

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

**Induktion von zytotoxischen T-Zellen gegen das
Minorhistokompatibilitätsantigen HA-1**

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

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

**vorgelegt von
Brigitte Spahlinger
aus
Bietigheim-Bissingen**

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Brugger
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Stevanovic

Teile meiner Untersuchungsergebnisse wurden am 15. Dezember 1999 in der Zeitschrift BLOOD publiziert:

Brossart P., Spahlinger B., Grünebach F., Stuhler G., Reichardt V. L., Kanz L., Brugger W. (1999): Induction of Minor Histocompatibility Antigen HA-1-Specific Cytotoxic T Cells for the Treatment of Leukemia After Allogeneic Stem Cell Transplantation. Blood, 94: 4374–4376

Gewidmet meinen lieben Eltern.

Diese Arbeit wurde von mir selbständig und nur mit Hilfe der angegebenen Mittel durchgeführt

**Sichere Wahrheit erkannte kein Mensch
und wird keiner erkennen
über die Götter und alle die Dinge,
von denen ich spreche.
Sollte einer auch einst die voll-
kommenste Wahrheit verkünden,
wissen könnt er das nicht: Es ist
alles durchweht von Vermutung.**

Xenophanes, um 500 v. Chr.

Inhaltsverzeichnis

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
2. EINLEITUNG	11
2.1 Leukämien	11
2.2 Die Hämatopoese	13
2.3 Immunologische Grundlagen	15
2.4 T-Zell vermittelte Immunität	15
2.5 Dendritische Zellen	16
2.6 Die Stammzelltransplantation	19
2.7 Der Majorhistokompatibilitätskomplex	19
2.8 Komplikationen nach Stammzelltransplantation	21
2.9 Minorhistokompatibilitätsantigene	23
2.10 Das Minorhistokompatibilitätsantigen HA-1	25
2.11 Neue Möglichkeiten der Therapie von Leukämien	26
2.12 Ziele dieser Arbeit	28
3. MATERIAL UND METHODEN	29
3.1 Untersuchungsmaterial	29
3.1.1. Patienten	29
3.1.2. Zelllinien	29
3.1.3. Chemikalien, Enzyme und andere Materialien	30
3.1.4. Medien, Puffer und Lösungen	32
3.2 Methoden	33
3.2.1. Zellkulturen	33
3.2.2. Isolierung von mononukleären Zellen (MNC)	34
3.2.3. Molekulargenetische Methoden	36
3.2.4. Herstellung von dendritischen Zellen (DC)	43
3.2.5. Durchflußzytometrie, FACS	44
3.2.6. CTL-Induktion	47
3.2.7. ⁵¹ Cr-Release Assay	49

4. <i>ERGEBNISSE</i>	52
4.1 RT-PCR Analyse der HA-1 Expression	52
4.2 FACS Ergebnisse	55
4.3 Induktion HA-1-spezifischer CTL	57
4.4 HA-1-spezifische CTL lysieren allogene leukämische Blasten	59
4.5 Sensitivität der HA-1-spezifischen CTL	65
4.6 Zusammenfassung der Assay-Ergebnisse	67
5. <i>DISKUSSION</i>	68
5.1 Diskussion der PCR-Ergebnisse	68
5.2 Herstellung der dendritischen Zellen und FACS	69
5.3 Diskussion der Ergebnisse der ⁵¹ Cr-Release Assays	70
5.3.1. Diskussion der eigenen Ergebnisse	70
5.3.2. Mögliche Fehlerquellen und Nachteile der Methode	72
5.3.3. Vorteile HA-1-spezifischer CTL beim Einsatz in der Immuntherapie	75
5.3.4. Mögliche Probleme bei der Immuntherapie mit HA-1-spezifischen CTL	76
5.3.5. Zukunftsprognose	77
6. <i>ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</i>	80
7. <i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	82
8. <i>DANKSAGUNGEN</i>	89
9. <i>LEBENS LAUF</i>	90

1. Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CD	cluster of differentiation
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
cRNA	complementary RNA (komplementäre RNA)
CTL	cytotoxic T lymphocytes (zytotoxische T-Lymphozyten)
DC	dendritic cells (dendritische Zellen)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLI	donor lymphocyte infusion (Infusion von Spenderlymphozyten)
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter (Durchflußzytometrie)
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GITC	Guanidinium Isothiozyanat
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukemia
HA-1	minor histocompatibility antigen-1 (Minorhistokompatibilitätsantigen 1)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
IC ₅₀	50% inhibitory dose
KMT	Knochenmarktransplantation

mHag	Minorhistokompatibilitätsantigen
MHC	Majorhistokompatibilitätskomplex
min.	Minuten
MNC	mononuclear cells (Mononukleäre Zellen)
NTP	Ribo-Nukleosid-Triphosphat
OD	optische Dichte
PBMNC	peripheral blood mononuclear cell (mononukleäre Zelle des Blutes)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PBSCT	peripheral blood stem cell transplantation (Transplantation mit peripheren Blutstammzellen)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	reverse Transkriptase
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borat/EDTA
Upm	Umdrehungen pro Minute

2. Einleitung

2.1 Leukämien

Leukämien sind definiert als diffuse autonome Proliferationen einer Leukozytenpopulation. Die Expansion eines malignen Zellklones führt zu einer generalisierten Ausbreitung im blutbildenden Knochenmark. Dabei kann es zur Infiltration extramedullärer Organe und zur Ausschwemmung leukämischer Zellen ins Blut kommen. Die in großer Zahl gebildeten Zellen sind oftmals nicht ausdifferenziert und können daher ihre physiologischen Funktionen nicht erfüllen.

Durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese treten Anämien, Granulozytopenien und Thrombozytopenien auf. Daraus resultieren Schwäche, Infektanfälligkeit und Blutungen. Außerdem kann es direkt durch eine Schädigung des B- und T-Zellsystems zu einer erhöhten Infektionsgefahr kommen. Beschwerden durch Infiltration von Organen, im schweren Fällen bis zur Organruptur, sind ebenfalls möglich.

Nach der Herkunft der Zellen unterscheidet man lymphatische oder myeloische Leukämien. Des Weiteren werden von den akuten Leukämien (ALL, AML) auch noch chronische Leukämien unterschieden: die chronisch lymphatischen Leukämien (CLL) werden zu den Non-Hodgkin-Lymphomen gezählt, die chronisch myeloischen Leukämien (CML) gehören zu den myeloproliferativen Syndromen.

Die Ätiologie der chronischen Leukämien ist meistens unbekannt. Es werden Knochenmarkschädigungen durch ionisierende Strahlen und chemische Substanzen vermutet. Bei mehr als 90% der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie findet man eine Translokation t(9;22), die mit einer gesteigerten Tyrosinkinase-Aktivität einher geht.

Als auslösende Faktoren für akute Leukämien gelten Viren (HTLV-1), Knochenmarkschädigung durch chemische Substanzen (Benzol, Zytostatika), oder ionisierende Strahlung, sowie genetische Faktoren.

Jedes Jahr erkranken rund 10 von 100.000 Einwohnern an Leukämien.

Die häufigste Leukämie Erwachsener ist die chronisch lymphatische Leukämie (CLL), (Abbildung 1). Die chronisch myeloische Leukämie (CML) hingegen ist eine eher seltene Erkrankung. Während das Vorkommen der akuten myeloischen Leukämien (AML) im höheren Alter stark ansteigt, betrifft die Mehrzahl der akuten lymphatischen Leukämien (ALL) Kinder und junge Erwachsene.

(Harrison T.R.: Principles of Internal Medicine, 14. Ausgabe, Mc Graw–Hill, New York, 1998; Herold G.: Innere Medizin, 1999).

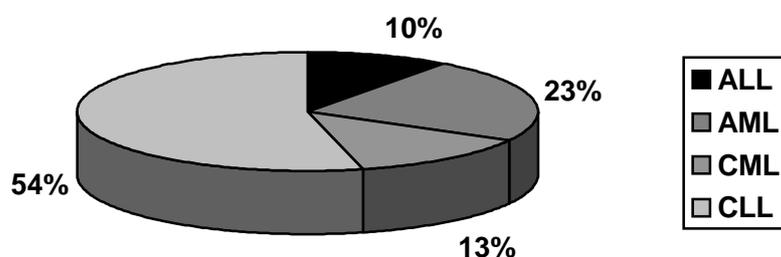


Abbildung 1: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung von Leukämieerkrankungen

Die meisten Leukämien werden zunächst mit einer Chemotherapie behandelt. Je nach Leukämieform und Therapieerfolg schließen sich dann weitere Chemotherapien oder eine autologe oder allogene Stammzelltransplantation (PBSCT) an.

Bei der autologen Stammzelltransplantation werden dem Patienten nach der Zerstörung des kranken Knochenmarks durch Hochdosischemotherapie eigene Stammzellen infundiert, die vor Therapie gewonnen wurden. Bei der allogenen PBSCT werden als mögliche Spender zunächst Familienmitglieder HLA-typisiert. Finden sich keine HLA-identischen Geschwister, versucht man über Knochenmarkspendeteile einen passenden Fremdspender zu finden.

2.2 Die Hämatopoese

Die kontinuierliche Blutzellbildung wird nur von 0,01% der Knochenmarkzellen gewährleistet. Alle Blutzellen stammen von einer einzigen undeterminierten, pluripotenten Stammzelle ab. Sie teilt sich wahrscheinlich sehr selten (=Selbsterneuerung), hat aber bei Bedarf eine große Kapazität zur Vermehrung und zur Bildung von sogenannten Progenitorzellen mit eingeschränkter Pluripotenz. Mit weiterer Differenzierung entstehen aus diesen determinierte Zellen, die sich über mehrere Vorstufen in eine bestimmte Zellreihe entwickeln können, (Abb. 2).

Aus den pluripotenten Stammzellen, die bislang immer noch nicht eindeutig identifiziert wurden, entstehen vermutlich zunächst zwei Zelllinien: die lymphatische und die myeloische. Aus den lymphatischen Vorläuferzellen entwickeln sich T- und B-Zellen, die bei Antigenkontakt zu aktivierten T-Zellen und zu Plasmazellen reifen. Aus der myeloischen Reihe entwickeln sich die verschiedenen Granulozyten und Monozyten, die sich im Gewebe zu Mastzellen und Makrophagen differenzieren. Thrombozyten und Erythrozyten entstehen ebenfalls aus der myeloischen Reihe.

(Inhalte der Kapitel 2.2, 2.3, 2.4 und 2.5 sind aus dem Buch Janeway C.A., Travers P.: Immunobiology, 3.Ausgabe, Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., London, New York, 1997 entnommen.)

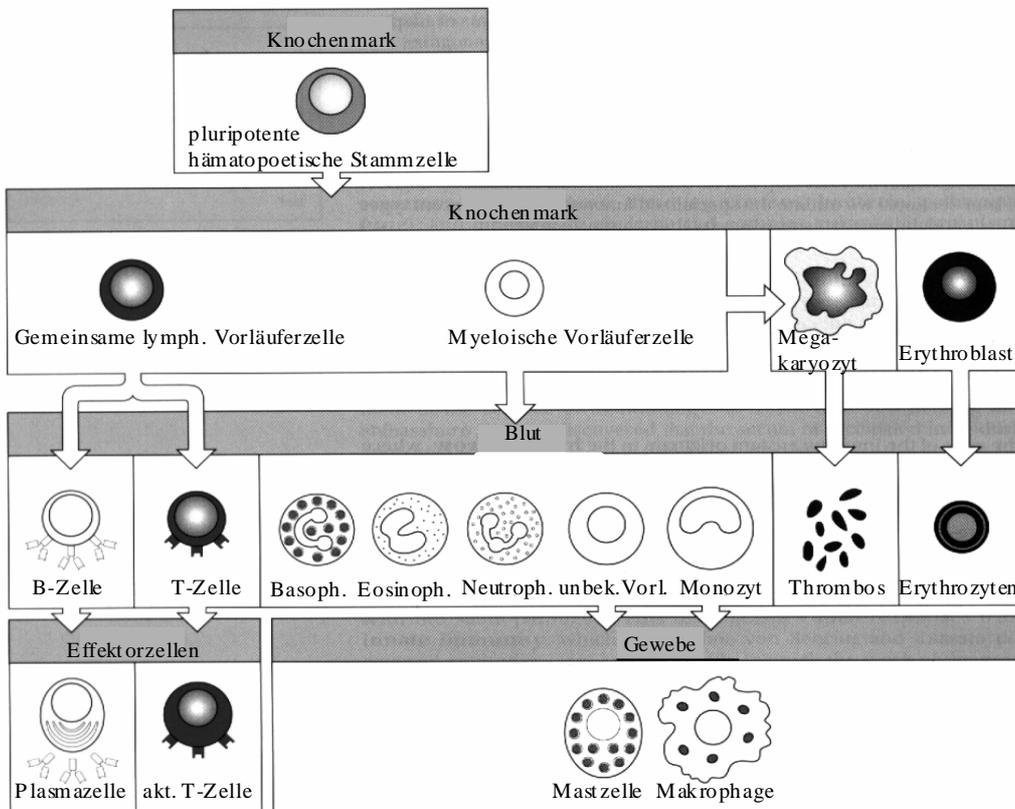


Abbildung 2:

Alle zellulären Elemente des Blutes entstehen aus einer hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark. Diese pluripotente Zelle teilt sich in zwei spezialisiertere Stammzelltypen, einer lymphatischen Vorläuferzelle, aus der B- und T-Lymphozyten hervorgehen und einer myeloischen Stammzelle, aus der Leukozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten, die Vorläufer der Thrombozyten, entstehen. Obwohl in dieser Abbildung nur eine Vorläuferzelle für T- und B- Zellen gezeigt wird, gibt es einen alternativen Weg, bei dem beide Zellarten direkt aus der pluripotenten Stammzelle hervorgehen.

Janeway C.A., Travers P.: Immunobiology, 3. Ausgabe, Current Biology Ltd./ Garland Publishing Inc., London, New York, 1997

2.3 Immunologische Grundlagen

Die zentrale Rolle des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor Verletzungen seiner Integrität, z.B. durch bakterielle und virale Infektionen, zu schützen. Heutzutage rückt aber immer mehr seine Bedeutung bei der Tumorabwehr in den Vordergrund.

Abwehrreaktionen können auf verschiedene Weise eingeteilt werden. Man unterscheidet spezifische von unspezifischen Reaktionen und humorale, d.h. durch lösliche Produkte in Körperflüssigkeiten vermittelte, von zellulären Abwehrmechanismen (Tabelle 1).

	unspezifische Abwehr	spezifische Abwehr
zellulär	Neutrophiler Granulozyt, Monozyt/Makrophage, NK-Zelle	T-Lymphozyt, B-Lymphozyt, Plasmazelle
humoral	Komplementsystem, unspezifische Resistenzfaktoren	Antikörper (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD)

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen Immunantworten

2.4 T-Zell vermittelte Immunität

Wenn T-Zellen im Thymus ihre Entwicklung beendet haben, treten sie in den Kreislauf über und verteilen sich in lymphatischen Organen, z.B. in den Lymphknoten, der Milz, aber auch in den Darm und andere Schleimhäute. Sie gehen dort bei fehlender Antigenbindung wieder in das Blut über und durchlaufen so unter Umständen mehrmals diesen Kreislauf, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Naive T-Zellen werden zu aktivierten Effektorzellen, wenn sie auf ihr spezifisches Antigen treffen, das an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert wird. APC fangen Antigene in der Peripherie ein und wandern dann in lymphatische Organe, um sie dort den zirkulierenden T-Zellen zu präsentieren. Die

wichtigsten APC sind die hoch spezialisierten dendritischen Zellen (DC). Des Weiteren gibt es die Makrophagen, die zusätzlich noch als phagozytierende Zellen die erste Abwehr gegen Infektionen bilden. B-Zellen können unter bestimmten Umständen auch als APC fungieren. Diese drei Zelltypen setzen die spezialisierten kostimulierenden Faktoren frei, die man benötigt, um ruhende T-Zellen in Effektor T-Zellen zu aktivieren. Von diesen Effektor T-Zellen gibt es drei verschiedene Arten:

CD8⁺ T-Zellen erkennen endogene Peptide, die von MHC I Molekülen an der Oberfläche präsentiert werden. Diese T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen (T_C) und lysieren die erkrankten Zellen.

Peptide von Pathogenen, die sich in intrazellulären Vesikeln vermehren, oder die von phagozytierten Bakterien oder exogenen Toxinen stammen, werden von MHC II Molekülen den T-Helfer (T_H) Zellen, oder CD4⁺ Zellen präsentiert. Diese können sich dann in zwei Arten weiterdifferenzieren: T_H1 Zellen, die Makrophagen aktivieren und B-Zellen zur Bildung von IgG Antikörpern anregen und T_H2 Zellen, die die humorale Immunantwort einleiten, in dem sie ruhende B-Zellen zum Bilden von IgM, IgA und IgE induzieren.

2.5 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen, die bis in die 70er Jahre von Wissenschaftlern kaum beachtet wurden, sind maßgeblich für die Aufnahme und Präsentation von Antigenen an der Zelloberfläche verantwortlich. Sie sehen sternförmig aus und haben zahlreiche Fortsätze. Diese sogenannten Dendriten sind baumartig verzweigt und hochbeweglich, (Abbildung 3).

Dendritische Zellen sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen und haben die Fähigkeit, direkt eine primäre Immunantwort zu initiieren und zu erhalten. Während Makrophagen v.a. die angeborene Immunantwort initiieren, spielen DC eine zentrale Rolle bei der adaptiven Immunantwort.

Bei den dendritischen Zellen, zu denen auch die Langerhans-Zellen der Haut gehören, handelt es sich um eine Untergruppe der Leukozyten. Die unreifen

Vorformen sind bevorzugt im Bereich der Eintrittspforten des Organismus lokalisiert. Werden diese Vorstufen mit Produkten von Bakterien, Zytokinen oder CD40 Ligation stimuliert, verändern die DC charakteristischerweise ihren Phänotyp und ihre antigenpräsentierenden Fähigkeiten und wandern in die sekundären lymphatischen Organe, (Brossart et al., 2000).

In vitro können dendritische Zellen aus menschlichen CD34⁺ Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, Nabelvenenblut und dem peripheren Blut nach Kultur mit unterschiedlichen Zytokinkombinationen (GM-CSF, TNF- α , SCF, FLT-3 Ligand und IL-3) entstehen, (Mutis et al., 1999a). Des Weiteren können sich DC auch aus CD14⁺ Blutmonozyten unter der Zugabe von Interleukin-4 und GM-CSF entwickeln. Diese unreifen DC können durch Entzündungsfaktoren wie TNF- α , IL-1, Lipopolysaccharid (LPS), Monocyte-Conditioned Medium (MCM) oder CD40 Ligation zur Reifung induziert werden, (Brossart et al., 1998).

Die Funktion der DC als antigenpräsentierende Zellen und die damit verknüpfte Induktion von Immunreaktionen wird bereits therapeutisch genutzt, indem DC zum Beispiel in vitro mit Tumorantigenen beladen werden. Bei der Präsentation von Tumorantigenen kommt es zu einer Induktion von Abwehrreaktionen und damit zur verstärkten Tumorabwehr, (Steinman, 1991; Timmerman et al., 1999). Die Effektivität von Impfungen mit DC bei Krebspatienten konnte bereits bei B-Zell Lymphomen, (Hsu et al., 1996; Bhandari et al., 1999), malignen Melanomen (Nestle et al., 1998; Thurner et al., 1999), Brustkrebs und Ovarialkrebs gezeigt werden, (Brossart et al., 2000). Nachdem die Patienten mehrmals geimpft wurden, konnte in ihrem Blut eine antigen-spezifische T-Zell-Antwort nachgewiesen werden. Außerdem konnte man feststellen, daß es auch zu einer Immunantwort gegen Tumorpeptid-Epitope kam, die nicht für die Impfung verwendet wurden. Bei den behandelten Patienten konnte unter der Therapie ein Rückgang, bzw. Sistieren des Tumorbefalls beobachtet werden, (Brossart et al., 2000).

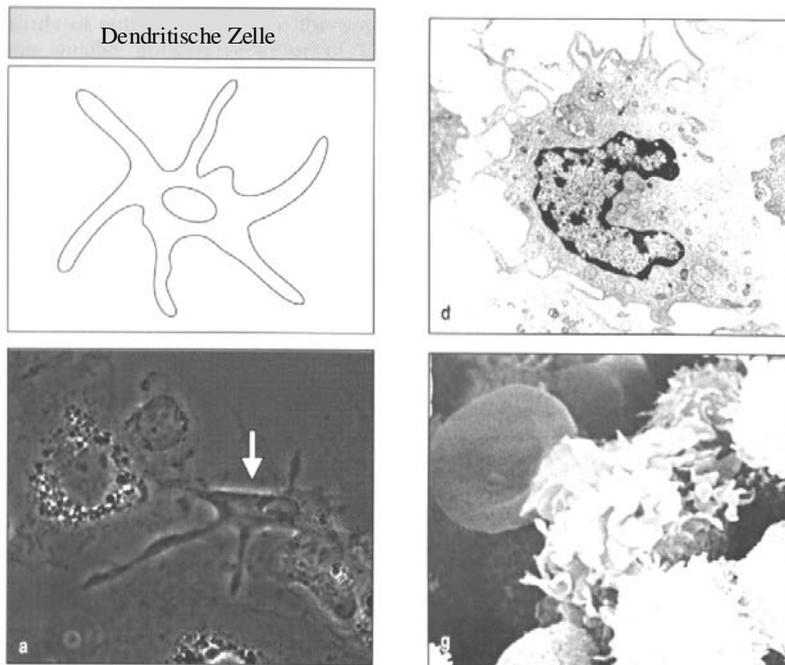


Abbildung 3:
 Dendritische Zellen sind in lymphatischen Geweben vorhanden und spielen eine große Rolle bei der Immunisierung gegen Antigene.
 a) Lichtmikroskopische Aufnahme
 d) Aufnahme mit einem Transmissionselektronen-
 mikroskop
 g) Aufnahme mit einem Rasterelektronenmikroskop

2.6 Die Stammzelltransplantation

Die erste erfolgreiche allogene Knochenmarktransplantation wurde in den späten 60er Jahren durchgeführt und in den 70er Jahren als Therapie bei Leukämien akzeptiert.

Stammzelltransplantationen werden sowohl bei nicht malignen Erkrankungen, wie z.B. der schweren aplastischen Anämie oder Immundefekten, als auch bei malignen Erkrankungen durchgeführt.

Die Quellen hämatopoetischer Stammzellen sind das Knochenmark, mobilisierte periphere Blutzellen oder Nabelvenenblut.

Knochenmarkspender und -empfänger sollten HLA-identisch sein, um schwere Abstoßungsreaktionen zu vermeiden. Stammzelltransplantationen zwischen zwei bzgl. der HLA-Allele genetisch differenten Individuen gleicher Spezies nennt man allogene. Es kann auch eigenes Knochenmark oder peripheres Blut vor der Therapie entnommen und aufbewahrt werden. Dies nennt man dann autologe Transplantation. Bei eineiigen Zwillingen spricht man von syngenetischer Transplantation.

Transplantationsrelevant sind die 4 HLA-Merkmale A, B, DR und DQ. Da jeder Mensch von Vater und Mutter je 1 Merkmal erbt, sind insgesamt 8 HLA-Merkmale bei der Spenderauswahl zu berücksichtigen.

(aus Herold G.: Innere Medizin, 1999 und Harrison T.R.: Principles of Internal Medicine, 14.Ausgabe, Mc Graw–Hill, New York, 1998)

2.7 Der Majorhistokompatibilitätskomplex

Bei einer Immunantwort können Antigene von Immunglobulinen, die von aktivierten B-Zellen sezerniert werden, direkt im Extrazellularraum gebunden und neutralisiert werden.

T-Zellen hingegen erkennen fremde Peptide nur, wenn sie auf einer Zelloberfläche, an MHC–Moleküle gebunden, präsentiert werden. Infizierte Zellen besitzen deshalb Mechanismen, intrazelluläre und phagozytierte

pathogene Proteine zu fragmentieren und mit speziellen Glykoproteinen an die Zelloberfläche zu transportieren. Diese Glykoproteine wurden bei Mäusen erstmals durch ihren starken Einfluß auf die Immunantwort nach Transplantationen entdeckt und Majorhistokompatibilitätskomplexe (MHC) genannt. Sie sind die genetische Hauptbarriere für Transplantationen und spielen eine herausragende Rolle bei der Abstoßung von allogenen Spendergeweben. Je ähnlicher die MHC von Spender und Empfänger sind, desto wahrscheinlicher wird das Transplantat angenommen.

MHC-Moleküle im Thymus spielen außerdem während der Reifung des Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Selektion des T-Zell-Rezeptor-Repertoires. Klone mit zu hoher oder zu niedriger Affinität zum eigenen Majorhistokompatibilitätskomplex werden eliminiert. Die Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“ wird hier festgelegt.

Bei Menschen wird der Majorhistokompatibilitätskomplex „humanes Leukozyten Antigen“, kurz HLA, genannt. Die HLA-Gensequenzen liegen alle auf einer einzigen Region des kurzen Arms von Chromosom 6. Das HLA-Gen ist eines der Gene mit dem größten Polymorphismus. Für jede Klasse der HLA-Moleküle gibt es verschiedene Gene und jedes dieser Gene hat viele Allele. So liegt eine hohe genetische Variabilität vor.

Es werden verschiedene Arten von HLA-Genprodukten kodiert:

- Klasse I Moleküle, die auf allen Zellen präsentiert werden: HLA-A, HLA-B und HLA-C. Peptide, gebunden an MHC I Moleküle, werden von CD8⁺ T-Zellen erkannt und es kommt zur Lyse der befallenen Zellen.
- Klasse II Moleküle, die nur auf B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Monozyten und Antigen-aktivierten T-Lymphozyten exprimiert werden: HLA-DR, DP und DQ. MHC Klasse II gebundene Peptide werden von CD4⁺ T-Zellen erkannt, die wiederum je nach Untergruppe Makrophagen aktivieren oder B-Zellen zur Bildung von Antikörpern induzieren können, (s. 2.4).

Transplantierte Gewebe oder Organe von Spendern, die sich in den MHC-Molekülen vom Empfänger unterscheiden, werden meistens abgestoßen. Hierbei reicht eine Differenz von einer Aminosäure aus. Diese schnelle und

sehr effektive Immunantwort resultiert aus der Präsenz vieler T-Zellen in jedem Individuum, die spezifisch mit fremden oder allogenen MHC-Molekülen reagieren. Ungefähr 1-10% aller T-Zellen antworten auf Stimulation mit allogenen Zellen = Alloreaktivität, (Janeway C.A., Travers P., 1997).

Normalerweise reagieren T-Zellen spezifisch auf fremde Peptide, die von eigenen MHC-Molekülen präsentiert werden. Bei allogem Gewebe kann der T-Zell-Rezeptor auf 2 Arten mit dem fremden MHC-Komplex reagieren: entweder als *Peptid-dominante Bindung*, wobei der Rezeptor stark mit dem fremden Peptid interagiert und es so zur Immunantwort kommt, oder aber als *MHC-dominante Bindung*, wobei der Rezeptor an bestimmte Merkmale des fremden MHC-Komplexes, hier unabhängig vom präsentierten Peptid, bindet. Bei letzterem ist aufgrund der großen Zahl der fremden Moleküle auf der Zelloberfläche die Reaktion deutlich stärker ausgeprägt.

Antikörper gegen HLA-Antigene können sich nach Bluttransfusionen, während der Schwangerschaft und bei Transplantatempfängern bilden.

2.8 Komplikationen nach Stammzelltransplantation

Falls der Stammzellempfänger durch vorhergehende Bluttransfusionen oder Schwangerschaften mit fremden Histokompatibilitätsantigenen vorimmunisiert wurde, kann es zur Transplantatabstoßung kommen, (Rufer et al., 1998), da restliche Lymphozyten des Empfängers Oberflächenantigene (u.a. Minorantigene) auf den Zellen des Spenderblutes als fremd erkennen und das Transplantat mit einer Immunreaktion abstoßen.

Des Weiteren ist die „Graft versus Host Disease“ (GvHD), selbst bei HLA-identischen Spendern, eine gefürchtete Komplikation. Bei dieser Reaktion geht man davon aus, daß Unterschiede der Minorhistokompatibilitätsantigene (mHags) beim Spender und Empfänger zur Immunantwort des Spenders gegen die mHags des Patienten führen. Bei der akuten GvHD reagieren v.a. CD4⁺, CD8⁺ Zellen und natürliche Killerzellen, (Goulmy et al., 1995). Für die Immunreaktion müssen die Minorantigene den zytotoxischen T-Zellen durch

Majorhistokompatibilitätsantigene (HLA-Antigene) präsentiert werden. Die aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen produzieren Zytokine, wie z.B. Interferon- γ (INF- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die eine Gewebszerstörung vermitteln, wie sie für die akute GvHD typisch ist. Die akute GvHD manifestiert sich in den ersten 3 Monaten nach SZT, insbesondere an Darm, an der Haut oder der Leber.

Die chronische GvHD tritt nach mehr als 100 d nach Transplantation auf. Hierbei findet man Kollagenose-ähnliche Syndrome: Sicca Syndrom (trockener Mund, trockene Augen), Hautveränderungen, sowie Leber- und Darmbeteiligung.

Es reagieren wiederum überwiegend T-Zellen, die v.a. IL-4 ausschütten. Minorantigen (mHag)-spezifische CTL können außerdem das Wachstum hämatopoetischer Vorläuferzellen direkt bei Zell-zu-Zell Kontakt durch Zytolyse verhindern, (Marijt et al., 1993b).

Das Entfernen der T-Lymphozyten aus dem Knochenmark des Spenders (T-Zell-Depletion), senkt das Auftreten und die Schwere der GvHD, ist aber verbunden mit erhöhter Transplantatabstoßung, (Marijt et al., 1993 a, b, Martin et al., 1988) und einer erhöhten Leukämie rezidivrate nach Transplantation.

Der antileukämische Effekt von allogenen Stammzelltransplantationen ist also nicht nur auf die zytoreduktive Behandlung vor Transplantation zurückzuführen, sondern auch auf einen „Graft-versus-Leukemia“ (GvL)-Effekt, der ebenfalls durch Reaktionen der Spender-T-Zellen gegen Minorantigene vermittelt wird, (Falkenburg et al., 1999).

Außer der Problematik der verschiedenen Immun- und Abstoßungsreaktionen, besteht immer ein Risiko, daß nach KMT trotz der vorherigen starken Konditionierungstherapie noch Tumorzellen im Körper des Empfängers vorhanden sind, die zum Leukämie rezidiv führen können. Auch wenn nach den Kriterien der kompletten Remission alle objektiven Krankheitsbefunde zurückgebildet sind, lassen sich mittels PCR mit einer Sensitivität von $1:10^5$ bis $1:10^6$ oft noch residuelle Leukämiezellen nachweisen. Diese sog. „minimal residual disease“ (MRD) oder „Minimale Resterkrankung“ ist eine Indikation für immuntherapeutische Strategien, (Herold, 1999, s.o.).

2.9 Minorhistokompatibilitätsantigene

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten viele Minorantigene mit Hilfe von CTL-Klonen charakterisiert werden. Aber nur wenige sind bisher in ihrer Gensequenz identifiziert worden. Die CTL-Klone wurden aus Blut von Empfängern nach Knochenmarktransplantation isoliert. Minorhistokompatibilitätsantigene (mHags) werden wie andere Peptide von spezifischen HLA-Antigenen an der Zelloberfläche präsentiert. Die meisten Minorantigene sind unspezifisch auf verschiedenen Geweben verteilt, (Tabelle 2).

Minorantigen	HA-3	HA-4	HA-B7	HA-6, HA-7
präsentiert von	HLA-A1	HLA-A2	HLA-A2/ -B7	HLA-B7
Vorkommen	auf Zellen der Haut, der Niere, des Blutes			

Tabelle 2: unspezifische Minorantigene

Andere Minorantigene, wie z.B. HA-1, HA-2 und HA-5 werden jedoch gewebespezifisch exprimiert, (Tabelle 3). Sie sind nur auf Zellen des hämatopoetischen Systems (PHA-Blasten, EBV-BLCL, T- und B-Zellen, Monozyten und unreifen Thymozyten) vorhanden, nicht jedoch auf der Haut (Melanozyten, Fibroblasten, Keratinozyten), den Tubulusepithelzellen der Niere, Leberzellen und den Endothelzellen der Umbilikalvenen, (von de Buerger et al., 1992; Dolstra et al., 1997; Mutis et al., 1999a; van Els et al., 1992).

HB-1-spezifische CTL erkennen sogar nur transformierte B-lymphatische Zellen und zeigen keine Zytolyse gegen Monozyten oder phytohämagglutinierte T-Zellen, so daß die HB-1 Expression nur auf die B-Zell Linie beschränkt ist, (Dolstra et al., 1999).

Minorantigen	HA-1, HA-2, HA-5	HB-1
präsentiert von	HLA-A2	HLA-B44
Vorkommen	nur auf hämatopoetischen Zellen	B-Zell Linie

Tabelle 3: gewebespezifische Minorantigene

Trotz der hohen Anzahl an Minorantigenen ist es wahrscheinlich, daß nur wenige immundominante mHags das GvHD-Risiko erhöhen können, (Martin, 1991).

Jedes dieser Antigene ist das Produkt eines einzigen Gens und zeigt Mendelschen Erbgang, (Goulmy et al., 1995). Ihre Genloci sind nicht mit dem HLA-Genlocus verbunden, (Goulmy et al., 1996). Bei einer HLA-identischen Situation ist deshalb nicht automatisch ein identisches Minorantigen-Paar vorhanden. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit, daß HLA-identische Familienmitglieder mHag-identisch sind, höher, als bei HLA-identen Fremden.

Die Phänotypfrequenz HLA-A2-positiver Patienten beträgt für HA-1 69%, für HA-2 95%, für HA-5 7% und für HB-1 28%, (Schreuder et al., 1993).

Die Wahrscheinlichkeit, zwei nicht verwandte HLA-identische Individuen zu finden, die auch in den Minorantigenen kompatibel sind, ist mit mHags sehr hoher oder sehr niedriger Häufigkeitsfrequenz, wie HA-2 oder HA-5, höher, als für solche mit mittlerer Allelverteilung wie HA-1, (Schreuder et al., 1993).

Während HLA-Klasse I und II Antigene bzw. Allele durch Serologie, isoelektrische Fokussierung oder Oligonukleotid-Typisierung bestimmt werden, konnten bis vor kurzem mHags nur durch Ag-spezifische T-Lymphozyten-Klone bestimmt werden, (Marijt et al., 1993a). In der Zwischenzeit ist es allerdings gelungen, die Aminosäure- und die Nukleotidsequenz von HA-1 und anderen Minorantigenen zu entschlüsseln, (den Haan et al., 1998), und es besteht nun die Möglichkeit mittels PCR diese mHags nachzuweisen.

2.10 Das Minorhistokompatibilitätsantigen HA-1

Das Minorantigen HA-1 hat die Besonderheit, daß es nur auf hämatopoetischen Zellen, einschließlich leukämischer Blasten exprimiert wird, jedoch nicht auf der Haut, der Leber und der Niere, (de Buerger et al., 1992, Dolstra et al., 1997, Mutis et al., 1999a, van Els et al., 1992). Trotz dieser Gewebespezifität wurde in mehreren Arbeiten eine deutliche Korrelation zwischen HA-1-Inkompatibilität und der Entwicklung einer GvHD nach Knochenmarktransplantation beobachtet, (Goulmy et al., 1996 und Tseng et al., 1999).

Im Februar 1998 wurde von den Haan et al. HA-1 aus der EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zelllinie „Rp“ isoliert und sequenziert. Das Nonapeptid hat die Aminosäuresequenz VLHDDLLEA (Peptid HA-1H) und unterscheidet sich von der bereits bekannten Aminosäure-Sequenz KIAA0223 mit VLRDDLLEA (Peptid HA-1R), (GenBank-Accession Nr. D86976), in nur einer Aminosäure. Auf DNA-Ebene hat der HA-1 Locus 2 Allele HA-1^H und HA-1^R, die sich in zwei Nukleotiden (s.u.) unterscheiden, (Wilke et al., 1998).

Bei den Untersuchungen wurde festgestellt, daß VLRDDLLEA (HA-1R) nicht, oder nur sehr wenig durch HLA-A*0201 auf der Zelloberfläche präsentiert wird und es wird angenommen, daß dies das Resultat der geringen Bindungsaffinität des Peptides HA-1R an den HLA-Komplex ist, die mit einer IC₅₀ von 365 nM nur $1/12$ derjenigen von HA-1H ist (IC₅₀ von 30 nM). Außerdem reicht bereits der Austausch einer Aminosäure aus, um Veränderung beim proteasomalen Prozessieren und in der Peptidpräsentation zu verursachen. Daß das Peptid HA-1R nicht durch HLA-A*0201 präsentiert wird, führte weiterhin zu der Annahme, daß das Allel HA-1^R als Nullallel im Hinblick auf HLA-A*0201-restringierte T-Zell-Reaktivität betrachtet werden konnte. Die beiden Genotypen H/H und H/R haben so beide den Phänotyp H, wohingegen R/R nicht auf der Zelloberfläche erscheint, (Tabelle 4).

Man kann also sagen, daß nur eine Stammzelltransplantation mit HA-1-negativen (Genotyp R/R) Spendern und HA-1-positiven Empfängern (Genotyp H/H, H/R) und nicht umgekehrt mit einem signifikant erhöhtem GvHD-Risiko verbunden ist, (den Haan et al., 1998).

Übersicht zur Verdeutlichung:

Das Minorantigen HA-1 hat auf DNA Ebene zwei Allele:

Das HA-1^R-Allel (Nullallel):

GTG TTG CGT GAC GAC CTC CTT GAG GCC

V L R D D L L E A (Peptid HA-1R=Peptid R)

Das HA-1^H-Allel:

GTG CTG CAT GAC GAC CTC CTT GAG GCC

V L H D D L L E A (Peptid HA-1H=Peptid H)

(Wilke et al., 1998)

	HA-1-positiv		HA-1-negativ
Genotyp	HA-1 ^{H/H} , (H/H)	HA-1 ^{H/R} , (H/R)	HA-1 ^{R/R} , (R/R)
Phänotyp	H		R
exprimiert wird	HA-1H = Peptid H		[HA-1R = Peptid R]*

Tabelle 4 : Übersicht der Benennung

*Peptid R wird kaum, bzw. gar nicht exprimiert

2.11 Neue Möglichkeiten der Therapie von Leukämien

Ursprünglich wollte man Knochenmarkspender nicht nur bezüglich der HLA-Antigene, sondern auch bezüglich der Minorantigene auf den Empfänger abgleichen. So sollte das Risiko der GvHD oder der Transplantatabstoßungen minimiert werden. Paradoxerweise hat sich aber eine positive Seite bei einer Differenz der Minorantigene herausgestellt, mit der Möglichkeit einer „Graft-versus-Leukemia“ (GvL) Reaktion, d.h. einer Immunantwort gegen residuale leukämischen Zellen des Empfängers, und somit die Möglichkeit der Vermeidung eines Rezidivs. Bei Versuchen, das Auftreten der GvHD durch T-Zell-Depletion des Spenderblutes zu vermindern, wurde ein Ansteigen der

Anzahl der Rezidive verzeichnet, (Marijt et al., 1993a, b, und Martin et al., 1988).

Donor-Lymphozyten-Infusionen (DLI) schienen bereits eine erfolgreiche Behandlungsmöglichkeit für Rezidive, zumindest bei Patienten mit CML. Wurden sie mit DLI ihrer Spender behandelt, traten bei 70 – 80% komplette Remissionen auf. Andererseits wurden jedoch wieder verstärkt GvHD beobachtet, und die Behandlung war wenig erfolgreich bei Patienten mit ALL, AML und CML in der fortgeschrittenen Phase und in der Blastenkrise. Hier wurden Remissionsraten von nur 10 - 30% erreicht, (Falkenburg et al., 1999).

Könnte man aber eine Immunantwort nur gegen Minorantigene induzieren, die selektiv auf den hämatopoetischen Zellen des Empfängers exprimiert werden, wie z.B. HA-1 oder HA-2, hätte man die Möglichkeit, spezifisch leukämische Blasten zu zerstören, ohne dabei anderes Gewebe anzugreifen.

Wenn es möglich wäre, mononukleäre Zellen HA-1-negativer, HLA-A2-positiver Spender in vitro gegen das HA-1H Peptid eines Empfängers zu immunisieren, könnte man nach allogener Stammzelltransplantation die induzierten HA-1-spezifischen CTL als DLI geben. Sie reagieren dann nur mit hämatopoetischen Zellen, die HA-1 präsentieren, also eventuell noch vorhandenen leukämischen Blasten, zerstören diese spezifisch und verhindern so das Auftreten eines Tumorrezidivs. Eine GvHD sollte nicht induziert werden.

2.12 Ziele dieser Arbeit:

Ziele dieser Arbeit waren die Etablierung einer RT-PCR Methode zur routinemäßigen Untersuchung von HLA-A2-positiven Patienten und Spendern im Hinblick auf die Expression der Allele HA-1^H und HA-1^R des Minorantigens HA-1.

Voraussetzung für die Untersuchungen waren HA-1-negative Spender (Genotyp R/R) und HA-1-positive Empfänger (Genotyp H/H, H/R).

Mit Hilfe reifer DC aus Spendermonozyten sollten aus peripheren mononukleären Zellen in vitro HA-1H-spezifische zytotoxische T-Zellen induziert werden. Diese CTL sollten in ⁵¹Cr-Release Assays HA-1-positive Zellen, im speziellen leukämische Blasten, spezifisch erkennen und lysieren und nicht mit anderen Peptiden kreuzreagieren.

Es sollte des weiteren die Möglichkeit untersucht werden, HA-1R-spezifische CTL zu induzieren.

Bei meinen Untersuchungen war es möglich, aus HA-1-negativen Spenderzellen mit Hilfe von DC, HA-1H-spezifische zytotoxische T-Zellen zu induzieren. Bei den ⁵¹Cr-Release Assays wurden HA-1-positive Kontrollzellen, HA-1-positive leukämische Blasten und sogar heterozygote Zelllinien lysiert. Außerdem konnten HA-1R-spezifische CTL induziert werden, die jedoch nur Zellen lysierten, die mit dem Peptid HA-1R beladen waren.

Diese Erkenntnisse ermöglichen eventuell eine neue Therapiemöglichkeit einer Minimal Residual Disease mit Hilfe von HA-1-spezifischen DLI nach Stammzelltransplantation.

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Patienten:

Für die Untersuchungen wurden mononukleäre Zellen von HLA-A2-positiven gesunden Spendern der Blutbank der Universität Tübingen, von anderen HLA-A2-positiven Freiwilligen und von Leukämiepatienten aus heparinisiertem Blut gewonnen. Von den Patienten wurden zumeist aliquotierte, tiefgefrorene Blasten verwendet.

Insgesamt wurden 15 Patienten, davon 7 ALL, 6 AML, 2 CML und 49 gesunde Spender mittels PCR auf ihren HA-1-Genotyp untersucht.

3.1.2 Zelllinien:

Es wurden die Zelllinien CROFT, U266, OPM-2, KG-1, 6574803 und 6574805 auf die Expression des Minorantigens HA-1 untersucht und z.T. als Kontrollzelllinien verwendet, (Tabelle 5).

Zelllinie	DSM ACC Nr.	Typ	Referenz
CROFT		B-Zell Lymphom	Brossart et al., 1999a
U266	9	Humanes Myelom	Nilsson et al., 1970
KG -1	14	Humane AML	Koeffler & Golde, 1978
OPM-2	50	Humanes Myelom	Katagiri et al., 1985
6574803		B-Zelllinie	M. Wilke, Leiden, NL
6574805		B-Zelllinie	M. Wilke, Leiden, NL

Tabelle 5: verwendete Zelllinien

3.1.3 Chemikalien, Enzyme und andere Materialien:

American National Can™	Greenich Parafilm M
Becton Dickinson, Heidelberg	Blue Max™, Falcon ^R , 50 ml konische Röhrrchen 30×115 mm FITC-Ak gegen CD14, CD19 PE-Ak gegen CD80, CD3, HLA-DR
Biochrom KG, Berlin	Trypan Blau 0,5%, Seromed ^R
Biozym Diagnostik, Hameln	NuSieve GTG Agarose (FMC)
Boehringer Ingelheim, Delta	Pharmaisotone NaCl, 0,9% Molekulargewichtsstandart VIII
Braun, Melsungen	Meliseptol HBV Tücher
Costar corporation, Cambridge, MA/USA	Kulturflaschen, 75 cm ² 6-Well und 24-Well Platten,
Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg	PE-Ak gegen CD83
Dow Chemical Company	Saran Verpackungsfolie
Genzyme, Cambridge, MA/USA	IL-2 (1 µg/ml) IL-4 (1000 IU/ml) TNF-α (10 ng/ml)

Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein	Superscript Preamplification System PBS Pulbeccos RPMI, 25 mM HEPES
Merck KGaA, Darmstadt	Ethanol absolut
Millipore S.A., Molsheim/Frankreich	Millex-GS Millipore Filter 0,22 µm
Novartis, Basel, Schweiz	GM-CSF (Leukomax, 100 ng/ml)
Nycomed Pharma AS, Oslo/Norway	Lymphoprep™
OrthoDiagnostic Systems, Neckargmünd, Pharming, Hamburg	FITC-Ak gegen CD1a FITC-Ak gegen CD86
Quiagen GmbH, Hilden	RNeasy Mini Kit (50)
Roth GmbH, Karlsruhe	DMSO β-Mecaptoethanol
Sartorius AG, Göttingen	Sartorius Minisart Filter 0,45 µm

3.1.4 Medien, Puffer und Lösungen:

a) Medien:

RPMI-1640-Medium	ergänzt mit	
	hitzeinaktiviertem FCS	10%
	Penicillin-G-Natriumsalz	2 mmol/l
	Mercapto-Ethanol	50 µmol/l
	L-Glutamin	2 mmol/l

b) Puffer und Lösungen:

TBE-Puffer 10-fach	TRIS	108,0 g
	Borsäure	55,0 g
	EDTA	9,3 g
	H ₂ O	ad 1,0 l

TBE-Puffer 1-fach	10* TBE–Laufpuffer	200 ml
	Ethidiumbromid	80 µl
	H ₂ O	1800 ml

PBS	NaCl	9 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	H ₂ O	ad 1 l
		pH 7,4

Einfriermedium:	Medium (RPMI)	70%
	FCS	(20%, 45 min bei 55°C inaktiviert)
	DMSO	10%

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturen:

a) Lagerung der humanen Kulturzellen:

Die Zellen wurden zunächst in Aliquots von $\sim 10^7$ Zellen/ml in Einfriermedium für einen Tag bei -70°C gelagert und dann bei -196°C in Flüssigstickstoff tiefgefroren.

b) Kultur:

Humane Zelllinien:

Die Kultivierung humaner Zelllinien erfolgte in 75 cm^2 Kulturflaschen in einem mit 5% $\text{CO}_2/95\%$ Luft begasten Brutschrank bei 37°C , (NUAIRE™, US Auto Flow, CO_2 water-jacketed-incubator).

Die Zellen wurden in RPMI bis zu einer Dichte von 10^6 bis 10^7 Zellen/ml kultiviert.

Um bessere Wachstumsergebnisse zu erzielen, wurde bei allen Zelllinien außer bei 6574803 und 6574805 auf Streptomycin verzichtet.

Dendritische Zellen (DC) und zytotoxische Zellen (CTL):

DC und CTL wurden ebenfalls in RPMI-Medium in einem mit 5% $\text{CO}_2/95\%$ Luft begasten Brutschrank bei 37°C , aber bei 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die DC wurden in 6-Well Platten und die CTL in 24-Well Platten, (Costar corporation, Cambridge, USA), gezüchtet.

Zellzahl und Vitalität wurden sowohl direkt in der Kulturflasche, als auch nach Anfärbung mit Trypanblau unter dem Mikroskop, (Leitz, Diavert), beobachtet.

Die Anfärbung ermöglicht die Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen, da die Farbmoleküle die intakte Zellmembran nicht durchdringen können, wodurch die gesunden Zellen hell leuchtend und die toten Zellen blau erscheinen.

c) Zellzahlbestimmung :

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden Zellen mit PBS in beliebigem Verhältnis verdünnt, mit Trypanblau im Volumenverhältnis 1:1 gefärbt und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde folgendermaßen berechnet:

Anzahl der Zellen im Großquadrat · Verdünnung · 10^4 · Gesamtvolumen

3.2.2 Isolierung von mononukleären Zellen (MNC) :

Zur Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMNC) für die RNA-Isolierung, wurden jeweils 20 ml heparinisiertes oder EDTA-Blut von gesunden Spendern und von Leukämiepatienten benötigt.

Die Abtrennung der mononukleären Zellen erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugation. Als Zentrifugationsmedium wurde LymphoprepTM mit der Dichte $\rho=1,077$ g/ml verwendet. Es enthält Na-Metrizoat und Polysaccharide, die mit den Erythrozyten agglutinieren.

Zunächst wurde das Blut mit physiologischer Kochsalzlösung 1:2 verdünnt und vorsichtig in einem 50 ml Falcon Röhrchen auf 15 ml bereits vorgelegtes LymphoprepTM geschichtet. Dabei sollten sich die Flüssigkeiten nicht durchmischen. Die Falcons wurden 30 min. bei Raumtemperatur mit ca. 755 x g ohne Bremse zentrifugiert (2000 Upm bei Ausschwingrotor: Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments).

Nach dem Zentrifugieren bilden die mononukleären Zellen eine Interphase zwischen den Erythrozyten und Granulozyten im Sediment und dem Medium. Diese milchige Schicht, die Lymphozyten und Monozyten enthält, wurde mit einer sterilen Pipette abgenommen und zum Waschen mit 0,9% NaCl in ein neues 50 ml Falcon Röhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde mit 272 x g (1200 Upm Ausschwingrotor) für 10 min. zentrifugiert.

Die Zahl der isolierten PBMNC war zum Teil sehr unterschiedlich, da Blut von Patienten im Blastenschub, aber auch von Patienten nach Chemotherapie und

von gesunden Spendern untersucht wurde. Aus 20 ml Blut konnten meistens ungefähr $4 \cdot 10^7$ Zellen gewonnen werden.

Für die Gewinnung von RNA wurden jeweils $\sim 10^7$ Zellen in 1 ml PBS aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, mit $289 \times g$ (1800 Upm im Festwinkelrotor) 10 min. zentrifugiert (Biofuge 15, Heraeus Sepatech) und der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden bei -70°C aufbewahrt.

Für das Einfrieren von viablen Zellen wurden $\sim 10^7$ mononukleäre Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und ebenfalls bei -70°C aufbewahrt. Zum Einfrieren über eine längere Zeitdauer wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff gegeben.

Bei der Herstellung von dendritischen Zellen (DC) und zur Induktion von zytotoxischen T-Zellen sollten so wenig Thrombozyten wie möglich unter den gewonnenen mononukleären Zellen sein. Deshalb wurden hier die Zellen mehrmals gewaschen.

Zur Herstellung von DC wurden meistens 100 ml heparinisiertes Blut von gesunden Spendern oder zur Restimulierung der CTL buffy coats verwendet. Nach dem Aufsichten des verdünnten Vollblutes auf das Ficoll (s.o.), wurde zunächst für 13 min. mit $682 \times g$ (1900 Upm im Ausschwingrotor) ohne Bremse zentrifugiert. Vom Überstand wurde dann die Hälfte verworfen und nochmals bei $682 \times g$ ohne Bremse für 12 min. zentrifugiert. Anschließend wurde die weiße Zellbande abgenommen, zwei mal mit PBS jeweils 10 min. mit $370 \times g$ (1400 Upm) mit Bremse gewaschen und beim dritten Waschschrift mit $120 \times g$ (800 Upm) für 15 min. ohne Bremse zentrifugiert.

Aus 100 ml Blut konnten durchschnittlich $\sim 1,2 \cdot 10^8$ Zellen (zwischen 10^8 und maximal $1,8 \cdot 10^8$), aus einem buffycoat $\sim 10^9$ Zellen gewonnen werden.

3.2.3 Molekulargenetische Methoden

a) Gesamt-RNA-Isolierung mit Qiagen-Anionenaustauscher-Säulen :

- Prinzip:

Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy Mini Kit, (Qiagen, Hilden), nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

Gesamt-RNA wurde aus humanen Suspensionskulturzellen und Zellen des peripheren Blutes isoliert. Mit den Qiagen-Anionenaustauscher-Säulen konnte RNA aus 10^6 bis 10^7 Zellen isoliert werden. Die Mengenangaben im Folgenden beziehen sich auf $\sim 10^7$ Zellen.

Bei dieser Methode bindet RNA mit mehr als 200 Nukleotiden an eine Siliciumdioxidmembran, während DNA und Zellbestandteile mit mehreren Puffern abgewaschen werden. Die RNA wird schließlich mit Wasser eluiert.

Vor Gebrauch der mitgelieferten Puffer mußten der Puffer RPE mit 100% Ethanol 1:4 verdünnt und auf 1 ml Puffer RLT 10 μ l β -Mercaptoethanol gegeben werden.

- Durchführung:

Alle Schritte wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Um die Plasmamembranen der Zellen und der Organellen zu zerstören und den Zellinhalt freizusetzen, wurden zum Zellpellet 350 μ l Lysepuffer (Puffer RLT, enthält GITC) gegeben und ca. 1 min. gevortext, (Heidolph Top-Mix 94323, Bioblock Scientific). Es sollten keine Zellklumpen mehr sichtbar sein. Zum Scheren der DNA und damit zur Reduktion der Viskosität des Lysates, pipettierte man die visköse Flüssigkeit in einen Qiashredder und zentrifugierte 2 min. bei maximaler Geschwindigkeit. Zu dem Lysat wurde dann 350 μ l 70% Ethanol gegeben, das die Bindung der RNA an die Membran ermöglicht. Die Flüssigkeiten wurden mit der Pipette gut durchmischt und mit eventuellen Präzipitaten in eine RNeasy mini spin column gegeben. Es folgte kurzes Zentrifugieren bei 8944 x g für 15 sec. (10.000 Upm im Festwinkelrotor: Biofuge 15, Heraeus Sepatech). Die RNA war nun an die Säule gebunden. Dann folgte

das Waschen mit Puffern, die im Kit enthalten waren. Auf die Säule wurden zunächst 700 µl Puffer RW1 gegeben. Erneutes Zentrifugieren bei 8944 x g (10.000 Upm) für 15 sec. Dann wurden 500 µl Puffer RPE auf die Säulen gegeben und bei 8944 x g (10.000 Upm) zentrifugiert. Zweites Waschen der Säule mit RPE. Um die Membran zu trocknen wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min. zentrifugiert (20.124 x g, 150.000 Upm). Zum Eluieren der RNA wurden 40 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben und für 1 min. bei 8944 x g (10.000 Upm) zentrifugiert.

Zum Bestimmen der Reinheit der Proben wurde das OD_{260}/OD_{280} Verhältnis bestimmt (es sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen) und zur Bestimmung der Konzentration die OD_{260} (Gene Quant II UV-Photometer, Pharmacia, Biotech). Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach der Formel $1 OD_{260} \equiv 40 \text{ ng}/\mu\text{l RNA}$.

Durchschnittlich wurden 163 ng/µl RNA isoliert und für die cDNA-Synthese weiter verwendet. Die RNA wurde bei -70°C gelagert.

Die Integrität und Reinheit der RNA ist wichtig für eine erfolgreiche Synthese von cDNA.

b) Maßnahmen zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen :

Um exogene RNase-Kontaminationen zu vermeiden, wurde beim Umgang mit RNA routinemäßig folgende Vorsichtsmaßnahmen ergriffen:

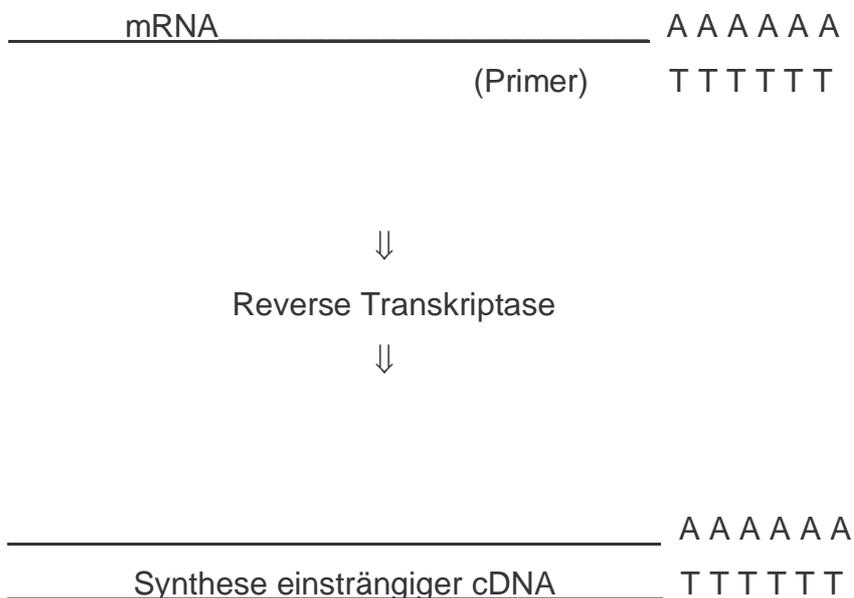
1. Einmalartikel (sterile Plastikwaren, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Pipetten) wurden separat gelagert und ausschließlich zur RNA-Isolierung verwendet.
2. Während des Umgangs mit RNA wurden Einmalhandschuhe getragen und diese regelmäßig gewechselt.
3. Es wurde nur DEPC-Wasser verwendet

b) cDNA-Synthese:

- Prinzip:

Die cDNA-Synthese wurde nach dem Protokoll von Life Technologies (Super Script™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis, GIBCO-BRL, Eggenstein, Deutschland) durchgeführt. Mit diesem System kann man cDNA aus Poly-A-oder Gesamt-RNA herstellen. In dieser Arbeit wurden Oligo (dT) Primer verwendet

Die Selektion von poly (A⁺) RNA mit Oligo (dT) Primern ist nicht unbedingt nötig, verbessert aber den Ertrag von spezifischer cDNA. Außerdem wird dadurch die Wahrscheinlichkeit der Verunreinigung mit genomischer DNA verringert. Der Anteil an RNA mit Poly-A Ende beträgt nur 1% - 2% der Gesamt-RNA, so daß die Menge an cDNA erwartungsgemäß geringer ist als bei Verwendung von random Hexameren.



- Durchführung

Bei dieser Methode können 1 bis 5 µg RNA in cDNA konvertiert werden. Hier wurden im Schnitt 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

Alle Reagenzien wurden bei -20°C aufbewahrt und durften nur kurz zum Gebrauch aufgetaut werden.

Zunächst wurde in sterile 0,5 ml Reaktionsgefäße 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg) vorgelegt und je 11 µl RNA hinzugefügt. Als Negativkontrolle diente eine Leerprobe mit 11 µl DEPC Wasser. Das ganze wurde in einem Hybridisierofen, (Bachofer, Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland), bei 70°C für 10 min. inkubiert, dann 2 min. auf Eis gestellt und scharf zentrifugiert.

In der Zwischenzeit wurde folgendes Reaktionsgemisch vorbereitet:

pro Reaktionsgefäß 2 µl 10x PCR Puffer, 2 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP Mix und 2 µl 0,1 M DTT. Zu jeder RNA/Primer-Mixtur wurden nun 7 µl von diesem Reaktionsgemisch hinzugefügt, gründlich gemischt und nach kurzem Zentrifugieren bei 42°C für 5 min. im Wasserbad inkubiert, (Thermomix Bu Braun).

Anschließend wurde pro Reaktionsgefäß 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase hinzugegeben, gemischt, zentrifugiert und bei 42°C für 50 min. inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Reaktionen bei 70°C für 15 min. beendet und dann auf Eis gestellt. Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

d) Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion, PCR):

- Prinzip

Die PCR ist ein in-vitro Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen, (Saiki et al., 1988). Man nutzt hierzu die Eigenschaften von DNA-Polymerasen aus, die einen Einzelstrang zum Doppelstrang polymerisieren können, wenn ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht.

Im Prinzip geht man so vor, daß man die Nucleinsäuren, die eine zu amplifizierende Sequenz enthalten, mit einem Überschuß von zwei chemisch synthetisierten Oligonucleotiden hybridisieren läßt. Diese definieren den Randbereich der zu amplifizierenden Sequenz und sind strangspezifisch, d.h. komplementär zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge. Unter geeigneten Bedingungen bilden sich Hybridmoleküle zwischen je einem Strang der zu amplifizierenden DNA („Template“) und dem zu diesem Strang passenden Oligonucleotid aus. Man erhält einsträngige Moleküle, die nur im Bereich des gebundenen Oligonucleotids doppelsträngig sind. Dieser doppelsträngige Bereich dient als Startpunkt (Primer) für die DNA-Polymerase, die Einzelstränge zum Doppelstrang synthetisiert. Die neu gebildeten Doppelstränge werden nach der Polymerasereaktion durch Erhitzen auf ca. 94°C erneut in Einzelstränge zerlegt. Diese liefern wieder einsträngige Matrizen, die mit Oligonucleotiden Doppelstränge bilden können und erneut als Ausgangsmoleküle für die Synthese der Doppelstränge dienen. Bei der Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Hybridisierung der Primer (Annealing) und Auffüllreaktion (Synthese) kommt es theoretisch nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven, etwa 10^6 - bis 10^7 -fachen Anreicherung der Target Sequenz. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemischs sind die amplifizierten DNA-Fragmente als Banden zu erkennen.

Für die DNA-Synthese wird heute eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) eingesetzt, (Saiki et al., 1988). Dieses Enzym besitzt ein Temperaturoptimum von ca. 72°C und ist bei Temperaturen bis zu 95°C stabil, (Chien et al., 1976; Kaledin et al., 1980).

