deutschland

Prof. Dr. Hanspeter Pircher

Abteilung für Immunologie und Hygiene, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität von Freiburg, Freiburg, Deutschland

Prof. Dr Dorothee Wernet

Personal Klinische Transfusionsmedizin, Eberhard Karls University, Tübingen, Deutschland

Dr. Hans-Jörg Bühring und Sabrina Treml

Medizinische Universitätsklinik II Abteilung für Hematologie, Immunologie, Rheumatologie, und Onkologie, Eberhard Karls University, Tübingen, Deutschland

Dr. Eva Tolosa

Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg , Universität von Hamburg, Hamburg Deutschland

Danksagungen

Mein erstes großes Dankeschön gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, der es mir ermöglicht hat, diese Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie in der Abteilung für Immunologie durchführen zu können. Besonders möchte ich mich für die konstruktiven Vorschläge, Diskussionen und daraus entstandenen Ideen bedanken, welche ich als sehr inspirierend und wertvoll empfunden habe.

Das zweite große Dankeschön geht an meine mittlerweile langjährige Betreuerin Dr. Cècile Gouttefangeas, der ich neben dem Thema dieser Arbeit auch für die hervorragende Betreuung danken möchte. Mit deiner Hilfe hab ich gelernt Konzepte zu entwickeln, Zellen zu streicheln und nicht zuletzt wie man richtig FACSen macht.

Prof. Dr. Stefan Stevanović und Patricia Hrstić, danke ich für die Hilfe mit allem, was Peptide angeht. Das „Peptidisch“ von Stefan und die fleißige und nie abreißende Versorgung mit diesen Aminosäureketten durch Patricia haben mir viel geholfen. Vielen Dank!

Prof. Dr. Gerd Klein und Konstanze Geier möchte ich hier für ihre tatkräftige Unterstützung rund um die Färbung von Gewebeschnitten danken. Es war sehr interessant, durch euch etwas mehr über die Fluoreszenzmikroskopie zu erfahren.

Dankend ist an dieser Stelle auch Jörg Hennelotter aus der Urologischen Klinik zu erwähnen. Er versorgte mich durch sein großes Engagement im Bereich des RCCs mit Dutzenden von Patientenproben, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Melanie Widenmeyer, Heinrich Griesemann und dem jetzt Dr. Sebastian Haen ein riesiges Dankeschön für die Monate und Jahre, die ich mit euch im Labor verbringen durfte. Es hat mir richtig viel Spaß gemacht, zusammen mit euch die Zellen zu quälen und bunt anzumalen.

Weiter gebührt Beate Pömmerl, Claudia Falkenburger und Franziska Löwenstein ein herzliches Dankeschön für die Versorgung durch Literatur der Scheibenwelt, Badewannen an FACS-Flow und den abertausenden Pipettenspitzen.

Ebenfalls ein herzliches Dankeschön gilt neben Sabrina, Sascha, Stefan, Martin und Ivan auch allen anderen Mitgliedern der Abteilung Immunologie und des 3. Stocks – von den Jungs über die Stevanovićs, Gückels, Steinles, Autenrieths, Dagmars bis zu den Deckers – für die Atmosphäre, Rat & Tat sowie der einen oder anderen Reagenz, wenn die eigene mal aus war.

Lynne Yakes und Gerhard Hörr danke ich für ihre Hilfe und die souveräne Organisation der Abteilung.

Herzlichen Dank auch an meinen zahlreichen Kooperationspartnern für die erfolgreiche Zusammenarbeit, v.a. Prof. Dr. Graham Pawelec und Sven Koch, Prof. Dr. Arnulf Stenzl und Jörg Hennenlotter, Prof. Dr. Gerd Klein, Prof. Dr. Hanspeter Pircher, Prof. Dr. Dorothee Wernet, Dr. Eva Tolosa, sowie Dr. Hans-Jörg Bühring und Sabrina Treml.

Außerhalb des Labors geht mein Dank an meine Freunde wie Andre und Sese, meinem Sifu Jochen und den WT'lern, die immer an mich geglaubt haben und für mich da waren.

Einem Menschen dem ein besonderer Dank gehört ist meiner Alex. Danke, dass du so viel Geduld und Verständnis für mich aufgebracht hast, sowie für die Ablenkung, wenn mir alles über den Kopf zu wachsen schien.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und beiden Brüdern für die Unterstützung und den nötigen Rückhalt danken. Ihr habt mich auf meinem Weg stets bestärkt und das Vertrauen gegeben, immer auf euch zählen zu können. Euch ist diese Arbeit gewidmet.

Eigene Publikationen

I Publikationen

- Welters, M.J., Gouttefangeas, C., Attig, S., Koch, S., and Britten, C.M. (2008).

  „Report on the Fifth Annual Meeting of the Association for Immunotherapy of Cancer (CIMT) April 12-14, 2007 in Würzburg, Germany" Cancer Immunol.Immunother.

- Koch, S., Larbi, A., Ozcelik, D., Solana, R., Gouttefangeas, C., Attig, S., Wikby, A., Strindhall, J., Franceschi, C., and Pawelec, G. (2007).

  „Cytomegalovirus infection: a driving force in human T cell immunosenescence" Ann.N.Y.Acad.Sci.

- Kloor, D., Fumic, K., Attig, S., Tete, M., Osswald, H., Baric, I., Tomiuk, J., and Kompf, J. (2006).

  „Studies of S-adenosylhomocysteine-hydrolase polymorphism in a Croatian population" J.Hum.Genet.

II Posterpräsentationen

- *"FINE ANALYSIS OF TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTE SUBSETS IN RENAL CELL CANCER"*

  Cancer Immunotherapy (CIMT) Annual Meeting, 15.-16. Mai 2008, Mainz, Deutschland

- *"PHENOTYPES AND FUNCTIONS OF TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES IN RENAL CELL CANCER PATIENTS"*

  Cancer Immunotherapy (CIMT) Annual Meeting, 12.-14. April 2007, Würzburg, Deutschland

- *"INVESTIGATING THE PHENOTYPE AND FUNCTION OF CYTOKERATIN 18-SPECIFIC CD8+ T CELLS IN HEALTHY INDIVIDUALS AND PATIENTS"*

  1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 06.-09. September 2006, Paris, Frankreich

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Sebastian Johannes Attig
Geburtsdatum	23. Februar 1980
Geburtsort	Darmstadt

Schulische Ausbildung

1990 – 1996	Realschule Osthofen
1996 – 1999	Rudi-Stephan Gymnasium Worms

Studium

2000 – 2001	Diplomstudiengang Biologie an der Universität Karlsruhe (TH)
2001 – 2005	Diplomstudiengang Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2004 – 2005	Anfertigung der Diplomarbeit *„Charakterisierung von dysfunktionellen Cytokeratin 18-spezifischen CD8-positiven T-Zellen in gesunden und kranken Individuen“* durchgeführt in der AG „T-Zell Monitoring“ unter der Leitung von Dr. Cécile Gouttefangeas, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie (Direktor: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee), Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2005 – 2009	Anfertigung der Doktorarbeit *„Tumorassoziierte T-Lymphozyten: Phänotypische und funktionelle Eigenheiten in Gesunden und in Tumorpatienten“* betreut von Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, durchgeführt in der AG „T-Zell Monitoring“ unter der Leitung von Dr. Cécile Gouttefangeas, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen