

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Definition neuer MHC-Klasse-I-Epitope aus dem Tumor-
assoziierten Antigen MUC1 und Untersuchungen zur
Bedeutung von T-Zellantworten gegen Tumor-
assoziierte Antigene in der Immunrestitution nach
allogener Stammzelltransplantation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von
Markus Stefan Kapp
aus
Stuttgart
2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. H. Einsele

2. Berichtstatter: Professor Dr. S. Stevanović

Meinem Vater
Dr. med. Anton Kapp
1949-1999

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	I
<u>1 EINLEITUNG</u>	1
1.1 LEUKÄMIEN & LYMPHOME	3
1.1.1 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE DER LEUKÄMIEN	4
1.1.2 KLASSIFIKATION VON LEUKÄMIEN	4
1.1.3 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE DER LYMPHOME	5
1.1.4 KLASSIFIKATION VON LYMPHOMEN	6
1.2 ÜBERBLICK ÜBER THERAPEUTISCHE VORGEHENSWEISEN BEI MALIGNEN TUMOREN	7
1.3 DIE STAMMZELLTRANSPLANTATION ALS THERAPIEOPTION BEI LEUKÄMIEN UND LYMPHOMEN	9
1.3.1 „GRAFT-VERSUS-HOST-DISEASE“	12
1.3.2 DER „GRAFT-VERSUS-LEUKEMIA“-EFFEKT	13
1.3.3 SPEZIFISCHE ANTIGENE BEI HÄMATOLOGISCHEN ERKRANKUNGEN	14
1.3.4 MUC1, WT1 UND PROTEINASE 3 – TUMORASSOZIIERTE ANTIGENE	15
1.3.5 MODERNE IMMUNTHERAPIEANSÄTZE IN DER HÄMATOLOGIE UND ONKOLOGIE	18
1.3.5.1 DNA Vakzine	18
1.3.5.2 Zell-basierte Immuntherapieansätze	19
1.3.5.3 Grenzen der Zell-basierten Immuntherapieansätze durch Fehlen geeigneter Peptidepitope	21
1.4 FRAGESTELLUNG	23
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	24
2.1 GESUNDE SPENDER UND PATIENTEN	24
2.1.1 GESUNDE SPENDER	24
2.1.2 PATIENTEN	24
2.2 GERÄTE UND GEBRAUCHSMATERIALIEN	26

2.3 REAGENZIEN	28
2.4 VERWENDETE KITS	31
2.5 IMMUNOLOGISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	33
2.5.1 STAMMLÖSUNGEN	33
2.5.2 PBMNC-ISOLIERUNG	34
2.5.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG MIT DER NEUBAUER-ZÄHLKAMMER	34
2.5.4 EINFRIEREN VON ZELLEN	35
2.5.5 AUFTAUEN VON ZELLEN	36
2.5.6 INKUBATION FÜR „QUANTITATIVE REAL-TIME - POLYMERASE-KETTENREAKTION“	36
2.5.7 SELEKTION VON ZELLPOPULATIONEN MIT DEM MACS-SYSTEM	37
2.5.7.1 Positivselektion mit CD8 oder CD14-Microbeads	37
2.5.8 INDUKTION PEPTID-SPEZIFISCHER CTL	38
2.5.8.1 Generierung von Dendritischen Zellen	38
2.5.8.2 Induktion MUC1-spezifischer CTL mittels peptidbeladener DC	39
2.6 DURCHFLUßZYTOMETRISCHE METHODEN	40
2.6.1 ZWEIFACHFÄRBUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN	40
2.6.2 INTRAZELLULÄRE ZYTOKINFÄRBUNG	41
2.6.3 AUSWERTUNG DER INTRAZELLULÄREN ZYTOKINFÄRBUNGEN	44
2.6.4 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG MIT MHC-PEPTID-TETRAMEREN	44
2.7 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	47
2.7.1 RNA-ISOLIERUNG	47
2.7.2 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER RNA	48
2.7.3 REVERSE TRANSKRIPTION	48
2.7.4 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (Q-RT-PCR)	49
2.7.5 AUSWERTUNG DER Q-RT-PCR-EXPERIMENTE	53
3 ERGEBNISSE	55
3.1 DEFINITION NEUER MHC-KLASSE-I-EPI TOPE AUS DEM TUMOR-ASSOZIIERTEN ANTIGEN MUC1	55
3.1.1 VORHERSAGE VON MUC1-EPI TOPEN DURCH SCREENING AUF MHC-KLASSE-I-BINDUNGSMOTIVE	55

3.1.2	ERKENNUNG DER VORHERGESAGTEN EPITOPE DURCH ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN - ALLGEMEINES	57
3.1.3	ERKENNUNG DER VORHERGESAGTEN EPITOPE DURCH ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN – HLA-B*4402	57
3.1.3.1	Direkter ex vivo-Test	57
3.1.3.2	Induktion MUC1-spezifischer T-Zellen für das Epitop P2132	60
3.1.3.3	Induktion MUC1-spezifischer T-Zellen für das Epitop P2134	65
3.1.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse - HLA-B*4402	66
3.1.4	ERKENNUNG DER VORHERGESAGTEN EPITOPE DURCH ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN – HLA-A*68	67
3.1.4.1	Direkter ex vivo-Test	67
3.1.4.2	Induktion MUC1-spezifischer T-Zellen für das Epitop P3511	68
3.1.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse - HLA-A*68	70
3.1.5	ERKENNUNG DER VORHERGESAGTEN EPITOPE DURCH ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN – HLA-B*0702	70
3.1.5.1	Direkter ex vivo-Test	70
3.1.5.2	Induktion MUC1-spezifischer T-Zellen für das Epitop P40009	72
3.1.5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse - HLA-B*0702	73
3.1.6	ERKENNUNG DER VORHERGESAGTEN EPITOPE DURCH ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN – HLA-B*2705	74
3.2	NACHWEIS TUMORPEPTID-SPEZIFISCHER CTL-ANTWORTEN BEI PATIENTEN NACH ALLOGENER STAMMZELLTRANSPLANTATION	75
3.2.1	BEDEUTUNG DER T-ZELLEN FÜR DEN KLINISCHEN VERLAUF	83
3.2.2	STATISTISCHE BEWERTUNG DER ERGEBNISSE	84
4	<u>DISKUSSION</u>	87
4.1	DEFINITION NEUER MHC-KLASSE-I-EPITOPE AUS DEM TUMOR-ASSOZIIERTEN ANTIGEN MUC1	88
4.2	NACHWEIS TUMORPEPTID-SPEZIFISCHER CTL-ANTWORTEN BEI PATIENTEN NACH ALLOGENER STAMMZELLTRANSPLANTATION	97
4.3	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	101

<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>103</u>
<u>6</u>	<u>ANHANG – MUC1-PROTEINSEQUENZ</u>	<u>105</u>
<u>7</u>	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	<u>106</u>
<u>8</u>	<u>ABBILDUNGEN</u>	<u>109</u>
<u>9</u>	<u>TABELLEN</u>	<u>111</u>
<u>10</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>112</u>
10.1	BÜCHER	112
10.2	PUBLIKATIONEN	113
<u>11</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>127</u>
<u>12</u>	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>128</u>

1 Einleitung

Im Gegensatz zu Entwicklungsländern, in denen immer noch Infektionskrankheiten die häufigste Todesursache darstellen, hat sich das Erkrankungsspektrum in den Industrienationen durch groß angelegte Hygiene- und Impfstrategien immer mehr in Richtung anderer Leiden wie beispielsweise kardiovaskulären Erkrankungen oder malignen Neoplasien entwickelt (vgl. Abbildung 1). Die Weltgesundheitsorganisation konnte in ihrem Gesundheitsbericht des Jahres 2004 zeigen, daß Krebserkrankungen bereits zur zweithäufigsten Todesursache in industrialisierten Nationen geworden sind („World Health Report 2004“; www.who.int/whr/2004).

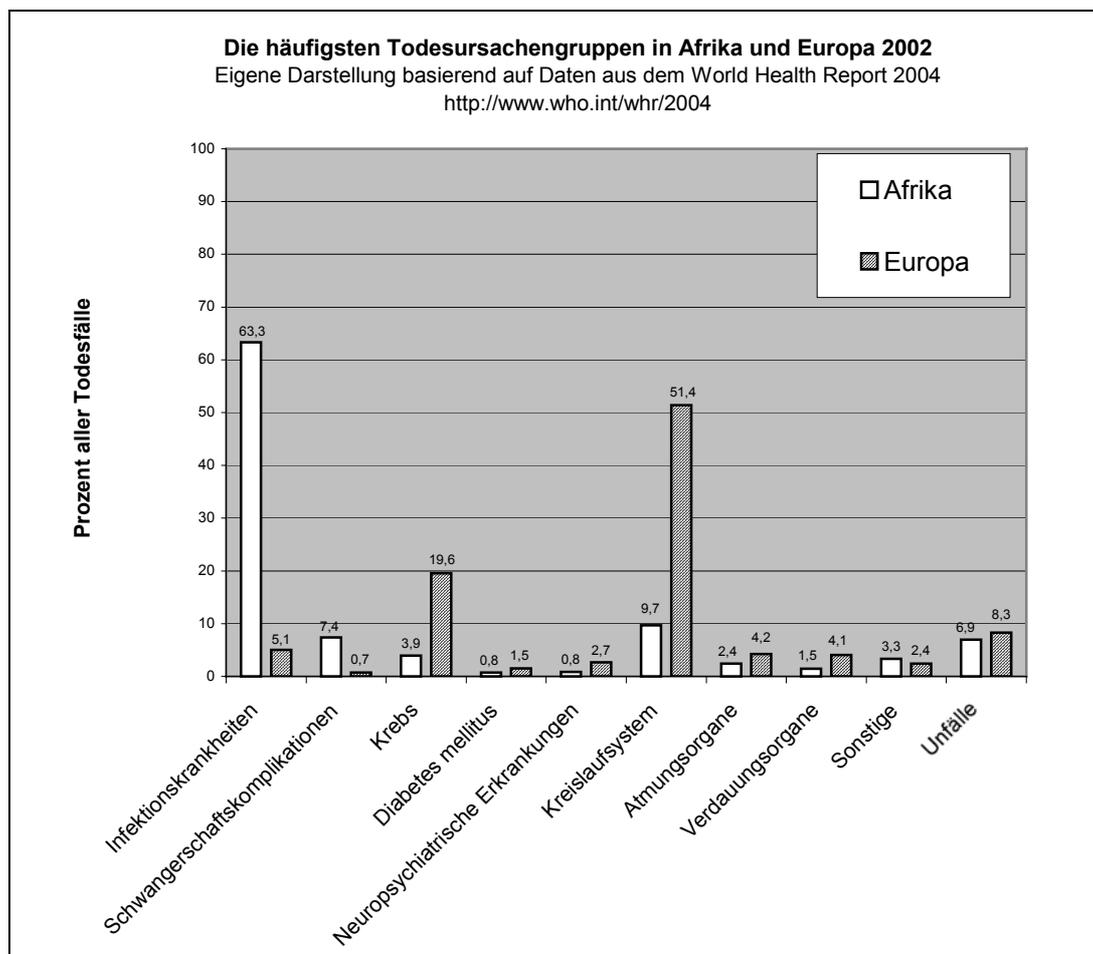


Abbildung 1 Die häufigsten Todesursachen in Afrika und Europa 2002

Eigene Darstellung basierend auf Daten aus dem „World Health Report 2004“
www.who.int/whr/2004

Die deutsche Bevölkerung liegt mit ihrem Erkrankungsspektrum im wesentlichen im Trend des restlichen Europas. Maligne Neoplasien verursachten im Jahre 2002 knapp ein Viertel aller auftretenden Todesfälle (vgl. Abbildung 2).

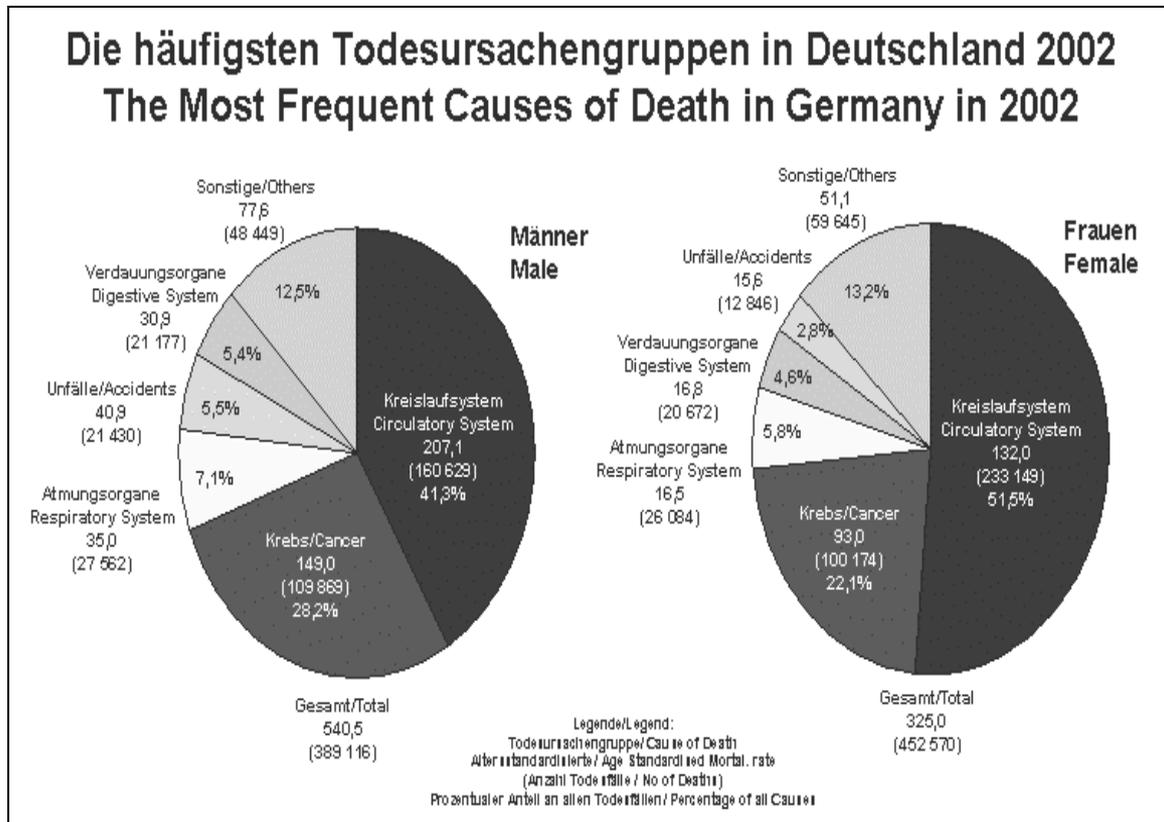


Abbildung 2 Die häufigsten Todesursachen in Deutschland 2002

aus: Becker und Wahrendorf, 2000
 Internet-Update 2004

www.dkfz.de/epi/Home_d/Programm/AG/Praevent/Krebshom/main/deutsch/frame.htm

1.1 Leukämien & Lymphome

Zu den malignen Erkrankungen des blutbildenden und lymphatischen Systems zählen **Leukämien**, die im Jahre 2002 3,3 % aller Krebstodesfälle des Mannes und 3,4 % aller krebsbedingten Todesfälle der Frau in Deutschland ausmachten, sowie **Lymphome**, die ebenfalls Todesfälle in einer ähnlichen Größenordnung verursachen (Becker und Wahrendorf, 2000; Internet-Update 2004). Einen Überblick gibt Abbildung 3:

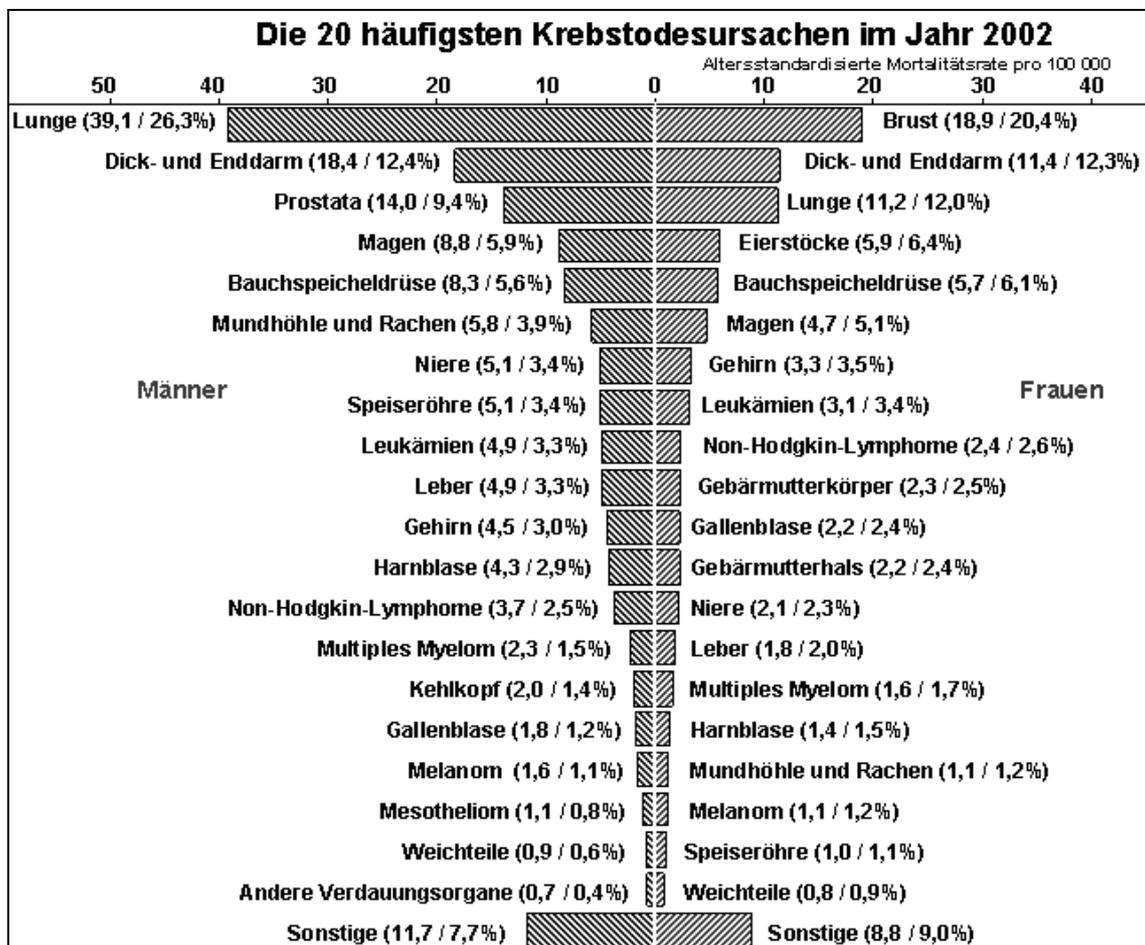


Abbildung 3 Krebsmortalität nach Organen

aus: Becker und Wahrendorf, 2000

Internet-Update 2004

www.dkfz.de/epi/Home_d/Programm/AG/Praevent/Krebshom/main/deutsch/frame.htm

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese der Leukämien

Die Ätiologie der Leukämien ist ungeklärt, wobei in einigen seltenen Fällen eine eindeutige Definition des auslösenden Agens möglich ist. Einen wesentlichen Beitrag zur Herausarbeitung von Faktoren, die zur Entstehung von Leukämien beitragen, konnten epidemiologische Untersuchungen in den letzten Jahren erbringen: So wurde einige Jahre nach den Atombombenexplosionen von Hiroshima und Nagasaki ein gehäuftes Auftreten leukämischer Erkrankungen beobachtet, das einen direkten dosisabhängigen Zusammenhang zwischen der Strahlenexposition und der Häufigkeit dieser Erkrankungen zeigte (Greaves, 1997). Des Weiteren konnten einige Chemikalien (z.B. Benzol und verschiedene Zytostatika) und mehrere genetische Erkrankungen wie angeborene Immundefektsyndrome oder Trisomie 21 mit einer erhöhten Leukämieinzidenz korreliert werden. Infektionen mit dem humanen T-lymphotropen Virus Typ I (HTLV-I) wurden als Auslöser einer Form der akuten T-Zellleukämie erkannt. Letztendlich geht auch der Konsum von Zigaretten mit einer zwei- bis dreifachen Risikoerhöhung für akute Leukämien einher (Severson *et al.*, 1990). Der Pathogenese von Leukämien liegt eine Genomveränderung eines hämatopoetischen Klons zugrunde (Sawyers, 1997). Diese betrifft in der Regel Gene, die für die Regulation der Teilung der Zelle und deren Differenzierung verantwortlich sind. Mechanistisch können diesen Veränderungen in Form von Mutationen, Deletionen oder Translokation von Chromosomenfragmenten auftreten, die zu Dauerstimulation, unregelter Zellproliferation oder Ausbleiben von Apoptose führen können. Resultat ist letztlich eine andauernde Proliferation der entarteten Leukämiezelle (Boehm, 1993; Sawyers, 1997).

1.1.2 Klassifikation von Leukämien

Der Begriff „Leukämie“ (von griechisch λευκος "weiß" und αιμα "Blut"), wurde von Rudolf Virchow geprägt und steht für eine systematische autonome Proliferation eines abnormen Zellstamms (Klons) der leukozytenbildenden

Systeme (Riede und Schäfer, 1993). Nach klinischem Verlauf, Reifegrad und Abstammung der pathologisch veränderten Leukozyten erfolgt eine Gliederung der Leukämien in akute oder chronische, unreifzellige oder reifzellige und lymphatische oder myeloische Leukämien (Abbildung 4).

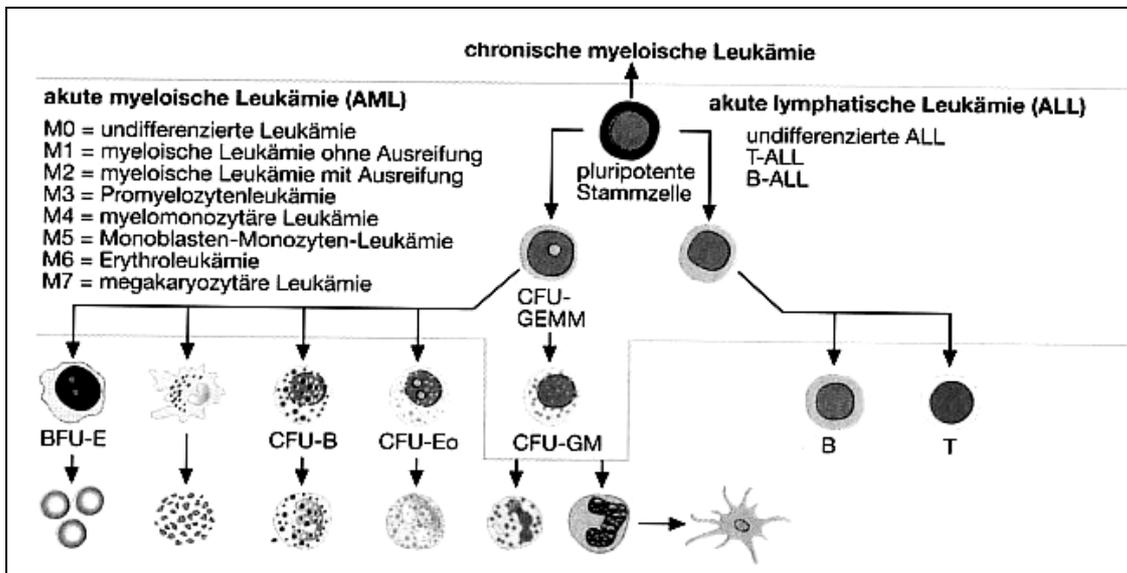


Abbildung 4 Hämatopoese und Ursprung der Leukämien (FAB-Klassifikation)
(aus: Burmester und Pezutto, 1998)

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese der Lymphome

Maligne Lymphome sind proliferative Erkrankungen, die von Lymphknoten oder extranodalen lymphatischen Organen ausgehen und sich dann im Körper ausbreiten (z.B. Infiltration des Knochenmarks). Entsprechend der vielfältigen Reifungs- und Differenzierungsstufen gibt es viele unterschiedliche Lymphomarten (B- und T-Zelllymphome, siehe auch Tabelle 1). Man spricht aber von einer Leukämie, wenn Lymphomzellen nach Infiltration im Knochenmark mehr als 25% des Zellanteils ausmachen. Unter den malignen Lymphomen nimmt das Hodgkin-Lymphom eine Sonderstellung ein, das jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Rolle spielte und deshalb nicht näher beschrieben werden soll. Ihm werden die übrigen Erkrankungen des

lymphatischen Systems als maligne Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) gegenübergestellt. Das Wissen über die Ätiologie der NHL ist begrenzt, jedoch konnten einige prädisponierende Faktoren identifiziert werden (nach Begemann 1999):

- Ionisierende Strahlen wurden vor allem bei Nachbeobachtung der überlebenden Strahlenopfer von Hiroshima und Nagasaki als Risikofaktor für die Genese von NHL in Betracht gezogen. Eine erhöhte Inzidenz zeigte sich vor allem bei Personen unter 25 Jahren und einer Strahlenbelastung von mehr als einem Gray.
- Manche virale Infekte führen ebenfalls zu einem vermehrten Auftreten von NHL in definierten Kollektiven. So wird beispielsweise das Epstein-Barr-Virus (EBV) mit der Entstehung des in Zentralafrika endemischen Burkitt-Lymphoms in Verbindung gebracht, da sich in dessen Zellen im Gegensatz zum nicht endemischen Burkitt-Lymphom in Europa oder den USA EBV nachweisen lässt.
- Bei Kindern mit angeborenen Immundefekten stellen maligne Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar, wobei die NHL in etwa die Hälfte dieser Malignome ausmachen.

1.1.4 Klassifikation von Lymphomen

Die Einteilung der Lymphome wird im internationalen Vergleich nicht einheitlich gehandhabt:

In Europa werden die Lymphome nach der sogenannten Kiel-Klassifikation eingeteilt. Hierbei unterscheidet man im wesentlichen zwischen niedrig malignen und hoch malignen Lymphomen, die entsprechend ihrer Abstammung nochmals in B- und T-Zelllymphome gegliedert werden. Diese Klassifikation wurde seit ihrer Einführung im Jahre 1967 mehrfach modifiziert.

1994 stellte die „International Lymphoma Study Group“ ihrer „Revised European-American classification of lymphoid neoplasms“ (REAL) vor, die erstmals vor allem auf morphologischen, immunologischen und genetischen

Charakteristika der malignen Lymphome basierte (Harris *et al.*,1994) und inzwischen als internationale Grundlage der Lymphomeinteilung herangezogen wird.

Tabelle 1 Lymphom – Subtypen (REAL-Klassifikation)

Non-Hodgkin-Lymphome				Hodgkin-Lymphom
B-Zell-Neoplasien		T-Zell- & NK-Zell-Neoplasien		
B-Zell-Vorläufer-Neoplasien	Periphere B-Zell-Neoplasien	T-Zell-Vorläufer-Neoplasien	Periphere T-Zell- & NK-Zell-Neoplasien	
1 Subtyp	11 Subtypen	1 Subtyp	10 Subtypen	

(Vereinfacht aus: Begemann, 1999)

1.2 Überblick über therapeutische Vorgehensweisen bei malignen Tumoren

(nach Erbar, 1994)

Eine Therapie maligner Tumoren umfasst im Prinzip vier Modalitäten:

- Operation
- Bestrahlung
- Pharmakologische Systemtherapien
- Supportive Therapie

Im Rahmen der internistischen Onkologie spielen hierbei vor allem die beiden letztgenannten Ansätze eine Rolle und in diesem Umfeld besonders chemotherapeutische Maßnahmen mit zytotoxischen Substanzen.

Um eine synergistische Wirkung der verschiedenen Substanzklassen zu erzielen, werden diese nicht nur einzeln, sondern auch in Kombination eingesetzt. Ihre Auswahl erfolgt nach der Zielsetzung, die mit der Therapie erreicht werden soll, sowie nach einem ausführlichen Staging des Patienten.

- Bei der **kurativen Zielsetzung** wird eine Heilung des Tumors angestrebt.
- Wenn bei unheilbaren Malignomen tumorbedingte Beschwerden durch Verringerung der Tumormasse gelindert oder eine Lebensverlängerung bei adäquater Lebensqualität angestrebt werden spricht man von einer **palliativen Therapie**.
- **Adjuvante Behandlungen** repräsentieren eine zusätzliche systemische oder strahlentherapeutische Behandlung nach einer bereits mit kurativer Absicht durchgeführten Operation, die keinen erkennbaren Resttumor zurückließ, um eventuell vorhandene Mikrometastasen therapeutisch erfassen zu können.
- **Neoadjuvante Therapien** werden vor einer Operation eingeleitet, um die Heilungschancen durch die nachfolgende OP aufgrund einer Reduktion der Tumormasse zu verbessern. Die OP wäre ohne neoadjuvante Therapie nicht in kurativer Absicht durchführbar.

Im Laufe der Therapie und nach Abschluss werden wiederum Staging-Untersuchungen durchgeführt, um das Ansprechen der Therapie zu evaluieren.

Der Therapieerfolg wird dabei folgendermaßen definiert:

- Eine **komplette Remission** („complete remission“, CR) ist dadurch gekennzeichnet, daß keinerlei Resttumor über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen mehr nachgewiesen werden kann. Dies gilt für histologische, laborchemische und bildgebende Nachweisverfahren.
- Bei der **partiellen Remission** („partial remission“, PR) wird eine Reduktion aller messbaren Tumorparameter um mindestens 50 % gefordert über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen ohne Auftreten neuer Metastasen.
- „**No Change**“ bezeichnet einen Zustand, in dem die Tumormanifestation über einen vierwöchigen Beobachtungszeitraum unverändert, um weniger als 50 % reduziert oder um weniger als 25 % vergrößert ist.
- Nimmt die Tumormasse um mehr als 25 % zu oder treten neue Metastasen auf, spricht man von einer **Progression** der Erkrankung.

1.3 Die Stammzelltransplantation als Therapieoption bei Leukämien und Lymphomen

Viele Tumoren, insbesondere Leukämien und Lymphome, können durch eine ausreichend hochdosierte Chemo- und Radiotherapie eliminiert werden. Limitierend ist hierbei aber die Toxizität der Therapie auf das blutbildende Knochenmark, das irreversibel geschädigt werden kann (Myeloablation). Einen Überblick über Ablauf und Indikationen dieser Therapie gibt Abbildung 5. Um nach einer myeloablativen Therapie die Blutbildung wieder herzustellen, werden hämatopoetische Stammzellen benötigt, die im Rahmen einer Stammzelltransplantation (SCT) zugeführt werden können. Man unterscheidet zwischen autologer Stammzelltransplantation (die Stammzellen werden beim Patienten selbst vor der myeloablativen Therapie gesammelt) und allogener Stammzelltransplantation (Familien- oder Fremdspender). Eine weitere Möglichkeit ist Verwendung von Nabelschnurblut (Chao *et al.*, 2004).

Die hämatopoetischen Stammzellen exprimieren das Oberflächenantigen CD34 und können aus Knochenmark oder durch eine Stammzellsammlung aus dem peripheren Blut (Leukapherese) nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF) gewonnen werden. Der Mindestbedarf an CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen für eine erfolgreiche Rekonstitution beträgt $2 \cdot 10^6/\text{kg}$ Körpergewicht bei autologen Stammzelltransplantation und $6 \cdot 10^6/\text{kg}$ Körpergewicht bei allogenen Stammzelltransplantation (Link *et al.*, 1997).

Zur Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation muss ein geeigneter Spender gefunden werden. Bei Geschwistern beträgt die Wahrscheinlichkeit 1:4, daß alle HLA-Allele übereinstimmen. Derzeit kann für 25-30 % der Patienten ein HLA-identischer Familienspender und für 50-70 % ein HLA-identischer Fremdspender gefunden werden (Link *et al.*, 1997). Seit einigen Jahren existiert zusätzlich die Möglichkeit der haploident-allogenen Stammzelltransplantation (Aversa *et al.*, 1994, Aversa *et al.*, 2001). Bei dieser Vorgehensweise werden Stammzellen transplantiert, die in ihrer HLA-Konstellation in jedem Subtyp denen des Empfängers lediglich in einem Allel

entsprechen. Dementsprechend werden hier oftmals die Eltern des Patienten zur Stammzellspende herangezogen.

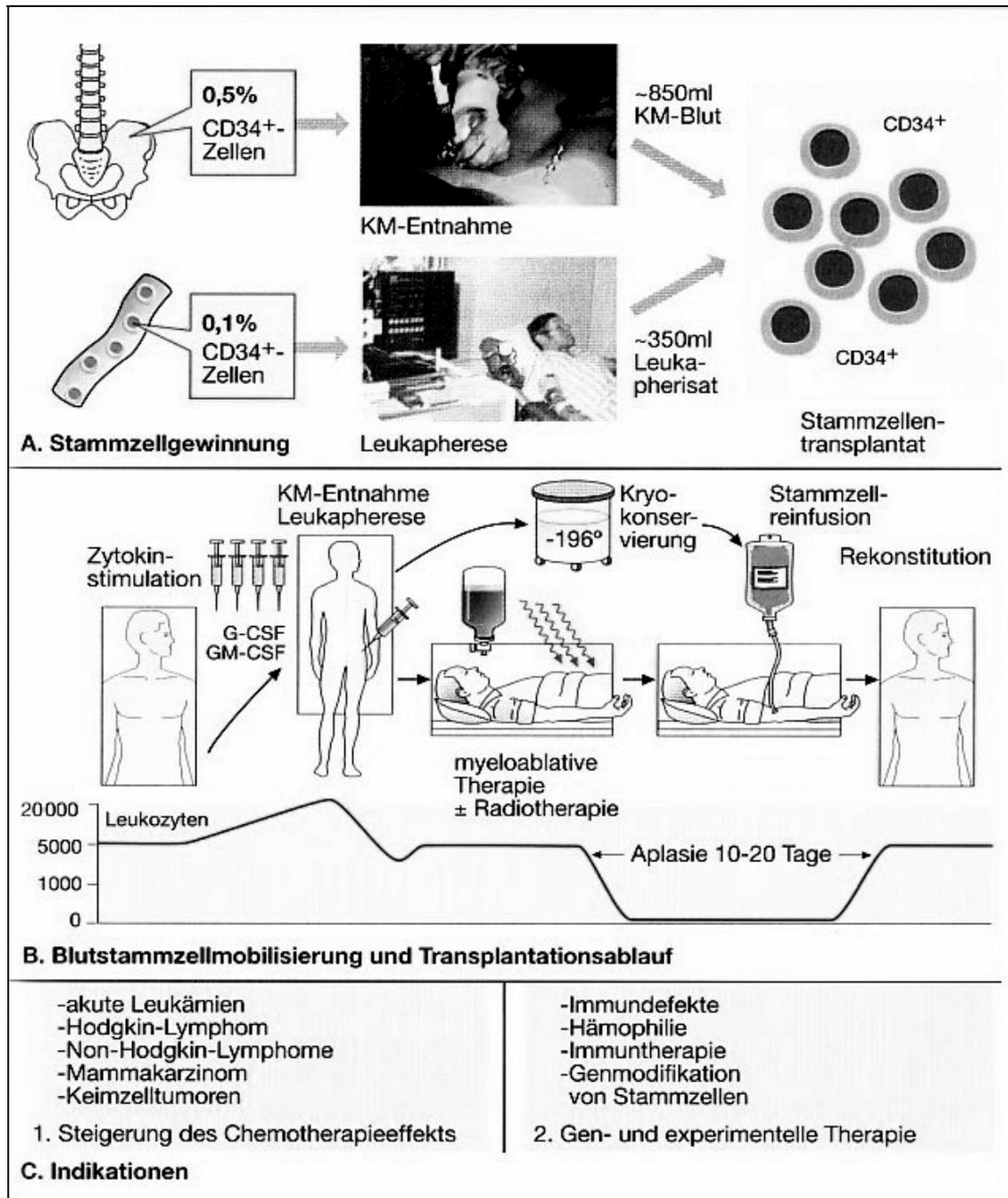


Abbildung 5 Möglichkeiten/Indikationen von Stammzelltransplantationen (aus: Burmester und Pezutto, 1998)

Vor Transplantation zerstört man durch die sogenannte „Konditionierungstherapie“, die aus einer hochdosierten Zytostatikabehandlung und in vielen Fällen einer zusätzlichen Ganzkörperbestrahlung besteht, die Tumorzellen und erzeugt gleichzeitig eine ausreichende Immunsuppression, um eine Abstoßung des Fremdtransplantats zu verhindern. Da dadurch ausgereifte T-Zellen, die unter anderem für die immunologisch-bedingte Graft-versus-Host-Reaktion (siehe 1.3.1) verantwortlich sind, nicht erfasst werden, erfolgt zusätzlich eine medikamentöse Immunsuppression sowie eine eventuelle *in vivo* T-Zelldepletion mittels polyklonalen Antithymozyten-Antikörpern (siehe auch Kapitel 1.3.1).

Komplikationen bei dieser Behandlungsform sind Chemo- und Radiotherapie induzierte Organschädigungen, opportunistische Infektionen während der Aplasiephase, sowie die im nächsten Abschnitt näher beschriebene „Graft-Versus-Host-Disease“ (Pfreundschuh, 1997):

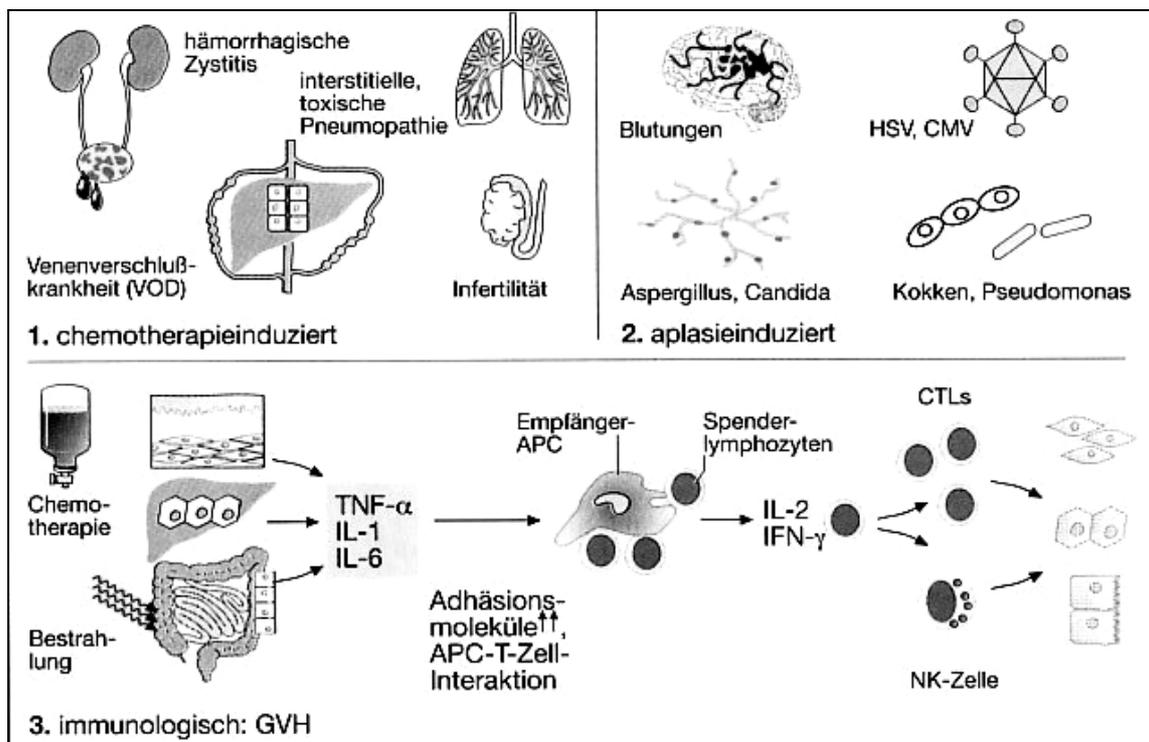


Abbildung 6 Komplikationen der allogenen Transplantation
(aus: Burmester und Pezutto, 1998)

1.3.1 „Graft-Versus-Host-Disease“

Die „**Graft Versus Host Disease**“ (**GVHD**) ist eine Hauptursache von Morbidität und Mortalität nach allogener Stammzelltransplantation und wird durch Spender-T-Lymphozyten im Transplantat verursacht. Im gesunden Empfängerorganismus werden die übertragenen Zellen rasch abgebaut. Sind die Empfänger jedoch zur Verhinderung einer Transplantatabstoßung durch Behandlung mit Immunsuppressiva in ihrer Immunabwehr geschwächt, kann die GVH-Reaktion zu einer schweren, akuten oder chronischen Erkrankung mit Leber-, Haut-, Darm- und Milzbeteiligung führen, die auch mit einer Atrophie der lymphatischen Organe und oftmals tödlichem Ausgang einhergeht. Bei HLA-kompatiblen Transplantationen ist die GVH-Reaktion gegen die sogenannten Nebenhistokompatibilitätsantigene („minor histocompatibility antigens“ = mHags) gerichtet (Goulmy *et al.*, 1996). Das Risiko an einer schweren GVHD zu erkranken (oder das Transplantat abzustoßen) steigt mit der Zahl der HLA-Unterschiede zwischen Empfänger und Spender (McLaughlin und Ku, 1994).

Um eine GVHD zu vermeiden kann man die T-Lymphozyten aus dem Transplantat entfernen. Dies wird insbesondere bei haploidenten Transplantationen und älteren Patienten routinemäßig durchgeführt, wobei die T-Zelldepletion, sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* (als auch kombiniert) erfolgen kann: Durch Sortieren der Stammzellen über magnetisch-markierte Antikörper in einer Trennsäule, kann eine Reinheit von >95% des Stammzellpräparats erzielt werden. Des weiteren wird das Immunsystem der Patienten im Rahmen der Konditionierungstherapie und auch in der Phase nach Transplantation bis zum Anwachsen des Transplantats massiv supprimiert, um sowohl eine Transplantatabstoßung zu vermeiden, als auch das Risiko einer GVHD zu senken. Zumeist geschieht dies mittels polyklonalen Anti-Lymphozyten/Thymozyten-Antikörpern (z.B. ATG), Substanzen, die in die Zytokin-gesteuerte Immunmodulation eingreifen (z.B. Cyclosporin A, Rapamycin), Glucocorticoiden (z.B. Dexamethason) oder Mycophenolsäurederivaten.

1.3.2 Der „Graft-Versus-Leukemia“- Effekt

Spender-T-Lymphozyten vermitteln jedoch ebenfalls den günstigen „**Graft Versus Leukemia**“-Effekt (**GVL**) durch Zerstörung von nach Chemotherapie übrig gebliebenen Tumorzellen, wodurch nach deren Depletion das Risiko eines Tumorrezidivs zunimmt. Es wurde nachgewiesen, daß Donor-Lymphozyten-Infusionen bei 75% aller CML-Patienten, die nach allogener Stammzelltransplantation ein Rezidiv erlitten, zytogenetisch vollständige Remissionen induzieren konnten (Collins *et al.*, 1997; Kolb *et al.*, 1995).

Interessanterweise erreichen 50 % aller Patienten eine komplette Remission ohne eine GVHD zu entwickeln, was die Möglichkeit impliziert, daß unterschiedliche Zielantigene für GVL- und GVH-Reaktionen existieren, wobei eine Vielzahl Leukämie-spezifischer Antigene immer noch unbekannt sind (Falkenburg *et al.*, 1999; Childs *et al.*, 1999).

Dieser mit der allogenen Stammzelltransplantation assoziierte GVL-Effekt war bis vor kurzem ein zum Großteil rein klinisch beschriebenes Phänomen, jedoch werden die ihm zugrunde liegenden molekularen und zellulären Mechanismen immer besser verstanden. Hier wird vor allem das Potential tumorspezifischer T-Zellantworten gegen sogenannte „Selbst“-Antigene wie die nachfolgend näher beschriebenen Proteine MUC1, Proteinase 3 oder WT1, hervorgehoben (Molldrem *et al.*, 2002).

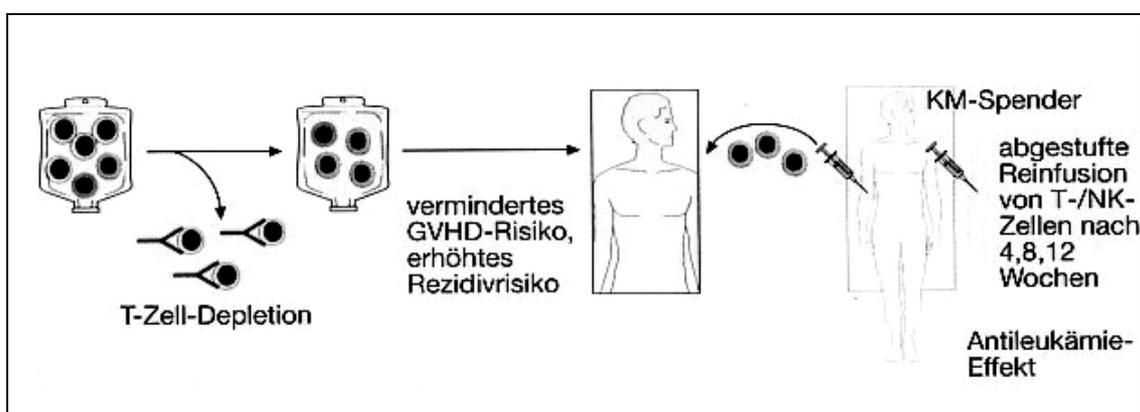


Abbildung 7 T-Zelldepletion und GVL-Effekt
(aus: Burmester und Pezutto, 1998)

1.3.3 Spezifische Antigene bei hämatologischen Erkrankungen

Tumore exprimieren häufig mutierte Proteine oder zeigen eine Überexpression normal auftretender Genprodukte. Im Rahmen der Antigenprozessierung werden auch Peptide dieser veränderten Proteine über MHC-Klasse-I präsentiert. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, die spezifisch für das präsentierte Antigen sind, können Tumorzellen erkennen (Robbins und Kawakami, 1996). Einen Einblick in die Heterogenität dieser Antigen-Gruppe gibt Abbildung 8.

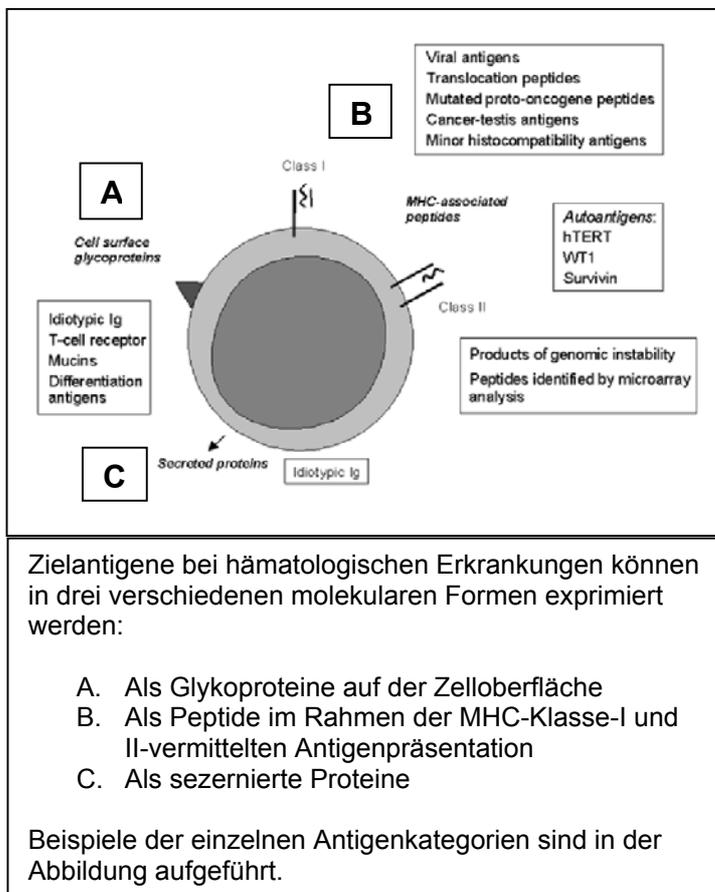


Abbildung 8 Zielantigene hämatologischer Erkrankungen

(aus: Heslop *et al.*, 2003)

In den letzten Jahren wurden einige Versuche unternommen, Leukämie-spezifische T-Zell-Epitope zu definieren. Fusionsproteine wie BCR-ABL bei der chronisch myeloischen Leukämie, ETV6-AML1 bei der prä-B ALL, PML-RAR α bei der akuten Promyelozytenleukämie und DEK-CAN bei der AML sind potentielle Ziele, da sie aufgrund von chromosomalen Fusionen entstehen und

deshalb nur in malignen Zellen exprimiert werden. Daher werden diese Antigene als Tumor-spezifische Antigene bezeichnet (Jurcic *et al.*, 2000).

Eine alternative Strategie, um Tumor- bzw. Leukämie-spezifische T-Zellepitope zu identifizieren, ist die Verwendung von antigenen Peptiden, die sich von bevorzugt in malignen Zellen exprimierten oder überexprimierten Proteinen ableiten. Diese werden als sogenannte Tumor-assoziierte Antigene (TAA) bezeichnet, da sie auch in manchen Normalgewebe exprimiert werden, jedoch auf einem signifikant geringeren Niveau. Eine antigenspezifische Lyse leukämischer Zellen durch CTL konnte unter anderem für HLA-A*0201-restringierte Epitope aus dem in CML-Zellen überexprimierten Enzym Proteinase 3 (Molldrem *et al.*, 1997), dem bei AML, ALL, CML und verschiedenen soliden Tumoren überexprimierten Transkriptionsfaktor „Wilms Tumor Protein“ WT1 (Ohminami *et al.*, 2000) und für das Mucin MUC1, das von Plasmazytomzellen, einigen Leukämietypen, sowie soliden Tumoren wie dem Nierenzellkarzinom oder dem Mammakarzinom in einer irregulären Form überexprimiert wird, nachgewiesen werden (Brossart *et al.*, 2001).

1.3.4 MUC1, WT1 und Proteinase 3 – Tumorassoziierte Antigene

MUC1 (CD227) ist ein hochglykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein (eine Transmembranhelix als Verankerung), das normalerweise auf der luminalen Oberfläche sekretorischer Drüsen exprimiert wird (Patton *et al.*, 1995). Es weist eine einzigartige extrazelluläre Domäne auf, die aus einer variablen Anzahl (meistens 20-60) von „Tandem Repeats“ mit einer Länge von 20 Aminosäuren besteht (PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA) (Gendler *et al.*, 1988) und zeigt in diesen Regionen einen sehr hohen Glykosylierungsgrad. Viele Adenokarzinome wie beispielsweise Brust- und Lungenkrebs weisen eine Überexpression einer hypoglykosylierten Form dieses Proteins auf, was zu einer Freilegung neuer Peptid- und Kohlenhydrat-Epitope führt. Diese werden spezifisch von monoklonalen Antikörpern erkannt. Darüber hinaus wurde auch eine MUC1-Expression bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen einschließlich

des Multiplen Myeloms und einigen B-Zell-Lymphomen nachgewiesen (Girling *et al.*, 1989; Duperray *et al.*, 1989; Mark und Mangkornkanok, 1989; Delsol *et al.*, 1988).

Mittels Computeranalyse wurde die Aminosäuresequenz von MUC1 auf MHC-Bindungsmotive überprüft (nach Rammensee *et al.*, 1997; Davenport *et al.*, 1995). Auf diese Weise konnten zwei HLA-A*0201-restringierte T-Zellepitope, die nonameren Peptide M1.1 und M1.2, (Brossart *et al.*, 1999) definiert und eine Erkennung durch MUC1-spezifische CTL (Brossart *et al.*, 1999; Brossart *et al.*, 2001) nachgewiesen werden. Das M1.1-Peptid leitet sich aus der letzten „Tandem Repeat“-Region von MUC1 ab (Aminosäuren 950-958: STAPPVHNV), die schon vielfach als hoch immunogen beschrieben wurde (Domenech *et al.*, 1995; Apostolopoulos *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu stammt das M1.2-Peptid (Aminosäuren 12-20: LLLLTVLTV) aus der ER-Signalsequenz von MUC1, was zeigt, daß T-Zell-vermittelte Immunantworten auf das MUC1-Protein nicht auf die „Tandem Repeat“-Domäne beschränkt sind. Darüber hinaus kann das M1.2-Peptid auch von TAP-defizienten malignen Zellen präsentiert werden: Die Proteolyse von Peptiden, die sich von den ER-spezifischen Signalsequenzen ableiten, ist eine zweite Möglichkeit für die Bildung MHC-Klasse-I-assoziiierter Peptide. Dieser Weg funktioniert TAP-unabhängig (Henderson *et al.*, 1992; Snyder *et al.*, 1994).

Das **WT1**-Gen codiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der in der Lage ist, an spezifischen Sequenzen in den Promotor-Regionen einer Vielzahl von Genen zu binden (Call *et al.*, 1990; Gessler *et al.*, 1990). WT1 ist an der Regulation von zellulären Wachstums- sowie Differenzierungsvorgängen beteiligt und interagiert mit verschiedenen Zielgenen (z.B. PDGF, IGF). In hämatopoetischen Zellen konnte für WT1 eine reprimierende Wirkung auf die Promotoren verschiedener Gene, einschließlich CSF-1, TGF- β , RAR- α , c-myc und bcl-2, nachgewiesen werden (Harrington *et al.*, 1993; Dey *et al.*, 1994; Goodyer *et al.*, 1995; Hewitt *et al.*, 1995). Es ist ebenfalls bekannt, daß WT1 eine wesentliche Rolle bei der regulären Entwicklung der Nieren und des Urogenitalsystems spielt (Pritchard-Jones *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990),

wohingegen die WT1-Expression beim Erwachsenen auf wenige Gewebe limitiert ist, wie Milzkapsel und -stroma, Sertoli-Zellen des Hodens u.a. (Park *et al.*, 1993; Pelletier *et al.*, 1991).

In den 1990er-Jahren häuften sich Ergebnisse, daß WT1 in Zellen akuter Leukämien überexprimiert wird (Miwa *et al.*, 1992; Miyagi *et al.*, 1993; Menssen *et al.*, 1995; Inoue *et al.*, 1997). Des weiteren konnte gezeigt werden, daß WT1 auch in normalen CD34⁺-hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird, jedoch in weitaus geringerem Maße als in leukämischen Zellen (Baird und Simmons, 1997; Maurer *et al.*, 1997).

Im Falle von WT1 konnten ebenfalls HLA-A*0201-restringierte Peptide definiert (Aminosäuren 126-134: RMFPNAPYL) und spezifische CTL-Antworten nachgewiesen werden (Oka *et al.*, 2000), die im Rahmen von immuntherapeutischen Vakzinierungsstrategien von Bedeutung sind (Sugiyama, 2002).

Proteinase 3 ist eine auf myeloische Gewebe beschränkte Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. Dieses Enzym wird normalerweise in den azurophilen Granula normaler myeloischer Zellen exprimiert und zeigt eine zwei- bis fünffache Überexpression in einigen Leukämie-Zellen. Dies kann für die Erhaltung des leukämischen Phänotyps von Bedeutung sein (Dengler *et al.*, 1995; Bories *et al.*, 1989). Es konnte gezeigt werden, daß Zelllinien zytotoxischer T-Lymphozyten, die spezifisch für das aus Proteinase 3 abgeleitete HLA-A*0201-restringierte Nonapeptid PR1 (Aminosäuren 169-177: VLQELNVTV) sind, CML-Zellen lysieren und das Wachstum von CML-Vorläuferzellen im Vergleich zu normalen Knochenmarkszellen hemmen. Diese Ergebnisse korrelieren stark mit der Überexpression von Proteinase 3 in den Leukämiezellen, sowie dem Nachweis einer ontogenetischen Expression in unreifen CD34⁺-Leukämiezellen (Molldrem *et al.*, 1996; Molldrem *et al.*, 1997).

1.3.5 Moderne Immuntherapieansätze in der Hämatologie und Onkologie

Da dem Immunsystem bei der Verhinderung maligner Erkrankungen eine immer größere Bedeutung beigemessen wird, stehen inzwischen mehr denn je Immuntherapien im Blickpunkt der onkologischen Forschung. Hierbei handelt es sich um verschiedene Vorgehensweisen, die das Immunsystem in die Lage versetzen sollen, neoplastische Zellen zu eliminieren.

Zielstrukturen dieser Ansätze sind unter anderem Tumor-spezifische oder Tumor-assoziierte Antigene, um eine möglichst hohe Spezifität der Therapien zu gewährleisten. Zum einen werden hier bewährte virale Impfsysteme mittels moderner gentechnischer Methoden auf einen Einsatz im Rahmen von Tumorerkrankungen zugeschnitten, zum anderen existiert inzwischen eine Vielzahl von verschiedenen Zell-basierten Immuntherapieansätzen, die beide fortwährender klinischer Evaluation unterliegen.

1.3.5.1 DNA Vakzine

Das Konzept einer Gen-basierter Tumor-Vakzine leitet sich von der Vorstellung ab, eine Tumor-assoziierte Gensequenz direkt in den Patienten einzubringen, um nach anschließender Transkription und Translation eine Präsentation des Proteins an das Immunsystem zu erreichen. Dies erfolgt in der Regel mittels viralen oder bakteriellen Vektorsystemen, die die interessierende DNA-Sequenz tragen (Heslop *et al.*, 2003). Mechanistisch kann eine DNA-Vakzine zum einen durch *ex vivo* Applikation in DC zu einer Antigenexpression in diesen Zellen führen und nach Reinfusion an den Patienten eine T-Zellantwort direkt initiieren. Viele DNA-Vakzine werden aber auch direkt intramuskulär oder intrakutan appliziert, was letztendlich in einem Cross-Priming der gewünschten T-Zellantwort *in vivo* resultieren soll. Letztendlich ist die Entstehung einer zellulären sowie humoralen Immunantwort das Ziel (vgl. Abbildung 9).

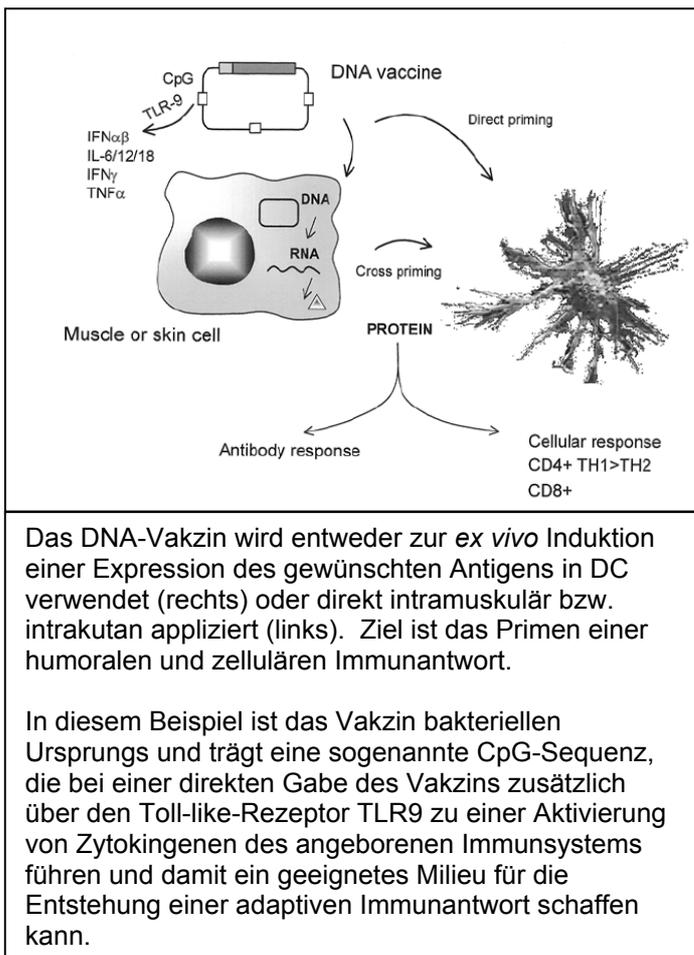


Abbildung 9 Immunitäts-Induktion durch DNA-Vakzine (aus: Heslop *et al.*, 2003)

1.3.5.2 Zell-basierte Immuntherapieansätze

T-Zell-Transfer

Der Ausgangspunkt dieses therapeutischen Ansatzes ist sicherlich in der Beschreibung des GVL-Effekts zu sehen, der die Bedeutung der T-Zell-basierten Immunität für eine Tumorkontrolle zeigen konnte (Kolb *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1997).

Der älteste dieser Ansätze stellt die unspezifische Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) nach allogener Stammzelltransplantation dar, die bei CML-Patienten hämatologische Remissionsraten von bis zu 75% induzieren konnten (Kolb *et*

al., 1995), wobei 80 % dieser Patienten ebenfalls eine durch fehlenden Nachweis des CML-spezifischen *bcr-abl*-Gens definierte zytogenetische Remission erreichten, die im Mittel 6 Monate anhielt (van Rhee *et al.*, 1994). Andere Erkrankungen sprechen weit weniger auf diese Therapieoption an. Da mit DLI auch ein erhöhtes Risiko einer GVHD assoziiert ist, speziell im Falle haploident-transplantierten Patienten, ist ein wichtiges Ziel, die Spezifität der infundierten Zellen zu steigern, um zum einen bessere Wirksamkeit, zum anderen ein geringeres GVH-Risiko zu erreichen. Am Modellsystem der CMV-Infektion konnte nach Gabe von CMV-spezifischen T-Zellen gezeigt werden, daß diese einen deutlichen Benefit bezüglich der CMV-Reaktivierung nach Transplantation vermitteln können (Riddell *et al.*, 1992; Einsele *et al.*, 2002). Die Gabe spezifischer T-Zellen wurde inzwischen auch im Rahmen von Tumorerkrankungen evaluiert, wobei diese experimentelle Therapie auch jenseits des Transplantations-Settings zum Einsatz kam, unter anderem auch bei soliden Tumoren wie beispielsweise dem malignen Melanom: So konnte gezeigt werden, daß Infusionen mit Melan-A oder MART-1 spezifischen T-Zellen bei Patienten mit fortgeschrittenem malignen Melanom positive Effekte im klinischen Krankheitsverlauf bedingen können (Mackensen *et al.*, 2004).

Vakzinierung mit Dendritischen Zellen

Weitere therapeutische Ansätze beschreiben den Einsatz verschiedener Zell-basierter Vakzine zur gezielten Stärkung des Immunsystems, sowohl nach Transplantation, als auch im Rahmen experimenteller Therapien bei fortgeschrittenen soliden Tumoren. Ein besonderes Augenmerk legen viele Arbeitsgruppen auf den Einsatz von Dendritischen Zellen (DC) als den potentesten antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems zur Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort. Dies erweist sich als sinnvoll, da die Fähigkeit einer effektiven Prozessierung und Präsentation Tumor-assoziierten oder Tumor-spezifischer Antigene im geeigneten MHC-Kontext einen kritischen Punkt bei der Generierung spezifischer T-Zellen

darstellt (Caligiuri *et al.*, 2004). DC kommen im peripheren Blut in geringen Frequenzen vor, können aber ebenfalls aus Monozyten unter Zytokin-Einfluß generiert werden (Sallusto und Lanzavecchia, 1994). *In vitro* konnten unreife zirkulierende DC aus peripherem Blut erfolgreich zur Ausreifung und Antigenbeladung verwendet werden (Hsu *et al.*, 1996). Im Rahmen von Phase I/II-Studien bei Plasmozytom-Patienten nach Hochdosischemotherapie und anschließender autologer Stammzelltransplantation konnte weiterhin gezeigt werden, daß Idiotyp-beladene DC ohne signifikante Nebenwirkungen appliziert werden können und auch bei einem Teil der Patienten zu einer Vakzine-spezifischen Immunantwort führen (Reichardt *et al.*, 1999; Reichardt *et al.*, 2003). Die Anwendung von Peptid-gepulsten DC des Stammzellspenders zur Therapie von CMV-Reaktivierungen im Hochrisikokollektiv nach allogener Stammzelltransplantation wurde ebenfalls im Rahmen einer Phase-I/II-Studie validiert, wobei keine relevanten Nebenwirkungen zu beobachten waren und eine spezifische gegen die applizierten T-Zellepitope gerichtete Immunantwort induziert werden konnte (Grigoleit *et al.*, 2007).

1.3.5.3 Grenzen der Zell-basierten Immuntherapieansätze durch Fehlen geeigneter Peptidepitope

Auf Peptiden basierende Vakzine gegen sowohl infektiöse als auch maligne Erkrankungen sind für klinische Zwecke im Prinzip recht unkompliziert herzustellen. „Good Manufacturing Practice“ (GMP) Bedingungen für eine Herstellung sowohl der zellulären Bestandteile (beispielsweise der DC), als auch der Peptide sind an größeren, auf Tumorerkrankungen spezialisierten Kliniken zumeist vorhanden. Der „Flaschenhals“ dieser Strategien wird vielmehr von der mangelnden Verfügbarkeit von Peptiden für ein breites Kollektiv von Patienten gebildet, da zwar immer mehr geeignete Antigene definiert werden können, sich viele Arbeiten aber lediglich auf eine Definition von Peptiden aus diesen Antigenen für eine oder wenige HLA-Restriktionen (zumeist auf das in der kaukasischen Bevölkerung häufigste Allel HLA-A2) beschränken. Für eine adäquate Anwendung Peptid-basierter immuntherapeutischer Strategien und

ein entsprechendes Monitoring Vakzine-spezifischer T-Zellantworten ist es deswegen unerlässlich, auch weniger häufige HLA-Restriktionen in die Bestimmung neuer T-Zellepitope einzubeziehen.

1.4 Fragestellung

Der GVL-Effekt nach allogener Stammzelltransplantation stellt eines der eindrucksvollsten Beispiele für die Fähigkeit des Immunsystems maligne Zellen zu eliminieren dar. Jedoch ist eine Untersuchung der spezifischen T-Zellantwort gegen Tumor-spezifische und Tumor-assoziierte Antigene oft auf wenige HLA-Restriktionen limitiert.

1. Deswegen sollten im ersten Teil der vorliegenden Arbeit aus dem Tumor-assoziierten Antigen MUC1 mittels eines MHC-Klasse-I-Bindungsalgorithmus Epitope für die Restriktionen HLA-A*68, HLA-B*0702, HLA-B*2705 und HLA-B*4402 vorhergesagt werden und auf ihre Relevanz in gesunden Spendern, sowie Patienten nach allogener Stammzelltransplantation mittels eines Nachweises Peptid-spezifischer IFN- γ Produktion untersucht werden.
2. Aufbauend auf Punkt 1 sollte das Vorkommen spezifischer T-Zellantworten gegen die oben näher beschriebenen Antigene MUC1, Proteinase 3 und WT1 nach allogener Stammzelltransplantation untersucht werden. Dies sollte unter Einbeziehung sowohl der bisher bekannten, als auch der in dieser Arbeit neu definierten Epitope geschehen.
3. Nach Vorliegen dieser Ergebnisse sollte letztendlich der klinische Status der Patienten in Bezug zu einem Vorkommen Tumor-spezifischer T-Zellantworten eingehender betrachtet werden, um deren Rolle in der Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Gesunde Spender und Patienten

2.1.1 Gesunde Spender

Die Bezeichnung der freiwilligen gesunden Spender („Healthy donor“ =HD) in dieser Arbeit erfolgte aus Datenschutzgründen stets als „HD X“ wobei jedem Spender eine aus nachfolgender Tabelle zu entnehmende Nummer (X) zugeordnet wurde.

Tabelle 2 HLA-Typisierungen der untersuchten gesunden Spender

Nr.	HLA-Typisierung (Allele A und B)
1	A30/68 B18/44
2	A1/28 B35/44
3	A2 B7/44
4	A1/2 B7/57
5	A2 B7/44

2.1.2 Patienten

Die Bezeichnung der Patienten in dieser Arbeit erfolgte aus Datenschutzgründen stets als „Patient X“ wobei jedem Patienten eine aus nachfolgender Tabelle zu entnehmende Nummer (X) zugeordnet wurde. Die für die Versuchsergebnisse relevanten Fakten sind an den betreffenden Stellen nochmals kurz aufgeführt.

Tabelle 3 Patientendaten

(c)-ALL = (common) Akute lymphatische Leukämie
 AML = Akute myeloische Leukämie
 CD = „Cluster of differentiation“ (spezifische Oberflächenantigene)
 CML = Chronisch myeloische Leukämie
 CMV = Zytomegalievirus
 HLA = Humanes Leukozyten Antigen
 MDS = Myelodysplastisches Syndrom
 MUD = HLA-identischer nicht-verwandter Spender
 Sibl. = HLA-identischer Geschwister-Spender
 UD = Nicht vollständig HLA-identischer Spender

Nr.	Erkrankung	HLA-Status (Allele A/ B)	CMV-Status Empfänger/Spender	Transplantationsart	Untersuchung an Tag x nach Transplantation
1	AML	A2/26 B51/56	+ / +	MUD	91
2	ALL	A1/2 B13/58	+ / +	UD (B-Split-Mismatch)	90
3	AML	A2/29 B15/44	+ / +	Sibl.	87
4	AML	A1/2 B8/7	- / -	MUD	1.) 293 2.) 348 3.) 741
5	AML	A2/26 B7/60	- / -	MUD	1.) 262 2.) 318
6	Plasmozytom	A2/3 B7/51	- / -	MUD	259
7	ALL/sek. MDS	A1/2 B4/44	- / -	UD (DQB1-Mismatch)	31
8	AML	A2/68 B60/61	- / -	MUD	1.) 88 2.) 471 3.) 1035
9	AML	A2/3 B44/51	+ / +	MUD	135
10	Plasmozytom	A2/33 B35/50	+ / +	Sibl.	39
11	Plasmozytom	A2/11 B51/44	+ / -	MUD	149
12	Plasmozytom	A2/X B7/62	+ / +	MUD	1.) 35 2.) 522
13	Prä-B-ALL	A2/29 B44/X	+ / +	MUD	209
14	c-ALL mit Koexpression CD13/33/35	A2/24 B51/40	- / -	MUD	139
15	AML	A1/2 B8/15	+ / -	MUD	~ 100
16	CML	A2/2 B27/40	- / +	MUD	440
17	Plasmozytom	A1/23 B44/52	+ / +	MUD	672
18	AML	A25/68 B18/45	+ / -	MUD	139
19	AML	A68	+ / +	Haploident	388
20	Mammakarzinom	A30/68 B27/44	unbekannt	Keine	-

2.2 Geräte und Gebrauchsmaterialien

Brutschrank (Heraeus BBD 6220)	Kendro Laboratory Products, Osterode
Durchflußzytometer: FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
• CellQuest-Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
• Computer: Macintosh, OS X	Apple Computer, USA
Einfrierröhrchen (1,5 ml)	Greiner, Solingen
FACS-Röhrchen (5ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Röhrchen (15ml/50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Gene Quant II RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech, Freiburg
Kühlschränke:	
• -80°C	Sanyo, Japan
• -20°C / + 4°C	Liebherr, Ochsenhausen
LightCycler und Zubehör:	
• Computer: PII, Windows 95 NT	Hewlett Packard, USA
• LightCycler-Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
• LightCycler Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
• LightCycler Reaktionskapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
• LC Software Version 3.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikroskope:	
• Laborlux S	Leica, Bensheim
• Diavert	Leica, Bensheim
Magnetische Zellseparierung:	
• MACS MS ⁺ Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
• MACS Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
• Midi MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauer-Zählkammer	Assistent, Sondheim
Pipetten:	
• 10/100/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
• 5 ml	Corning Inc. , USA
• 10/25 ml	BD Labware, Frankreich

Pipettenspitzen (10/100/1000 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettierhilfe Hirschmann	Neolab Laborbedarf, Heidelberg
Probenröhrchen (0,5 ml)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Sterilbank Heraeus Herasafe	Kendro Laboratory Products, Osterode
Sterilfilter 0,20 µm	Sartorius, Göttingen
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
QIAshredder Columns	Qiagen, Hilden
Quarzküvette (5 mm Schichtdicke)	Hellma, Müllheim/Baden
Wasserbäder:	
• 37°C	GFL, Burgwedel
• 42°C/95°C	Memmert GmbH, Schwabach
Zellkulturplatten:	
• Cellstar (24 / 96 Well)	Greiner, Solingen
• MultiWell (6 Well)	BD/Falcon, Heidelberg
Zentrifugen:	
• Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
• Heraeus Biofuge 13	Kendro Laboratory Products, Osterode
• Heraeus Multifuge 3-S-R	Kendro Laboratory Products, Osterode
• IEC Centra GP8R	Thermo Life Sciences, Egelbach

2.3 Reagenzien

Biocoll Separating Solution	Biochrom KG, Berlin
Brefeldin A	Sigma, Deisenhofen
CD8 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
DMSO (Dimethylsulfoxid) 99,5%	Sigma, Deisenhofen
EDTA 0,5 M (pH 8)	BIO Whittaker, USA
Ethanol 100 %	Merck, Darmstadt
FACS-Antikörper	
• Isotyp – IgG _{1κ} / IgG _{2aκ}	Becton Dickinson, Heidelberg
• Anti – CD8 (FITC) IgG _{1κ}	Becton Dickinson, Heidelberg
• Anti – CD4 (PE) IgG _{1κ}	Becton Dickinson, Heidelberg
• Anti – CD3 (PerCp) IgG _{1κ}	Becton Dickinson, Heidelberg
• Anti – CD14 (PE) IgG _{2aκ}	Becton Dickinson, Heidelberg
• Anti – IFN-γ (PE) IgG _{1κ}	Pharmingen (BD), Heidelberg
• Anti – CD80 (PE) IgG _{1κ}	Pharmingen (BD), Heidelberg
• Anti – CD83 (PE) IgG _{1κ}	Pharmingen (BD), Heidelberg
• Anti – CD86 (PE) IgG _{1κ}	Pharmingen (BD), Heidelberg
• Anti – CD40 (PE) IgG _{1κ}	Pharmingen (BD), Heidelberg
• Anti – CD1a (FITC) IgG _{2aκ}	DAKO, Dänemark
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Safe/Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FCS	Sigma Cell Culture, USA
Formaldehyd 2%, neutral-gepuffert	Sigma, Deisenhofen
Gentamicinsulfat	Refobacin ® 80 mg; Merck, Darmstadt
Hanks` Bal Salt Solution	Gibco (Invitrogen Corp.), Karlsruhe
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	ICN Biomedicals, USA

Peptide

Herr Prof. Dr. Stefan Stevanović,
Interfakultäres Institut für Zellbiologie,
Abt. Immunologie, Universität Tübingen

HLA-A*0201 (Position)

- WT1_Human (126-134) RMFPNAPYL
- PR1_Human (169-177) VLQELNVTV
- M1.1_Human (950-958) STAPPVHNV
- pp65_HCMVA (495-503) NLVPMVATV
- RT_HIV (476-484) ILKEPVHGV

MUC1 Human HLA-A*68 (Position)

- P3473 (97-105) DVTSVPVTR
- P3475 (1100-1108) VVQLTLAFR
- P3482 (1218-1226) YVPPSSTDTR
- P3510 (1000-1008) DTP TTLASH
- P3511 (117-125) DVTSAPDNK
- P3512 (217-225) GVTSAPDTR
- P3513 (1116-1125) DVETQFNQYK
- P3514 (1062-1071) STDYYQELQR
- P3521 (1178-1187) LIALAVCQCR

MUC1 Human HLA-B*0702 (Position)

- P40001 (1095-1103) RPGSVVVQL
- P40003 (2-11) TPGTQSPFFL
- P40005 (7-15) SPFFLLLLL
- P40009 (1156-1164) VPGWGIALL
- P40010 (1060-1069) DPSTDYYQEL
- P40011 (352-361) APPAHGVTSA
- P40017 (227-235) SPGSTAPPA

MUC1 Human HLA-B*2705 (Position)

- P8506 (1107-1115) FREGTINVH
- P8507 (1186-1194) CRRKNYGQL
- P8512 (1070-1078) QRDISEMFL
- P3523 (1192-1200) GQLDIFPAR

MUC1 Human HLA-B*4402 (Position)

- P2132 (1126-1134) TEAASRYNL
- P2134 (1058-1066) LEDPSTDYY

PMA	Sigma, Deisenhofen
q-RT-PCR-Primer	TIB MOLBIOL, Berlin
• hu IFN γ – S	5'-gCATCCAAAAGAgTgTggAg
• hu IFN γ – 255	5'-gCAggCAggACAACCATTAC
q-RT-PCR-Sonden	TIB MOLBIOL, Berlin
• hu IFN γ LC	5'-TCCAAgTgATggCTgAACTgTCg
• hu IFN γ FL	5'-TCCAACgCAAAGCAATACATgAACTC
RPMI-1640 – Medium (+Glutamax)	Gibco (Invitrogen Corp.), Karlsruhe
Saponin	Roth, Karlsruhe
Tetramere/Pentamere (PE-konjugiert)	Proimmune, UK
• HLA-A68 – P3475	VVQLTLAFR
• HLA-A68 – P3511	DVTSAPDNK
• HLA-A2 - M1.1 (MUC1)	STAPPVHNV
Trypanblau 0,4 %	Gibco (Invitrogen Corp.), Karlsruhe
Zytokine:	
• GM-CSF	Leukine ®; Berlex, USA
• Interleukin 2	Proleukin ®; Chiron, USA
• Interleukin 4	R&D Systems, Wiesbaden
• TNF- α	R&D Systems, Wiesbaden

2.4 Verwendete Kits

LC FastStart DNA-Master Hyb Probes, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

LightCycler FastStart Enzyme	}	10 mM MgCl ₂ , dNTP-Mix (dUTP statt dTTP)
LightCycler FastStart Reaction Mix Hyb Probes		Taq-DNA-Polymerase
MgCl ₂ (25 mM)		
H ₂ O (PCR grade)		

LC-h-ALAS Housekeeping Gene Set, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

h-ALAS RNA-Standards

→ 10² – 10⁶ Kopien

h-ALAS Detection Mix

→ Primer / Hybridization Probes spezifisch für ALAS

MgCl₂ (25 mM)

H₂O (PCR grade)

RNeasy Mini Kit

Qiagen, Hilden

RLT-Lyse-Puffer

Guanidin-Thiocyanat, β-
Mercaptoethanol

RW1-Waschpuffer

Guanidin-Salz, Ethanol

RPE-Waschpuffer

RNase-freies Wasser

RNeasy mini columns

1st Strand cDNA Synthesis Kit (AMV) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

AMV Reverse Transkriptase	25 Units/ μ l
dNTP-Mix	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
MgCl ₂	25 mM
Oligo-p(dT) ₁₅ Primer	0,02 A ₂₆₀ units/ μ l (0,8 μ g/ μ l)
10X Reaction Buffer	100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,3
RNase Inhibitor	50 Units/ μ l
H ₂ O (Steril)	

2.5 Immunologische und zellbiologische Methoden

2.5.1 Stammlösungen

Die **Peptide** wurden als Lyophilisate vom Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abt. Immunologie, Universität Tübingen (Prof. Dr. Stefan Stevanović) bezogen, wo sie als Laborsynthesen nach Standard-Fmoc-Chemie mit anschließender Charakterisierung durch HPLC und Massenspektroskopie synthetisiert wurden. Die lyophilisierten Peptide wurden in DMSO zu einer Lösung von 10 mg/ml aufgenommen und mit Wasser auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt und aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80°C eingefroren und nach einmaligem Auftauen bei 4°C aufbewahrt.

PMA wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in DMSO angesetzt (Lagerung bei -20°C), vor Verwendung 1:20 mit Medium verdünnt und letztlich in einer Konzentration von 0,5 µg/ml in die Versuche eingesetzt.

Ionomycin wurde als Stammlösung von 1 mg/ml in DMSO angesetzt (Lagerung bei -20°C), vor Verwendung 1:10 mit dem Medium verdünnt und zusammen mit PMA in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt.

Brefeldin A wurde als Stammlösung von 5 mg/ml in Ethanol angesetzt (Lagerung bei 4°C), vor Verwendung 1:10 mit Medium verdünnt und in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

RPMI-Medium wurde zur Kontaminationsprophylaxe routinemäßig mit 100 µg/ml des Aminoglykosid-Antibiotikums Gentamicin (Refobacin®) versetzt.

FCS wurde 1 h bei 56°C hitzeinaktiviert, anschließend bei -20°C eingefroren und vor Verwendung durch Filter mit einer Porengröße von 0,20 µm sterilfiltriert.

2.5.2 PBMNC-Isolierung

Humane „Peripheral **B**lood **M**ononuclear **C**ells“ (PBMNC), die hauptsächlich aus Lymphozyten und Monozyten bestehen, können aus Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden. Der Gradient besteht aus einer Mischung des Kohlenhydrat-Polymers Ficoll™ und der iodhaltigen Verbindung Metrizamid. Über diesen wird verdünntes Blut geschichtet. Erythrozyten, polymorphkernige Leukozyten (z.B. Granulozyten) sind dichter als Monozyten und Lymphozyten und wandern zum Boden des Gradienten, während sich die mononukleären Zellen auf dem Gradienten als Bande ansammeln und als sogenannte „Interphase“ zwischen Serum und sedimentierten Zellen abgenommen werden können. Zur Zellisolierung wurden entweder 50 ml EDTA-Blut (von Patienten), Buffy Coats (erythrozytenabgereichertes Zellkonzentrat aus Blut) der Abteilung Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums, die aus Vollblutspenden freiwilliger gesunder Spender gewonnen wurden oder 50-200 ml Heparinblut von freiwilligen gesunden Spendern verwendet.

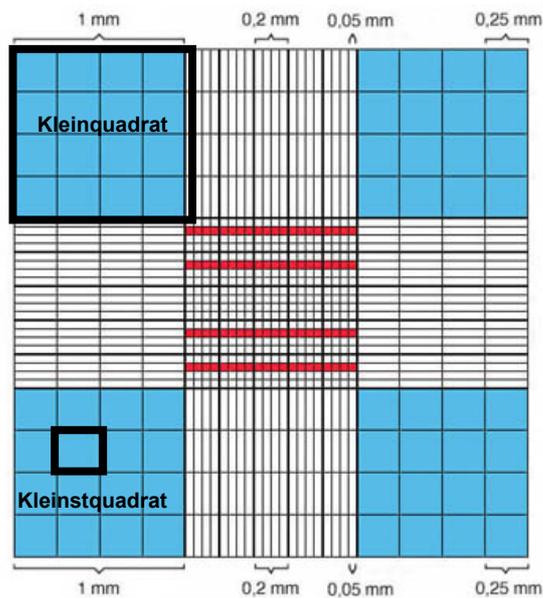
Durchführung:

Die Blutprobe wurde 1:1 mit „Hanks balanced salt solution“ (Hanks) verdünnt. In 50 ml Falcon-Tubes wurden je 20 ml Ficoll ($\rho=1,077$ g/ml) vorgelegt und mit verdünntem Blut überschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 2.000 rpm ohne Bremse wurden die Interphasen in frische Tubes überführt, mit Hanks gewaschen und 10 Minuten bei 1.300 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abdekantiert, das Pellet in Hanks aufgenommen und ein Aliquot ausgezählt.

2.5.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

20 μ l der Zellsuspension wurden mit 20 μ l des Farbstoffs Trypanblau verdünnt, der nur tote Zellen blau anfärbt. Bei PBMNC-Isolierung aus Buffy Coat (die erwartete Zellzahl liegt hier im Bereich von 10^8 bis 10^9) wurde davor nochmals

1:10 mit Hanks verdünnt. Die Probe wurde in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.



Bei der Neubauer-Zählkammer handelt es sich um einen Objektträger, auf dem zwei 3 x 3 mm große Zählnetze eingraviert wurden. Das Zählnetz setzt sich aus neun 1 x 1 mm messenden Kleinquadraten zusammen.

Zur Bestimmung der PBMNC wurden jeweils die Zellzahlen in den vier Kleinquadraten bestimmt, die aus jeweils 16 Kleinstquadraten bestehen und daraus der Mittelwert gebildet.

Abbildung 10 Neubauer-Zählkammer

Zur Leukozytenzählung werden die Zellen in den Kleinquadraten ausgezählt

Liegt das Deckglas satt auf, besteht zwischen Zählnetz und Deckglas ein Abstand von 0,1 mm (Kammertiefe). Das Volumen, das somit über den Quadraten des Zählnetzes liegt, entspricht bei einem Kleinquadrat $0,1 \mu\text{l}$ ($1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$).

Die Zellzahl eines Kleinquadrats entspricht also der Zellzahl in $0,1 \mu\text{l}$. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl müssen das Gesamtvolumen, die 1:1 Verdünnung durch Trypanblau und weitere eventuelle Verdünnungen berücksichtigt werden.

2.5.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden bei 1.300 rpm 10 Minuten pelletiert und anschließend in eiskaltem FCS (halbes Einfriervolumen) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf Eis gekühlt und mit dem selben Volumen RPMI/20% DMSO versetzt.

Nun wurde die Zellsuspension rasch in 1 ml Einfrierröhrchen verteilt. Diese wurden bei -80°C eingefroren. Es wurden maximal $5 \cdot 10^7$ Zellen pro Röhrchen eingesetzt.

2.5.5 Auftauen von Zellen

Das Einfrierröhrchen wurde aus dem -80°C -Gefrierschrank entnommen und ins 37°C -Wasserbad überführt. Sobald sich der Eisblock vom Röhrchen löste, wurde er sofort in 10 ml RPMI (Raumtemperatur) überführt und die Zellen bei 1.300 rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Auf diese Weise wurde das für die Zellen schädliche DMSO ausgewaschen. Die Zellen wurden noch einmal in RPMI gewaschen, in RPMI/10%FCS aufgenommen und ausgezählt.

2.5.6 Inkubation für „quantitative Real-Time - Polymerase-Kettenreaktion“

Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Um eine Erholung des Zellstoffwechsels vom Einfrier- und Auftauvorgang zu gewährleisten wurden die PBMNC in ca. 5 ml Medium (RPMI/10%FCS) über Nacht bei $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2/95\%$ Luftfeuchtigkeit im Brutschrank ohne weitere Zusätze inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen ausgezählt und in der zur gewünschten Konzentration notwendigen Menge Medium aufgenommen. Die Inkubationen für die „quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion“ (q-RT-PCR) wurden in 24-well-Zellkulturplatten durchgeführt, wobei pro well $2 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml RPMI/10% FCS eingesetzt wurde. In jedes well wurden anschließend die entsprechenden Mengen der bei den Ergebnissen jeweils aufgeführten Reagenzien eingesetzt.

2.5.7 Selektion von Zellpopulationen mit dem MACS-System

(Miltenyi *et al.* ,1990)

2.5.7.1 Positivselektion mit CD8 oder CD14-Microbeads

Hier werden CD8⁺ bzw. CD14⁺ T-Zellen durch Metall-gekoppelte Antikörper direkt markiert. Im magnetischen Feld der Trennsäule werden die mit Antikörper besetzten Zellen zurückgehalten. Die nicht gewünschten Zellen laufen durch die Säule und werden entweder verworfen oder zur Isolierung weiterer Zellpopulationen aufgefangen. Die Positivfraktion kann nach Entnahme der Säule aus dem Magneten als Positivfraktion eluiert werden.

Durchführung:

Nach Zählen der Zellen wurden diese bei 4°C/1.300 rpm 10 Minuten pelletiert und nach vollständigem Abnehmen des Überstands in 80 µl Hanks/2 mM EDTA/1% FCS pro 1·10⁷ Zellen aufgenommen. Anschließend wurden 20 µl pro 1·10⁷ Zellen Anti-CD8 bzw. CD14-Microbeads zugegeben, mit der Pipette gemischt und 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Jetzt wurde mit Hanks/2 mM EDTA/1% FCS auf ca. 20 ml aufgefüllt und die Zellen wie oben beschrieben abzentrifugiert. Währenddessen wurde eine MACS-MS⁺-Trennsäule in den Magneten (Midi MACS) eingesetzt und mit 3 ml kaltem Hanks/2 mM EDTA/1% FCS vorgespült. Der Überstand aus dem Zentrifugationsschritt wurde erneut vollständig abgenommen, das Pellet in 500 µl Hanks/2 mM EDTA/1% FCS aufgenommen und das gesamte Volumen auf die Säule gegeben. Nach dreimaligem Nachspülen mit je 3 ml Hanks/2 mM EDTA/1% FCS wurde die Säule aus dem Magneten genommen, die positiv selektierten Zellen mit dem mitgelieferten Stempel aus der Säule gedrückt und ein Aliquot ausgezählt. Die selektierten Zellen standen dann für weitere Versuche zur Verfügung.

2.5.8 Induktion Peptid-spezifischer CTL

2.5.8.1 **Generierung von Dendritischen Zellen**

Zunächst wurden Monozyten als CD14⁺-Zellen über das MACS-System aus etwa der Hälfte der gewonnenen PBMNC präpariert (siehe 2.5.2). Die 2. Hälfte wurde zur Verwendung als Feederzellen eingefroren. Aus der Negativfraktion der CD14-Selektion wurden mittels CD8-Positivselektion die zytotoxischen T-Zellen (CTL) aufgereinigt und für die anschließende Induktion bei -80°C kryokonserviert.

In einer 6-well-Platte wurden pro well 3·10⁶ Monozyten in 3 ml Medium angesetzt. Das Medium wurde mit den Zytokinen IL-4, GM-CSF und TNF- α analog Tabelle 3 ergänzt:

Tabelle 4 Mediumzusammensetzung bei der DC-Generierung

Medium	GM-CSF	IL-4	TNF- α
RPMI/10% FCS	100 ng/ml	20 ng/ml	10 ng/ml

Nach zwei Tagen Inkubation bei 37°C/5% CO₂/95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank wurde 1 ml des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Zytokinkonzentration wurde hierbei so gewählt, daß in 1 ml Austauschmedium die gesamte Menge der Zytokine enthalten war.

Nach 7-10 Tagen, während derer die Zellkultur täglich unter dem Mikroskop morphologisch beurteilt und auf Kontamination untersucht wurde, konnten die DC geerntet werden. Um deren Adhärenz zu vermindern, wurden die Zellkulturplatten zunächst etwa eine Stunde auf Eis gestellt. Anschließend wurde das komplette Medium unter mehrfachem Nachspülen abgenommen und ein Aliquot ausgezählt.

Je nachdem wie viele DC generiert werden konnten, wurden die nicht benötigten Zellen eingefroren (siehe 2.5.4). Die restlichen DC wurden zum

einen im FACS auf ihren Reifungszustand untersucht (siehe 2.6.1), zum anderen zum Ansatz der Induktion MUC1-spezifischer CTL verwendet.

2.5.8.2 Induktion MUC1-spezifischer CTL mittels peptidbeladener DC

$5 \cdot 10^5$ DC/well wurden in 1ml RPMI/10% FCS in einem 50 ml Falcon-Tube mit 50 $\mu\text{g/ml}$ des jeweiligen Peptids versetzt und 2 h im Brutschrank inkubiert („Pulsen“ der DC mit Peptid). Parallel wurden die autologen CD8^+ T-Zellen zur Induktion aufgetaut und gezählt. Anschließend wurden zu den gepulsten DC $3 \cdot 10^6$ CD8^+ T-Zellen hinzugefügt (Endvolumen 2 ml) und die Zellen in einer 24-well-Platte ausgesät. Nach 5 Tagen wurden der Induktion 30 U/ml IL-2 zugesetzt. Nach insgesamt 7 Tagen wurden die Zellen abgenommen und gezählt.

Zur Restimulation wurden autologe PBMNC als Feederzellen aufgetaut und mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Peptid über einen Zeitraum von 2 h gepulst. Da IL-2 als einer der potentesten T-Zellwachstumsfaktoren die T-Zellproliferation in den Feederzellen unspezifisch fördern würde und somit die spezifischen Zellen überwachsen werden könnten, wurden die Feederzellen mit einer Energiedosis von 30 Gy bestrahlt, um weitere Zellteilungen der Feederzellen zu verhindern. Anschließend wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen der Induktion mit $3 \cdot 10^6$ Peptid-beladenen Feederzellen und Zusatz von 30 U/ml IL-2 weiterkultiviert. Jeden 2.Tag wurde frisches Zytokin zugesetzt und die Zellen bei starkem Wachstum im Verhältnis 1:1 bis 1:2 unter Zusatz von neuem Medium gesplittet.

Dieser Restimulationszyklus wurde bis zu dreimal wiederholt. Abschließend wurden die Zellen abgenommen, gezählt und durchflußzytometrisch auf ihre Spezifität hin überprüft.

2.6 Durchflußzytometrische Methoden

Beim Durchflußzytometer werden die Zellen durch eine vibrierende Fliesskammer in Einzelzellsuspension gebracht und in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Photomultiplier messen die Streuung des Laserlichts. Die Vorwärtslichtstreuung (FSC) korreliert mit der Zellgröße, die seitliche Lichtstreuung (SSC, im 90° Winkel gemessen) mit der Granularität bzw. dem Kern-Plasma-Verhältnis der Zellen. So lassen sich große Zellen mit hoher Kern-Plasma-Relation und granuliertem Zytoplasma (Granulozyten) von kleinen Zellen mit hohem Kernanteil (Lymphozyten) unterscheiden. Monozyten zeigen ein intermediäres Verhalten.

Als weiterer Parameter in den so eingegrenzten Zellfraktionen kann die Fluoreszenz bestimmt werden. Es ist möglich gleichzeitig mehrere Antikörper einzusetzen, die gegen verschiedene Antigene gerichtet und an verschiedene Farbstoffe gekoppelt sind (z.B. FITC, PE und PerCP). Die Farbstoffe werden durch Laserlicht angeregt und zeigen verschiedene Fluoreszenzemissionsgipfel.

Die Messungen wurden gemäß den Bedienungsanleitungen der verwendeten Hard- und Software durchgeführt (FACS-Calibur Durchflußzytometer, Becton Dickinson). Bei Mehrfachfärbungen waren zunächst Kompensationseinstellungen an Kontrollproben notwendig.

Die Auswertung wurde mittels CellQuest- sowie CellQuestPro-Software von Becton Dickinson durchgeführt.

2.6.1 Zweifachfärbung von Dendritischen Zellen

Zur Analyse von Zellpopulationen auf eine Expression bestimmter Proteine auf ihrer Oberfläche (sog. „Oberflächenmarker“) können diese mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten, für das interessierende Oberflächenmolekül spezifischen Antikörpern markiert werden.

Durchführung:

$1 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden, nachdem sie 10 Minuten bei 1.300 rpm abzentrifugiert wurden, in 200 µl kaltem Hanks/10% FCS aufgenommen. Nach Zugabe von je 5 µl des jeweiligen Antikörpers wurde der Ansatz 30 Minuten lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde einmal mit kaltem Hanks/10% FCS, einmal mit Hanks/2% Formaldehyd gewaschen und die Zellen in 200 µl Hanks/2% Formaldehyd aufgenommen. Die so fixierten Zellen konnten bis zur Messung mehrere Tage abgedunkelt im Kühlschrank gelagert werden. Die Dendritischen Zellen wurden standardmäßig auf ihren Zustand nach der Kultivierung durch Färbung mit folgenden Antikörpern untersucht, wobei die Zellen für einen anschließenden Einsatz in der T-Zellinduktion die angegebene Oberflächenmarkerexpression erfüllen mussten:

Tabelle 5 Oberflächenantikörper zur Überprüfung des Phänotyps der generierten DC

CD1a (FITC)	+
CD14 (PE)	-
CD80 (PE)	+
CD83 (PE)	+
CD86 (PE)	+
CD40 (PE)	+

+ DC exprimieren diesen Marker

- Marker ist bei von DC negativ

2.6.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

(Prussin und Metcalfe, 1995)

Die Zytokinproduktion auf Ebene der einzelnen Zellen kann durchflußzytometrisch bestimmt werden. T-Zellen werden *in vitro* mit Antigen oder gepulsten APC stimuliert. Zusätzlich werden Substanzen zugegeben, die den Transport der Zytokine (und natürlich aller anderen sezernierten Proteine) über den Golgi-Apparat blockieren, wie zum Beispiel Monensin oder Brefeldin A. Die Zytokine häufen sich dementsprechend intrazellulär an. Nach Fixierung

und Permeabilisierung der Zellen wird direkt innerhalb der Zelle mit einem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten zytokinspezifischen Antikörper detektiert. Diese Methode zeigt eine Sensitivität bis zu 0,1 % aller CD3⁺/CD8⁺ bzw. CD3⁺/CD4⁺ Lymphozyten.

Durchführung:

5·10⁵-1·10⁶ Zellen pro Well wurden in 200 µl RPMI/10%FCS in einer 96-well Rundbodenplatte vorgelegt.

Falls Zelllinien nach mehreren Stimulationszyklen auf ihre Antigen-spezifische IFN-γ-Produktion untersucht werden sollten, wurde diesen das Antigen auf autologen Dendritischen Zellen präsentiert. Dazu wurden zunächst DC in einer Zelldichte von 1·10⁵/100 µl über einen Zeitraum von 2 h mit Peptid (10 µg/ml) beladen. Anschließend wurden 5·10⁵ CTL/100 µl hinzugegeben, so daß wiederum ein Endvolumen von 200 µl und ein Verhältnis DC : CTL = 1 : 5 erreicht wurden.

Folgende Ansätze waren für eine Versuchsreihe notwendig:

Tabelle 6 Inkubationsansätze zur Peptid-spezifischen IFN-γ-Bestimmung im ICCS

GeräteEinstellung (IgG)	-----	Brefeldin A 10 µg/ml
GeräteEinstellung (3/4/8)	-----	Brefeldin A 10 µg/ml
Positivkontrolle	PMA 0,5 µg/ml Ionomycin 1 µg/ml	Brefeldin A 10 µg/ml
Negativkontrolle	HIV-Peptid 10 µg/ml	Brefeldin A 10 µg/ml
Peptid (1,2,3 etc.)	In jedem Ansatz 10 µg/ml	Brefeldin A 10 µg/ml

Die Kulturplatte wurde über Nacht (16-18 Stunden) bei 37°C/5% CO₂/95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden je 5 µl Oberflächenmarkerantikörper zugegeben:

Tabelle 7 Zugabeschema der Oberflächenantikörper im ICCS

Geräteeinstellung (IgG)	IgG (PerCP)	IgG (FITC)	IgG (PE)
Geräteeinstellung (3/4/8)	CD3 (PerCP)	CD8 (FITC)	CD4 (PE)
Positivkontrolle	CD3 (PerCP)	CD8 (FITC)	-----
Negativkontrolle	CD3 (PerCP)	CD8 (FITC)	-----
Peptid (1,2,3 etc.)	CD3 (PerCP)	CD8 (FITC)	-----

Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C und fünfminütiger Zentrifugation bei 4°C/1.300 rpm wurde der Überstand abgenommen und die Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 100 µl Formaldehyd (2%)/well fixiert. Die Fixierung wurde durch Zugabe von 100 µl RPMI/10% FCS abgebrochen und der Überstand nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten/4°C/1.300 rpm) komplett abgenommen. Die Zellen wurden in 50 µl PBS/0,5 % Saponin/1 % FCS/well resuspendiert und je 1 µl IFN-γ-Antikörper zugegeben (siehe Schema).

Tabelle 8 Zugabeschema des IFN-γ -Antikörpers im ICCS

Geräteeinstellung (IgG)	-----
Geräteeinstellung (3/4/8)	-----
Positivkontrolle	+ 1 µl IFN-γ-Antikörper (PE)
Negativkontrolle	+ 1 µl IFN-γ-Antikörper (PE)
Peptid (1,2,3 etc.)	+ 1 µl IFN-γ-Antikörper (PE)

Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 4°C inkubiert und jedes well mit 150 µl PBS/0,5 % Saponin/1 % FCS aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation und Abnehmen des Überstands wurden die Zellen in 200 µl Formaldehyd (2%) pro well fixiert, in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung abgedeckt im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.6.3 Auswertung der intrazellulären Zytokinfärbungen

Die analysierte Zellpopulation wurde zunächst anhand des FSC und SSC auf die Lymphozyten eingeschränkt. Anschließend erfolgte eine erneute Limitierung auf CD3⁺/CD8⁺ Zellen. Eine Probe wurde dann als positiv gewertet, wenn die stimulierte Probe mehr als doppelt so viel spezifische T-Zellen (in % aller CD3⁺/CD8⁺ Zellen) wie die mit Kontrollpeptid stimulierte Negativkontrolle (Background) und über 0,10 % enthielt (Scheibenbogen *et al.*, 2002b).

2.6.4 Immunphänotypisierung mit MHC-Peptid-Tetrameren

(Altman *et al.*, 1996)

Lösliche Schwereketten von MHC-Klasse-I-Molekülen werden in *E. coli* exprimiert. Die Moleküle nehmen ihre Konformation erst nach Zugabe von β_2 -Mikroglobulin und einem synthetischen Peptid, welches das Epitop darstellt, das vom interessierenden TCR erkannt wird, an. Dieses Peptid ist in der Lage, an das MHC-Molekül zu binden. Zusätzlich wird das Enzym BirA dazu verwendet, ein Biotinmolekül an die spezifische BirA-Erkennungssequenz, die gentechnisch in den C-Terminus des MHC-Moleküls eingebaut wurde, zu koppeln. Vier MHC-Biotin-Komplexe binden an ein Streptavidin-Molekül, wobei die spezifische Biotin-Avidin-Wechselwirkung dazu verwendet wird ein Tetramer zu bilden. Das Streptavidin-Molekül ist mit einem Fluorochrom (z.B. PE) gekoppelt.

Die Tetramere und die Zellen werden miteinander vermischt. Nur solche T-Zellen, die T-Zell-Rezeptoren besitzen, die in der Lage sind, die im vorliegende MHC-Peptid-Kombination der Tetramers zu erkennen, können dieses binden. Die T-Zellen werden zumeist parallel mit einem oder mehreren Antikörpern gegen Oberflächenmarker, die für zytotoxische T-Zellen spezifisch sind, angefärbt (z.B. CD3, CD8).

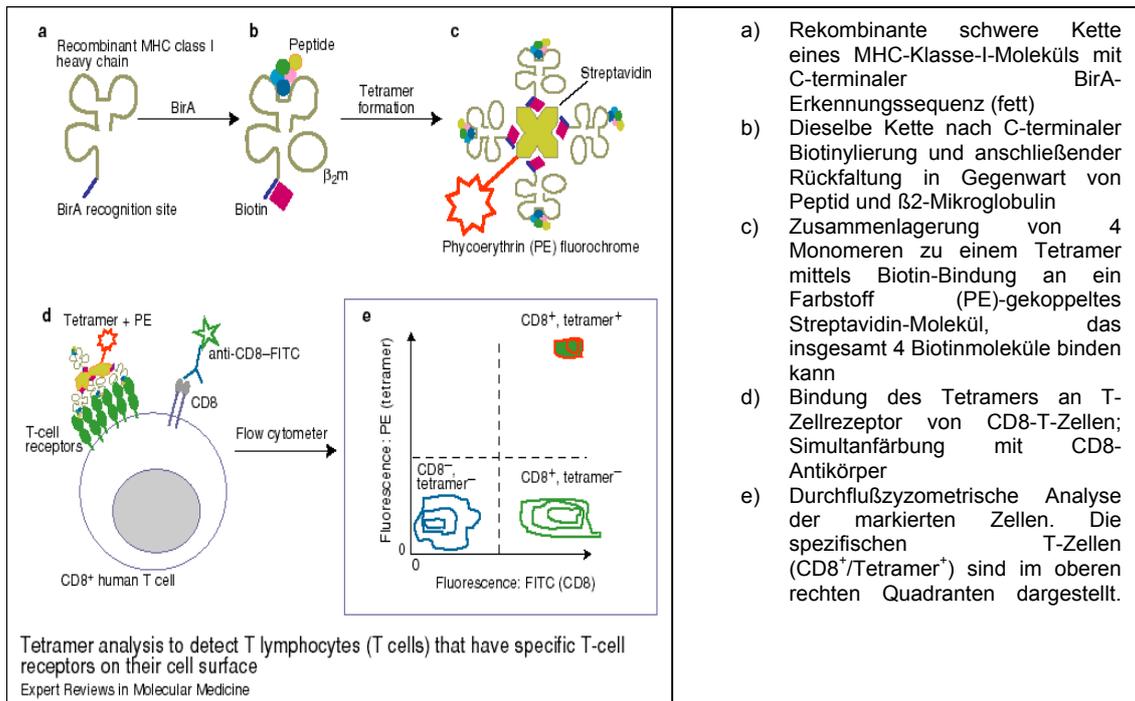


Abbildung 11 Prinzip der Immunphänotypisierung mit MHC-Peptid-Tetrameren

(aus: „Expert Reviews in Molecular Medicine“
www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/jhc/fig004jhc.htm)

Mit dieser Methode können bis zu einer Grenze von 0,1 % spezifische T-Zellen nachgewiesen werden, d. h. eine antigenspezifische T-Zelle kann unter 1000 anderen detektiert werden. In der Regel werden hierzu mindestens $1 \cdot 10^5$ Zellen im Durchflußzytometer gezählt

Durchführung:

Je $5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen/Ansatz wurden in 500 μ l Hanks/10% FCS (37°C) in einem FACS-Röhrchen vorgelegt.

Tabelle 9 Versuchsansätze bei der Tetramer-Analyse

Geräteeinstellung (IgG)	-----
Geräteeinstellung (3/4/8)	-----
Tetramer	+ 1 μ l Tetramer (PE-konjugiert)

Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C wurde einmal mit 2 ml Hanks/10% FCS (37°) gewaschen, 10 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 200 µl kaltem Hanks/10% FCS aufgenommen. Anschließend wurden je 5 µl der jeweiligen Oberflächen-Antikörper zugegeben.

Tabelle 10 Zugabeschema der Oberflächenantikörper in der Tetramer-Analyse

Geräteeinstellung (IgG)	IgG (FITC)	IgG (PE)	IgG (PerCP)
Geräteeinstellung (3/4/8)	CD8 (FITC)	CD4 (PE)	CD3 (PerCP)
Tetramer	CD8 (FITC)	-----	CD3 (PerCP)

Nun wurde erneut für 15 Minuten inkubiert, diesmal bei 4°C auf Eis und anschließend einmal mit kaltem Hanks/10% FCS, sowie einmal in 1% Formaldehyd gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 100 µl Hanks/10% FCS/1-2% Formaldehyd aufgenommen und bis zur Messung lichtgeschützt und kühl gelagert.

Anmerkung:

Seit Beginn des Jahres 2004 waren von der Firma Proimmune keine Tetramere mehr erhältlich, sondern es wird eine Weiterentwicklung des Tests in Form von MHC-Pentameren angeboten. Die Vorgehensweise ist dieselbe wie bei der Tetramerfärbung bis auf den Unterschied, daß vom Testreagenz in der Pentamerfärbung 10 µl (anstatt 1 µl des Tetramers) eingesetzt werden.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus PBMNC erfolgte mittels des RNeasy-Mini-Kits (Qiagen) laut Protokoll des Herstellers. Das Verfahren bedient sich der Bindung von RNA an eine Silica-Matrix in einer Mini-Säule. Diese Technik erlaubt eine Isolierung und Durchführung von Waschschritten in kürzester Zeit.

Durchführung:

Die Zellen (maximal $5 \cdot 10^6$ PBMNC) wurden 5 Minuten bei 5.400 rpm zentrifugiert und dadurch pelletiert. Der Überstand musste nun vollständig abgenommen werden, da ansonsten die anschließende Lyse der Zellen durch zurückbleibende Reste des Zellkulturmediums hätte beeinträchtigt werden können.

Das Pellet wurde in 350 μ l RLT-Puffer aufgenommen und gemischt. Dies führte zur Lyse der Zellmembran. Anschließend wurde die Probe auf QIAshredder-Säulchen gegeben und zwei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, womit sie homogenisiert wurde. Durch Zugabe von 350 μ l 70%igen Ethanols und gutes Mischen wurden Bedingungen geschaffen, unter denen die RNA an „RNeasy mini columns“ binden kann, auf die diese Mischung überführt und 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert wird. Die gebundene RNA wurde einmal mit 700 μ l RW1-Waschpuffer und zweimal mit je 500 μ l RPE-Waschpuffer gewaschen, wobei zwischen den einzelnen Waschschritten jeweils 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule durch zweiminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm getrocknet, das Säulchen auf ein neues Tube überführt und durch nochmalige Zentrifugation bei 10.000 rpm zwei Minuten von letzten Pufferresten befreit. Die RNA wurde anschließend in 30 μ l RNase-freies Wasser eluiert (1 Minute Zentrifugation bei 10.000 rpm) und bei -80°C eingefroren.

2.7.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, da in diesem Bereich die heterozyklischen Basen aromatische ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergänge aufweisen. Dies macht man sich für die Konzentrationsbestimmung der RNA zunutze:

Eine wässrige Lösung, die bei 260 nm eine Absorption von 1 aufweist, besitzt eine RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Darüber hinaus kann aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ein Rückschluss auf die Reinheit der RNA gezogen werden. Saubere RNA besitzt ein Verhältnis $A(260\text{nm})/A(280\text{nm})$, die sogenannte „Ratio“, von 1,9-2,1 (Sambrook *et al.* 1989).

2.7.3 Reverse Transkription

Die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA erfolgte mit dem „1st Strand cDNA Synthesis Kit“ von Roche gemäß angegebenem Protokoll:

Fast alle mRNA's weisen an ihrem 3'-Ende eine Folge von vielen AMP-Resten auf (den sog. „Poly-A-Schwanz“. An diesen binden die für die Umschreibung verwendeten Oligo-dT-Primer. Nach Primer-Annealing kann die AMV-Reverse-Transkriptase an deren Enden angreifen und die RNA in einen Einzelstrang cDNA übersetzen.

Durchführung:

Pro Versuchsreihe wurde jeweils eine konstante Menge RNA eingesetzt, die von der Qualität und Menge der isolierten RNA abhing. In der Regel waren dies 0,2 bis 1 μg . Diese befanden sich in einem Endvolumen von 8 μl . Eventuell nötige Ergänzungen auf dieses Volumen, wenn sich die RNA in einem kleineren Volumen befand, erfolgte mit RNase-freiem Wasser. Anschließend wurden 2,2 μl Oligo-dT-Primer (entspricht 1,76 μg) zugegeben. Durch zehnmünütige Inkubation bei 65°C im Heizblock wurde die RNA denaturiert und die Primer

konnten an das Template anlagern. Die Proben wurden dann 5 Minuten auf Eis gekühlt, bevor 9,8 µl des Mastermix zugegeben wurden. Dieser setzte sich folgendermaßen zusammen (für eine Probe):

Tabelle 11 Mastermix für 1 Ansatz (1X) der Reversen Transkription

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
10 X Reaction Buffer	2,0 µl	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	4,0 µl	5 mM
dNTPs (10 mM)	2,0 µl	1 mM
RNase-Inhibitor (50 Units/µl)	1,0 µl	50 Units
AMV-RT (25 Units/µl)	0,8 µl	20 Units

Die Umschreibung erfolgte mittels einstündiger Inkubation bei 42°C im Wasserbad. Danach wurde die Reverse Transkriptase bei 95°C 5 Minuten denaturiert und die Probe für 5 Minuten auf Eis gekühlt.

Die cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

2.7.4 Quantitative Real-Time PCR (q-RT-PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden auf dem LightCycler-Instrument der Firma Roche durchgeführt: Einer der größten Vorteile, den dieses System im Vergleich zu konventionellen Thermo Cyclern bietet, ist die Möglichkeit, die Reaktion kontinuierlich am Bildschirm verfolgen zu können und dadurch auch eine Quantifizierung der PCR-Ergebnisse durchführen zu können.

Bei einer konventionellen PCR werden zu einer Quantifizierung der Reaktion entweder viele verschiedene Probenansätze oder eine Entnahme von Aliquots nach bestimmten Zeitintervallen benötigt.

Das Amplifikat wird in diesem Fall mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Ethidiumbromid-Färbung oder per Southern Blot identifiziert. Dies erfordert in jedem Fall einen höheren Arbeits- und Zeitaufwand als das mit dem LightCycler mögliche kontinuierliche Monitoring der Reaktion.



Abbildung 12 Markierung der LC-Sonden

(www.lightcycler-online.com)

Das eingesetzte Detektionssystem beruht auf kontinuierlicher Fluoreszenzmessung während der Reaktion:

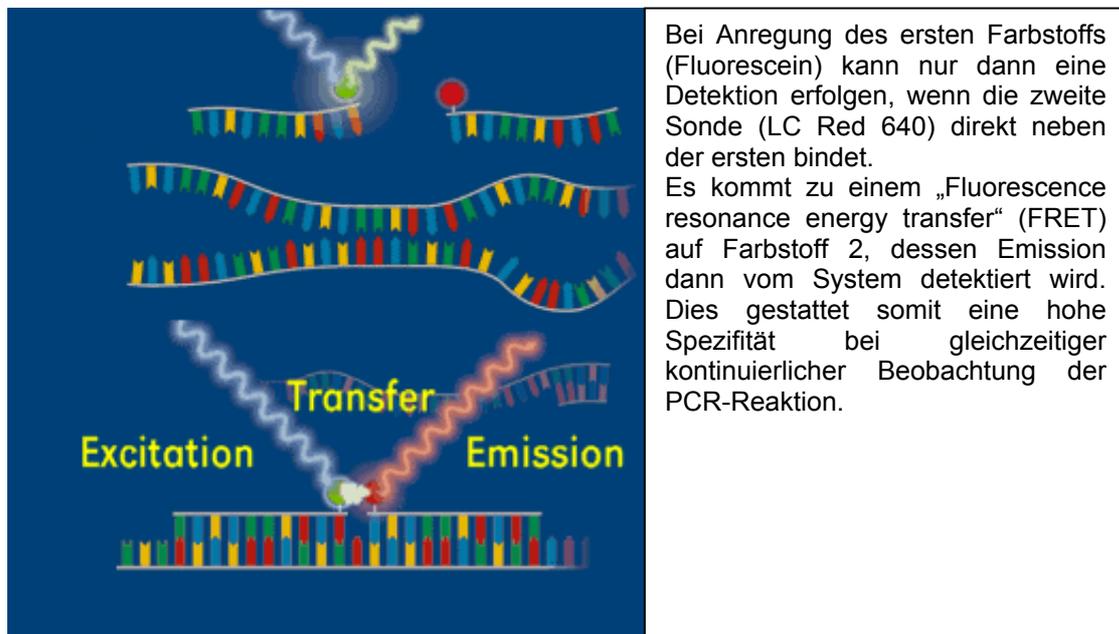


Abbildung 13 Amplifikatdetektion beim LC

(www.lightcycler-online.com)

Durchführung:

Die Reaktion findet in LightCycler-Glaskapillaren statt, die ein Volumen von 20 µl aufnehmen können. Diese wurden in einem Kühlblock vorbereitet und darin je 2 µl der interessierenden cDNA und 8 µl Wasser (steril, PCR-grade) vorgelegt. Von den jeweiligen Standardlösungen mit bekannter Kopienzahl wurden 10 µl eingesetzt.

Der LightCycler-Mastermix muss unter sterilen Bedingungen (Mundschutz, Handschuhe) vorbereitet werden. Pro Ansatz wurden folgende Komponenten benötigt, die bis auf Primer und Sonden Bestandteil des „LC FastStart DNA-Master Hybridization Probes“-Kit der Firma Roche sind. Die 10x-konzentrierte Taq-Polymerase enthält bereits eine MgCl₂-Konzentration von 10 mM. Auf die gewünschte Endkonzentration wurde durch Zugabe der separaten 25 mM MgCl₂-Stammlösung eingestellt.

Tabelle 12 Mastermix für 1 Ansatz (1X) IFN- γ -q-RT-PCR:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O (PCR-grade)	2,6 μ l	-
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 μ l	4 mM
Primer 1 (5 μ M)	0,5 μ l	0,125 μ M
Primer 2 (5 μ M)	0,5 μ l	0,125 μ M
Sonde 1 (3 μ M)	1,0 μ l	0,15 μ M
Sonde 2 (3 μ M)	1,0 μ l	0,15 μ M
Taq-Mix (10 X)	2,0 μ l	1 X

Zur Normalisierung der ermittelten Kopienzahlen wurde das von der Firma Roche kommerziell erhältliche „LightCycler-h-ALAS Housekeeping Gene Set“ verwendet. Die darin enthaltenen RNA-Standards wurden mittels Oligo-dT-Priming in cDNA umgeschrieben und in einem Endvolumen von 10 μ l/Kapillare eingesetzt. Die unbekanntenen Proben wurden analog den Ansätzen der IFN- γ -PCR (2 μ l cDNA + 8 μ l Wasser/Kapillare) eingesetzt. Auf diese Weise wurden in einem separaten LightCycler-Lauf die Kopienzahlen des Housekeeping Gens bestimmt.

Tabelle 13 Mastermix für 1 Ansatz (1X) ALAS-q-RT-PCR:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O (PCR-grade)	3,6 µl	-
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl	4 mM
Detection Mix (10 X)	2,0 µl	1 X
Taq-Mix (10 X)	2,0 µl	1 X

Zur vorgelegten DNA wurden 10 µl des jeweiligen Mastermix zugegeben, die Kapillaren ins LightCycler-Karussell eingesetzt und die Reaktionsmischung in den Kapillaren herunterzentrifugiert (LightCycler Carousel Centrifuge).

Tabelle 14 LightCycler-PCR-Programm für IFN- γ -q-RT-PCR

10 Minuten	95°C	Vorinkubation Dies ist notwendig, da es sich beim verwendeten Enzym um eine sogenannte „Hot Start“-Polymerase handelt, die durch einen Inhibitor im aktiven Zentrum blockiert ist und somit eine unspezifische Amplifikation vor Beginn der eigentlichen PCR verhindert. Bei 95°C schmilzt dieser ab.	
10 Sekunden	95°C	Strangtrennung	45 Zyklen
10 Sekunden	54°C	Primer-Annealing	
25 Sekunden	72°C	Elongation	
		Schmelzkurven-Analyse (kontinuierliche Fluoreszenzerfassung bei einem linearen Temperaturanstieg (0,2°C/s) von 50°C → 95°C)	
3 Minuten	40°C	Kühlung	

Für das ALAS-Housekeeping-Gen wurde ein alternatives Protokoll nach Empfehlung der Firma Roche verwendet:

Tabelle 15 LightCycler-PCR-Programm für h-ALAS-q-RT-PCR

10 Minuten	95°C	Vorinkubation	
10 Sekunden	95°C	Strangtrennung	45 Zyklen
15 Sekunden	55°C	Primer-Annealing	
15 Sekunden	72°C	Elongation	
		Schmelzkurven-Analyse (kontinuierliche Fluoreszenzerfassung bei einem linearen Temperaturanstieg (0,2°C/s) von 50°C → 95°C)	
3 Minuten	40°C	Kühlung	

2.7.5 Auswertung der q-RT-PCR-Experimente

Die IFN- γ -Expression wurde am LightCycler-Instrument der Firma Roche unter Mitführung eines externen Standards quantifiziert. Diese Standards wurden in der Arbeitsgruppe etabliert und validiert (Loeffler *et al.*, 2003). Die Primer sind so gewählt, daß sie Spleißstellen überspannen und somit eine Amplifikation eventuell kontaminierender genomischer DNA verhindert wird. Um die Hintergrund-Expression des untersuchten Zytokins IFN- γ durch PBMNC in der Negativkontrolle, sowie die Variabilität zwischen den verschiedenen Durchführungen der q-RT-PCR und Unterschiede der eingesetzten RNA-Mengen in verschiedenen Versuchsreihen zu berücksichtigen, wurden sämtliche Kopienzahlen auf die Kopienzahl der δ -Aminolävulinatsynthase ALAS (EC.2.3.1.37) als konstant exprimiertes Housekeeping Gen (Bishop *et al.*, 1990) normalisiert (Normalisierung der IFN- γ -Kopienzahl auf 10^5 Kopien ALAS): Die absoluten Kopienzahlen wurden dabei nach folgender Formel auf das Housekeeping Gen normalisiert:

$$Kopienzahl_{normalisiert}^{IFN-\gamma} = \frac{Kopienzahl_{absolut}^{IFN-\gamma}}{Kopienzahl_{absolut}^{ALAS}} \cdot 10^5$$

Anschließend erfolgte eine Relativierung auf die Kopienzahl nach Stimulation mit dem Kontrollpeptid ILKEPVHGV aus der Reversen Transkriptase von HIV und eine Angabe des Ergebnisses als relative Kopienzahlen:

$$Kopienzahl_{relativ}^{IFN-\gamma} = \frac{Kopienzahl_{normalisiert}^{IFN-\gamma} (\text{getestetes_Peptid})}{Kopienzahl_{normalisiert}^{IFN-\gamma} (\text{HIV - Peptid})}$$

Ein Ergebnis wurde dann als positiv gewertet, wenn nach Stimulation mit dem interessierenden Peptid die relative Kopienzahl im Vergleich zur Negativkontrolle auf einen Wert größer 2 anstieg (in Anlehnung an Kammula *et al.*, 1999; Rezvani *et al.*, 2003). Auf diese Weise wurden sämtliche Stimulationsexperimente nach Analyse durch q-RT-PCR ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Definition neuer MHC-Klasse-I-Epitope aus dem Tumor-assoziierten Antigen MUC1

3.1.1 Vorhersage von MUC1-Epitopen durch Screening auf MHC-Klasse-I-Bindungsmotive

Die Definition neuer MHC-Klasse-I-Peptidepitope aus dem Antigen MUC1 erfolgte nach dem Prinzip der „Reverse Immunology“ (Celis *et al.*, 1994). Hierbei wurde zunächst die Proteinsequenz von MUC1 (Swissprot-No. P15941; www.pubmed.com, siehe Kapitel 6: Anhang) mittels des Vorhersageprogramms SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) auf Basis von Klasse-I-Bindungsalgorithmen für die Allele HLA-A*68, HLA-B*0702, HLA-B*2705 und HLA-B*4402 gescreent (nach Rammensee *et al.*, 1999). Dieses Programm ordnet jedem Peptid eine Wertigkeit („Score“) zu, die auf verschiedenen Faktoren wie beispielsweise dem betreffenden HLA-Allel und daraus resultierenden „Peptidmotiven“ (Falk *et al.*, 1991) beruht und die eine Graduierung der Bindungswahrscheinlichkeit am betreffenden HLA-Molekül widerspiegelt. Die folgenden Peptide wurden vom Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, Abteilung Immunologie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Stevanović) vorhergesagt, nach Standard-Fmoc-Chemie synthetisiert und mittels HPLC und anschließender Massenspektroskopie in ihrer Sequenz verifiziert.

Tabelle 16 Vorhergesagte MUC1-Peptide HLA-B*4402

Nr.	Position	Sequenz	Score (nach SYFPEITHI)
P2132	1126-1134	TEAASRYNL	21
P2134	1058-1066	LEDPSTDYY	25

Tabelle 17 Vorhergesagte MUC1-Peptide HLA-A*68

Nr.	Position	Sequenz	Score (nach SYFPEITHI)
P3473	97-105	DVTSVPVTR	26
P3475	1100-1108	VVQLTLAFR	26
P3482	1218-1226	YVPPSSTDR	21
P3510	1000-1008	DTP TTLASH	20
P3511	117-125	DVTSAPDNK	20
P3512	217-225	GVTSAPDTR	18
P3513	1116-1125	DVETQFNQYK	12
P3514	1062-1071	STDYYQELQR	7
P3521	1178-1187	LIALAVCQCR	7

Tabelle 18 Vorhergesagte MUC1-Peptide HLA-B*0702

Nr.	Position	Sequenz	Score (nach SYFPEITHI)
P40001	1095-1103	RPGSVVQL	25
P40003	2-11	TPGTQSPFFL	22
P40005	7-15	SPFFLLLLL	22
P40009	1156-1164	VPGWGIALL	22
P40010	1060-1069	DPSTDYYQEL	22
P40011	352-361	APPAHGV TSA	21
P40017	227-235	SPGSTAPPA	21

Tabelle 19 Vorhergesagte MUC1-Peptide HLA-B*2705

Nr.	Position	Sequenz	Score (nach SYFPEITHI)
P8506	1107-1115	FREGTINVH	25
P8507	1186-1194	CRRKNYGQL	23
P8512	1070-1078	QRDISEMFL	22
P3523	1192-1200	GQLDIFPAR	17

3.1.2 Erkennung der vorhergesagten Epitope durch zytotoxische T-Zellen - Allgemeines

Zunächst wurden die vorhergesagten Peptide zur Stimulation von PBMNC aus gesunden Spendern oder Patienten nach allogener Stammzelltransplantation direkt *ex vivo* herangezogen, um eine durch das jeweilige Peptid spezifisch stimulierbare T-Zellpopulation zu detektieren. Da sehr viele Peptide für die verschiedenen Allele vorhergesagt werden konnten, wurden 1-3 Peptide pro Ansatz zur Stimulation verwendet und nach eventueller Positivreaktion in einem zweiten Versuch einzeln getestet. Zusätzlich wurde versucht, in Spendern, die keine direkte *ex vivo* Reaktivität auf Stimulation mit den vorhergesagten Peptiden zeigten, MUC1-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu induzieren. Dies erfolgte mit Hilfe Peptid-gepulster Dendritischer Zellen (DC), wobei die Peptid-Spezifität nach den Stimulationszyklen erneut mittels eines intrazellulären IFN- γ -Nachweises untersucht wurde.

3.1.3 Erkennung der vorhergesagten Epitope durch zytotoxische T-Zellen – HLA-B*4402

3.1.3.1 Direkter *ex vivo*-Test

PBMNC von vier Spendern wurden auf ein Vorkommen einer direkt *ex vivo* nachweisbaren HLA-B*4402 restringierten MUC1-spezifischen T-Zellantwort

untersucht. Es wurden PBMC von drei gesunden Spendern (HD1, HD2, HD3), sowie eines Plasmozytom-Patienten (Patient 17) nach allogener Stammzelltransplantation und eines Patienten mit Mammakarzinom (Patient 20) untersucht.

Bei keinem der gesunden Spender konnte eine Peptid-spezifische IFN- γ -Produktion detektiert werden. Exemplarisch sind die Ergebnisse eines Experiments dargestellt.

HD 1

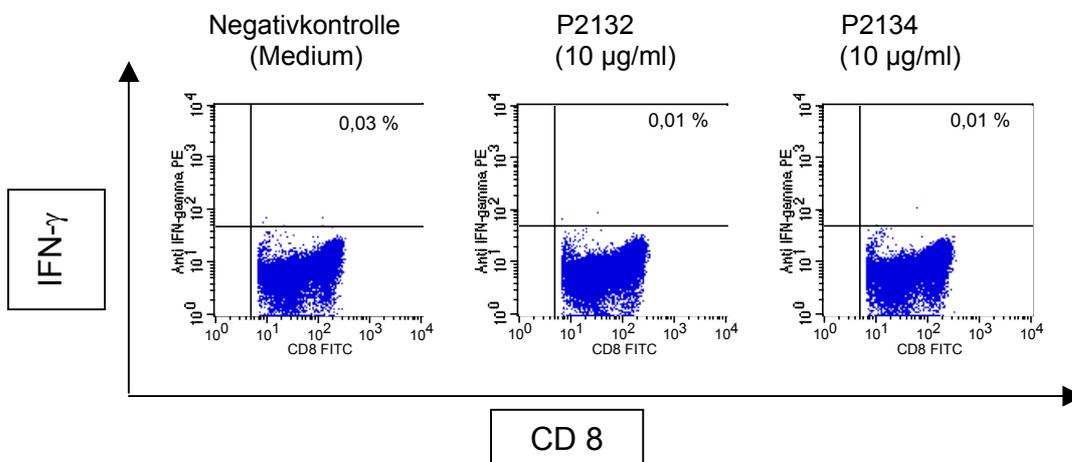


Abbildung 14 Intrazelluläre IFN- γ -Färbung direkt *ex vivo* (HD 1)

nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden

Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

Patient 17 (Plasmozytom)

Aufgrund von Therapierefraktärität nach zweifacher Hochdosischemotherapie mit anschließendem autologem Stammzelltransfer wurde bei diesem Patienten eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt. Im Rahmen der weiteren Behandlung erhielt der Patient mehrere Gaben von Donorlymphozyteninfusionen (DLI). Die vorliegende Blutprobe war etwa 12 Wochen nach der 4. DLI entnommen worden. Klinisch gesehen befand sich der Patient zu diesem Zeitpunkt in gutem Allgemeinzustand. In der intrazellulären

IFN- γ -Färbung konnte eine Reaktion auf Stimulation mit Peptid 2132 (TEAASRYNL) nachgewiesen werden, dessen Spezifität durch Mitführung von P2134 (LEDPSTDYY) als „sekundäre Negativkontrolle“ gezeigt wurde.

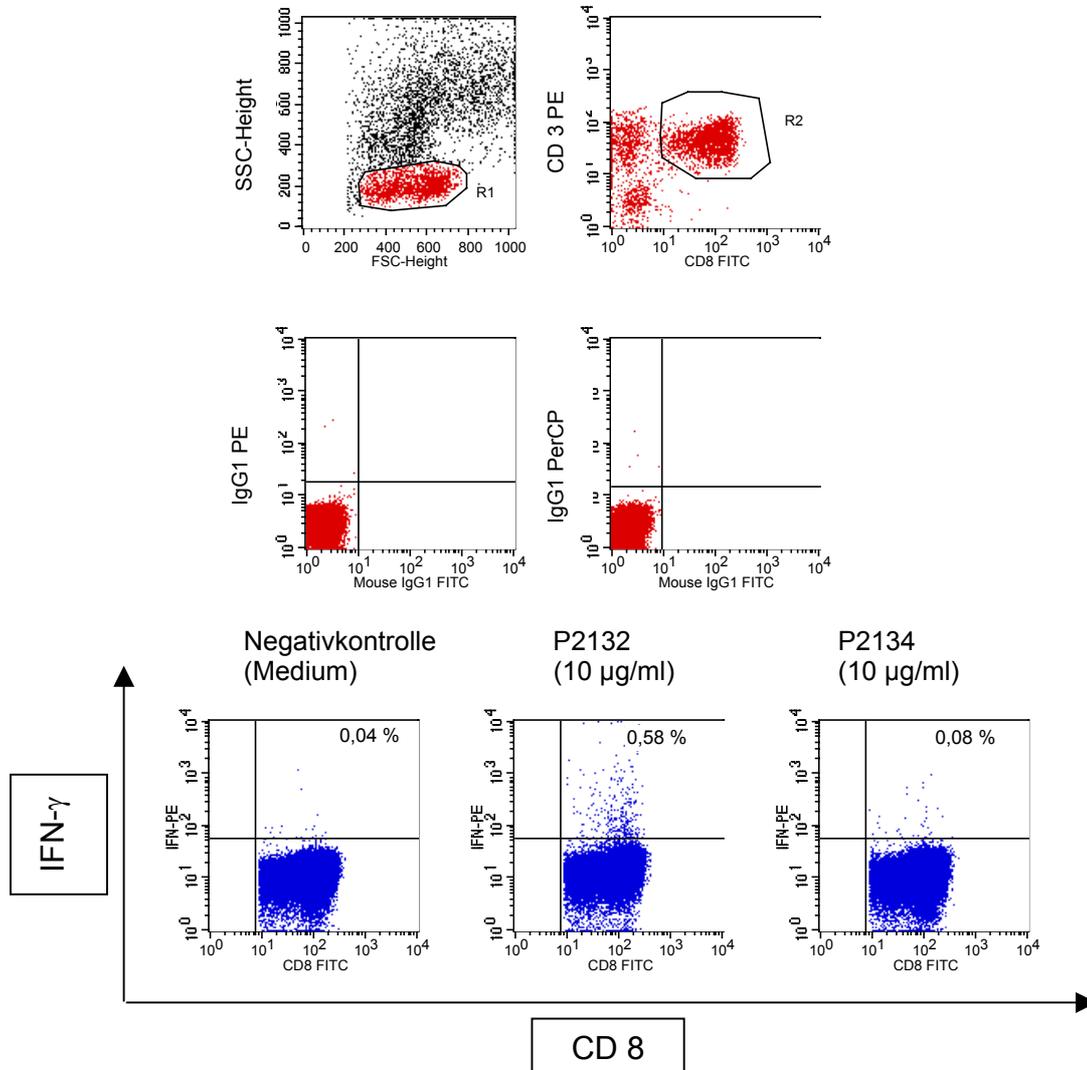


Abbildung 15 Intrazell. IFN- γ -Färbung direkt *ex vivo* (Patient 17, Tag 672 n. Transplantation) nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden

Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

3.1.3.2 Induktion MUC1-spezifischer T-Zellen für das Epitop P2132

HD 2

Nachdem für das Peptid P2132 eine spezifische Erkennung durch CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen im Falle von Patient 17 nachgewiesen werden konnte, sollte im nächsten Schritt versucht werden, eine T-Zellantwort in vorher negativ getesteten gesunden Spendern zu generieren.

Exemplarisch sollen am Beispiel dieses Spenders die durchflußzytometrischen Untersuchungen der Ausgangszellpopulationen (CD8-selektierte T-Zellen und DC) für die T-Zellinduktion demonstriert werden.

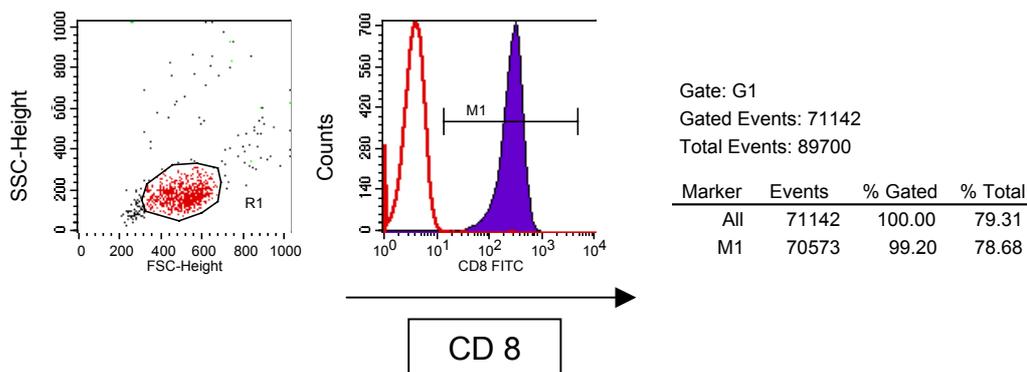


Abbildung 16 Reinheit der CD8-Zellen nach Positivselektion (HD 2)

In der Regel wurden mit der CD8-Positivselektion über das Miltenyi-System (siehe 2.5.7.1) Reinheiten von ca. 80 % aller gezählten Events und >95% aller enthaltenen Lymphozyten erreicht und somit eine wesentliche Anreicherung für die anschließende Induktion MUC1-spezifischer T-Zellen erzielt.

Die zum Zwecke der CTL-Induktion generierten DC zeigten in der Regel eine Expression typischer DC-Marker wie CD1a, der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40 und des Reifungsmarkers CD83. Der Monozytenmarker CD14 war nicht mehr oder nur noch in geringem Maße nachzuweisen.

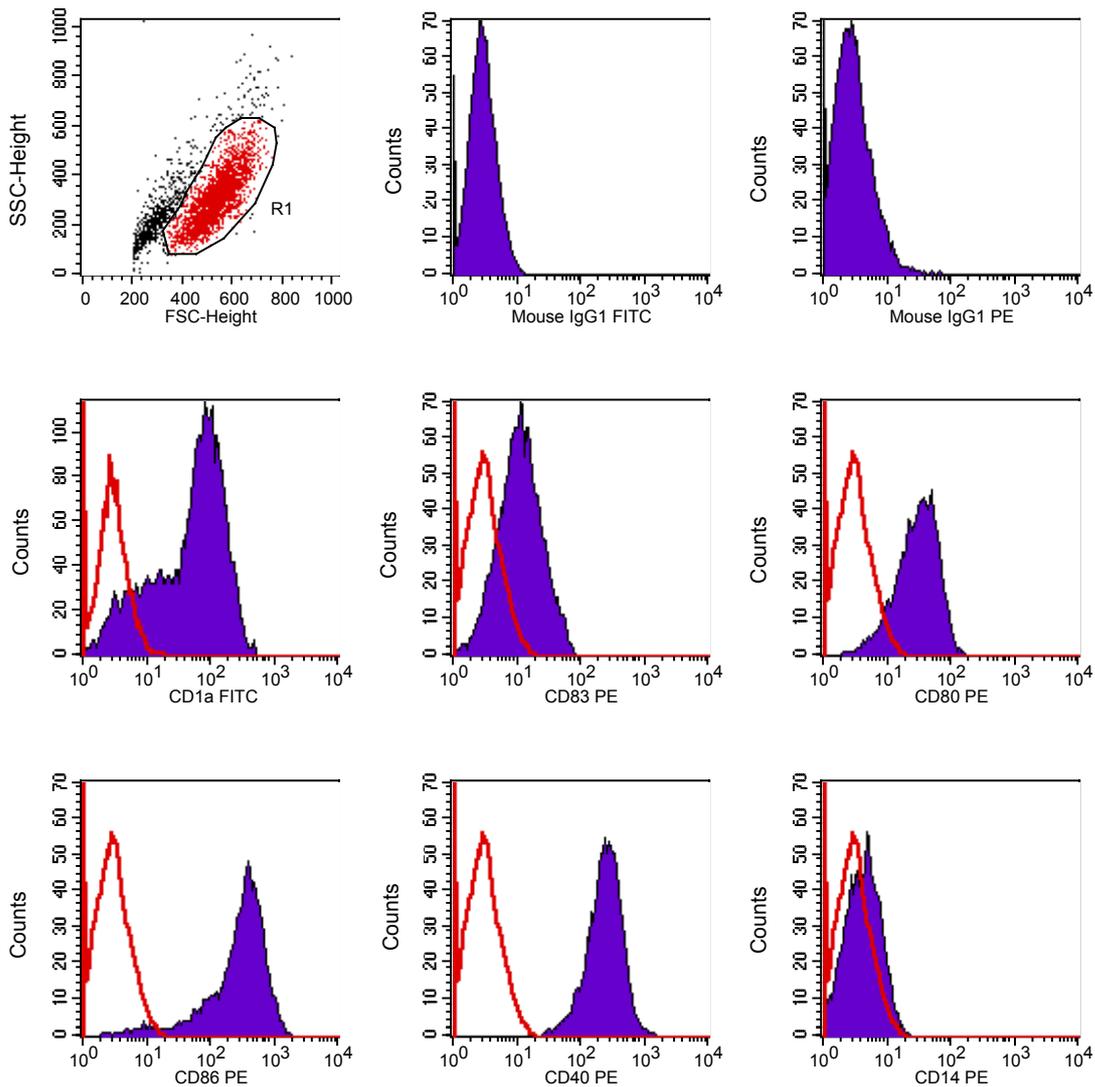


Abbildung 17 Aus CD14-positiv-selektierten Monozyten generierte Dendritische Zellen (DC) nach 10 Tagen Kultur (HD2)

Als nicht gefüllte Kurve ist die Isotypenkontrolle (Negativkontrolle) dargestellt, als ausgefüllte Kurve der gegen das jeweils angegebene Antigen gerichtete Antikörper

Nachdem bei den Spendern HD1, HD2 und HD3 keine direkte *ex vivo* IFN- γ -Produktion (s.o.) nach Stimulation mit den vorhergesagten HLA-B*4402-Peptiden erfolgte, konnte nach einwöchiger Induktion mit autologen Peptid-gepulsten Dendritischen Zellen und anschließender Restimulation mit Peptid-gepulsten autologen PBMC eine Population IFN- γ -produzierender CD3⁺/CD8⁺ Zellen nach Restimulation mit dem Peptid P2132 nachgewiesen werden. Um

die Spezifität dieser IFN- γ -Produktion zu verifizieren, wurde als Negativkontrolle das Peptid P2134, das nicht für die Induktion verwendet wurde, herangezogen. Die nach 14 Tagen nachgewiesenen spezifischen T-Zellen konnten zwar weiterhin nach 21 bzw. 30 Tagen detektiert werden, jedoch war trotz Zunahme der Gesamtzellzahl nur eine geringe Expansion dieser Zellen nach 21 Tagen möglich. In weiteren 9 Tagen Kultur konnte keine weitere Expansion erzielt werden.

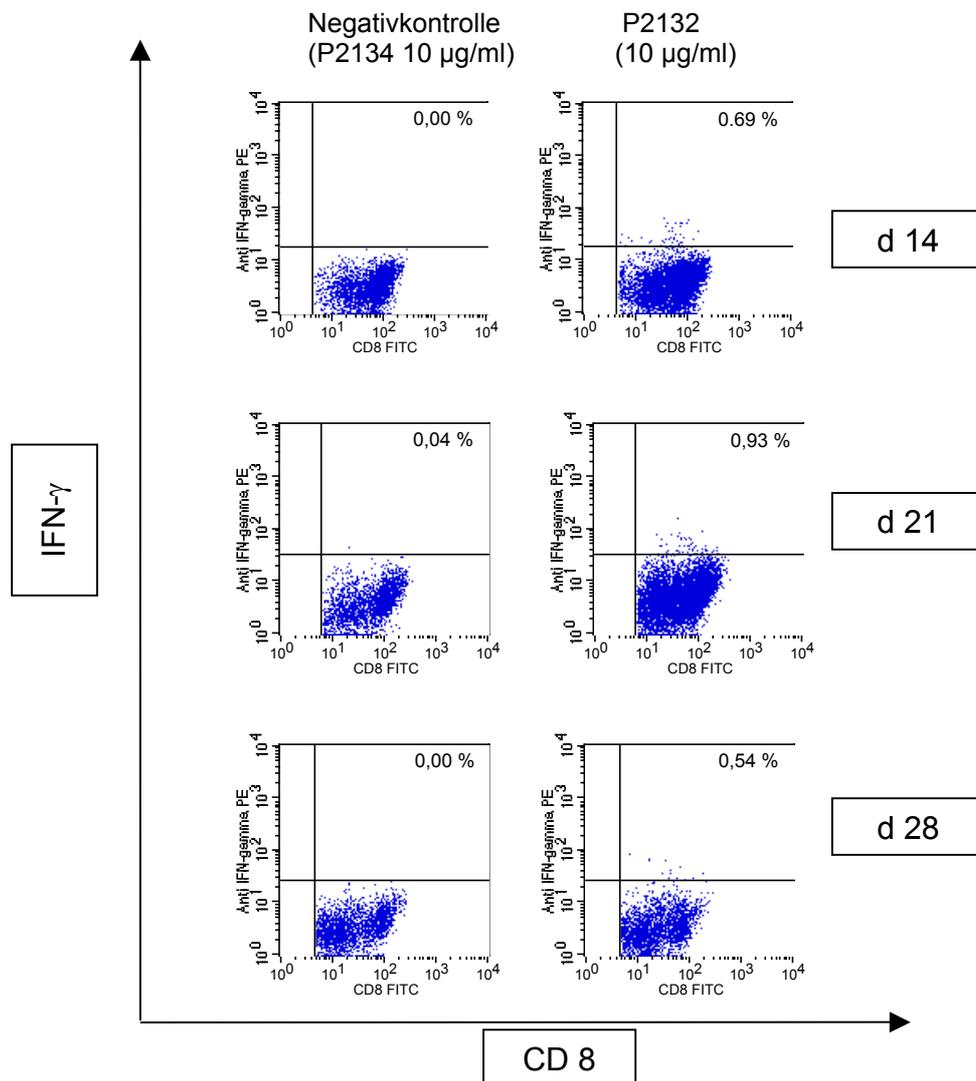


Abbildung 18 Intrazell. IFN- γ -Färbung nach verschiedener Kulturdauer mit Epitop P2132 (HD2) in CD8-selektierten T-Zellen nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden
Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

HD 1

Im Falle des Spenders HD 1 war ebenfalls kein Nachweis Peptid-spezifischer T-Zellen direkt *ex vivo* möglich und es wurde erneut versucht, einen Nachweis nach Induktion zu erbringen:

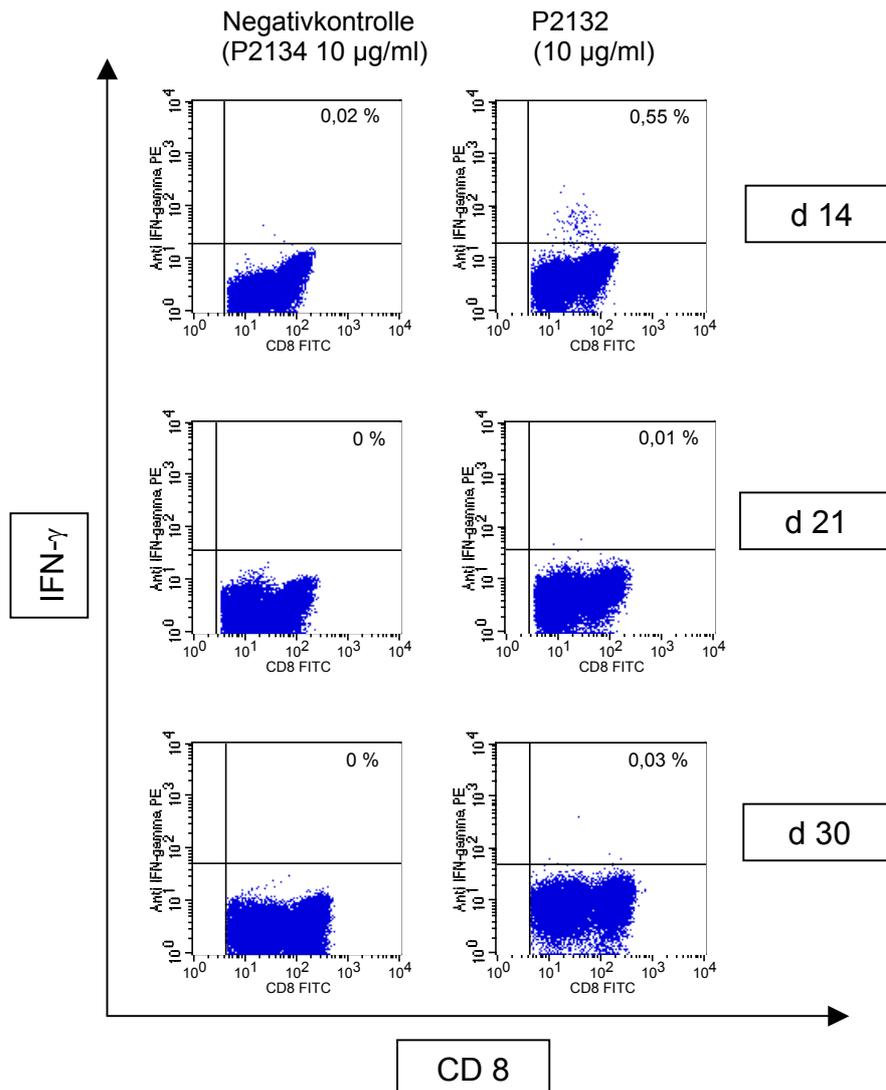


Abbildung 19 Intrazell. IFN- γ -Färbung nach verschiedener Kulturdauer mit Epitop P2132 (HD1) in CD8-selektierten T-Zellen nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden
Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

Erneut konnte gezeigt werden, daß sich nach entsprechendem Priming durch autologe DC spezifische zytotoxische T-Zellen in geringen Frequenzen induzieren lassen. Eine IFN- γ -Produktion lag nur nach Stimulation mit dem relevanten Peptid (in diesem Fall P2132) vor. Wie bereits bei HD 2 war es auch bei HD1 nicht möglich, die spezifischen Zellen auf konventionelle Weise mit Peptid-gepulsten autologen PBMNC zu expandieren:

In weiteren Restimulationszyklen wurde versucht, diese spezifischen Zellen weiter zu expandieren. Die Zellen zeigten zwar weiterhin gutes Wachstum, jedoch war ein Nachweis einer spezifischen IFN- γ -Produktion nach 21 bzw. 30 Tagen nicht mehr möglich.