Systematische Studien über den Einfluß der verschiedenen Reaktionsparameter auf Wirkungsgrad und Spezifität der PCR gibt es nach wie vor wenige (Linz et al., 1990; Syvänen et al., 1988). Sie müssen grundsätzlich nach dem Prinzip „Versuch und Irrtum“ optimiert werden. Die wichtigsten Parameter sind folgende: die Mg^{2+} -Konzentration (diese Ionen sind Cofaktoren der Taq-Polymerase), der pH-Wert des Reaktionspuffers, die Primerwahl und

Primerkonzentration, die Templatekonzentration, die Anzahl der PCR-Zyklen, das Temperaturprofil sowie *Taq*-Polymerasen-Typ und -Konzentration.

- PCR-Protokoll:

Um zu prüfen, ob die cDNA-Synthese erfolgreich war, wurde zunächst eine PCR durchgeführt, die das β_2 -Mikroglobulin nachweist, das auf der Zellmembran aller kernhaltiger Zellen vorhanden ist und beim Gesunden in relativ konstanter Rate gebildet wird.

War bei dieser, mit Ausnahme der Leerprobe, bei allen Proben in der Gelelektrophorese eine Bande zu sehen, konnte mit der PCR-HA-1 die Probanden-cDNA auf ihre HA-1 Minorantigenallele untersucht werden. Als Positivkontrollen der PCR-HA-1 dienten die heterozygote Zelllinie KG-1 (HA-1^{H/R}), (den Haan et al., 1998) und die homozygoten Zelllinien 6574803 (HA-1^{R/R}) und 6574805 (HA-1^{H/H}), die uns freundlicherweise von Dr. M. Wilke/Leiden, NL zur Verfügung gestellt wurden.

Protokoll der β_2 -Mikroglobulin-PCR:

Zu 1 μ l cDNA wurden 73,7 μ l H₂O, 5,0 μ l 10-facher Synthesepuffer, 1 μ l Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), je 2,5 μ l upstream (Primer I (B2M-L)) und downstream Primer (Primer II (B2M-R)) und 0,3 μ l *Taq*-Polymerase gegeben.

Zur Amplifikation wurde folgendes Protokoll verwendet:

einmaliger Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 min., dann 22 Zyklen mit 15 sec. Denaturierung bei 94°C, 30 sec. Annealing bei 55°C und DNA-Synthese bei 72°C für 30 sec. Nach dem letzten Zyklus folgte noch ein einmaliger Extensionsschritt bei 72°C für 5 min., (Dr. rer. nat. Frank Grünebach, Tübingen, persönliche Auskunft).

Protokoll PCR-HA-1:

Für das Minorantigen HA-1 mit seinen Allelen HA-1^H und HA-1^R wurde die cDNA-Synthese mit zwei verschiedenen upstream Primern angesetzt:

Zu 2 µl cDNA wurden 31,7 µl H₂O, 5,0 µl 10-facher Puffer, 1,0 µl dNTP, 5,0 µl einer der beiden upstream Primer (Primer H1 oder R1), 5,0 µl downstream Primer HA-1-R und 0,3 µl *Taq*-Polymerase.

Das PCR-Temperaturprofil war folgendes:

26 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 1 min., Annealing bei 67°C für 1 min. und DNA-Synthese bei 72°C für 1 min., (den Haan et al., 1998).

- Primersequenzen:

β₂-Mikroglobulin PCR:

B2M-L "upstream": 5' > GGG-TTT-CAT-CCA-TCC-GAC-AT < 3'

B2M-R "downstream": 5' > GAT-GCT-GCT-TAC-ATG-TCT-CGA < 3'

(Dr. rer. nat. Frank Grünebach, Tübingen, persönliche Auskunft)

PCR HA-1:

für das HA-1^H-Allel H1: "upstream": 5' > CCT-TGA-GAA-ACT-TAA-GGA-GTG-TGT-GCT-GCA < 3,

für das HA-1^R-Allel R1: "upstream": 5' > CCT-TGA-GAA-ACT-TAA-GGA-GTG-TGT-GTT-GCG < 3,

für beide Allele:

HA-1-R: "downstream": 5' > GAA-GGC-CAC-AGC-AAT-CGT-CTC-CAGG < 3,
(den Haan et al., 1998).

e) Gelelektrophorese

Für die 50 ml Agarosegele wurden Gelkammern der Firma Appligene, Freiburg, verwendet. Die 3% Gele wurden mit der entsprechenden Menge Agarose, (3:1 Qvalax Gold/Nu Sieve GTG), mit 1-fach TBE-Puffer, der schon 40 µl/l EtBr enthielt, gemischt, aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in den Gelträger gegossen und ein Probenauftragskamm aufgesetzt. Es wurden je

10 µl der PCR-Produkte elektrophoretisch bei 100 V aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden die Banden über UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert, (Polaroid MP-4 Land Camera mit Polaroid Positive/Negative Instant Pack Film 665, Cambridge, MA, USA).

Die β_2 -Mikroglobuline waren mit der 230 bp Bande, die Allele des Minorantigens HA-1 mit der 255 bp Bande assoziiert.

3.2.4 Herstellung von dendritischen Zellen (DC):

a) Isolierung von mononukleären Zellen (s. 3.2.2)

b) Monozytenisolierung:

Für die Monozytenisolierung wurden 6-Well Platten verwendet. Pro Vertiefung (Well) wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen eingesetzt und mit 3 ml RPMI + FCS für 2 h bei 37°C, 5% CO₂/95% Luft und 90% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert, damit die Monozyten am Boden der Wells adhären konnten.

Nichtadhärente Zellen wurden nach diesem Zeitraum aus den Vertiefungen gespült. Auf jede Vertiefung wurden hierfür zunächst 2 ml PBS geben, mit der Pipette die Lösung gut durchmischt und aufgezogen, die Vertiefungen mehrmals gespült und in Falcon-Röhrchen die Flüssigkeit gesammelt. In diesem Überstand befanden sich die peripheren Blutlymphozyten (PBL). Die adhärenen Monozyten blieben am Boden der Wells haften. In jedes Well wurden nun wieder 3 ml Medium und zur Herstellung von Dendritischen Zellen zusätzlich noch Zytokine (s.u.) zugegeben. Inkubation bei 37°C.

Die nichtadhärenen Zellen wurden ausgezählt und in Einfriermedium bei -70°C für die spätere Verwendung bei der CTL-Restimulation tiefgefroren.

Da im Schnitt $1,2 \cdot 10^8$ Zellen aus 100 ml Spenderblut isoliert wurden, konnten meistens zwei Platten angesetzt werden.

c) Herstellung von dendritischen Zellen (DC)

Die isolierten Monozyten wurden nun jeden 2.Tag mit Zytokinen versetzt. Die Menge wurde immer auf das Endvolumen/Well berechnet.

Folgende Zytokine wurden verwendet:

IL-4 (500.000 U/ml Stammlösung).....1000 U/ml entspricht 2µl/ml RPMI

GM-CSF (50.000 ng/ml Stammlösung).....100 ng/ml entspricht 2µl/ml RPMI

TNF-α (10.000 ng/ml Stammlösung).....10 ng/ml entspricht 1µl/ml RPMI

Die Gabe der Zytokine erfolgte an Tag 1, an den Tagen 3 und 5. Die Zelldifferenzierung wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet. An Tag 7 wurden die DC ausgezählt, mittels Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) die Reife und Qualität der DC beurteilt und mit der CTL-Induktion begonnen. Gewöhnlich wurden aus 2 angesetzten 6-Well Platten $\sim 6 \cdot 10^6$ DC gewonnen

3.2.5 Durchflußzytometrie, (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS):

a) Prinzip:

Die Durchflußzytometrie ermöglicht es, Zellen nach ihren Oberflächenantigenen zu identifizieren und zu sortieren. Die verschiedenen Antigene auf Leukozyten werden im Englischen „Clusters of Differentiation“, kurz CD genannt. Bei der Durchflußzytometrie müssen diese Oberflächenantigene zunächst mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Dies kann entweder durch direkt an Farbstoff gebundene, spezifische Antikörper erfolgen, oder aber indirekt, indem man markierte Antiimmunglobuline verwendet, die an zellgebundene Antikörper binden. Die Zellen werden dann einzeln in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Kanüle beschleunigt und passieren einen Laserstrahl. Elektronenvervielfacher (sog. Photomultiplier) erfassen zum einen das Streulicht (FSC =

Vorwärtsstreulicht und SSC = Seitwärtsstreulicht), das ein Maßstab der Zellgröße und Granularität ist und zum anderen Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe. Die Informationen werden dann in einem Computer analysiert.

Untersucht man unterschiedliche Zellen, kann die Anzahl an Zellen mit spezifischen Charakteristika und das Ausmaß der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle gemessen werden.

Die CD-Antigene lassen sich verschiedenen Zelltypen zuordnen, die nachfolgend kurz charakterisiert werden:

CD1a, b, c und d: auf kortikalen Thymozyten, Langerhans Zellen, dendritischen Zellen, B-Zellen (CD1c)

CD14: auf myelomonozytären Zellen

CD19: auf B-Zellen

CD86: costimulierender Faktor, auf Monozyten, aktivierten B-Zellen und dendritischen Zellen

CD83: auf reifen dendritischen Zellen

CD3: auf Thymozyten, T-Zellen

CD80: costimulierender Faktor

HLA-DR ist eine MHC II Untergruppe, nur exprimiert auf Monozyten, dendritischen Zellen und aktivierten T-Zellen

b) FACS-Färbung:

Nach 7 Tagen Inkubationszeit wurden die dendritischen Zellen mit PBS aus den Vertiefungen gespült und gezählt. Der Hauptanteil der DC wurde für die CTL-Induktion verwendet, (s.u.). Für die FACS-Analyse wurden 5 Ansätze mit je $0,5 \cdot 10^6$ Zellen bereitgestellt.

Die Färbung wurde mit Fluoresceinthiocyanat (FITC)- und Phycoerythrin (PE)-konjugierten monoklonalen Mausantikörpern durchgeführt.

Vor der Markierung der DC mußten diese zunächst vorbereitet werden. Als erstes wurden die Zellen mit dem FACS-Puffer (PBS + 0,5% BSA) gewaschen und bei 370 x g (1400 Upm im Ausschwingrotor) 10 min. zentrifugiert. Dann wurden auf das Pellet Maus-Immunglobuline (IgGs) gegeben, um eine unspezifische Bindung der Fluoreszenz-markierten-Antikörper zu verhindern. Das ganze wurde 20 min. bei 4°C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die spezifischen FITC- und PE-markierten Ak in spezielle FACS-Röhrchen (Tubes) nach folgendem Schema vorgelegt :

Tube	FITC-Konjugat (grün, 527nm)	PE-Konjugat (rot, 687nm)
1	α -mouse-IgG Negativkontrolle	α -mouse-IgG Negativkontrolle
2	α CD1a auf allen DC	α CD83 auf reifen DC
3	α CD14 Monozytenmarker	α HLA-DR MHC II (auf Monos, DC, T-Zellen)
4	α CD19 B-Zell-Marker	α CD3 T-Zell-Marker
5	α CD86 costimulierender Faktor	α CD80 costimulierender Faktor

Tabelle 6: verwendete FITC- und PE- markierte Antikörper

Nach der Inkubation wurden die DC nochmals mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert, in 500 µl Puffer aufgenommen und auf die 5 Röhrchen verteilt.

Es folgte erneutes Inkubieren für 30 min. bei 4°C. Die Zellen sollten vor Licht geschützt sein. Nachdem die DC zum Schluß nochmals gewaschen und in 200 µl Puffer aufgenommen wurden, konnte die Messung erfolgen, (FACScan Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

Zur längeren Aufbewahrung wurde das Pellet in 200 µl Puffer und 200 µl PFA aufgenommen.

Die DC waren phänotypisch „reif“, wenn in hohem Maß CD83, CD86 und CD80, bzw. wenig CD14 exprimiert wurden.

3.2.6 CTL-Induktion

a) Ansatz der CTL-Induktion:

Aus peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurden durch wiederholte Präsentation von Peptiden durch DC zytotoxische T-Zellen (CTL) induziert. Es wurden zwei Nonapeptide verwendet: Peptid R mit der Sequenz VLRDDLLEA, das HA-1R, also das negative Allel repräsentierte und Peptid H mit der Sequenz VLHDDLLEA, welches das HA-1 Minorantigen HA-1H repräsentierte, (den Haan et al., 1998).