HD 3

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in dem ebenfalls eine Induktion HLA-B*4402-restringierter MUC1-spezifischer CTL nach 14 Tagen demonstriert werden konnte.

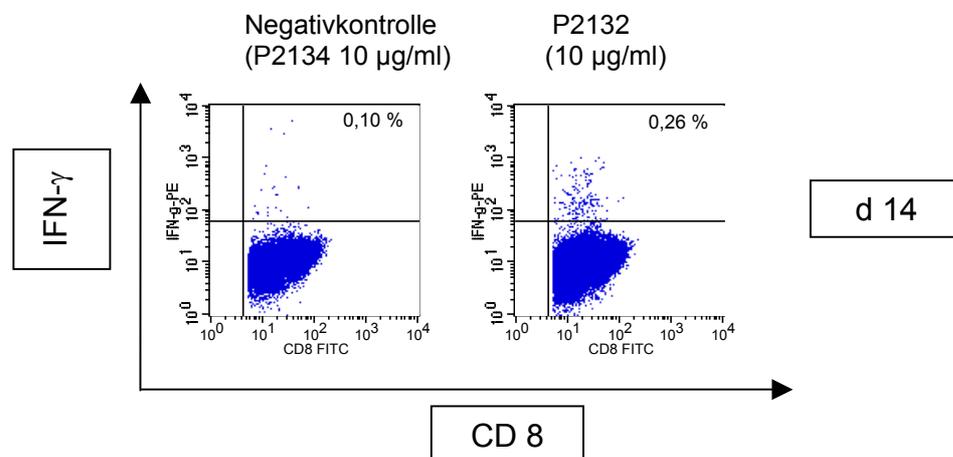


Abbildung 20 Intrazelluläre IFN- γ -Färbung nach 14 Tagen Zellkultur mit Epitop P2132(HD 3) in CD8-selektierten T-Zellen nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden
Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

3.1.3.3 Induktion MUC1-spezifischer T-Zellen für das Epitop P2134

Auch im Falle des Epitops P2134 wurde versucht, in vorher negativ getesteten Spendern mit dem Peptid P2134 Peptid-spezifische T-Zellen zu induzieren:

HD 1

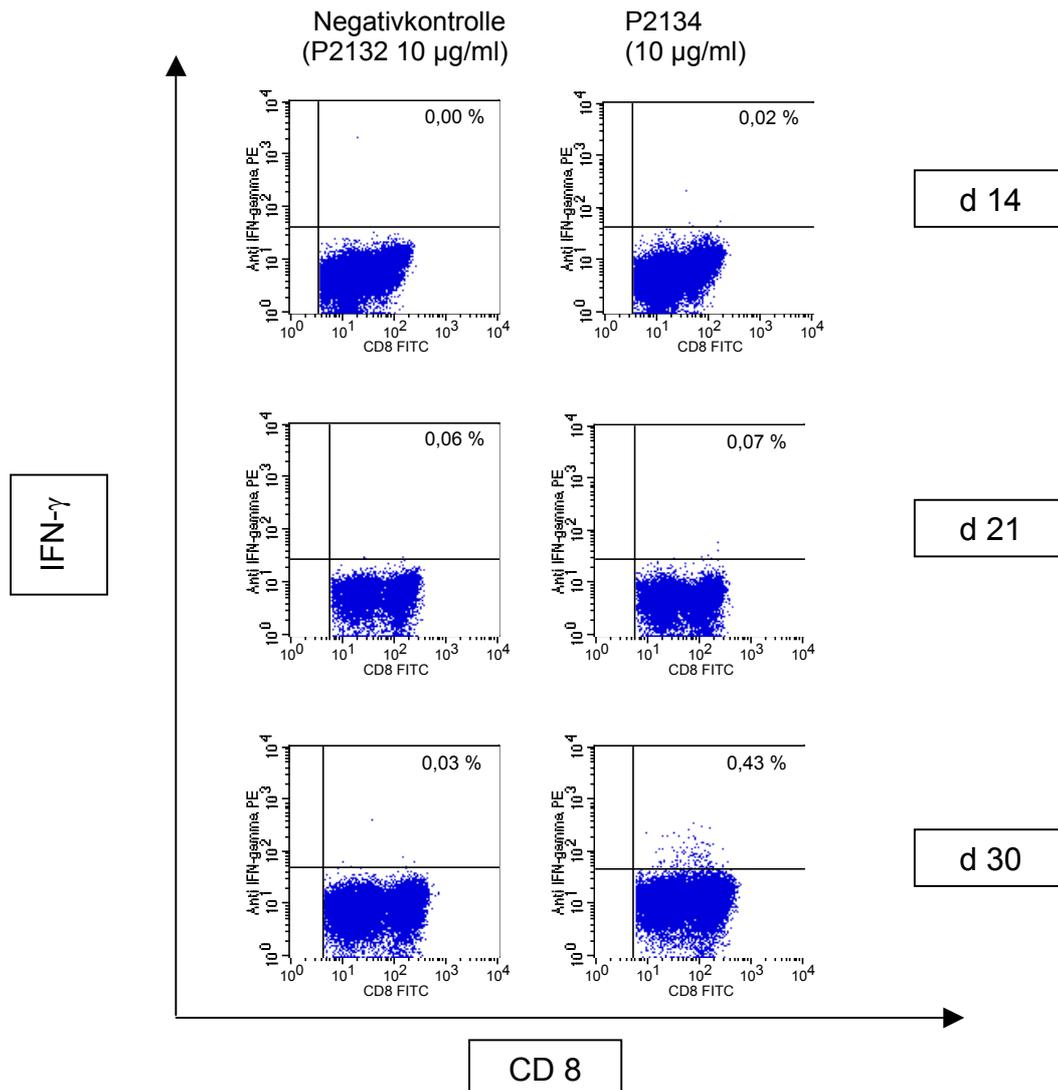


Abbildung 21 Intrazell. IFN- γ -Färbung nach verschiedener Kulturdauer mit Epitop P2134 (HD1) in CD8-selektierten T-Zellen nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden
Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

Ein Nachweis spezifischer T-Zellen war in diesem Fall erst nach einer Gesamtkulturdauer von 30 Tagen möglich.

HD 3

Zur Absicherung wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in dem ebenfalls eine Induktion HLA-B*4402-restringierter MUC1-spezifischer CTL nach 14 Tagen demonstriert werden konnte.

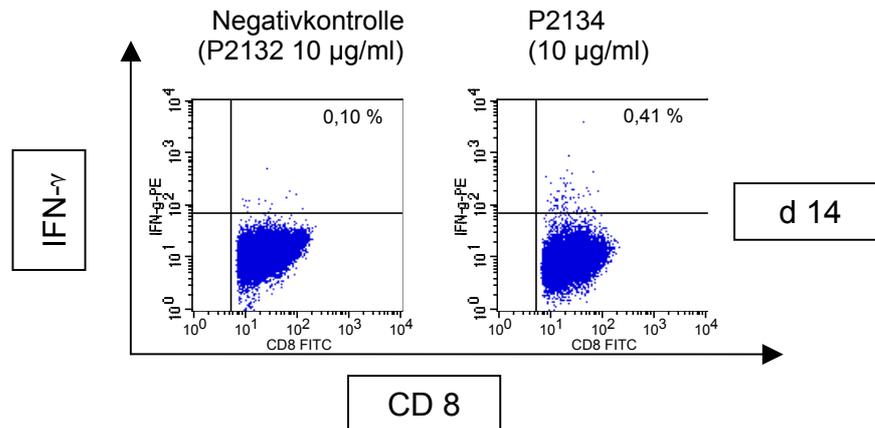


Abbildung 22 Intrazelluläre IFN- γ -Färbung nach 14 Tagen Zellkultur mit Epitop P2134(HD 3) in CD8-selektierten T-Zellen nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden
Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen)

3.1.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse - HLA-B*4402

In PBMC dreier gesunder Spender konnte direkt *ex vivo* keine spezifische IFN- γ -Produktion nach Stimulation mit den vorhergesagten Peptiden nachgewiesen werden.

Im Falle des Peptids P2132 (TEAASRYNL) konnte direkt *ex vivo* bei einem Plasmozytom-Patienten nach allogener Stammzelltransplantation eine spezifische IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden. Nach mehrfachen Stimulationszyklen mittels Peptid-gelulster DC und PBMC gelang es zudem mehrfach P2132-spezifische T-Zellen bei zuvor direkt *ex vivo* negativ getesteten gesunden Spendern zu induzieren.

Im Falle des Peptids P2134 (LEDPSTDYY) war auch bei Patienten kein direkter *ex vivo* Nachweis einer spezifischen IFN- γ -Produktion möglich. Es gelang jedoch ebenfalls mehrfach P2134-spezifische T-Zellen nach 3-4 Stimulationszyklen bei zuvor direkt *ex vivo* negativ getesteten gesunden Spendern zu induzieren.

3.1.4 Erkennung der vorhergesagten Epitope durch zytotoxische T-Zellen – HLA-A*68

3.1.4.1 Direkter *ex vivo*-Test

In PBMNC eines gesunden Spenders (HD 1) sowie dreier Patienten (8, 18 und 19) wurden Untersuchungen der T-Zell-Vorläuferfrequenzen, die für die Restriktion vorhergesagten MUC1-Peptide spezifisch sind, durchgeführt.

Im Falle des gesunden Spenders HD 1 war kein Nachweis einer Peptid-spezifischen Reaktion auf die Stimulation festzustellen. Bei zwei der drei Patienten (18 und 19) war ebenfalls keine Detektion einer IFN- γ -Produktion möglich, wohingegen bei Patient 8 zu zwei verschiedenen Blutabnahmezeitpunkten eine IFN- γ -Produktion nach Stimulation mit Epitopen aus MUC1 nachzuweisen war. Im Falle der ersten beiden Untersuchungen wurde lediglich eine Reaktivitätstestung bezüglich HLA-A2-restringierter Leukämie-spezifischer Epitope durchgeführt (siehe Teil 3.2 dieser Arbeit, Abbildungen 31 und 32). Die Relevanz der HLA-A*68-Peptide wurde nur bei der dritten Blutabnahme untersucht (Abbildung 23).

Patient 8 (AML)

Mittels intrazellulärer IFN- γ -Färbung konnte eine Reaktion auf Stimulation mit Peptid 3511 (DVTSAPDNK) nachgewiesen werden, dessen Spezifität durch ein Negativergebnis bei Betrachtung der Reaktion auf die weiteren eingesetzten HLA-A*68-restringierten Peptide deutlich gezeigt werden konnte.

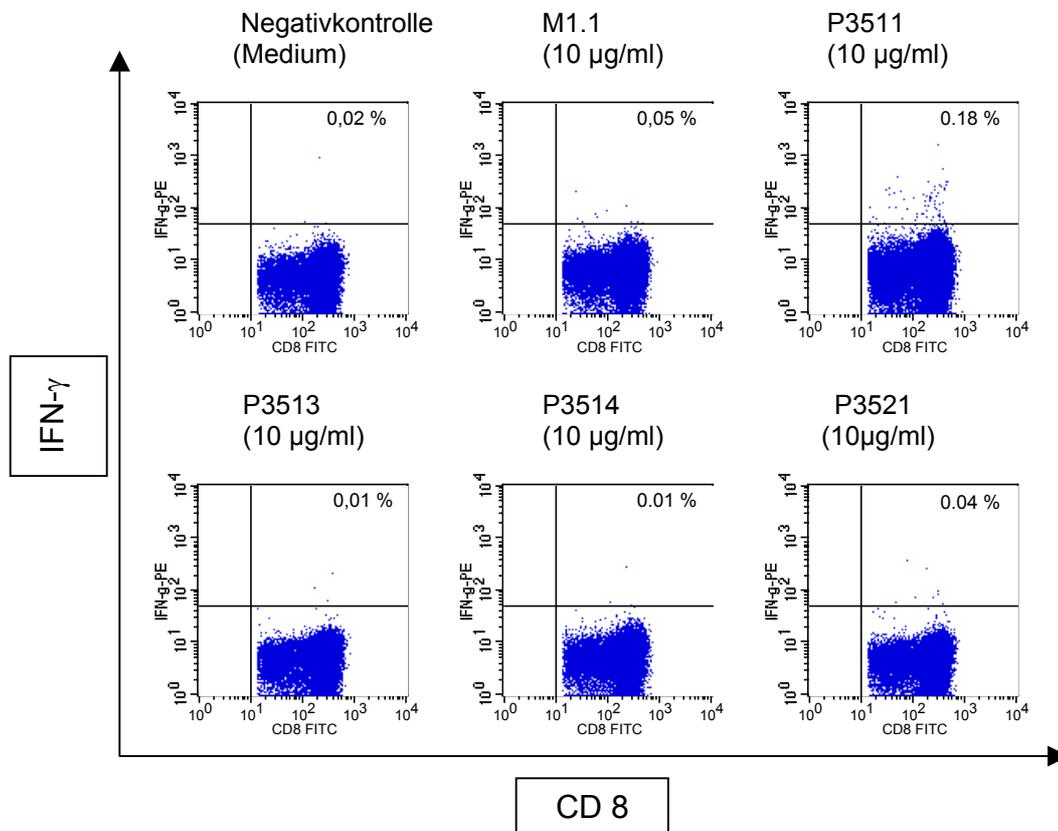


Abbildung 23 Intrazelluläre IFN- γ -Färbung direkt *ex vivo* (Patient 8, Tag 1035 nach Tx.)
nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden

Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

3.1.4.2 Induktion MUC1-spezifischer T-Zellen für das Epitop P3511

Des Weiteren wurde versucht beim direkt *ex vivo* negativ getesteten Spender HD 1 eine HLA-A68-restringierte MUC1-spezifische T-Zellantwort (Peptid 3511) in Kultur zu induzieren (siehe Abbildung 24). In diesem Fall war es möglich nach einer einwöchigen Induktion mit autologen gepulsten DC und zweimaliger Restimulation mit autologen gepulsten PBMC einen phänotypischen Nachweis von T-Zellen mit P3511-spezifischen Rezeptoren mittels MHC-Pentamer-Färbung zu erbringen (0,20 % der CTL). Deren Funktionalität konnte

mittels P3511-spezifischem IFN- γ -Nachweis in der intrazellulären Zytokinfärbung demonstriert werden (0,19 % der CTL).

HD1

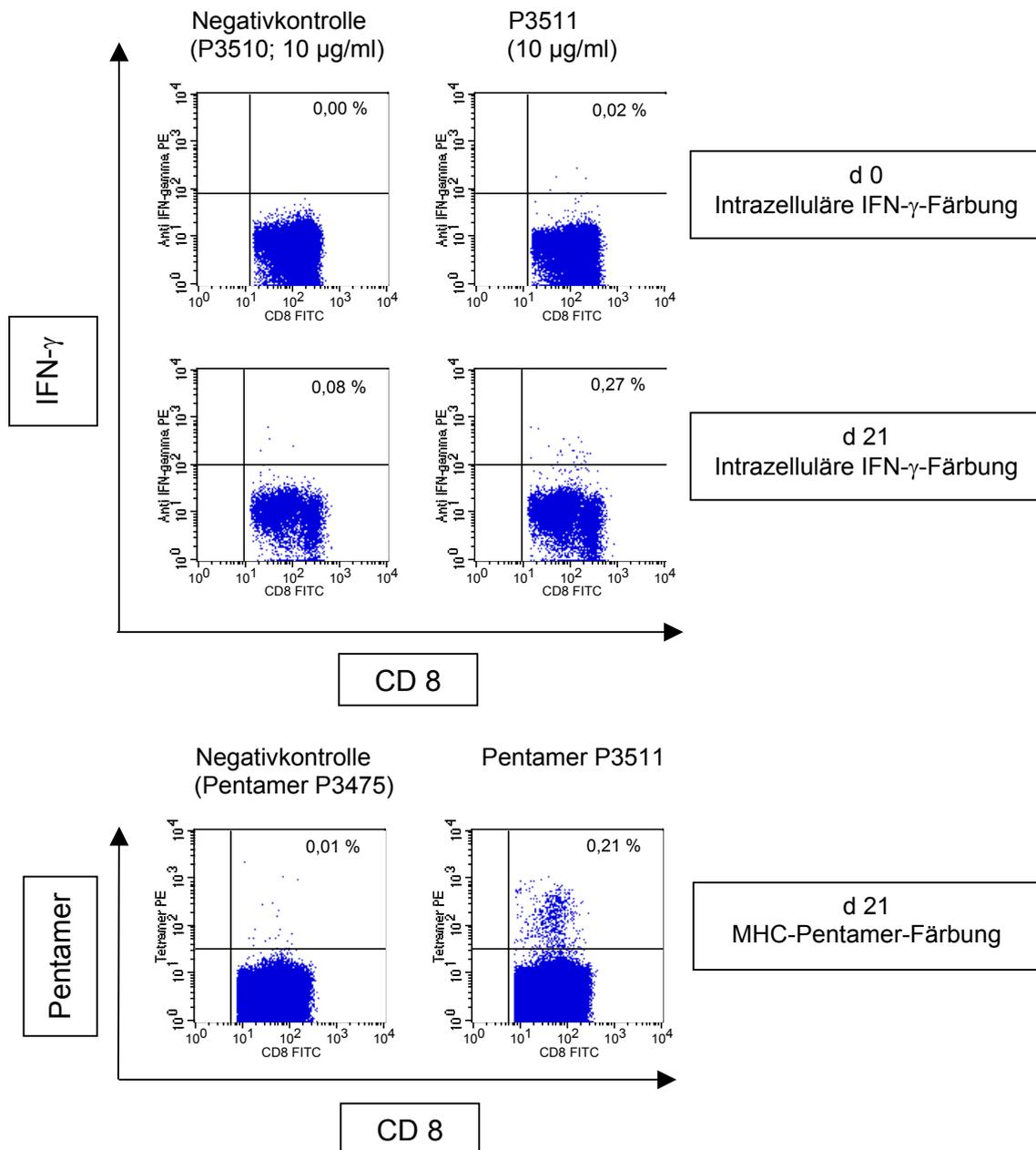


Abbildung 24 FACS-Färbung nach verschiedener Kulturdauer mit Epitop P3511(HD1) in CD8-selektierten T-Zellen nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden/Methoden

Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

3.1.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse - HLA-A*68

In PBMNC des gesunden Spenders und zweier der drei untersuchten Patienten konnte direkt *ex vivo* keine spezifische IFN- γ -Produktion nach Stimulation mit den vorhergesagten Peptiden nachgewiesen werden.

Im Falle des Peptids P3511 (DVTSAPDNK) konnte bei einem AML-Patienten nach allogener Stammzelltransplantation eine spezifische IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden. Nach mehrfachen Stimulationszyklen mittels Peptid-gepulster DC und PBMNC gelang es zudem P3511-spezifische T-Zellen bei einem zuvor direkt *ex vivo* negativ getesteten gesunden Spender zu induzieren.

3.1.5 Erkennung der vorhergesagten Epitope durch zytotoxische T-Zellen – HLA-B*0702

3.1.5.1 Direkter *ex vivo*-Test

PBMNC zweier gesunder Spender (HD 4, HD 5) sowie zweier Patienten (4 und 12) wurden für eine Untersuchung der Relevanz der für diese Restriktion vorhergesagten MUC1-Peptide verwendet.

Im Falle der gesunden Spender HD 4 und HD 5 war kein Nachweis einer Peptid-spezifischen Reaktion auf die Peptidstimulation direkt *ex vivo* festzustellen. Bei einem der zwei Patienten (HD 4) konnte zu den ersten beiden Abnahmezeitpunkten eine Reaktivität auf HLA-A*0201 restringierte Epitope aus WT1 sowie auf M1.1 aus MUC1 nachgewiesen werden (siehe Teil 3.2 dieser Arbeit, Abbildungen 33 und 34). Am Abnahmezeitpunkt 3 (Tag 741 nach Transplantation) war die Detektion einer IFN- γ -Produktion weder nach Stimulation mit den vorhergesagten HLA-B*0702 restringierten MUC1-Peptiden, noch mit dem bereits publizierten Epitop M1.1 möglich.

Im Falle von Patient 12 (Plasmozytom) konnte 35 Tage nach Transplantation keine Peptid-spezifische IFN- γ -Produktion auf das bekannte M1.1-Peptid gezeigt werden (siehe Teil 3.2.1, Tabelle 20), jedoch zeigte sich an Tag 522

nach Transplantation sowohl eine Antwort bezüglich des M1.1-Peptids als auch des HLA-B*0702 restringierten MUC1-Peptids P40009 (VPGWGIALL).

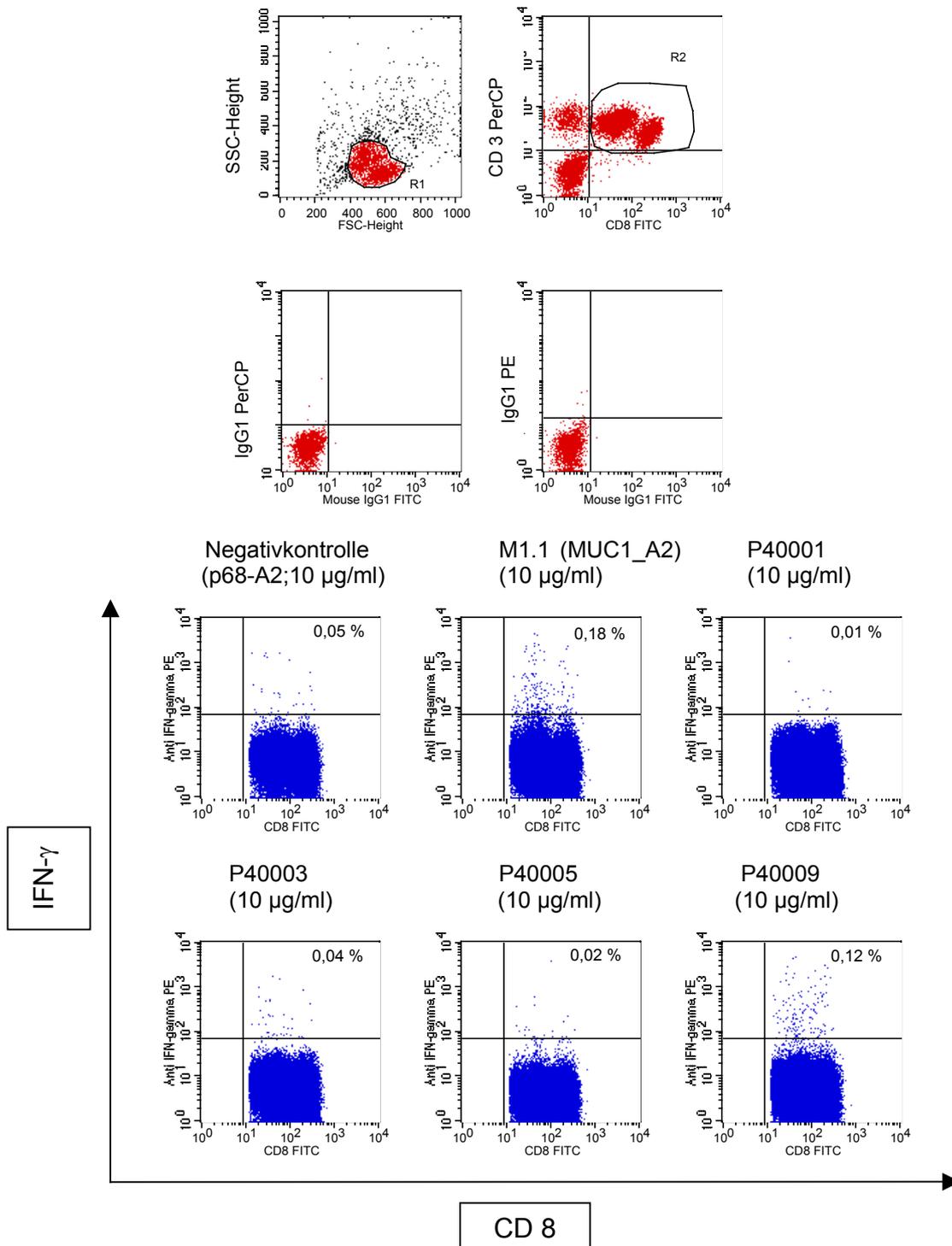


Abbildung 25 Intrazelluläre IFN- γ -Färbung direkt *ex vivo* (Patient 12, Tag 522 nach Tx.)
nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden

Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

3.1.5.2 Induktion MUC1-spezifischer T-Zellen für das Epitop P40009

Weiterhin wurde versucht beim direkt *ex vivo* negativ getesteten Spender HD 5 eine HLA-B*0702-restringierte MUC1-spezifische T-Zellantwort mit dem in Patient 12 positiv getesteten Peptid P40009 in Kultur zu induzieren, da angenommen wurde, daß nach einer Erkennung dieses Epitops direkt *ex vivo* auch eine Induzierbarkeit möglich sein sollte. Auch in diesem Fall war es möglich, funktionelle CTL nach einer Expansionszeit von 14 Tagen (0,15 % aller CD3⁺/CD8⁺ Zellen), 21 Tagen (0,30 % aller CD3⁺/CD8⁺ Zellen) und 28 Tagen (1,22 % aller CD3⁺/CD8⁺ Zellen) nachzuweisen (vgl. Abbildung 26/27).

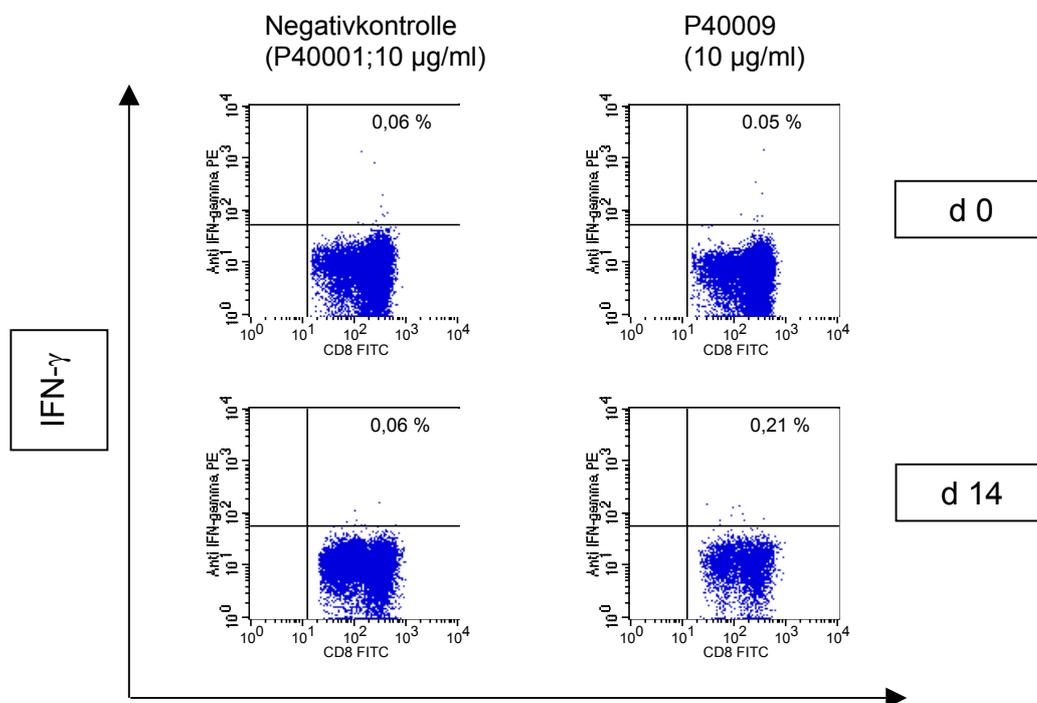


Abbildung 26 Intrazell. IFN- γ -Färbung n. verschiedener Kulturdauer mit Epitop P40009 (HD5) in CD8-selektierten T-Zellen nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden
Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

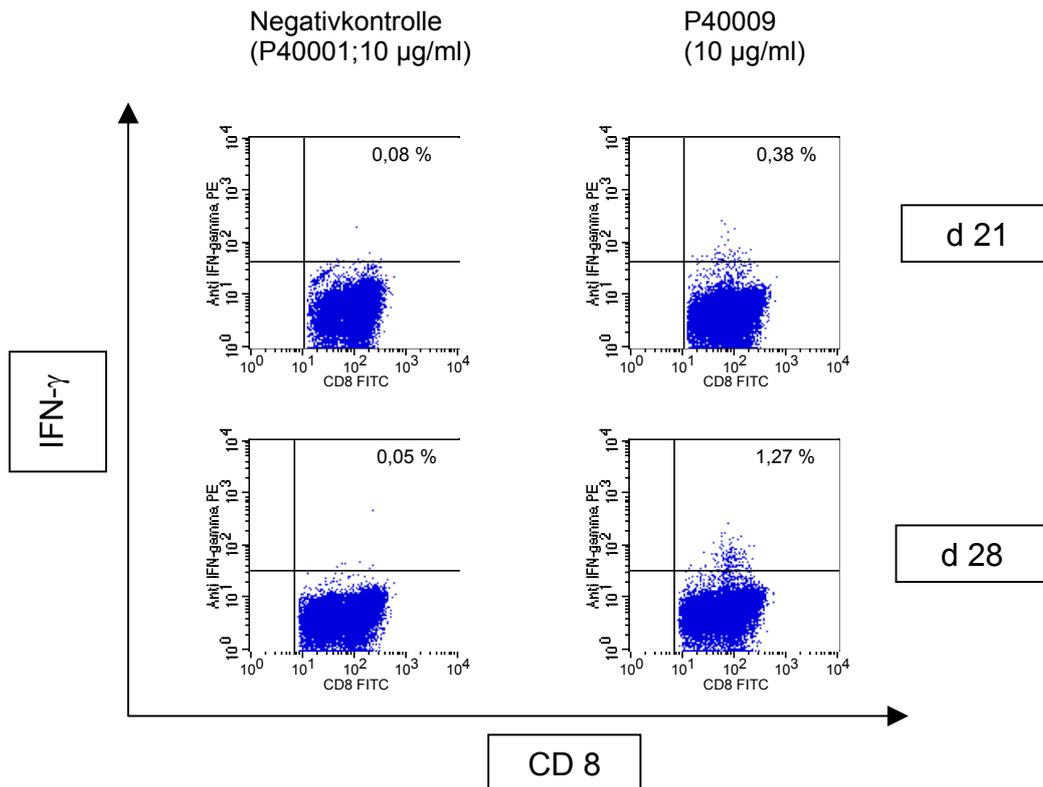


Abbildung 27 Intrazell. IFN- γ -Färbung n. verschiedener Kulturdauer mit Epitop P40009 (HD5) in CD8-selektierten T-Zellen nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden
Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

3.1.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse - HLA-B*0702

In PBMC zweier gesunder Spender sowie eines der beiden untersuchten Patienten konnte keine spezifische IFN- γ -Produktion nach Stimulation mit den vorhergesagten Peptiden nachgewiesen werden.

Im Falle des Peptids P40009 (VPGWGIALL) konnte bei einem Plasmozytom-Patienten nach allogener Stammzelltransplantation eine spezifische IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden. Nach mehrfachen Stimulationszyklen mittels Peptid-gepulster DC und PBMC gelang es zudem P40009-spezifische T-Zellen bei einem zuvor direkt ex vivo negativ getesteten gesunden Spendern zu induzieren.

3.1.6 Erkennung der vorhergesagten Epitope durch zytotoxische T-Zellen – HLA-B*2705

Im Falle von Patient 20 konnte mit einer IFN- γ q-RT-PCR eine Reaktion auf einen Mix aus den beiden HLA-B*2705 restringierten Peptiden P8506 und P8507 gezeigt werden (Relative Kopienzahl IFN- γ 3,39; positiv ab 2).

Nachfolgend wurde mit PBMC dieses Patienten ein Stimulationsversuch durchgeführt, um erstens zu zeigen, auf welches der beiden Peptide die Reaktion erfolgte, sowie zweitens um die Induzierbarkeit des entsprechenden Peptids nachzuweisen. Nach einer 21-tägigen Kultivierung nach Standard-Protokoll konnte mittels intrazellulärer IFN- γ -Färbung in der Durchflußzytometrie ein sehr geringer Anteil spezifischer CD3⁺/CD8⁺ Zellen für das Peptid 8507 (CRRKNYGQL) nachgewiesen werden, wobei die absolute Zellzahl nach 21 Tagen ebenfalls sehr gering war.

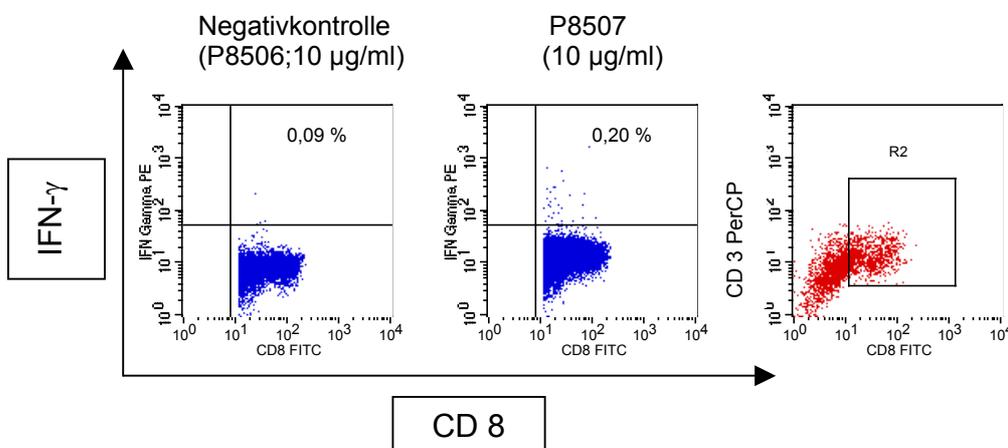


Abbildung 28 Intrazell. IFN- γ -Färbung nach 21 Tagen Zellkultur mit Epitop P8507(Patient 20) in CD8-selektierten T-Zellen nach Stimulation mit den angegebenen Peptiden
Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

3.2 Nachweis Tumorpeptid-spezifischer CTL-Antworten bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation

Im Rahmen eigener Vorarbeiten wurde die Möglichkeit der Detektion von HLA-A*0201-restringierten T-Zellantworten bei hämatologischen Erkrankungen nach allogener Stammzelltransplantation mittels verschiedener Nachweissysteme (ICCS, q-RT-PCR, Tetramer-Färbung) untersucht (Kapp, M. 2003).

Die klinische Bedeutung einer Tumor-spezifischen CTL-Antwort nach allogener Stammzelltransplantation ist bisher nicht eindeutig geklärt. Da bisher keine größeren Kollektive untersucht werden konnten, war ein Ziel der Arbeit, eine Tumor-spezifische CTL-Antwort bei einer größeren Anzahl von HLA-Typen und damit Patienten überprüfen zu können. Um im Rahmen der ohnehin kleinen Kollektive nach Transplantation ein möglichst großes untersuchen zu können, wurden alle vom Autor erhobenen Daten zur T-Zellantwort gegen Tumor-assoziierte Antigene nach allogener Stammzelltransplantation zusammengeführt. Ergebnisse aus Vorarbeiten wurden als Zitat gekennzeichnet.

Patient 3 (AML)

Im Blut dieses Patienten konnte 87 Tage nach Transplantation mittels Tetramerphänotypisierung ein Vorliegen von spezifischen T-Zellen gegen das Epitop M1.1 (STAPPVHNV) aus MUC1 nachgewiesen werden. Da dieser phänotypische Nachweis noch keinen Rückschluss auf Antigen-induzierte Aktivierbarkeit zulässt, wurde weiterhin ein funktioneller Nachweis mittels q-RT-PCR durchgeführt, womit eine M1.1-spezifische IFN- γ -Produktion demonstriert werden konnte.

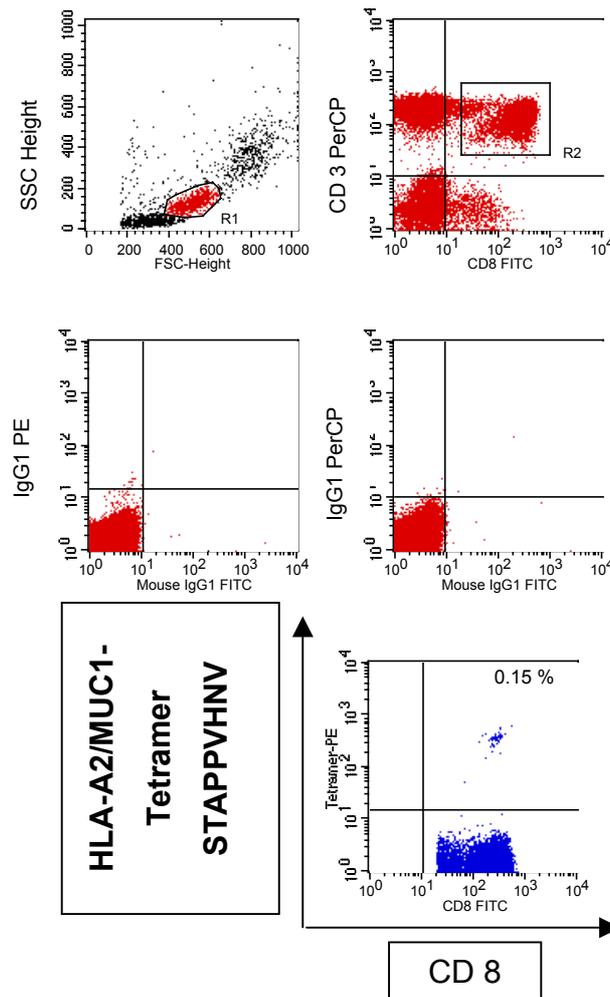


Abbildung 29 Tetramerfärbung direkt ex vivo Patient 3 (Tag 87 nach Transplantation)

AML, CMV-Serostatus E/S +/-

(aus Kapp, M. 2003)

Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

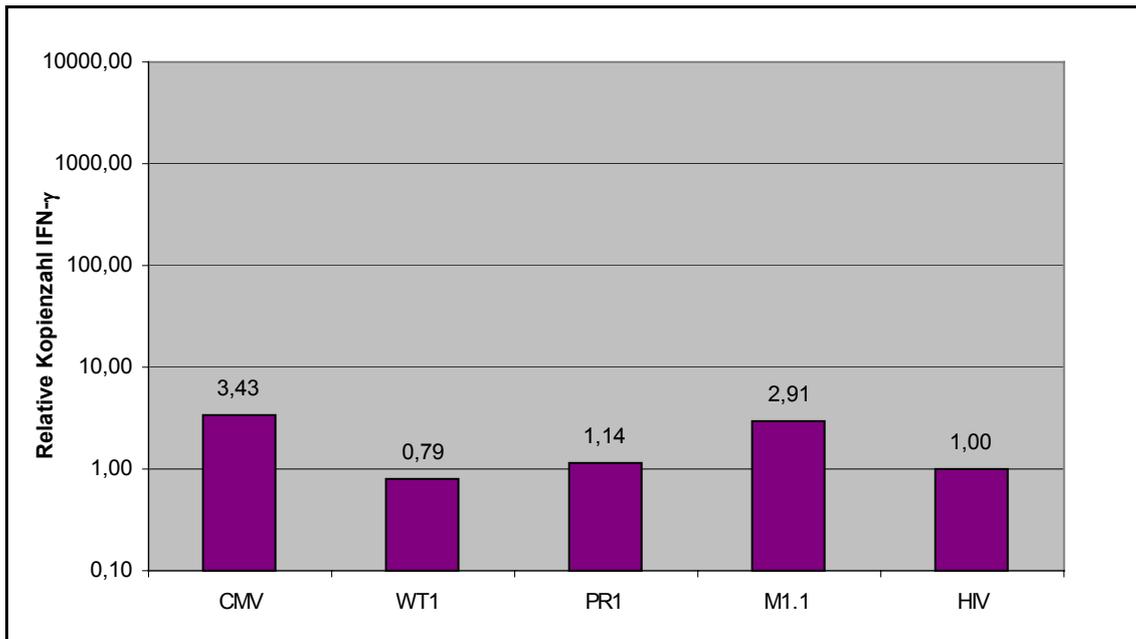


Abbildung 30 q-RT-PCR Patient 3 (Tag 87 nach Transplantation)

AML, CMV-Serostatus E/S +/+

Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ des jeweiligen Peptids

(aus Kapp, M. 2003)

Klinisch befand sich Patient 3 auch nach längerer Nachkontrolle (Tag 1233 nach Transplantation) in anhaltender kompletter Remission mit vollständigem Spenderchimärismus in der molekulargenetischen Analyse des peripheren Blutes. Es wurden keine weiteren Blutproben des Patienten gesammelt, so daß eine erneute Untersuchung auf spezifische T-Zellen nicht durchgeführt werden konnte.

Patient 8 (AML)

Im Falle von Patient 8, der 1035 Tage nach Transplantation im Rahmen der Relevanztestung der vorhergesagten Peptide untersucht wurde (siehe 3.1.4.1, Abbildung 23), wurden im Vorfeld ebenfalls Blutproben früherer Abnahmezeitpunkte untersucht, jedoch lediglich auf die bis dahin bekannten und im Theorieteil beschriebenen HLA-A*0201-bindenden Epitope aus den Antigenen WT1, Proteinase 3 sowie MUC1. Hier zeigte sich eine T-Zellantwort gegen das Epitop M1.1 (HLA-A*0201) aus MUC1.

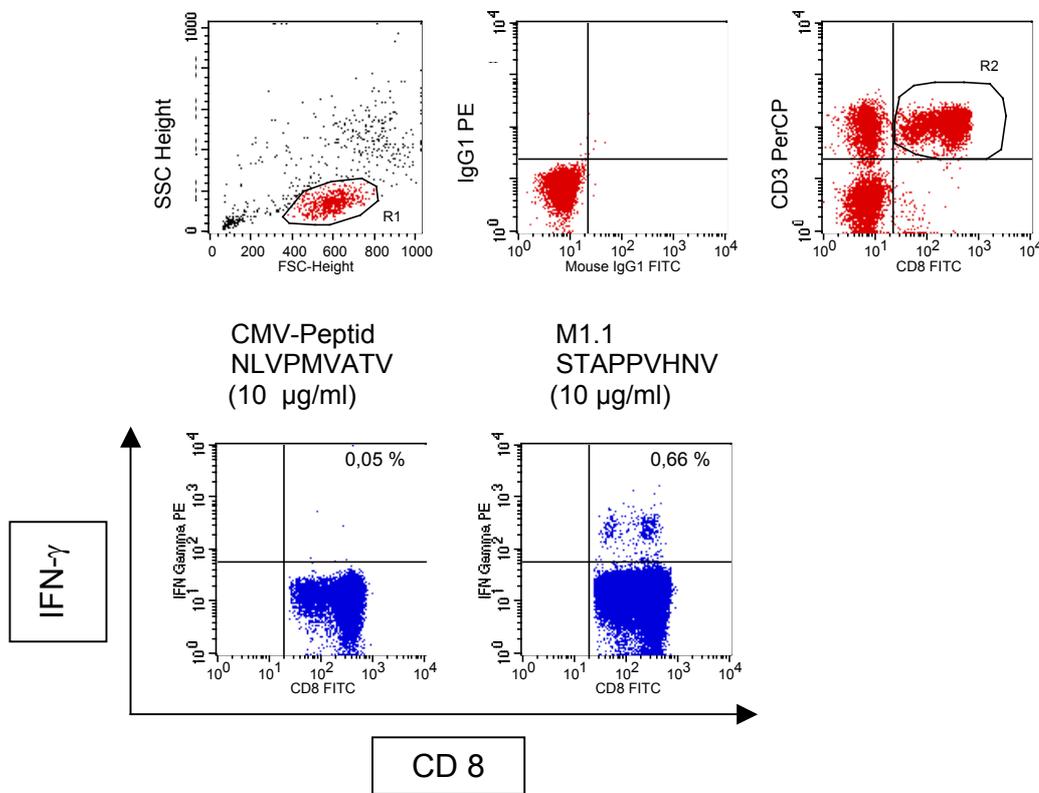


Abbildung 31 Intrazell. IFN- γ -Färbung direkt ex vivo Patient 8 Tag 471 nach Transplantation
 AML, CMV-Serostatus E/S -/-
 (aus Kapp,M. 2003)

Zellen eingegrenzt auf Lymphozyten anhand FSC/SSC und auf CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, Prozentangaben im Diagramm sind auf diese Population bezogen

In diesem Falle gelang es erneut, die detektierte T-Zellantwort durch q-RT-PCR mittels einer zweiten, funktionellen Methode zu verifizieren:

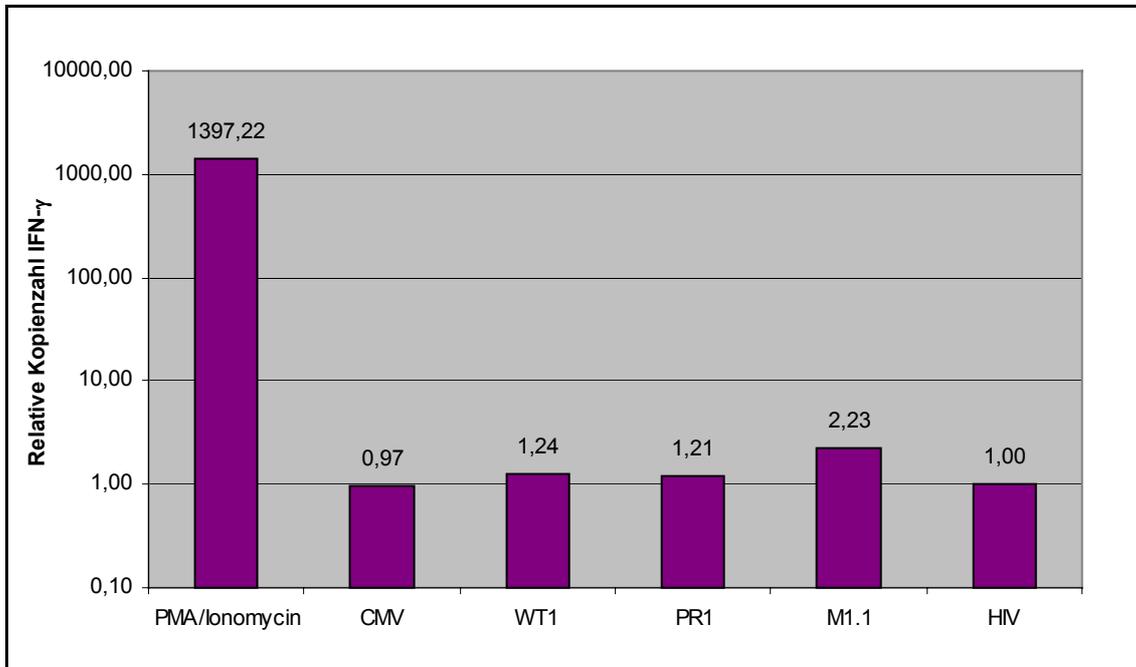


Abbildung 32 q-RT-PCR Patient 8 (Tag 471 nach Transplantation)

AML, CMV-Serostatus E/S -/-

10 μ g/ml des jeweiligen Peptids ;

Positiv: PMA/Ionomycin 0,5 μ g / 1 μ g

(aus Kapp, M. 2003)

Zu einem späteren Zeitpunkt war gegen dieses Epitop keine Aktivität mehr festzustellen. Interessanterweise zeigte sich jedoch hier eine Reaktion auf das HLA-A68-restringiertes MUC1-Peptid P3511 (DVT SAPDNK), also eine Verschiebung der T-Zellantwort gegen MUC1 von der Restriktion A*0201 auf A*68, was eine Präsentation dieses Antigens auf multiplen HLA-Allelen und die Möglichkeit einer entsprechenden T-Zellantwort impliziert.

Klinisch befand sich auch Patient 8 im Follow-up (Tag 934 nach Transplantation) in anhaltender kompletter Remission mit vollständigem Spenderchimerismus in der molekulargenetischen Analyse.

Patient 4 (AML)

Bei Patient 4 war die Reaktion auf das HLA-A*0201 - restringierte Peptid RMFPNAPYL aus WT1 in der q-RT-PCR als deutlich positiv zu bewerten:

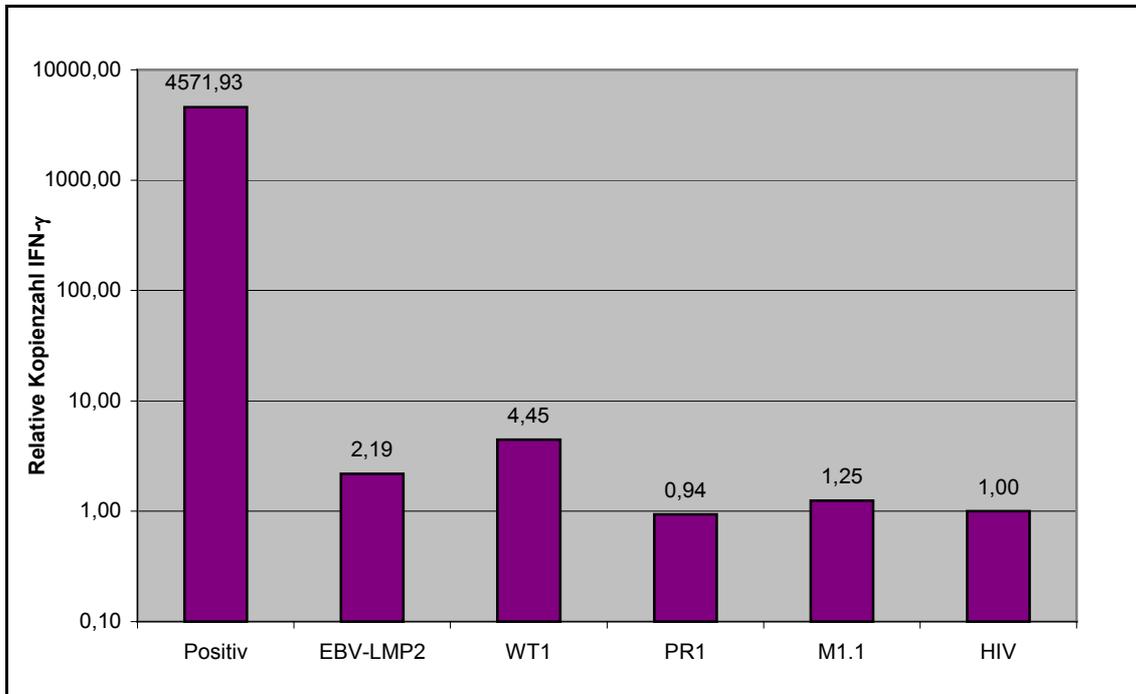


Abbildung 33 q-RT-PCR Patient 4 (Tag 293 nach Transplantation)

AML, CMV-Serostatus E/S -/-

10 μ g/ml des jeweiligen Peptids

(aus Kapp, M. 2003)

In der intrazellulären IFN- γ -Färbung konnte durchflußzytometrisch in diesem Fall keine Bestätigung des Ergebnisses erzielt werden.

Im Falle dieses Patienten waren PBMNC unterschiedlicher Zeitpunkte nach Transplantation zugänglich:

Die Reaktivität auf das WT1-Peptid konnte mit PBMNC einer späteren Blutabnahme (ca. zwei Monate später) nicht reproduziert werden. Interessanterweise war jedoch zu diesem Zeitpunkt eine grenzwertige Reaktion auf das M1.1-Peptid mittels q-RT-PCR nachzuweisen. In der weniger sensitiven

intrazellulären IFN- γ -Färbung konnte diese Population nicht dargestellt werden. Die Frequenz scheint damit unter 0,10 % der CD3⁺/CD8⁺ Zellen zu liegen, was die Sensitivitätsgrenze des ICCS darstellt.

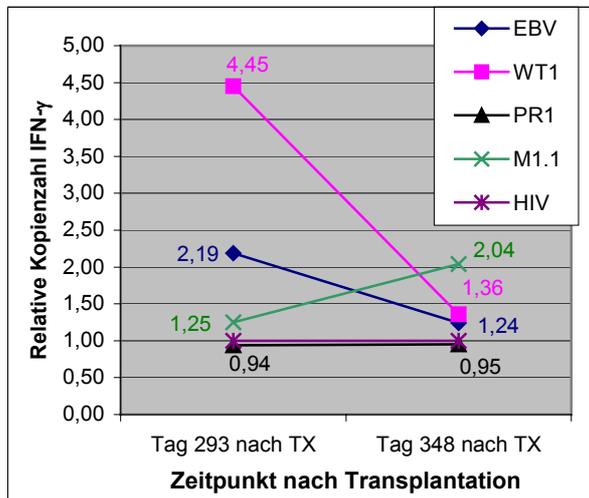


Abbildung 34 Verlaufsdiagramm Patient 4
Stimulation mit jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ des
angegebenen Peptids
(aus Kapp,M. 2003)

Klinisch befand sich auch Patient 4 am Tag 585 nach Transplantation in anhaltender kompletter Remission.

Patient 14 (biphänotypische Leukämie)

Bei der Untersuchung von Patient 14 zeigte sich lediglich in der IFN- γ -Expressionsmessung mittels q-RT-PCR eine Reaktion auf das HLA-A*0201-restringierte Peptid VLQELNVTV aus Proteinase 3 und M1.1 aus MUC1. In einer parallel durchgeführten intrazellulären IFN- γ -Färbung in der Durchflußzytometrie konnte dies jedoch nicht bestätigt werden.

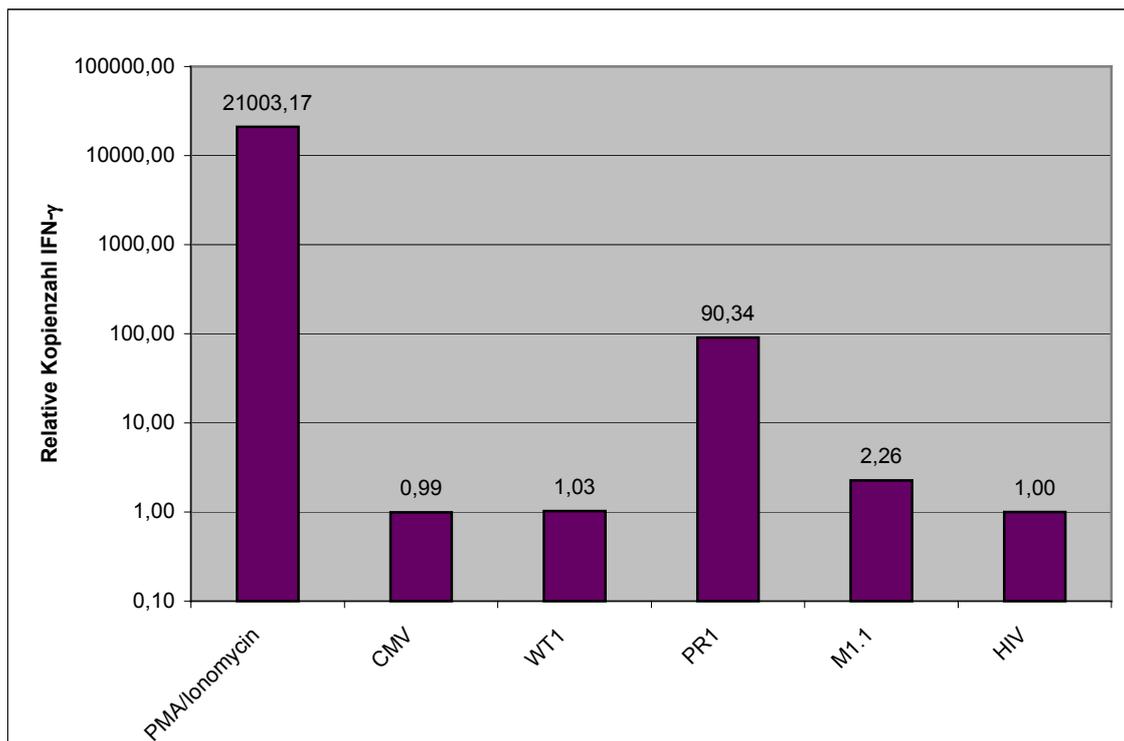


Abbildung 35 q-RT-PCR Patient 14 (Tag 136 nach Transplantation)

Biphänotypische Leukämie (c-ALL mit Koexpression myeloischer Marker CD13,CD15,CD33)
 CMV-Serostatus E/S -/-
 10 μ g/ml des jeweiligen Peptids
 (aus Kapp,M. 2003)

Klinisch befand sich auch Patient 14 zum Zeitpunkt des Zusammenstellens der Ergebnisse (Tag 454 nach Transplantation) in anhaltender kompletter Remission mit vollständigem Spenderchimärismus in der molekulargenetischen Analyse des peripheren Blutes.

3.2.1 Bedeutung der T-Zellen für den klinischen Verlauf

Nachdem bei einigen Patienten Leukämie-spezifische T-Zellen detektiert werden konnten, wurde der aktuelle klinische Status der Patienten zusammengestellt.

Tabelle 20 T-Zellantwort vs. „Clinical outcome“

ALL = Akute lymphatische Leukämie
 AML = Akute myeloische Leukämie
 CML = Chronische myeloische Leukämie
 CR = Komplette Remission
 d X = Tag X nach Transplantation
 GVH = „Graft-Versus-Host“
 MDS = Myelodysplastisches Syndrom
 ND = Nicht durchgeführt
 PR = Partielle Remission
 † = Verstorben
 M1.1/PR1/WT1/P XXXX entsprechen den im Methodenteil angegebenen Peptiden

Nr.	Erkrankung	T-Zellantwort gegen Peptid		GVH-Erkrankung (Grad)	Outcome
		Durchflußzytometrie	RT-PCR		
1	AML	ND	-	II (Haut)	CR
2	ALL	ND	-	I (gesamt)	† (kein Rezidiv)
3	AML	M1.1	M1.1	I (gesamt)	CR
4	AML	-	WT1 (d 293)	I (Leber)	CR
		-	M1.1 (d 348)		
		-	ND		
5	AML	-	- (d 262)	0	Rezidiv
		-	- (d 318)		
6	Plasmozytom	-	-	II (gesamt)	Rezidiv
7	ALL/sek. MDS	-	PR1	0	† (Rezidiv)
8	AML	-	- (d 88)	II (gesamt)	CR
		M1.1	M1.1 (d 471)		
		P3511	ND (d 1035)		
9	AML	ND	-	II (gesamt)	Rezidiv
10	Plasmozytom	ND	-	0	† (kein Rezidiv)
11	Plasmozytom	ND	-	III (Haut)	† (Rezidiv)
12	Plasmozytom	-	- (d 35)	0	CR
		P40009 & M1.1	ND (d 522)		
13	ALL	-	-	0	Rezidiv
14	biphänotypische Leukämie	-	PR1 & M1.1	II (gesamt)	CR
15	AML	ND	-	0	† (Rezidiv)
16	CML	-	-	0	CR
17	Plasmozytom	P2132	ND	0	PR
18	AML	-	ND	II (Gesamt)	CR
19	AML	-	ND	I (Haut)	CR
20	Mamma-Ca	-	P8507	-	†

3.2.2 Statistische Bewertung der Ergebnisse

In die Bewertung wurden 19 Patienten einbezogen, da bei Patient 20 keine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden konnte.

Rezidivfreiheit bei Patienten mit Tumor-spezifischen T-Zellen:

6 von 7 (entspricht 86 %)

Rezidivfreiheit bei Patienten ohne Tumor-spezifische T-Zellen:

6 von 12 (entspricht 50 %)

Um beurteilen zu können, ob diese Verteilung einer statistischen Signifikanz im untersuchten Patientenkollektiv unterliegt, wurde ein statistischer Vergleich der beiden Gruppen durchgeführt.

Als Nullhypothese H_0 wurde hierbei kein Unterschied im Verlauf der malignen Erkrankung zwischen den Patienten mit bzw. ohne Tumor-spezifische T-Zellen angenommen. Die Alternativhypothese H_1 nimmt einen solchen Unterschied an und es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ festgelegt. Aufgrund der dichotomen Verteilung der Variablen T-Zellen (ja/nein) und Remission nach Transplantation (ja/nein) kamen der χ^2 -Test und Fishers exakter Test in Frage. Aufgrund der geringen Patientenzahl wurde Fishers exakter Test gewählt und mittels der Software „Analyze it for Excel“ (www.analyze-it.de) berechnet.

Abbildung 36 4-Felder-Tafel von Fishers exaktem Test zur Signifikanzbewertung der Bedeutung spezifischer CTL nach allogener Stammzelltransplantation

n	19		
	spez. T-Zellen		
Rezidivfreiheit	Ja	Nein	Total
Ja	6	6	12
Nein	1	6	7
Total	7	12	19
Difference between proportions	0,36		
95% CI	-0,03 to 0,74		(normal approximation)
2-tailed p	0,29 (exact, double 1-tailed p)		

Da bei Durchführung des Testes ein p-Wert von 0,29 ermittelt wurde und dieser damit deutlich über dem geforderten Signifikanzniveau lag, konnte die Nullhypothese nicht verworfen werden und das empirisch bessere Ansprechen von Patienten mit Leukämie-spezifischen T-Zellen gegenüber Patienten ohne dementsprechende Zellen nicht im Sinne einer statistischen Signifikanz (beruhend auf einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 Prozent) untermauert werden. Somit konnte kein Rückschluss auf eine Untersuchung künftiger Patientenkollektive gezogen werden.

Die zweite zu überprüfende Hypothese war, ob die GVH-Erkrankung mit einem besseren Ansprechen im klinischen Verlauf assoziiert ist. Wiederum kam Fishers exakter Test ($\alpha = 0,05$) zum Einsatz. Die Nullhypothese H_0 war hier „kein Zusammenhang zwischen GVH-Erkrankung (ja/nein) und Rezidivfreiheit (ja/nein)“.

Abbildung 37 4-Felder-Tafel von Fishers exaktem Test zur Signifikanzbewertung des Zusammenhangs zwischen GVHD und Rezidivfreiheit nach allogener Stammzelltransplantation

n	19		
	GVHD		
Rezidivfreiheit	Ja	Nein	Total
Ja	8	4	12
Nein	3	4	7
Total	11	8	19
Difference between proportions	0,24		
95% CI	-0,22 to 0,69		(normal approximation)
2-tailed p	0,59 (exact, double 1-tailed p)		

Der bestimmte p-Wert (0,59) liegt erneut deutlich über dem geforderten Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ und somit existiert in dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Patientenkollektiv ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer GVH-Erkrankung und Rezidivfreiheit. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren, die ein deutlich vermindertes Rezidivrisiko bei Auftreten einer GVHD zeigen konnten (Horowitz *et al.*, 1990; Appelbaum, 2001).

4 Diskussion

Im wesentlichen werden zwei verschiedene Arten von Tumorantigenen unterschieden (Stevanović, 2002).

Mutierte Gene können deren Grundlage und auch gegebenenfalls die Grundlage der Tumorgenese darstellen, womit eine exklusive Expression auf neoplastisch veränderten Zellen gegeben ist (z.B. *bcr-abl* bei CML). Diese Antigene werden als Tumor-spezifische Antigene bezeichnet und ausschließlich von Tumorzellen präsentiert.

Die Tumor-assoziierten Antigene (TAA), zu denen auch MUC1 zählt, werden zusätzlich von Zellen des Normalgewebes exprimiert und präsentiert, jedoch in weitaus geringerem Maße als von Tumorzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue HLA-Restriktionen aus dem Tumor-assoziierten Antigen MUC1 auf ihre Relevanz und Erkennung durch spezifische CTL in allogenen-stammzelltransplantierten Patienten sowie gesunden Spendern untersucht.

Die Klonierung von MAGE-1 als erstem Tumor-assoziiertem Antigen, das von T-Zellen spezifisch erkannt werden kann (van der Bruggen *et al.*, 1991), lieferte den „Startschuss“ zu einer neuen Perspektive bei der Therapie maligner Erkrankungen. Inzwischen konnte eine Vielzahl klinischer Studien demonstrieren, daß eine Tumor-Behandlung mittels T-Zell-basierter Immuntherapie einen günstigeren klinischen Krankheitsverlauf bedingen kann (Rosenberg *et al.*, 1998; Nestle *et al.*, 1998; Brossart *et al.*, 2000).

4.1 Definition neuer MHC-Klasse-I-Epitope aus dem Tumor-assoziierten Antigen MUC1

Eine Vielzahl humaner Krebserkrankungen exprimiert eine veränderte Form des MUC1-Glykoproteins. Sowohl im Falle solider Tumoren wie des Mammakarzinoms, Pankreaskarzinoms oder mancher Kolonkarzinome (Ceriani *et al.*, 1977; Lloyd *et al.*, 1996), als auch bei hämatologischen Erkrankungen (Brossart *et al.*, 2001) konnte eine Überexpression einer hypoglykosylierten MUC1-Isoform auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. In Studien an MUC1-Knockout-Mäusen konnten zusätzlich Hinweise gefunden werden, die eine Beteiligung von MUC1 am Prozess der Kanzerogenese implizieren. Bei Induktion von Tumoren der Brustdrüse mittels eines modifizierten Polyoma-Virus wurde beobachtet, daß die MUC1-Knockout-Mäuse in geringerer Inzidenz Tumoren entwickelten und diese auch langsamer wuchsen als die Tumoren in den Wildtypmäusen (Spicer *et al.*, 1995).

Die Beobachtung, daß Brustkrebspatienten in frühen Erkrankungsstadien, die eine intrinsische humorale Immunantwort gegen MUC1 entwickelten, ein signifikant verbessertes Überleben zeigen, als Patienten ohne nachweisbare MUC1-Antikörper, deutet ebenfalls darauf hin, daß MUC1 eine Rolle in der Brustkrebsprogression und als Ziel einer Tumor-spezifischen Immunantwort spielen könnte (von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000). Ähnliche Resultate wurden auch bei anderen Erkrankungen wie beispielsweise dem Pankreaskarzinom gezeigt, was insgesamt darauf hindeutet, daß die Induktion einer MUC1-spezifischen Immunantwort eine wichtige therapeutische Strategie darstellen könnte (Hamanaka *et al.*, 2003).

Ein Ansatz zur Induktion einer MUC1-spezifischen Immunantwort wurde mittels rekombinanter viraler Impfsysteme angegangen. In der modernen Gentechnik spielt das Vaccinia-Virus als Carrier-System eine sehr bedeutende Rolle, wobei sich bei Verwendung rekombinanter Stämme zur Impfung stets das Problem der Virusreplikationsfähigkeit stellt. Einen sicheren Vektor stellt das „Modified Vaccinia Ankara“ (MVA) Virus als ein in humanen Zellen nicht-vermehrungsfähiger, hoch-attenuierter Vaccinia-Stamm dar (Sutter *et al.*, 1992).

Ein rekombinanter MVA-MUC1-Stamm, der zusätzlich das Gen für das immunstimulatorische Zytokin IL-2 trägt, zeigte in klinischen Phase I/II Studien bereits eine hohe Sicherheit bezüglich der impfspezifischen Nebenwirkungen und zusätzlich ein klinisches Ansprechen bei Patienten mit soliden MUC1-exprimierenden Tumoren wie beispielsweise Prostata-, Mamma-, Lungen- oder Nierenzellkarzinom (Rochlitz *et al.*, 2003; Pantuck *et al.*, 2004).

MUC1 stellt sich bei einer Vielzahl von malignen Erkrankungen als vielversprechendes Ziel immuntherapeutischer Strategien dar. Es wird unter anderem beim Multiplen Myelom in mehr als 90 % aller Zellen exprimiert (Brossart *et al.*, 2001), und es konnte demonstriert werden, daß sich MUC1-spezifische CD8⁺ Memory-Zellen im Knochenmark von Myelom-Patienten anreichern und neben dem Nachweis einer phänotypischen Spezifität in der Tetrameranalyse auch eine Peptid-spezifische Lyse im Zytotoxizitätstest zeigen, was eine aktive Auseinandersetzung des Immunsystems mit *in situ* vorhandenen Myelomzellen repräsentieren könnte (Choi *et al.*, 2005). Zusätzlich konnte der interessante Nachweis erbracht werden, daß aus Blut von gesunden Spendern und Patienten mit Prostata-Karzinom mittels Stimulation durch MUC1-Peptid, IL-2 und IL-12 *ex vivo* T-Zellen generiert werden können, die sowohl eine Spezifität für das Tumor-assoziierte Antigen MUC1 besitzen (CTL-Aktivität), als auch HLA-Klasse-I-defiziente Ziele (NK-Aktivität) erkennen und lysieren können (Wajchman *et al.*, 2004), was einen interessanten Ansatz darstellen könnte, den Immunevasionsmechanismus der MHC-Downregulation mancher Tumoren durch eine duale Spezifität der für eine adoptive Immuntherapie verwendeten T-Zellen zu umgehen. MUC1 stellt sich damit als vielversprechendes Ziel immuntherapeutischer Ansätze dar. Gezielte Untersuchungen zur T-Zell-vermittelten Immunität sind jedoch in bisherigen Studien lediglich auf das Allel HLA-A2 beschränkt, weswegen als Ziel dieser Arbeit weitere MUC1-Peptide für ein breiteres Spektrum von HLA-Restriktionen bereit gestellt werden sollten, um mehr Patienten als bisher untersuchen zu können.

Die Induktion einer CTL-Antwort gegen definierte und spezifische Zielstrukturen ist auf eine Identifizierung von MHC-Klasse-I-Liganden aus Tumor-assoziierten Antigenen für eine möglichst große Zahl von HLA-Restriktionen angewiesen. Eine Vielzahl neuer Methoden gestattet es heutzutage, diese viel schneller zu identifizieren als dies noch vor wenigen Jahren möglich war.

Der in vorliegender Arbeit gewählte Ansatz der „Reverse Immunology“ (Celis *et al.*, 1994) begründet sich auf Computer-basierten Vorhersage-Algorithmen mittels derer die Sequenz interessierender Tumor-assoziiertes Antigene auf MHC-Bindungsmotive gescreent und die Epitope nach anschließender Synthese auf eine Erkennung durch T-Zellen untersucht werden. Einen Nachteil dieser Methode stellen mit Sicherheit die zeitlich überaus aufwendigen Verfahren der T-Zellkultur dar. Es ist sehr wesentlich, die Vielzahl der vorhergesagten Peptide bereits vor den Untersuchungen zur Induzierbarkeit von T-Zellen gegen diese Epitope einzuschränken, um den enormen Arbeitsaufwand der T-Zellkulturen zu reduzieren. Dazu ist es wichtig, die Versuche in geeigneten Spendern durchzuführen. Ein sehr gutes Beispiel für eine solche Herangehensweise stellt die Definition CMV-spezifischer T-Zellepitope im Kollektiv CMV-seropositiver Donoren dar, in denen eine zelluläre Immunantwort gegen Bestandteile des Cytomegalievirus erwartet werden kann. Hier konnten relativ rasch eine große Zahl von vorhergesagten T-Zellepitopen für verschiedene Restriktionen mittels ELISPOT-Technik und Durchflußzytometrie verifiziert werden (Hebart *et al.*, 2002; Kern *et al.*, 1998).