Zunächst wurden 50 µg/ml jedes Peptids (Stammlösung mit 10 mg/ml) in 10 ml Röhrchen vorgelegt. Die dendritischen Zellen waren bereits für die FACS Färbung ausgezählt worden. Nun wurden $0,5 \cdot 10^6$ DC/Well für 3 Wells/Peptid, d.h. also $1,5 \cdot 10^6$ DC/Peptid in 1 ml RPMI bei 37°C für 2 h im Brutschrank mit den Peptiden inkubiert.

Dann wurden für jedes Peptid jeweils pro Well $3 \cdot 10^6$ autologe PBL in einem Volumen von je 1 ml in eine 24-Well Platte vorpipettiert.

Nach der Inkubation wurden die DC/Peptid-Ansätze mit RPMI auf 3 ml aufgefüllt und je 1 ml DC-Suspension in die Vertiefungen verteilt.

Nun wurde für 7 Tage bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte keine Zytokinzugabe und kein Mediumwechsel.

b) Restimulierung:

Nach siebentägiger Ruhezeit erfolgte die erste Restimulierung.

Dazu wurden zunächst die Zellen nach Peptiden getrennt mit 1 ml Pipetten aus den Vertiefungen aufgenommen, in 50 ml Röhrchen gesammelt. Die aufgenommene Zellsuspension wurde bei $370 \times g$ für 10 min. zentrifugiert. Nach der Zellzahlbestimmung wurden $0,8 \cdot 10^6$ CTL/Well in neue 24-Well Platten ausgesät.

Als nächstes wurde die benötigte APC-Zellzahl berechnet. Pro Vertiefung wurden $2,5 \cdot 10^6$ mononukleäre Zellen (MNCs) als APC benötigt, die z.T. bereits

aliquotiert eingefroren waren und schnell aus dem Einfriermedium in frisches RPMI überführt werden mußten. Die MNCs wurden dazu ebenfalls in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und mit RPMI gewaschen (370 x g, 10 min.).

Nach der Zellzahlbestimmung wurden die MNCs entsprechend der benötigten Anzahl an Vertiefungen auf die zwei Peptide aufgeteilt und mit 1 ml RPMI in 10 ml Röhrchen, in die bereits 5 µl (10 mg/ml) des jeweiligen Peptids vorgelegt waren, gegeben.

Diese Zellsuspension wurde 2 h bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der Inkubation wurden die MNCs für 10,3 min. 100% (30 Gy) bestrahlt, (Gammacell, Gammamaster B.V., Ede, Niederlande). Damit werden APC teilungsunfähig gemacht, behalten aber die Fähigkeit Antigene zu präsentieren. Nach der Bestrahlung wurden die MNCs mit Medium verdünnt, so daß 1 ml RPMI mit $2,5 \cdot 10^6$ Zellen auf eine Vertiefung kamen und diese dann auf die entsprechenden Platten verteilt wurden.

Die 24-Well Platten wurden 1 Woche inkubiert, wobei jeden 2. Tag 2 µl IL-2/Well (Stammlösung 1 µg/ml) auf die Zellen gegeben wurde.

An Tag 14 erfolgte dann die 2. Restimulation nach dem gleichen Prinzip wie beschrieben. Fünf Tage nach der 3. Restimulation (am Tag 21) erfolgte der ^{51}Cr -Release Assay, um die Fähigkeit der CTL zu überprüfen, die Peptide, die ihnen präsentiert wurden, spezifisch zu erkennen und die entsprechenden Zellen zu lysieren (Übersicht Tabelle 7).

Zeitplan:

Tage nach Restimulierung	0 = 7	1	3	5
1. Restimulierung		IL-2 Gabe	IL-2 Gabe	IL-2 Gabe
2. Restimulierung		IL-2 Gabe	IL-2 Gabe	IL-2 Gabe
3. Restimulierung		IL-2 Gabe	IL-2 Gabe	Cr ⁵¹ - Release Assay
eventuell 4. Restimulierung		...		

Tabelle 7: Zeitplan der CTL-Induktion

Bei Farbumschlag des Mediums vor der nächsten Restimulation wurden die Zellen aufgesplittet.

Nach der 3. Restimulation konnten pro Peptid im Schnitt $\sim 10^7$ CTL ausgezählt werden.

3.2.7 ⁵¹Cr-Release Assay

a) Prinzip:

Antigen-spezifische bzw. Peptid-spezifische zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) zerstören alle Zellen, die den für sie spezifischen Peptid-MHC I-Komplex auf ihrer Oberfläche tragen. Diese Fähigkeit nutzt man aus, um die Funktion von CD8⁺-T-Zellen zu überprüfen: zunächst werden Zielzellen (Targetzellen) mit radioaktivem Na₂⁵¹CrO₄ versetzt. Lebende Zellen nehmen das Chromat auf und speichern es. Werden die Targetzellen mit zytotoxischen Zellen inkubiert und kommt es zur Lyse, wird das Chromat freigesetzt und kann im Überstand nachgewiesen werden, indem die Radioaktivität gemessen wird.

b) Methode:

Für den ^{51}Cr -Release Assay wurden 96-Well Platten verwendet.

Alle Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt.

Als Targetzellen dienten Blasten homozygoter HA-1-positiver (H/H) und HA-1-negativer (R/R), sowie heterozygoter (H/R) Leukämiepatienten und die Zelllinien CROFT (HA-1^{H/H}), U266 (HA-1^{R/R}) und OPM-2 (HA-1^{H/R}).

Die leukämischen Blasten wurden 48 h bevor sie als Targetzellen in den ^{51}Cr - Release Assay eingesetzt wurden, aufgetaut und in RPMI mit 10% FCS und 5% Streptomycin in Kultur genommen.

Pro Ansatz, d.h. pro Well wurden $0,5 \cdot 10^4$ Targetzellen/100 μl RPMI eingesetzt.

Die benötigte Anzahl an Targetzellen wurden dann zum Teil jeweils mit 25 μg relevantem oder irrelevantem Peptid in 1 ml RPMI für 2 h bei 37°C inkubiert.

In der Zwischenzeit konnten die CTL für den Assay vorbereitet werden. Nach dem Zentrifugieren bei 370 x g für 10 min. wurden die Zellen ausgezählt und dann pro Ansatz Verdünnungsreihen auf je 6 Wells vorgelegt. Es wurde immer mit einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^5$ CTL begonnen und pro Well 1:3 verdünnt. So resultierte im ersten Well ein Effektor- zu Targetzellen Verhältnis (E:T Ratio) von 30:1, im zweiten 10:1, im folgenden 3,3 : 1 usw.

Nach der Inkubationszeit von 2 h wurden die beladenen Targetzellen nach dem Zentrifugieren mit je 10 μl ^{51}Cr (Stammlösung 370 mBq/10 mCi; Cat. NEZ-030, NEN) für 1 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Danach wurden die Targetzellen mit RPMI gewaschen und je $0,5 \cdot 10^4$ Targets zu den CTL pipettiert.

Die Platte wurde für 4 h bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der radioaktive Überstand abgenommen und im Microbeta Counter (Wallac, Turcu, Finnland) die Strahlung gemessen, („Experimental Release“, ER).

Damit die Stärke der radioaktiven Strahlung in ein Verhältnis zum Grad der Zellyse gesetzt werden konnte, mußten zwei Kontrollen im Versuch mit angesetzt werden.

Zum einen wurden Targetzellen ohne CTL eingesetzt, die dann also nicht lysiert wurden und nur eine geringe Spontanstrahlung aufwiesen. Diese ist durch die Diffusion des Chromats durch die Zellmembran zu erklären = „Spontaneous Release“, (SR). Zum anderen verwendete man Targetzellen, deren Membranen durch den Zusatz von Tritan X-100 völlig zerstört wurden, und deren Strahlung den „Maximal Release“ (MR) darstellten.

Die prozentuale spezifische Lyse wurde nach der Formel:

$100 \times (\text{Experimental Release} - \text{Spontaneous Release} / \text{Maximal Release} - \text{Spontaneous Release})$ ermittelt.

Eine Abwandlung dieses Assays war die Herstellung einer Peptidverdünnungsreihe bei einem konstanten Verhältnis von Effektor- zu Targetzellen mit 30:1 (pro Well $1,5 \cdot 10^5$ CTL und $0,5 \cdot 10^4$ Targets). Es wurde mit einer Peptidkonzentration von 50 µg/200 µl (250 µM) begonnen und in Zehnerschritten fünf Mal verdünnt. Als Negativkontrolle diente das HLA-A2 restringierte HIV-1-Peptid mit der Sequenz ILKEPVHGV.

4. Ergebnisse

4.1 RT-PCR Analyse der HA-1 Expression

Mittels RT-PCR wurde bei 64 HLA-A2 positiven Personen die Allelverteilung des HA-1 Minorantigens untersucht. Dabei wurde aus Gesamt-RNA synthetisierte cDNA von 49 gesunden Spendern und 15 Patienten untersucht. Unter den Patienten waren 6 Patienten mit AML, 7 Patienten mit ALL und 2 Patienten mit CML. Des Weiteren wurden verschiedene HLA-A2 positive Zelllinien auf ihren HA-1 Minorantigen Phänotyp untersucht, um sie als zusätzliche Kontrollen beim ^{51}Cr -Release Assay verwenden zu können. Es handelte sich um die Zelllinien CROFT, U266 und OPM-2.

Als heterozygote Kontrolle mit HA-1^{H/R} diente bei der RT-PCR die Zelllinie KG-1 (den Haan et al., 1998), als homozygote Kontrollen die Zelllinien 6574803 (HA-1^{R/R}) und 6574805 (HA-1^{H/H}), (von Dr. M. Wilke, Leiden, NL).

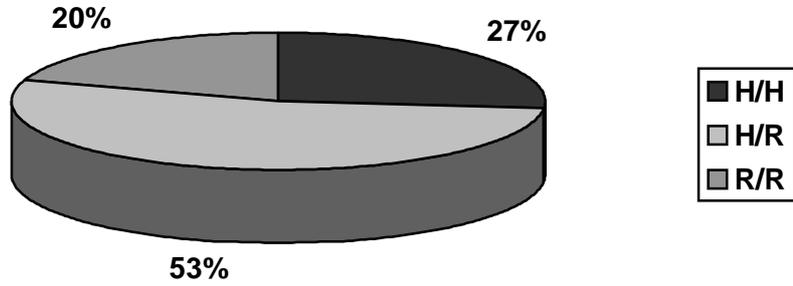
Von den 64 untersuchten Personen waren 10 homozygot für HA-1^H (H/H), 35 hatten den heterozygoten Genotyp HA-1^{H/R} (H/R) und 19 waren homozygot für HA-1^R (R/R). Das ergibt, bezogen auf die HLA-A2 positive Bevölkerung, die 60% unserer mitteleuropäischen Bevölkerung ausmacht, eine prozentuale Verteilung von 16% H/H, 54% H/R und 30% R/R, (Tab.8, Abb.4).

Unter den Zelllinien hatte CROFT den Genotyp HA-1^{H/H}, U266 war homozygot HA-1^{R/R} und OPM-2 heterozygot mit HA-1^{H/R}, (Abb. 5).

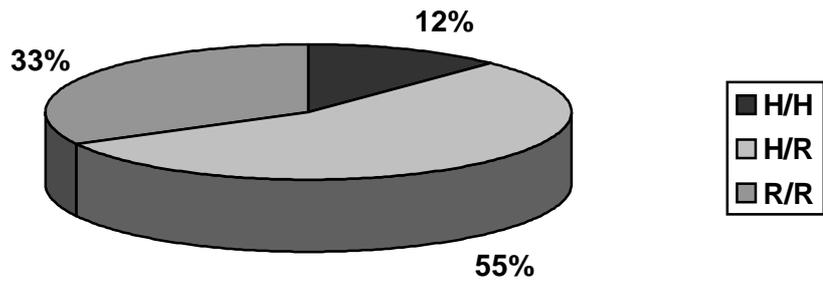
	Spender, HLA-A2 pos.	Empfänger, HLA-A2 pos.	Zeilensumme	Verteilung
HA-1^{H/H}, (H/H)	6	4	10	16%
HA-1^{H/R}, (H/R)	27	8	35	54%
HA-1^{R/R}, (R/R)	16	3	19	30%
Spaltensumme	49	15	64	100%

Tabelle 8: Verteilung des Genotyps vom Minorhistokompatibilitätsantigen HA-1 von 64 untersuchten HLA-A2 positiven Personen.