Im Falle der Identifikation von Peptidepitopen aus TAA ist es sicherlich im Kollektiv allogentransplantierten Patienten einfacher, da hier ein allgemein aktivierterer Status des Spenderimmunsystems in Auseinandersetzung mit Empfängerantigenen, sei es als Graft-versus-Host oder aber Graft-versus-Leukemia-Reaktion, anzunehmen ist, da die relevanten Antigene auf Tumorzellen präsentiert werden. Eine ähnliche Herangehensweise, d. h. ein Screening von T-Zellen des peripheren Bluts von Melanompatienten mittels in Computeranalysen vorhergesagter Peptide, wurde bereits erfolgreich zur Identifizierung neuer immunogener, Melanom-assoziiertes T-Zellepitope aus dem Antigen Tyrosinase eingesetzt (Scheibenbogen *et al.*, 2002a). Diese

Strategie erleichtert die Identifizierung immunogener T-Zellepitope, die wahrscheinliche Ziele von Abwehrmechanismen gegen den Tumor sind. Auf diese Weise wurden in der vorliegenden Arbeit sämtliche vorhergesagten MUC1-Peptide zusätzlich zu Tests in gesunden Spendern auch in Empfängern eines allogenen Transplantats mit einer Grunderkrankung, die eine Expression der betrachteten Antigene MUC1, WT1 oder Proteinase 3 in hoher Wahrscheinlichkeit erwarten lässt, untersucht. Erst anschließend wurde versucht, eine Induzierbarkeit der in Patienten detektierten T-Zellantwort in gesunden Spendern nachzuweisen (für das Tumor-assoziierte Antigen MUC1). Im Vergleich zu Experimenten, in denen der Versuch unternommen wurde gegen alle vorhergesagten Peptide einzeln oder in Form von Mischungen aus zwei bis drei Peptiden eine T-Zellantwort in gesunden Spendern zu generieren, zeigte sich die Herangehensweise mit einer zuerst durchgeführten Verringerung der Epitopkandidaten durch Testung in Transplantationspatienten als deutlich effektiver und auch vom Arbeitsaufwand praktikabler (Ergebnisse nicht gezeigt), da hier häufiger T-Zellantworten gegen TAA vorhanden sind.

Obwohl immer mehr Tumor-assoziierte Antigene entdeckt und in der Literatur beschrieben werden, beschränken sich die Identifikationen geeigneter T-Zellepitope sehr oft auf das im jeweiligen Land bzw. im jeweiligen Erdteil häufigste HLA-Klasse-I-Molekül, das beispielsweise in der kaukasischen Bevölkerung Westeuropas HLA-A2 ist. Um eine umfassendere Aussage über die T-Zellantworten gegen MUC1 auch in größeren Patientenkollektiven machen zu können, wurden in dieser Arbeit Peptide für HLA-Restriktionen, für die bisher keine T-Zellepitope aus diesem Antigen bekannt sind, mittels des Programms SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) vorhergesagt. Als Marker für eine Erkennung des jeweiligen Peptids durch CTL wurde ein intrazellulärer IFN- γ -Nachweis in der Durchflußzytometrie nach Peptid-spezifischer Stimulation herangezogen, da CD8⁺ Memory-, Memory-Effektor- und Effektorzellen im Gegensatz zu naiven CD8⁺ Zellen nach Aktivierung dieses Zytokin exprimieren (Sallusto *et al.*, 1999) und dieses auch mit einer Vielzahl von Effektorfunktionen verbunden ist. Beispielsweise verstärkt IFN- γ die Präsentation von

Tumorzellantigenen durch eine Vermehrung von MHC-Klasse-I-Komplexen auf der Zelloberfläche (Seliger *et al.*, 1997) und kann weiterhin in den Tumorzellen Apoptose auslösen (Kaplan *et al.*, 1998; Trubiani *et al.*, 1994).

Der Nachweis einer Peptid-spezifischen IFN- γ -Produktion mittels intrazellulärer Zytokinfärbung ist eine sehr aussagekräftige Methode für Untersuchungen im Rahmen der „Reverse Immunology“. Zielzellen für eine funktionelle Analyse der CTL in Zytotoxizitätsversuchen sind für die immer größer werdende Zahl von Tumorantigenen und gleichzeitig alle notwendigen HLA-Restriktionen nicht in adäquatem Maßstab zugänglich. Die meisten auf dem kommerziellen Markt erhältlichen Zelllinien, die endogen die gewünschten Tumorantigene exprimieren, sind nicht näher charakterisiert was die HLA-Typisierungen angeht. Weitere Versuche die hierzu in Zukunft anstehen würden, sind damit neben der Optimierung der Expansionsbedingungen Tumor-spezifischer T-Zellen auch die Etablierung geeigneter „Read-out“-Systeme für Zytotoxizitätstests von MUC1-spezifischen T-Zellen, die andere Restriktionen als HLA-A*0201 erkennen. Beispielsweise könnte versucht werden, Zellen passend typisierter Spender stabil mit dem gewünschten Zielantigen mittels viraler Vektorsysteme zu transfizieren und zu immortalisieren. Hier stellt sich jedoch das Problem einer adäquaten Negativkontrolle, da unbehandelte Ausgangszellen im Vergleich zu transfizierten Zellen allein durch die Manipulation im Rahmen der Transfektionsversuche sicher nicht als identisch in ihrem Verhalten als Zielzellen in Zytotoxizitätsversuchen angesehen werden dürfen.

Es ist dementsprechend notwendig, alternative Methoden einzusetzen, die mindestens gleich gut oder besser sind. Hier ist insbesondere die auch in dieser Arbeit eingesetzte Detektion von IFN- γ -Produktion nach Peptid-spezifischem Stimulus mittels Durchflußzytometrie und/oder q-RT-PCR von sehr großem Nutzen, da unter anderem am Modellsystem der CMV-spezifischen CTL-Antwort gezeigt werden konnte, daß eine hohe Korrelation zwischen Peptid-spezifischer IFN- γ -Produktion und Peptid-spezifischer Zytotoxizität im „Chrom-Release-Assay“ besteht (Ghanekar *et al.*, 2001). Ein weiterer gravierender

Vorteil des Screenings mittels IFN- γ -Nachweis ist im Kollektiv der Tumorpatienten mit Sicherheit, daß mit relativ geringen Zellzahlen, d.h. auch mit geringen Volumina bei Blutabnahmen (es wurden in dieser Arbeit maximal 50 ml eingesetzt) in kurzer Zeit aussagekräftige Ergebnisse erhalten werden können. Auf diese Weise bleiben den Patienten belastende, aufwendige Blutentnahmen erspart.

Zunächst wurde der Versuch unternommen, CTL, die für die vorhergesagten Peptide spezifisch sind, in gesunden Spendern direkt *ex vivo* nachzuweisen. Da hier durchweg negative Ergebnisse erzielt wurden, ist anzunehmen, daß für diese Epitope mit hoher Wahrscheinlichkeit keine durch direkten Antigenkontakt aktivierbaren Memory-, Memory-Effektor- oder Effektorzellen in gesunden Spendern vorliegen.

Im nächsten Schritt konnte dann jedoch demonstriert werden, daß im Blut von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation spezifische CTL existieren, die Peptide aus MUC1 im Kontext der HLA-Restriktionen HLA-A*68 (P3511), HLA-B*0702 (P40009) und HLA-B*4402 (P2132), direkt *ex vivo* erkennen können und eine spezifische IFN- γ -Produktion aufweisen. Zusätzlich wurden CTL, die ein MUC1-Peptid auf HLA-B*2705 (P8507) erkennen im Blut eines Tumorpatienten nachgewiesen, bei dem keine Transplantation durchgeführt werden konnte. Die Frequenzen dieser Zellen lagen im Bereich 0,11 - 0,54 % aller CD3⁺/CD8⁺ Zellen. Bei diesen Patienten ist davon auszugehen, daß die nachgewiesenen CTL vom Memory-, Memory-Effektor- oder Effektorzell -Typ sind, da sie durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Methoden ansonsten nicht nachweisbar wären.

Des weiteren konnte gezeigt werden, daß mittels Peptid-gepulster DC spezifisch T-Zellen in vorher direkt *ex vivo* negativ getesteten gesunden Spendern induziert werden können. Für diese Experimente wurden die zuvor in Patienten positiv getesteten Peptide eingesetzt. Es konnte demonstriert werden, daß CTL mit einer Spezifität für Epitope aus MUC1, die von den HLA-Allelen HLA-A*68, B*0702, B*4402 und B*2705 (siehe vorheriger Abschnitt und Ergebnisteil) präsentiert werden, im Rezeptorrepertoire des Immunsystems

angelegt sind, nicht deletiert werden und nach Antigen-spezifischem Stimulus zu nachweisbaren Frequenzen expandiert werden können (Induktion naiver T-Zellen). Die Frequenz der nachweisbaren Zellen war im allgemeinen relativ gering und befand sich im Bereich zwischen 0,11 – 1,22 % aller CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, dennoch war die IFN- γ -Produktion stets spezifisch nachzuweisen. Die spezifische IFN- γ -Produktion wurde in allen Versuchen mit einer Negativkontrolle verglichen, in der ein anderes Peptid zur Stimulation eingesetzt wurde. Bei den Induktionen wurde darauf geachtet, als Negativkontrolle immer ein MUC1-Peptid derselben Restriktion, das nicht für die Induktion verwendet wurde, zu nutzen.

Damit konnten für das Antigen MUC1 fünf neue, bisher nicht beschriebene Peptide identifiziert werden, die von CTL spezifisch erkannt werden können. Die Peptide P3511, P2132 und P2134 leiten sich aus der extrazellulären Domäne von MUC1 ab, sind jedoch im Gegensatz zu den bereits publizierten Epitopen weder in der Tandem-Repeat-Sequenz (M1.1), noch in der Signalsequenz (M1.2) lokalisiert. Eine Analogie zeigt sich zwischen M1.1 und P2132, die beide in ihrer Sequenz eine potentielle Glykosylierungsstelle an einer Asparaginseitenkette (N) aufweisen. Inwiefern dies eine Rolle für die Eignung als T-Zellepitop aus der hypoglykosylierten Isoform von MUC1 im Rahmen mancher maligner Erkrankungen eine Rolle spielt, ist aus den bisherigen Daten nicht ersichtlich. Das HLA-B*0702-restringierte Peptid P40009 ist teilweise noch aus der extrazellulären Domäne abgeleitet, ein Teil spannt sich jedoch noch in die Transmembrandomäne, was darauf hindeutet, daß auch transmembranöse Epitope von MUC1 über MHC-Klasse-I natürlich prozessiert und präsentiert werden können. P8507 entstammt vollständig dem intrazellulären Teil von MUC1 (siehe auch Kapitel 6: MUC1-Proteinsequenz).

Als zusätzliche Untersuchung könnten Versuche zur Zytotoxizität durchgeführt werden, um nicht nur die Peptid-spezifische IFN- γ -Produktion, sondern auch die Antigen-spezifische Lyse nachzuweisen. Diese Versuche erschienen im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus mehreren Gründen nicht sinnvoll. Zum

ersten konnten mit der hier eingesetzten Methode der Induktion mit Peptid-beladenen DC und anschließender Restimulation über mehrere Zyklen mit autologen gepulsten PBMNC in gesunden Spendern keine ausreichend hohen Zellzahlen spezifischer CTL für Zytotoxizitätsversuche generiert werden. Bei den begrenzten Ressourcen, was sowohl Patientenmaterial als auch die relativ geringen spezifischen CTL-Zahlen nach Induktion und Restimulation anbetrifft, erschien es deutlich günstiger, die vorliegenden Zellen mittels intrazellulärer IFN- γ -Messung auf ihre Spezifität zu überprüfen, als geringe Zellzahlen mit nicht-etablierten „Read-out“-Systemen in einen „Chrom-Release-Assay“ einzusetzen. Zudem konnte eine deutliche Korrelation zwischen IFN- γ -Produktion in der Durchflußzytometrie und Lyse im Zytotoxizitätstest am Beispiel CMV-spezifischer T-Zellen gezeigt werden (Ghanekar *et al.*, 2001), was auch Daten unserer Arbeitsgruppe entspricht (Grigoleit, 2005).

Wie dieser geringe Prozentsatz spezifischer T-Zellen am besten expandiert werden kann, wird Ziel zukünftiger Experimente sein. Dabei sollen mehrere Verfahren überprüft werden: Auf der einen Seite könnte eine Isolierung der IFN- γ -produzierenden Zellen über einen „IFN- γ secretion assay“[®] (Miltenyi Biotec) erfolgen, dessen Wert zur Isolierung virusspezifischer T-Zellen schon mehrfach gezeigt werden konnte (Rauser, 2003; Bissinger *et al.*, 2002), wobei es im Falle von TAA eventuell von Vorteil sein könnte, einen Stimulationszyklus mit gepulsten DC vorzuschalten und nach anschließender Isolation die spezifischen-T-Zellen in Gegenwart allogener Feederzellen und höher dosiertem Interleukin-2 zu expandieren. Andererseits wäre es möglich die spezifischen T-Zellen nach Anfärbung mittels IFN- γ -Antikörpern oder Peptid-beladenen Multimer-Komplexen im Durchflußzytometer auszusortieren und anschließend ebenfalls mit allogenen Feederzellen und Interleukin-2 zu expandieren (Walter *et al.*, 2003).

Unter diesen Gesichtspunkten bieten die hier durch den Nachweis spezifischer IFN- γ -Sekretion definierten Peptide vielversprechende Möglichkeiten für eine Anwendung im Rahmen immunologischer Screening- und immuntherapeutischer Therapieansätze.

Durch die Bereitstellung von Peptiden aus MUC1 für eine erweiterte Zahl von HLA-Restriktionen ist es in Zukunft möglich, nahezu alle Patienten mit potentiell MUC1-exprimierenden Tumoren auf MUC1-spezifische T-Zellantworten zu untersuchen. Weiterhin können weitaus mehr Patienten als bisher mit MUC1-exprimierenden Tumoren immuntherapeutischen Impfstudien auf Basis von DC-Peptid-Vakzinen zugeführt werden. Im Falle des MUC1-Antigens konnte bei soliden MUC1-exprimierenden Tumoren bereits ein immunologisches und klinisches Ansprechen bei hoher Sicherheit eines solchen Impfstoffs in HLA-A2⁺ Patienten gezeigt werden (Brossart *et al.*, 2000). Welche Rolle die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesene Expression von MUC1 auf DC (Cloosen *et al.*, 2004) bei der physiologischen Funktion der APC spielt, ist momentan noch nicht geklärt. Jedoch konnte in zitierter Publikation demonstriert werden, daß MUC1-exprimierende DC im Vergleich zu MUC1-negativen DC dieselbe Stimulationskapazität aufweisen, was im Gegensatz zur früheren Annahme steht, daß MUC1 aufgrund seiner ausgedehnten Struktur einen inhibitorischen Effekt auf die T-Zellaktivierung ausübt (van de Wiel-van Kemenade *et al.*, 1993).

4.2 Nachweis Tumorpeptid-spezifischer CTL-Antworten bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation

Die Stammzelltransplantation wurde ursprünglich mit dem Gedanken entwickelt, ein irreversibel geschädigtes Stammzellkompartiment nach myeloablativer Radio- und Chemotherapie zu ersetzen. Vor allem die allogene Stammzelltransplantation wird jedoch heutzutage als eines der eindrucksvollsten Beispiele für die Fähigkeit des Immunsystems angesehen, maligne Zellen zu eliminieren (Appelbaum, 2001). So konnte gezeigt werden, daß die Haupttodesursache nach autologer Stammzelltransplantation die Wiederkehr der malignen Grunderkrankung darstellt, wohingegen bei Patienten nach HLA-identischer allogener Stammzelltransplantation eine verminderte Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs festzustellen war (Zittoun *et al.*, 1995; Ljungman *et al.*, 1993). Dieser Effekt wird den im Transplantat enthaltenen T-Zellen zugesprochen, die neben der gefürchteten Graft-versus-Host-Disease (GVHD) auch einen günstigen Graft-versus-Leukemia-(GVL)-Effekt vermitteln, was daran gezeigt werden konnte, daß eine T-Zelldepletion zur Verminderung des Risikos einer GVHD gleichzeitig zu einer erhöhten Rezidivrate führt (Apperley *et al.*, 1986; Sullivan *et al.*, 1989).

Die nach allogener Stammzelltransplantation häufig auftretende GVHD und der günstige GVL-Effekt werden unter anderem auf Alloreaktivität gegenüber „minor histocompatibility“ Antigenen (mHags) zurückgeführt (Goulmy *et al.*, 1996). mHags sind von polymorphen intrazellulären Proteinen abgeleitete immunogene Peptide, die nach Antigenprozessierung über MHC-Klasse-I-TCR-Interaktion erkannt werden können. Interessanterweise erreichen 50 % aller Patienten eine komplette Remission ohne eine GVHD zu entwickeln, was den Schluß nahe legt, daß verschiedene Zielstrukturen für die GVH- bzw. GVL-Reaktionen existieren (Falkenburg *et al.*, 1999; Childs *et al.*, 1999). So konnte gezeigt werden, daß nach Donor-Lymphozyten-Infusionen bei rezidierten Patienten nach allogener Stammzelltransplantation CTL-Klone gegen eine Vielzahl von Empfänger-mHags isoliert werden können (Kloosterboer *et al.*, 2005).

Die in vorliegender Arbeit untersuchten Antigene (MUC1, WT1, Proteinase 3) werden ebenfalls mit einem kurativen GVL-Effekt der allogenen Stammzelltransplantation in Verbindung gebracht. So konnte bei CML-Patienten nachgewiesen werden, daß eine Korrelation zwischen dem Vorkommen Proteinase-3-spezifischer CTL und zytogenetischem bzw. klinischem Verlauf der Erkrankung bestand (Molldrem *et al.*, 2000). Diese T-Zellen konnten bei 66 % der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation nachgewiesen werden, wobei sich diese Patienten zum Untersuchungszeitpunkt in kompletter Remission befanden. Bei Patienten unter konventionellen Chemotherapieschemata (ohne anschließenden allogenen Stammzelltransfer) war die Remissionsrate deutlich geringer. CTL-Antworten gegen Proteinase 3 und WT1 konnten des weiteren auch bei AML-Patienten unter konventionellen Chemotherapieschemata detektiert werden, was darauf hindeutet, daß im natürlichen T-Zellrepertoire diese CTL immer noch vorhanden sind, nicht im Rahmen der T-Zellentwicklung im Thymus deletiert werden und auch reaktiviert werden können (Scheibenbogen *et al.*, 2002b), was einer Induktion naiver T-Zellen entspricht. Eine sehr interessante Feststellung war dann die Tatsache, daß Leukämie-assoziierte Antigen-spezifische CD8⁺ Memory-T-Zellen gerichtet gegen Proteinase 3, WT1 oder BCR-ABL sowohl bei gesunden Spendern, als auch bei CML-Patienten vor sowie nach allogener Stammzelltransplantation nachzuweisen waren und es in diesem Fall zu einer Verschiebung von zentralen Memory-T-Zellen (CD45RO⁺CD27⁺CD57⁻) in gesunden Spendern zu terminal ausdifferenzierten Effektor-Memory-T-Zellen (CD45RO⁻CD27⁻CD57⁺) in Empfängern eines allogenen Stammzelltransplantats kam, was einen ablaufenden GVL-Effekt impliziert (Rezvani *et al.*, 2003).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten in einem Kollektiv von 19 Patienten nach allogener Stammzelltransplantation ebenfalls Leukämie-spezifische T-Zellantworten detektiert werden. So ließen sich wie in der Literatur bereits mehrfach beschrieben HLA-A*0201-restringierte T-Zellantworten gegen die Antigene WT1 und Proteinase 3 nachweisen. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, daß das TAA MUC1, das bereits im Rahmen von Vakzinierungsstudien solider Tumoren einen klinischen Einsatz erfährt,

auch bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation ein vielversprechendes Ziel für T-Zellantworten im Rahmen eines GVL-Effekts darstellt.

Insgesamt zeichnete sich bei Untersuchung des vorgestellten Patientenkollektivs der Trend ab, daß Patienten mit Tumor-spezifischen T-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation ein vermindertes Risiko aufweisen, ein Rezidiv zu erleiden. So entwickelten sechs von sieben Patienten (86 %) mit einer nachweisbaren T-Zellantwort gegen mindestens eines der Antigene MUC1, WT1 oder Proteinase 3 eine Remission, die mittlerweile bei allen über ein Jahr andauert, wohingegen es in der Patientengruppe ohne spezifische T-Zellen nur die Hälfte aller Patienten war, die in Remission kamen bzw. kein Rezidiv erlitten. Jedoch konnte dieser Unterschied nicht als statistisch signifikant beruhend auf einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha < 0,05$ verifiziert werden (Fishers exakter Test: $p=0,29$). Eine mögliche Erklärung hierfür ist sicherlich, daß das untersuchte Kollektiv mit einer Gesamtzahl von 19 Patienten für eine umfassende Beurteilung der Bedeutung Tumor-spezifischer T-Zellantworten zu klein ist. Für diese Hypothese spricht ebenfalls, daß im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen dem Auftreten einer GVHD und einem verminderten Rezidivaufreten festgestellt werden konnte (Fishers exakter Test: $p=0,59$), was in Widerspruch zu einer Vielzahl weltweit erhobener retrospektiver Studien steht, die in weitaus größeren Kollektiven von mehreren tausend Patienten eine signifikant verminderte Rezidivwahrscheinlichkeit bei Auftreten einer GVHD demonstrieren konnten (Horowitz *et al.*, 1990; Appelbaum, 2001). Wenn der Zusammenhang zwischen GVHD und Rezidivfreiheit aufgrund des zu kleinen Kollektivs bei den untersuchten Patienten nicht signifikant ist, ist es gleichzeitig wahrscheinlich, daß der Unterschied im Krankheitsverlauf zwischen den beiden Gruppen mit bzw. ohne Tumor-spezifische T-Zellen aus dem gleichen Grund als nicht signifikant ermittelt wird. Diese Hypothese wird in zukünftigen Projekten bei Untersuchung größerer Patientenkollektive eine besondere Beachtung finden.

Insgesamt erscheint die Entwicklung einer Immunantwort gegen Tumor-assoziierte Antigene eine wichtige Rolle für das leukämiefreie Überleben zu spielen, deren genauer Stellenwert in größeren Untersuchungen weiterverfolgt werden sollte.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Der mit allogener Stammzelltransplantation assoziierte GVL-Effekt war bis vor kurzem ein rein klinisch beschriebenes Phänomen, jedoch werden die zugrunde liegenden molekularen und zellulären Mechanismen immer besser verstanden. Ein Teil dieses GVL-Effekts ist auf das Potential tumorspezifischer T-Zellantworten gegen sogenannte „Selbst“-Antigene wie die in dieser Arbeit untersuchten Tumor-assoziierten Antigene MUC1, Proteinase 3 oder WT1 zurückzuführen (Molldrem *et al.*, 2002). Die Definition von immer mehr TAA erweitert den „Pool“ an potentiellen Zielstrukturen für immuntherapeutische Impfstrategien ständig. Es ist jedoch von großer Bedeutung, sich bei der steten Zunahme neuer Antigene nicht nur auf wenige HLA-Restriktionen für die Induktion von T-Zellantworten zu beschränken, sondern ein breit gefächertes Angebot an Vakzine-Kandidaten zur Verfügung zu haben, um die Immunantworten gegen ein möglichst breites Spektrum von HLA-Restriktionen überprüfen zu können und bei einem eventuellen zukünftigen klinischen Einsatz möglichst vielen Patienten diese Therapieformen ermöglichen zu können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde hierzu demonstriert, wie durch Screening von Epitop-Kandidaten in Patienten nach allogener Stammzelltransplantation mittels IFN- γ -Sekretionsmessung in der Durchflußzytometrie, unkompliziert neue Kandidaten für Peptid-basierte Vakzinierungsstrategien identifiziert werden können. Insgesamt konnten 5 neue Peptide aus dem Tumor-assoziierten Antigen MUC1 identifiziert werden, womit zusätzlich mit den bisher publizierten Epitopen der Großteil aller bei unseren Patienten vorkommenden HLA-Restriktionen abgedeckt werden kann.

Weiterhin werden die Mechanismen der Alloimmunität immer besser verstanden und es konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, daß Patienten mit T-Zellantworten gegen Tumorantigene nach allogener Stammzelltransplantation einen klinisch günstigeren Verlauf als Patienten ohne derartige T-Zellen aufweisen. Deswegen muss es langfristig

sicherlich das Ziel sein, das Potential des GVL-Effekts in Kombination mit immuntherapeutischen Ansätzen möglichst optimal auszunutzen, dabei das GVH- und das Rezidivrisiko zu minimieren.

5 Zusammenfassung

MHC-Klasse-I Peptidepitope aus dem Tumor-assoziierten Antigen MUC1 wurden für die HLA-Restriktionen HLA-A*68, HLA-B*0702, HLA-B*2705 und HLA-B*4402 *in silico* vorhergesagt und synthetisiert.

Für die Restriktionen HLA-A*68, HLA-B*0702 und HLA-B*4402 konnten Peptidepitope nachgewiesen werden, die bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation direkt *ex vivo* eine Peptid-spezifische IFN- γ -Produktion in einem Teil der CTL induzieren. Im Falle des Allels HLA-B*2705 konnte ein direkter *ex vivo* Nachweis bei einem Patienten demonstriert werden, bei dem keine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt wurde. Zusätzlich konnte für jedes dieser insgesamt fünf Peptide eine Induzierbarkeit spezifischer T-Zellen in direkt *ex vivo* negativ getesteten Spendern nachgewiesen und ein Funktionsnachweis dieser Zellen durch Peptid-spezifische IFN- γ -Produktion erbracht werden.

Des Weiteren konnten bei sieben von 19 Patienten nach allogener Stammzelltransplantation für die Tumor-assoziierten Antigene WT1, Proteinase 3 und MUC1 spezifische T-Zellen detektiert werden und deren Peptid-spezifische Aktivierbarkeit durch Nachweis von IFN- γ -Produktion erbracht werden. Interessanterweise zeigte sich bei 85,7 % der Fälle bei diesen Patienten eine Remission. Demgegenüber traten in der Gruppe ohne spezifische T-Zellen für die untersuchten Antigene nur 50% Remissionen/keine Rezidive auf. Nach Durchführung von Fishers exaktem Test konnte jedoch keine statistische Signifikanz dieser Ergebnisse festgestellt werden ($p=0,29$), ebenso existierte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Auftreten einer GVHD und einem vermehrten Vorkommen von Remissionen/keinen Rezidiven bei den untersuchten Patienten ($p=0,59$). Wenn der Zusammenhang zwischen GVHD und Rezidivfreiheit aufgrund des zu kleinen Kollektivs bei den untersuchten Patienten nicht signifikant ist (was dem aktuellen Stand der Literatur widerspricht), ist es gleichzeitig wahrscheinlich, daß der Unterschied im Krankheitsverlauf zwischen den beiden Gruppen mit bzw. ohne Tumorspezifische T-Zellen aus dem gleichen Grund als nicht signifikant ermittelt wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß ein wesentliches Ziel der Forschung auf dem Gebiet der Alloimmunität eine bessere Differenzierung von GVH- und GVL-assoziierten Antigenen darstellt, um so das große Potential, das Alloimmunantworten darstellen möglichst gut für die Patienten nutzen zu können.

Für eine grundlegendere Beurteilung TAA-spezifischer Immunantworten nach allogener Stammzelltransplantation wurde hierzu im Rahmen dieser Arbeit demonstriert, wie durch Validierung *in silico* vorhergesagter Epitope in einem geeigneten Patientenkollektiv relativ schnell Informationen über die Erkennung dieser Epitope durch T-Zellen und deren Funktion gewonnen werden können. Insgesamt konnten fünf neue Peptide aus dem Tumor-assoziierten Antigen MUC1 definiert werden. Des Weiteren wiesen die Patienten im hier untersuchten Kollektiv, die Tumor-spezifische T-Zellantworten nach allogener Stammzelltransplantation entwickelten, einen günstigeren Krankheitsverlauf auf als Patienten ohne die entsprechenden Immunantworten.

Anhand der hier gewonnenen Daten erscheinen weitere Untersuchungen zur klinischen Bedeutung dieser Epitope und der T-Zellantwort auf diese Epitope nicht nur wissenschaftlich interessant sondern auch im Hinblick auf die klinische Anwendung als überaus lohnenswert.

6 Anhang – MUC1-Proteinsequenz

M1.2 (12-20)	
1	<u>mtpgtqspff llllltvlvtv vtgsqhasst pggeketsat qrssvpsste knavsmtssv</u>
	P3511 (117-125)
61	<u>lsshspgsgs sttqqgdvtl apatepasgs aatwgqdvts vpvtrpalgs ttpahdvts</u>
121	<u>apdnkPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
181	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
241	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
301	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
361	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
421	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
481	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
541	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
601	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
661	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
721	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
781	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
841	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs</u>
	M1.1 (950-958)
901	<u>APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDNRPALGS TAPPVHNVTs</u>
961	<u>ASGSASgsas tlvhngtsar atttpaskst pfsipshsd tpttlashst ktdaßthhs</u>
	P2134 (1058-1066)
1021	<u>svpptssnh stspqlstgv sffllsfhis nlqfnssled pstdvygelq rdisemflqi</u>
	P2132 (1126-1134)
1081	<u>ykqggflqls nikfrpgsvv vqltlafreg tinvhdveta fqnykteaas rynltisdvs</u>
	P40009 (1156-1164) P8507(1186-1194)
1141	<u>vsdvpfpfsa gsgagvpgwg IALLVLCVL VALAIVYLIA Lavcqcrrkn ygqldifpar</u>
1201	<u>dtyhpmseyp tythgryvp psstrspye kvsagnggss lsytnpavaa asanl</u>

Abbildung 38 MUC1-Proteinsequenz (nach Swissprot: MUC1_HUMAN, Accession P15941)
(www.pubmed.com)

Unterstrichen und kursiv: Signalsequenz (Position 1-23)

Unterstrichen: Extrazelluläre Domäne (Position 24-1158)

KAPITÄLCHEN: TRANSMEMBRANDOMÄNE (POSITION 1159-1181)

Normal: Intrazelluläre Domäne (Position 1182-1255)

KAPITÄLCHEN UND UNTERSTRICHEN: TANDEM REPEAT (POSITION 126-965)

Fett hervorgehoben sind T-Zellepitope aus MUC1, die entweder schon früher publiziert wurden (M1.1 und M1.2, Brossart et al., 1999) oder im Rahmen dieser Arbeit von T-Zellen erkannt wurden.

7 Abkürzungen

ALAS	δ - Aminolevulinat Synthase (EC 2.3.1.37)
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
ATG	Antithymozytenglobulin
APC	Antigen Presenting Cell
Bcl-2	Protoonkogen
BCR-ABL	CML-spezifisches Fusionsprotein
cDNA	complementary DNA
CD	Cluster of Differentiation
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
c-myc	Protoonkogen
CR	Complete Remission
CSF-1	Colony-Stimulating-Factor 1
CTL	Cytotoxic T-Lymphocytes
DC	Dendritic Cell
DEK-CAN	AML-spezifisches Fusionsprotein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scattering
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor
GVHD	Graft-Versus-Host-Disease

GVL	Graft-Versus-Leukemia
HD	Healthy Donor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICCS	Intracellular Cytokine Staining
IFN	Interferon
IGF	Insulin like growth factor
IL	Interleukin
IMP	Influenza Matrix Protein
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
LC	Light Cycler
MACS	Magnetic Associated Cell Sorting
MAGE	Melanoma Antigen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHags	Minor Histocompatibility Antigens
MHC	Major Histocompatibility Complex
MM	Multiplres Myelom
MVA	Modified Vaccinia Ankara
MUC1	Mucin1 (Tumor-assoziiertes Antigen)
NHL	Non Hodgkin Lymphom
PML-RAR α	Promyelozytenleukämie-spezifisches Fusionsprotein
PBMNC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBSC	Peripheral blood stem cells
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyllprotein
PMA	Phorbolmyristylacetat
PR	Partial Remission
q-RT-PCR	Quantitative Real-Time PCR

RAR α	R etinoic a cid r eceptor α
RNA	R ibonucleic A cid
RT	R everse T ranscription
rpm	Umdrehungen pro Minute
SCT	S tem C ell T ransplantation
SSC	S ide S cattering
TAA	T umor A ssociated A ntigens
TAP	T ransportprozesse assoziiert mit A ntigen p rozessierung
TCR	T - C ell R eceptor
TGF- β	T ransforming G rowth F actor β
TNF- α	T umor N ekrose F aktor α
TX	Transplantation
VZ	V orläuferzelle
WT1	W ilms- T umor- P rotein 1 (Tumor-assoziiertes Antigen)

8 Abbildungen

ABBILDUNG 1	DIE HÄUFIGSTEN TODESURSACHEN IN AFRIKA UND EUROPA 2002	1
ABBILDUNG 2	DIE HÄUFIGSTEN TODESURSACHEN IN DEUTSCHLAND 2002	2
ABBILDUNG 3	KREBSMORTALITÄT NACH ORGANEN	3
ABBILDUNG 4	HÄMATOPOESE UND URSPRUNG DER LEUKÄMIEN (FAB-KLASSIFIKATION)	5
ABBILDUNG 5	MÖGLICHKEITEN/INDIKATIONEN VON STAMMZELLTRANSPLANTATIONEN	10
ABBILDUNG 6	KOMPLIKATIONEN DER ALLOGENEN TRANSPLANTATION	11
ABBILDUNG 7	T-ZELLENDEPLETION UND GVL-EFFEKT	13
ABBILDUNG 8	ZIELANTIGENE HÄMATOLOGISCHER ERKRANKUNGEN	14
ABBILDUNG 9	IMMUNITÄTS-INDUKTION DURCH DNA-VAKZINE	19
ABBILDUNG 10	NEUBAUER-ZÄHLKAMMER.....	35
ABBILDUNG 11	PRINZIP DER IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG MIT MHC-PEPTID-TETRAMEREN	45
ABBILDUNG 12	MARKIERUNG DER LC-SONDEN	50
ABBILDUNG 13	AMPLIFIKATDETEKTION BEIM LC	50
ABBILDUNG 14	INTRAZELLULÄRE IFN- γ -FÄRBUNG DIREKT <i>EX VIVO</i> (HD 1)	58
ABBILDUNG 15	INTRAZELL. IFN- γ -FÄRBUNG DIREKT <i>EX VIVO</i> (PATIENT 17, TAG 672 N. TRANSPLANTATION)	59
ABBILDUNG 16	REINHEIT DER CD8-ZELLEN NACH POSITIVSELEKTION (HD 2)	60
ABBILDUNG 17	AUS CD14-POSITIV-SELEKTIERTEN MONOZYTEN GENERIERTE DENDRITISCHE ZELLEN (DC) NACH 10 TAGEN KULTUR (HD2)	61
ABBILDUNG 18	INTRAZELL. IFN- γ -FÄRBUNG NACH VERSCHIEDENER KULTURDAUER MIT EPITOP P2132 (HD2)	62
ABBILDUNG 19	INTRAZELL. IFN- γ -FÄRBUNG NACH VERSCHIEDENER KULTURDAUER MIT EPITOP P2132 (HD1)	63
ABBILDUNG 20	INTRAZELLULÄRE IFN- γ -FÄRBUNG NACH 14 TAGEN ZELLKULTUR MIT EPITOP P2132(HD 3).....	64
ABBILDUNG 21	INTRAZELL. IFN- γ -FÄRBUNG NACH VERSCHIEDENER KULTURDAUER MIT EPITOP P2134 (HD1)	65
ABBILDUNG 22	INTRAZELLULÄRE IFN- γ -FÄRBUNG NACH 14 TAGEN ZELLKULTUR MIT EPITOP P2134(HD 3).....	66
ABBILDUNG 23	INTRAZELLULÄRE IFN- γ -FÄRBUNG DIREKT <i>EX VIVO</i> (PATIENT 8, TAG 1035 NACH TX.)	68
ABBILDUNG 24	FACS-FÄRBUNG NACH VERSCHIEDENER KULTURDAUER MIT EPITOP P3511(HD1).....	69
ABBILDUNG 25	INTRAZELLULÄRE IFN- γ -FÄRBUNG DIREKT <i>EX VIVO</i> (PATIENT 12, TAG 522 NACH TX.)	71
ABBILDUNG 26	INTRAZELL. IFN- γ -FÄRBUNG N. VERSCHIEDENER KULTURDAUER MIT EPITOP P40009 (HD5).....	72
ABBILDUNG 27	INTRAZELL. IFN- γ -FÄRBUNG N. VERSCHIEDENER KULTURDAUER MIT EPITOP P40009 (HD5).....	73
ABBILDUNG 28	INTRAZELL. IFN- γ -FÄRBUNG NACH 21 TAGEN ZELLKULTUR MIT EPITOP P8507(PATIENT 20).....	74

ABBILDUNG 29	TETRAMERFÄRBUNG DIREKT <i>EX VIVO</i> PATIENT 3 (TAG 87 NACH TRANSPLANTATION)	76
ABBILDUNG 30	Q-RT-PCR PATIENT 3 (TAG 87 NACH TRANSPLANTATION).....	77
ABBILDUNG 31	INTRAZELL. IFN- γ -FÄRBUNG DIREKT <i>EX VIVO</i> PATIENT 8 TAG 471 NACH TRANSPLANTATION.....	78
ABBILDUNG 32	Q-RT-PCR PATIENT 8 (TAG 471 NACH TRANSPLANTATION).....	79
ABBILDUNG 33	Q-RT-PCR PATIENT 4 (TAG 293 NACH TRANSPLANTATION).....	80
ABBILDUNG 34	VERLAUFSDIAGRAMM PATIENT 4.....	81
ABBILDUNG 35	Q-RT-PCR PATIENT 14 (TAG 136 NACH TRANSPLANTATION).....	82
ABBILDUNG 36	4-FELDER-TAFEL VON FISHERS EXAKTEM TEST ZUR SIGNIFIKANZBEWERTUNG DER BEDEUTUNG SPEZIFISCHER CTL NACH ALLOGENER STAMMZELLTRANSPLANTATION	85
ABBILDUNG 37	4-FELDER-TAFEL VON FISHERS EXAKTEM TEST ZUR SIGNIFIKANZBEWERTUNG DES ZUSAMMENHANGS ZWISCHEN GVHD UND REZIDIVFREIHEIT NACH ALLOGENER STAMMZELLTRANSPLANTATION	86
ABBILDUNG 38	MUC1-PROTEINSEQUENZ (NACH SWISSPROT: MUC1_HUMAN, ACCESSION P15941)	105

9 Tabellen

TABELLE 1	LYMPHOM – SUBTYPEN (REAL-KLASSIFIKATION)	7
TABELLE 2	HLA-TYPISIERUNGEN DER UNTERSUCHTEN GESUNDEN SPENDER.....	24
TABELLE 3	PATIENTENDATEN	25
TABELLE 4	MEDIUMZUSAMMENSETZUNG BEI DER DC-GENERIERUNG	38
TABELLE 5	OBERFLÄCHENANTIKÖRPER ZUR ÜBERPRÜFUNG DES PHÄNOTYPS DER GENERIERTEN DC.....	41
TABELLE 6	INKUBATIONSANSÄTZE ZUR PEPTID-SPEZIFISCHEN IFN- γ -BESTIMMUNG IM ICCS.....	42
TABELLE 7	ZUGABESCHEMA DER OBERFLÄCHENANTIKÖRPER IM ICCS	43
TABELLE 8	ZUGABESCHEMA DES IFN- γ -ANTIKÖRPERS IM ICCS	43
TABELLE 9	VERSUCHSANSÄTZE BEI DER TETRAMER-ANALYSE	45
TABELLE 10	ZUGABESCHEMA DER OBERFLÄCHENANTIKÖRPER IN DER TETRAMER- ANALYSE	46
TABELLE 11	MASTERMIX FÜR 1 ANSATZ (1X) DER REVERSE TRANSKRIPTION.....	49
TABELLE 12	MASTERMIX FÜR 1 ANSATZ (1X) IFN- γ -Q-RT-PCR:	51
TABELLE 13	MASTERMIX FÜR 1 ANSATZ (1X) ALAS-Q-RT-PCR:	52
TABELLE 14	LIGHTCYCLER-PCR-PROGRAMM FÜR IFN- γ -Q-RT-PCR	52
TABELLE 15	LIGHTCYCLER-PCR-PROGRAMM FÜR H-ALAS-Q-RT-PCR.....	53
TABELLE 16	VORHERGESAGTE MUC1-PEPTIDE HLA-B*4402.....	55
TABELLE 17	VORHERGESAGTE MUC1-PEPTIDE HLA-A*68.....	56
TABELLE 18	VORHERGESAGTE MUC1-PEPTIDE HLA-B*0702.....	56
TABELLE 19	VORHERGESAGTE MUC1-PEPTIDE HLA-B*2705.....	57
TABELLE 20	T-ZELLANTWORT VS. „CLINICAL OUTCOME“	83

10 Literaturverzeichnis

10.1 Bücher

Becker, N., Wahrendorf, J. (2000)
Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland.
Springer-Verlag , Berlin

Begemann, M. (1999)
Praktische Hämatologie: Klinik – Therapie - Methodik (11.Auflage)
Thieme-Verlag, Stuttgart

Burmester, G.R., Pezutto, A. (1998)
Taschenatlas der Immunologie (1.Auflage)
Thieme-Verlag, Stuttgart

Erbar, P. (1994)
Onkologie: Einführung in Pathophysiologie, Klinik und Therapie maligner
Tumoren (Compact Lehrbuch)
Schattauer-Verlag, Stuttgart

McLaughlin, C.J, Ku, N.C. (1994)
Bone marrow transplantation
In: Cameron: Practical oncology
Norwalk: Appleton & Lange

Pfreundschuh, M. (1997)
Onkologische Therapie
Thieme-Verlag, Stuttgart

Rammensee, H.G., Bachmann, J., Stevanović, S. (1997)
MHC ligands and peptide motifs
Landes Bioscience, Austin

Riede, U.N., Schaefer, H.E. (1993)
Allgemeine und spezielle Pathologie (3.Auflage)
Thieme-Verlag, Stuttgart

Sambrook, J., Fritsch, E.M., Maniatis, T. (1989)
Molecular cloning: A laboratory manual (2nd edition).
Cold Spring Harbor, New York

10.2 Publikationen

Altman, J.D., Moss, P.A.H., Goulder, P.J.R., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., Davis, M.M. (1996)

Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes
Science, 274, 94-96

Apostolopoulos, V., Karanikas, V., Haurum, J., McKenzie, I.F. (1997)

Induction of HLA-A2-restricted CTL to the mucin 1 human breast cancer antigen
J. Immunol. , 159, 5211-5218

Appelbaum, F.R. (2001)

Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy
Nature, 411, 385-389

Apperley, J.F., Jones, L., Hale, G., Waldmann, H., Hows, J., Rombos, Y., Tsatalas, C., Marcus, R. E., Goolden, A. W., Gordon-Smith E. C., *et al.* (1986)

Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse
Bone Marrow Transplant. , 1, 53-66

Aversa, F., Tabilio, A., Terenzi, A., Velardi, A., Falzetti, F., Giannoni, C., Iacucci, R., Zei, T., Martelli, M. P., Gambelunghe, C., Rossetti, M., Caputo, P., Latini, P., Aristei, C., Raymond, C., Reisner, Y., Martelli, M. F. (1994)

Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum
Blood, 84, 3948-3955.

Aversa, F., Velardi, A., Tabilio, A., Reisner, Y., Martelli, M.F. (2001)

Haploidentical stem cell transplantation in leukaemia
Blood Rev. ,15, 111-119.

Baird, P.N., Simmons, P.J. (1997)

Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hematopoiesis
Exp. Hematol. ,25, 312-320

Bishop, D.F., Henderson, A.S., Astrin, K.H. (1990)

Human δ -Aminolevulinic Synthase: Assignment of the Housekeeping Gene to 3p21 and the Erythroid-Specific Gene to the X-Chromosome
Genomics, 7, 207-214

Bissinger, A. L., Rauser, G., Hebart, H., Frank, F., Jahn, G., Einsele, H. (2002)
Isolation and expansion of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T
lymphocytes using interferon-gamma secretion assay
Exp. Hematol., 30, 1178-1184

Boehm, T. (1993)
Ätiologie und Pathogenese der Leukämien
Internist, 34, 491-497

Bories, D., Raynal, M.C., Solomon, D.H., Darzynkiewicz, Z., Cayre, J.E. (1989)
Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and
differentiation of promyelocytic leukaemia cells
Cell, 59, 959-968

Brossart, P., Heinrich, K.S., Stuhler, G., Behnke, L., Reichardt, V.L.,
Stevanović, S., Muhm, A., Rammensee, H.G., Kanz, L., Brugger, W. (1999)
Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor
antigen for broadly applicable vaccine therapies
Blood, 93, 4309-4317

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

Brossart, P., Schneider, A., Dill, P., Schammann, T., Grunebach, F., Wirths, S.,
Kanz, L., Buhning, H.J., Brugger, W. (2001)
The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies
and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes
Cancer Res., 61, 6846-6850

Caligiuri, M.A., Velardi, A., Scheinberg, D. A., Borello, I. M. (2004)
Immunotherapeutic approaches for hematologic malignancies
Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program), 337-353

Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose,
E.A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W.H., Jones, C., Housman, D.E. (1990)
Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human
chromosome 11 Wilms` tumor locus
Cell, 60, 509-520

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

Ceriani, R. L., Thompson, K., Peterson, J. A., Abraham, S. (1977)
Surface differentiation antigens of human mammary epithelial cells carried on the human milk fat globule
Proc. Acad. Sci. USA, 74, 582-586

Chao, N. J., Emerson, S. G., Weinberg, K. I. (2004)
Stem cell transplantation (Cord blood transplants)
Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program), 354-370

Childs, R., Epperson, D., Bahceci, E., Clave, E., Barrett, J. (1999)
Molecular remission of chronic myeloid leukaemia following a non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplant: *in vivo* and *in vitro* evidence for a graft-versus-leukaemia effect
Br. J. Haematol., 107, 396-400

Choi, C., Witzens, M., Bucur, M., Feuerer, M., Sommerfeldt, N., Trojan, A., Ho, A., Schirmacher, V., Goldschmidt, H., Beckhove, P. (2005)
Enrichment of functional CD8 memory T cells specific for MUC1 in bone marrow of multiple myeloma patients
Blood, 105, 2132-2134

Cloosen, S., Thio, M., Vanclée, A., van Leeuwen, E. B. M., Senden-Gijsbers, B. L. M. G., Oving, E. B. H., Germeraad, W. T. V., Bos, G. M. J. (2004)
Mucin-1 is expressed on dendritic cells, both *in vitro* and *in vivo*
Int. Immunol., 16, 1561-1571

Collins, R.H. Jr., Shpilberg, O., Drobyski, W.R., Porter, D.L., Giralto, S., Champlin, R., Goodman, S.A., Wolff, S.N., Hu, W., Verfaillie, C., List, A., Dalton, W., Ognoskie, N., Chetrit, A., Antin, J.H., Nemunaitis, J. (1997)
Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation
J. Clin. Oncol., 15, 433-444

Davenport, M.P., Ho Shon, I.A., Hill, A.V. (1995)
An empirical method for the prediction of T-cell epitopes
Immunogenetics, 42, 392-397

Delsol, G., Al Saati, T.A., Gatter, K.C., Gerdes, J., Schwarting, R., Caveriviere, P., Rigal-Huguet, F., Robert, A., Stein, H., Mason, D.Y. (1988)
Coexpression of epithelial membrane antigen (EMA), Ki-1, and interleukin-2 receptor by anaplastic large cell lymphoma
Am. J. Pathol., 130, 59-70

Dengler, R., Muenstermann, U., Al-Batran, S., Hausner, I., Faderl, S., Nerl, C., Emmerich, B. (1995)

Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells
Br. J. Haematol., 89, 250-257

Dey, B.R., Sukhatme, V.P., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Rauscher, F.J. III., Kim, J.S. (1994)

Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms` tumor suppressor WT1 gene product
Mol. Endocrinol., 8, 595-602

Domenech, N., Henderson, R.A., Finn, O.J. (1995)

Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeats domain of the epithelial tumor antigen mucin
J. Immunol., 155, 4766-4774

Duperray, C., Klein, B., Durie, B.G. M., Zhang, X., Jourdan, M., Poncelet, R., Favier, F., Vincent, C., Brochier, J., Lenoir, G., Bataille, R. (1989)

Phenotypic analysis of human myeloma cell lines
Blood, 73, 566-572

Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Löffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H.-G., Kanz, L., Kleihauer, A., Frank, F., Jahn, G., Hebart, H. (2002)

Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy
Blood, 99, 3916-3922

Falk, K., Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G., Rammensee, H.-G. (1991)

Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules
Nature, 351, 290-296

Falkenburg, J.H., Wafelman, A.R., Joosten, P., Smit, W.M., van Bergen, C.A., Bongaerts, R., Lurvink, E., van der Hoorn, M., Kluck, P., Landegent, J.E., Kluin-Nelemans, H.C., Fibbe, W.E., Willemze, R. (1999)

Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes
Blood, 94, 1201-1208

Gendler, S., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Rothbard, J., Burchell, J. (1988)

A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats
J. Biol. Chem., 263, 12820-12823

Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R.L., Orkin, S.H., Bruns, G.A.P. (1990)

Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping
Nature, 343, 774-778

Ghanekar, S. A., Nomura, L. E., Suni, M. A., Picker, L. J., Maecker, H. T., Maino, V. C. (2001)

Gamma interferon expression in CD8⁺ T cells is a marker for circulating cytotoxic T lymphocytes that recognize an HLA A2-restricted epitope of human cytomegalovirus phosphoprotein pp65
Clin. Diagn. Labor. Immunol., 8, 628-631

Girling, A., Bartkova, J., Burchell, J., Gendler, S., Gillett, C., Taylor-Papadimitriou, J. (1989)

A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas
Int. J. Cancer, 43, 1072-1076

Goodyer, P., Dehbi, M., Torban, E., Bruening, W., Pelletier, J. (1995)

Repression of the retinoic acid receptor-alpha gene by the Wilms' tumor suppressor gene product, WT1
Oncogene, 16, 1125-1129

Goulmy, E., Schipper, R., Pool, J., Blokland, E., Falkenburg, J.H., Vossen, J., Grathwohl, A., Vogelsang, G.B., van Houwelingen, H.C., van Rood, J.J. (1996)

Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation
N. Eng. J. Med., 334, 281-285

Greaves, M.F. (1997)

Aetiology of acute leukaemia
Lancet, 349, 344-349

Grigoleit GU, Kapp M, Hebart H, Fick K, Beck R, Jahn G, Einsele H. (2007)

Dendritic cell vaccination in allogeneic stem cell recipients: induction of human cytomegalovirus (HCMV)-specific cytotoxic T lymphocyte responses even in patients receiving a transplant from an HCMV-seronegative donor.
J Infect Dis., 196, 699-704

Grigoleit, U. (persönliche Mitteilung), 2005

Hamanaka, Y., Suehiro, Y., Fukui, M., Shikichi, K., Imai, K., Hinoda, Y. (2003)

Circulating anti-MUC1 IgG antibodies as a favorable prognostic factor for pancreatic cancer
Int. J. Cancer, 103, 97-100

Harrington, M.A., Konicek, B., Song, A., Xia, X., Fredericks, W.J., Rauscher, F.J. III. (1993)

Inhibition of colony-stimulating factor-1 promotor activity by the product of the Wilms` tumor locus

J. Biol. Chem., 268, 21271-21275

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., de Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C. (1994)

A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal of the International Lymphoma Study Group

Blood, 84, 1361-1392

Hebart, H., Daginek, S., Stevanović, S., Grigoleit, U., Dobler, A., Baur, M., Rauser, G., Sinzger, C., Jahn, G., Löffler, J., Kanz, L., Rammensee, H.-G., Einsele, H. (2002)

Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation

Blood, 99, 3830-3837

Henderson, R.A., Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Apella, E., Hunt, D.F., Engelhard, V.H. (1992)

HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: A second pathway of antigen presentation

Science, 255, 1264-1266

Heslop, H. E., Stevenson, F. K., Molldrem, J. J. (2003)

Immunotherapy of Hematologic malignancy

Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program), 331-349

Hewitt, S.M., Hamada, S., McDonnell, T.J., Rauscher F.,J. III., Saunders, G.F. (1995)

Regulation of the proto-oncogene bcl-2 and c-myc by the Wilms` tumor suppressor gene WT1

Cancer Res., 55, 5386-5389

Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H. J., Rimm, A. A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., Truitt, R. L., Zwaan, F. E., Bortin, M. M. (1990)

Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation

Blood, 75, 555-562

Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F. Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G., Levy, R. (1996)

Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells

Nat. Med., 2, 52-58

Huang, A., Campbell, C.E., Bonetta, L., McAndrews-Hill, M.S., Chilton-MacNeill, S., Coppes, M.J., Law, D.J., Feinberg, A.P., Yeger, H., Williams, B.R.G. (1990)

Tissue, developmental, and tumor-specific expression of divergent transcripts in Wilms tumor

Science, 250, 991-994

Inoue, K., Ogawa, H., Sonada, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., Tatekawa, T., Soma, T., Kishimoto, T., Sugiyama, H. (1997)

Aberrant overexpression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human Leukemia

Blood, 89, 1405-1412

Jurcic, J.G., Cathcart, K., Pinilla-Ibarz, J., Scheinberg, D.A. (2000)

Advances in immunotherapy of hematologic malignancies: cellular and humoral approaches

Curr. Opin. Hematol., 7, 247-254

Kammula, U.S., Lee, K.H., Riker, A.I., Wang, E., Ohnmacht, G.A., Rosenberg, S.A., Marincola, F.M. (1999)

Functional analysis of antigen-specific T-Lymphocytes by serial measurement of gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tumor specimens

J. Immunol., 163, 6867-6875

Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., Schreiber, R. D. (1998)

Demonstration of an interferon-gamma dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 7556-7561

Kapp, M. (2003)

Monitoring und Funktionsanalyse tumorspezifischer CTL in allogentstammzelltransplantierten Patienten und deren Spendern

Diplomarbeit der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Tübingen

Kern, F., Surel, I. P., Brock, C., Freistedt, B., Radtke, H., Scheffold, A., Blasczyk, R., Schneider-Mergener, J., Radbruch, A., Walden, P., Volk, H. D. (1998)

T-cell epitope mapping by flow cytometry

Nat. Med., 4, 975-978

Kloosterboer, F. M., van Luxemburg-Heijs, S. A. P., van Soest, R. A., van Egmond, H. M., Barbui, A. M., Strijbosch, M. P. W., Willemze, R., Falkenburg, J. H. F. (2005)

Minor histocompatibility antigen-specific T cells with multiple distinct specificities can be isolated by direct cloning of IFN γ -secreting cells from patients with relapsed leukemia responding to donor lymphocyte infusion

Leukemia, 19, 83-90

Kolb, H.J., Schattenberg, A., Goldman, J.M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D. *et al.* (1995)

Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia
Blood, 86, 2041-2050

Link, H., Kolb, H.J., Ebell, W., Hossfeld, D.K., Zander, A., Niethammer, D., Wandt, H., Grosse-Wilde, H., Schaefer, U.W. (1997)

Transplantation of hematopoietic stem cells
Med. Klin., 92, 480-491

Ljungman, P., de Witte, T., Verdonck, L., Gahrton, G., Freycon, F., Gravett, P., McCann, S., Morgenstern, H.G., Nikoskelainen, J., Powles, R., *et al.* (1993)

Bone marrow transplantation for acute myeloblastic leukaemia: an EBMT Leukaemia Working Party prospective analysis from HLA-typing
Br. J. Haematol., 84, 61-66

Lloyd, K. O., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B. W., Taylor-Papadimitriou, J. (1996)

Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells
J. Biol. Chem., 271, 33325-33334

Loeffler, J., Swatoh, P., Akhawi-Araghi, D., Hebart, H., Einsele, H. (2003)

Automated RNA extraction followed by rapid quantification of cytokine and chemokine gene expression using fluorescence resonance energy transfer
Clinical Chemistry, 49, 985-988

Mackensen, A., Vogl, S., Laumer, M., Andreesen, R., Meidenbauer, N. (2004)

Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma: A phase I clinical study
Onkologie, 27 (suppl 3) Abstract O120, 20

Maurer, U., Brieger, J., Weidmann, E., Mitrou, P.S., Hoelzer, D., Bergmann, L. (1997)

The Wilms' tumor gene is expressed in a subset of CD34+ progenitors and downregulated early in the course of differentiation *in vitro*
Exp. Hematol., 25, 945-950

Mark, A.S., Mangkornkanok, M. (1989)

B-cell lymphoma marking only with anti-epithelial membrane antigen
Cancer, 63, 2152 -2155

Menssen, H.D., Renkl, H.J., Rodeck, U., Maurer, J., Notter, M., Schwartz, S., Reinhardt, R., Thiel, E. (1995)

Presence of Wilms` tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias

Leukemia, 9, 1060-1067

Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990)

High gradient magnetic cell separation with MACS

Cytometry, 11, 231-238

Miwa, H., Beran, M., Saunders, G.F. (1992)

Expression of the Wilms` tumor gene (WT1) in human leukemias

Leukemia, 6, 405-409

Miyagi, T., Ahuja, J., Kubota, T., Kubonishi, I., Koeffler, H.P., Miyoshi, I. (1993)

Expression of the candidate Wilms` tumor gene, WT1, in human leukemia cells

Leukemia, 7, 970-977

Molldrem, J.J., Dermime, S., Parker, K., Jiang, Y.Z., Mavroudis, D., Hensel, N., Fukushima, P., Barrett, A.J. (1996)

Targeted T-cell therapy for human leukemia: Cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells

Blood, 88, 2450-2457

Molldrem, J.J., Clave, E., Jiang, Y.Z., Mavroudis, D., Raptis, A., Hensel, N., Agarwala, V., Barrett, A.J. (1997)

Cytotoxic T lymphocytes specific for a nonpolymorphic proteinase 3 peptide preferentially inhibit chronic myeloid leukemia colony-forming units

Blood, 90, 2529-2534

Molldrem, J.J., Lee, P.P., Wang, C., Felio, K., Kantarjian, H.M., Champlin, R.E., Davis, M.M. (2000)

Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukaemia

Nat. Med., 6, 1018-1023

Molldrem, J.J., Komanduri, K., Wieder, E. (2002)

Overexpressed differentiation antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions

Curr. Opin. Hematol., 9, 503-508

Ohminami, H., Yasukawa, M., Fujita, S. (2000)

HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide

Blood, 95, 286-293

Oka, Y., Elisseeva, O.A., Tsuboi, A., Ogawa, H., Tamaki, H., Li, H., Oji, Y., Kim, E.H., Soma, T., Asada, M., Ueda, K., Maruya, E., Saji, H., Kishimoto, T., Udaka, K., Sugiyama, H. (2000)

Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1) product

Immunogenetics, 51, 99-107

Pantuck, A. J., van Ophoven, A., Gitlitz, B. J., Tso, C.-L., Acres, B., Squiban, P., Ross, M. E., Belldegrün, A. S., Figlin, R. A. (2004)

Phase I trial of antigen-specific gene therapy using a recombinant vaccinia virus encoding MUC1 an IL-2 in MUC1-positive patients with advanced prostate cancer

J, Immunother, 27, 240-253

Park, S., Schalling, M., Bernard, A., Maheswaran, S., Shipley, G.C., Roberts, D., Fletcher, J., Shipman, R., Rheinwald, J., Demetri, G., Griffin, J., Minden, M., Housman, D.E., Haber, D.A. (1993)

The Wilms tumor gene WT1 is expressed in murine mesoderm-derived tissues and mutated in a human mesothelioma

Nat. Gen., 4, 415-420

Patton, S., Gendler, S.J., Spicer, A.P. (1995)

The epithelial mucin, Muc1, of milk, mammary gland and other tissues

Biochim. Biophys. Acta, 1241, 407-423

Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A.J., Rogers, A., Haber, D.A., Housman, D.E. (1991)

Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system

Genes Dev., 5, 1345-1356

Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., Bard, J., Buckler, A., Pelletier, J., Housman, D., van Heyningen, V., Hastie, N. (1990)

The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary development

Nature, 346, 194-197

Prussin, C., Metcalfe, D.D. (1995)

Detection of intracytoplasmatic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies

J. Immunol. Methods., 188, 117-128

Rammensee, H.-G., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A., Stevanović, S. (1999)

SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs

Immunogenetics, 50, 213-219

Rausser, G. (2003)

Generierung von virusspezifischen T-Zellen für den adoptiven Transfer
Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Tübingen

Reichardt, V. L., Okada, C.Y., Liso, A., Benike, C. J., Stockerl-Goldstein, K. E., Engleman, E. G., Blume, K. G., Levy, R. (1999)

Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a feasibility study
Blood, 93, 2411-2419

Reichardt, V. L., Milazzo, C., Brugger, W., Einsele, H., Kanz, L., Brossart, P. (2003)

Idiotype vaccination of multiple myeloma patients using monocyte-derived dendritic cells
Haematologica, 88, 1139-1149

Rezvani, K., Grube, M., Brenchley, J.M., Sconocchia, G., Fujiwara, H., Price, D.A., Gostick, E., Yamada, K., Melenhorst, J., Childs, R., Hensel, N., Douek, D.C., Barrett, A.J. (2003)

Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8⁺ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukaemia before and after stem cell transplantation
Blood, 102, 2892-2900

Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E., Greenberg, P. D. (1992)

Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by adoptive transfer of T cell clones
Science, 257, 238-241

Robbins, P.F., Kawakami, Y. (1996)

Human tumor antigens recognized by T-cells
Curr. Opin. Immunol., 8, 628-636

Rochlitz, C., Figlin, R., Squiban, P., Salzberg, M., Pless, M., Herrmann, R., Tartour, E., Zhao, Y., Bizouarne, N., Baudin, M., Acres, B. (2003)

Phase I immunotherapy with a modified vaccinia virus (MVA) expressing human MUC1 as antigen-specific immunotherapy in patients with MUC1-positive advanced cancer
J. Gene Med., 5, 690-699

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., 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

Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1994)
Efficient presentation of soluble antigen by cultured human Dendritic Cells is maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor plus Interleukin 4 and downregulated by Tumor Necrosis Factor α
J. Exp. Med., 179, 1109-1118

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. (1999)
Two subsets of memory lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions
Nature, 401, 708-712

Sawyers, C. L. (1997)
Molecular genetics of acute leukaemia
Lancet, 349, 196-200

Scheibenbogen, C., Sun, Y., Keilholz, U., Song, M., Stevanović, S., Asemissen, A. M., Nagorsen, D., Thiel, E., Rammensee, H.-G., Schadendorf, D. (2002a)
Identification of known and novel immunogenic T cell epitopes from tumor antigens recognized by peripheral blood T cells from patients responding to IL-2-based treatment
Int. J. Cancer, 98, 409-414

Scheibenbogen, C., Letsch, A., Thiel, E., Schmittel, A., Mailaender, V., Baerwolf, S., Nagorsen, D., Keilholz, U. (2002b)
CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia
Blood, 100, 2132-2137

Seliger, B., Dunn, T., Schwenzler, A., Casper, J., Huber, C., Schmoll, H. J. (1997)
Analysis of the MHC class I antigen presentation machinery in human embryonal carcinomas: evidence for deficiencies in TAP, LMP and MHC class I expression and their upregulation by IFN-gamma
Scand. J. Immunol., 46, 625-632

Severson, R.K., Davis, S., Heuser, L., Daling, J.R., Thomas, D.B. (1990)
Cigarette smoking and acute nonlymphocytic leukaemia
Am. J. Epidemiol., 132, 418-422

Snyder, H.L., Yewdell, J., Bennink, J.R. (1994)
Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment
J. Exp. Med., 180, 2389-2394

Spicer, A. P., Rowse, G. J., Lidner, T. K., Gendler, S. J. (1995)
Delayed mammary progression in MUC1 null mice
J. Biol. Chem., 270, 30093-30101

- Stevanović, S. (2002)
Identification of tumour-associated T cell epitopes for vaccine development
Nat. Rev. Cancer, 2, 514-520
- Sugiyama, H. (2002)
Cancer immunotherapy targeting WT1 protein.
Int. J. Hematol., 76, 127-132
- Sullivan, K.M., Weiden, P.L., Storb, R., Witherspoon, R. P., Fefer, A., Fisher, L., Buckner, C. D., Anasetti, C., Appelbaum, F.R., Badger, C., *et al.* (1989)
Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukaemia
Blood, 73, 1720-1728
- Sutter, G., Staib, C. (1992)
Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery
Curr. Drug Targets Infect. Disord., 3, 263-271
- Trubiani, O., Bosco, D., Di Primio, R. (1994)
Interferon-gamma (IFN-gamma) induces programmed cell death in differentiated human leukemic B cell lines
Exp. Cell Res., 215, 23-27
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T. (1991)
A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma
Science, 254, 1643-1647
- van de Wiel -van Kemenade, E., Ligtenberg, M. J., de Boer, A. J., Buijs, F., Vos, H. L., Melief, C. J., Hilkens, J., Figdor, C. G. (1993)
Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction
J. Immunol., 151, 767-776
- van Rhee, F., Lin, F., Cullis, J.O., Goldman, J. (1994)
Relapse of chronic myeloid leukaemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor lymphocyte transfusions before the onset of a haematological relapse
Blood, 83, 3377-3383
- von Mensdorff-Pouilly, S., Verstraeten, A. A., Kenemans, P., Snijdwint, F. G., Kok, A., van Kamp, G. J., Paul, M. A., van Diest, P. J., Meijer, S., Hilgers, J. (2000)
Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin
J. Clin. Oncol., 18, 574-583

Wajchman, H. J., Pierce, C. W., Varma, V. A., Issa, M. M., Petros, J., Dombrowski, K. E. (2004)

Ex vivo expansion of CD8⁺CD56⁺ and CD8⁺CD56⁻ natural killer T cells specific for MUC1 mucin

Cancer Res., 64, 1171-1180

Walter, S., Herrgen, L., Schoor, O., Jung, G., Wernet, D., Bühring, H.-J., Rammensee, H.-G., Stevanović, S. (2003)

Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/Anti-CD28-coated microspheres

J. Immunol., 171, 4974-4978

Zittoun, R. A., Mandelli, F., Willemze, R., de Witte, T., Labar, B., Resegotti, L., Leoni, F., Damasco, E., Visani, G., Papa, G., *et al.* (1995)

Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups

N. Engl. J. Med., 332, 217-223

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hermann Einsele danke ich für die Überlassung des Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung zu jedem denkbaren Zeitpunkt. Ihr großes Interesse an meiner Arbeit hat mich stets motiviert, mir immer wieder neue Herangehensweisen an die Problematik zu erarbeiten.

Herr Dr. Götz Ulrich Grigoleit war von der Themenstellung bis zum Abschluss immer sehr begeistert von dieser Arbeit, sei es mit Vorschlägen zu Versuchen, Interpretation von Daten oder auch Frustverarbeitung von misslungenen Experimenten. Für diese hervorragende Zusammenarbeit im Labor und auch darüber hinaus in Tübingen und weiter in Würzburg sei Dir Uli herzlich gedankt.

Frau Friederike Frank danke ich für die vielen Hilfestellungen im Labor. Des weiteren wusste ich die Diskussionen und Unterhaltungen über historische und aktuelle Themen jenseits des Laboralltags immer sehr zu schätzen.

Dem restlichen GVH-Labor team, bestehend aus meinem „Biochemie-Leidensgenossen“ Ziad Haddad, Marija Markulin, Jürgen Löffler, Ingeborg Wagner, Florian Gebhardt und allen anderen Medizin-Doktoranden gilt ein riesiges Dankeschön für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und den Umgang miteinander sowohl im Labor als auch auf privater Ebene.

Ein sehr wichtiger Rückhalt in sämtlichen Situationen war und ist meine Familie. Meinem Bruder Andreas, meiner Schwester Katrin und natürlich meiner Mutter Katharina möchte ich für alles danken, was ich bisher mit euch erfahren durfte und für all das, was noch kommen wird.

12 Lebenslauf

Persönliche Information

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 13.09.1978
- Geburtsort: Stuttgart
- Eltern: Dr. med. Anton Kapp (+)
Katharina Kapp, geb. Kupferschmid

Ausbildung

1985 – 1989

Berta-Hummel-Grundschule, Bad Saulgau

1989 – 1998

Störck-Gymnasium, Bad Saulgau

1998

Abitur

1998 – 2003

Studium der Biochemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

2001 – 2008

Studium der Humanmedizin

Eberhard-Karls-Universität Tübingen

(2001-2005)

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

(2005-2008)

2003

Diplomarbeit:

„Monitoring und Funktionsanalyse Tumor-spezifischer CTLs in allogentstammzelltransplantierten Patienten und deren Spendern“

an der Medizinischen Klinik II der Universität Tübingen

(Anleitung Prof. Dr. H.-G. Rammensee und Prof. Dr. H. Einsele)

2003

Erwerb des akademischen Grades

„Diplom-Biochemiker“

2003-2005

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrads der Medizin (Experimenteller Teil):

„Definition neuer MHC-Klasse-I-Epitope aus dem Tumor-assoziierten Antigen MUC1 und Untersuchungen zur Bedeutung von T-Zellantworten gegen Tumor-assoziierte Antigene in der Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation“

an der Medizinischen Klinik Abteilung II der Universität Tübingen

(Anleitung Prof. Dr. H. Einsele)

2008

30. Mai 2008

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2008

04. Juni 2008

Approbation als Arzt (Regierung von Unterfranken, Würzburg)

Wissenschaftliche

Tätigkeiten

2002

Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft:

Institut für Medizinische Mikrobiologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Vorstand: Prof. Dr. I. B. Autenrieth); Arbeitsgruppe PD Dr. U. Schumacher

2005-2008

Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft:

Medizinische Klinik und Poliklinik II der Julius- Maximilians-Universität Würzburg (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H. Einsele); Arbeitsgruppe Dr. G.U. Grigoleit

Publikationen

2006

Grigoleit U, Kapp M, Einsele H. Adoptive T lymphocyte therapy to fight cytomegalovirus infection in immunodeficient hosts. Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 2006; 3: 63-68. Review.

2007

Grigoleit GU, Kapp M, Hebart H, Fick K, Beck R, Jahn G, Einsele H. Dendritic cell vaccination in allogeneic stem cell recipients: induction of human cytomegalovirus (HCMV)-specific cytotoxic T lymphocyte responses even in patients receiving a transplant from an HCMV-seronegative donor. J Infect Dis. 2007;196: 699-704.

Kapp M, Tan SM, Einsele H, Grigoleit G. Adoptive immunotherapy of HCMV infection. Cytotherapy. 2007;9: 699-711. Review.

2008

Einsele H, Kapp M, Grigoleit GU. CMV-specific T cell therapy. Blood Cells Mol Dis. 2008;40: 71-75. Review.

Buchbeiträge

2008

Kapp M, Grigoleit GU, Einsele H. Immunotherapy post-transplant – Infections
In:
ESH-EBMT Handbook on Haematopoietic Stem Cell Transplantation
New Revised Edition (2008)
Editors: J. Apperley, E. Carreras, E. Gluckman, A. Gratwohl, T. Masszi

Kongressbeiträge

2003

43rd ICAAC Meeting:

Loeffler J, Kapp M, Koeberle M, Einsele H, Hebart H, Schumacher U. ERG11 overexpression contributes to Azole resistance in *Candida tropicalis*.

2004

Gemeinsame Jahrestagung von DGHO, ÖGHO,SGH und SGMO:

Hebart H, Haddad Z, Loeffler J, Bonin M, Schumacher U, Markulin M, Frank F, Kapp M, Einsele H.

Activation Of Monocytes By Aspergillus Fumigatus Hyphae And Conidia.

Onkologie 2004;27(suppl 3):1–230 Abstract O69

Grigoleit U, Kapp M, Loeffler J, Frank F, Haddad Z, Einsele H.

Monitoring of T Cell Responses to Leukaemia Specific Antigens in Patients after Allogeneic Hematopoetic Stem Cell Transplantation.

Onkologie 2004;27(suppl 3):1–230 Abstract P738

46th Meeting of The American Society of Hematology:

Haddad Z, Loeffler J, Bonin M, Schumacher U, Markulin M, Frank F, Kapp M, Einsele H, Hebart H.

Activation of Monocytes by Aspergillus Fumigatus Hyphae and Conidia.

Blood 2004; 104:11, Abstract P3165

2005

47th Meeting of The American Society of Hematology:

Grigoleit U, Kapp M, Hebart H, Beck R, Jahn,G, Einsele H.

Dendritic Cell Vaccination Induces HCMV Specific T-Cell Responses in Allogeneic Stem Cell Recipients.

Blood 2005, 106: 11, Abstract P475

2006

32nd Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation:

Grigoleit GU, Kapp M, Hebart H, Beck R, Jahn G, Einsele H.

Prophylactic and therapeutic vaccination with dendritic cells against human cytomegalovirus among allogeneic stem cell recipients.

Bone Marrow Transplant 2006: 37, Issue S1, Abstract P734

2007

49th Meeting of The American Society of Hematology:

Kapp M, Stevanovic S, Fick K, Loeffler J, Tan SM, Opitz A, Tonn T, Einsele H, Grigoleit GU.

CTL Responses Against Tumor Associated Antigens Are Part of the Graft Versus Leukemia-Effect and Protect from Relapse after Allogeneic Hematopoetic Stem Cell Transplantation.

Blood 2007, 110: 11, Abstract P3231

2008

34th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation:

Kapp M, Stevanovic S, Loeffler J, Fick K, Tonn T, Opitz A, Tan SM, Einsele H, Grigoleit GU.

T-cell responses against tumour-associated antigens protect from relapse after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation.

Bone Marrow Transplant 2008: 41, Issue S1 Abstract P645

Auslandsaufenthalt

08/2006-10/2006

Johns Hopkins University, Dept. Of Pathology, Baltimore, USA

Arbeitsgruppe: Prof. Dr. J.P. Schneck