Empfänger HLA-A2



Spender HLA-A2



Gesamtverteilung

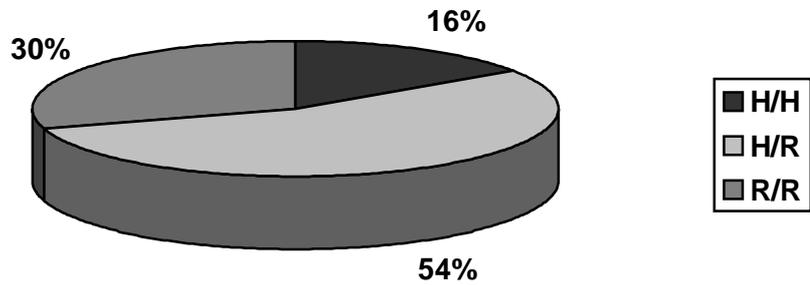


Abbildung 4: Graphische Darstellung der Allelverteilung des Minorantigens HA-1 unter HLA-A2 positiven Spendern, Empfängern und gesamt.

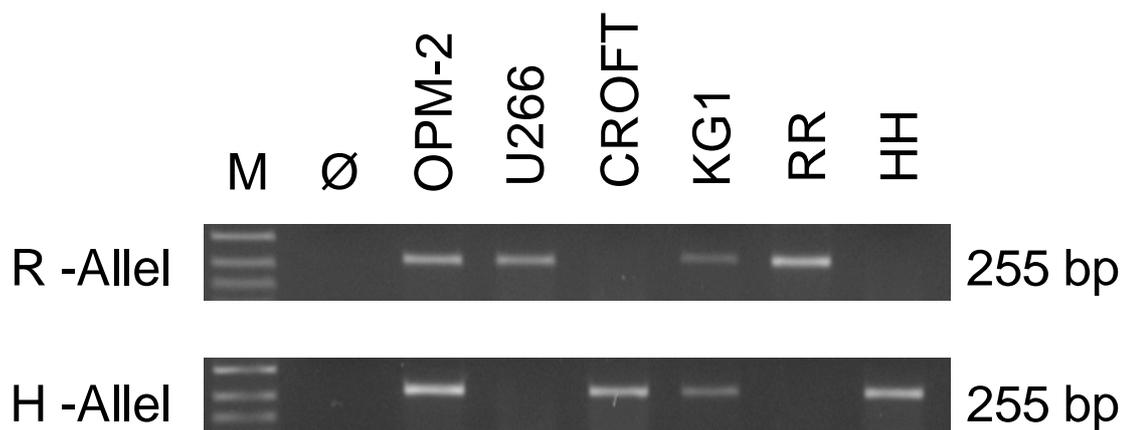
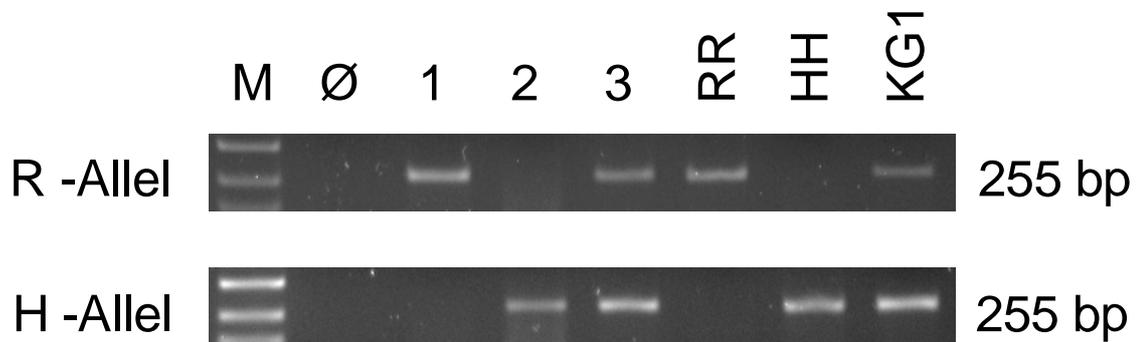


Abbildung 5:

Die HA-1 Genexpression wurde bei HLA-A2 positiven leukämischen Blasten, gesunden Spendern und bei verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien untersucht. Die PCR wurde wie bei den Methoden beschrieben mit HA-1 allelspezifischen Primern durchgeführt. Als Kontrollen wurden die Zelllinie KG-1 (heterozygot H/R), und die homozygoten Zelllinien HH (6574805) und RR (6574803) verwendet.

Oben: Proben von leukämischen Blasten der Patienten 1, 2 und 3: Pat.-Nr. 1 hat den Genotyp R/R, Pat.-Nr. 2 H/H und Nr. 3 H/R.

Unten: verschiedene Zelllinien: OPM-2 ist heterozygot H/R, U266 homozygot R/R und CROFT H/H. Nach RT-PCR wurden 10 µl der PCR-Produkte auf einem 3% Gel elektrophoretisch aufgetrennt. M ist der Molekulargewichtsmarker VIII von Boehringer/Mannheim. Ø ist die Negativkontrolle. Die Größe der PCR-Produkte ist 255 bp.

4.2 FACS Ergebnisse

Für die in-vitro-Induktion von HA-1H-spezifischen zytotoxischen T-Zellen wurden vier Mal dendritische Zellen aus CD14⁺ Monozyten von drei verschiedenen HA-1-negativen, HLA-A2-positiven Spendern hergestellt.

Mit der FACS-Analyse wurde der Reifegrad und die Reinheit der dendritischen Zellen beurteilt.

Die verwendeten Antikörper waren gegen folgende Oberflächenmoleküle gerichtet:

FITC: CD1a, CD14, CD19, CD86

PE: CD83, HLA-DR, CD3, CD80 (CD-Klassifizierung s. 3.2.5)

Als Negativkontrolle wurden bei beiden Farbstoffen Maus-IgGs verwendet.

Die untersuchten dendritischen Zellen (markierte Zellpopulation in Abbildung 6) zeigten die typischen Oberflächenantigene für reife DC:

CD83⁺ und CD1a wurden stark exprimiert. Der Monozyten-spezifische Marker CD14⁺ konnte kaum nachgewiesen werden, die MHC II Moleküle HLA-DR wurden hingegen ebenfalls stark exprimiert.

Ein weiteres Indiz für die Reife der DC war der hohe Anteil an CD80⁺ und CD86⁺ Zellen. Die Zellkulturen enthielten wenig nichtadhärente Zellen, da kaum CD3⁺ (T-Zellen) und CD19⁺ (B-Zellen) nachgewiesen werden konnten (Tabelle 9).

Oberflächenantigene	CD83 u. CD1a pos.	HLA-DR pos. u. CD14 neg.	CD3 u. CD19 neg.	CD80 u. CD86 pos.
DC markiert	79,99%	98,55%	89,25%	88,24%

Tabelle 9: Prozentuale Verteilung der Oberflächenantigene am Beispiel von Abbildung 6: hierbei handelt es sich um Ansatz 4 mit der zweiten Probe von Spender Nr. 1

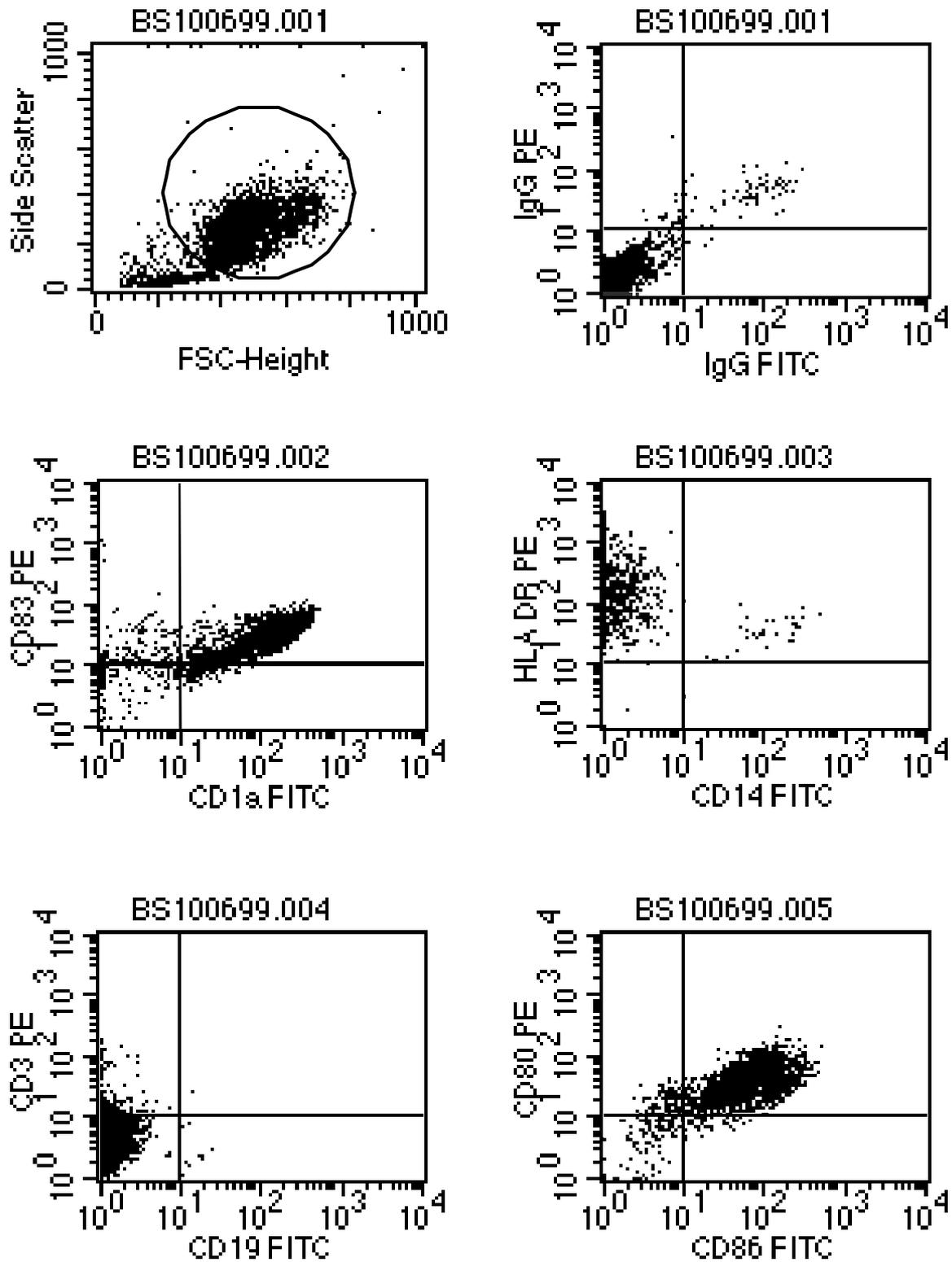


Abbildung 6: Repräsentative FACSscan Dot Plot Diagramme als Beispiel für die Überprüfung des Phänotyps der hergestellten dendritischen Zellen aus Monozyten nach Induktion mit IL-4, GM-CSF und TNF- α .

4.3 Induktion von HA-1-spezifischen CTL

Die reifen dendritischen Zellen wurden mit den synthetisch hergestellten Peptiden HA-1H (Peptid H, VLHDDLLEA) und HA-1R (Peptid R, VLRDDLLEA) beladen und mit mononukleären Zellen des gleichen Spenders inkubiert, um autologe CD8⁺ T-Zellen zu induzieren.

Nachdem die mononukleären Zellen über vier Wochen mit den Peptiden stimuliert worden waren, wurde an Tag 5 nach der 3. Restimulation der ⁵¹Cr-Release Assay durchgeführt.

Jeder Assay wurde mit 6 verschiedenen Effektor- zu Targetzell-Verhältnissen (E:T) durchgeführt. Das maximale E:T Verhältnis war 30:1. Es wurde jeweils auf ein Drittel verdünnt bis zu einem minimalen Verhältnis von 0,1:1.

Als Effektorzellen wurden die induzierten Peptid-spezifischen CTL eingesetzt, als Targetzellen dienten die zum Teil beladenen Zelllinien U266, CROFT und OPM-2, sowie Blasten von 3 ALL- und 3 AML- Patienten.

Alle eingesetzten Effektorzellen waren HA-1-negativ mit dem Genotyp HA-1^{R/R}.

Bei dem ersten Ansatz handelte es sich um mononukleäre Zellen des Spenders Nr.01. Über 4 Wochen wurde ein Teil der Zellen mit Peptid R, der andere Teil mit Peptid H stimuliert. Nach dieser Zeit wurde der Assay mit den Zielzellen CROFT (HA-1^{H/H}), die zum Teil mit dem jeweils zur Stimulation verwendeten Peptid beladen waren, und OPM-2 (HA-1^{H/R}) durchgeführt, (siehe Abbildung 7).

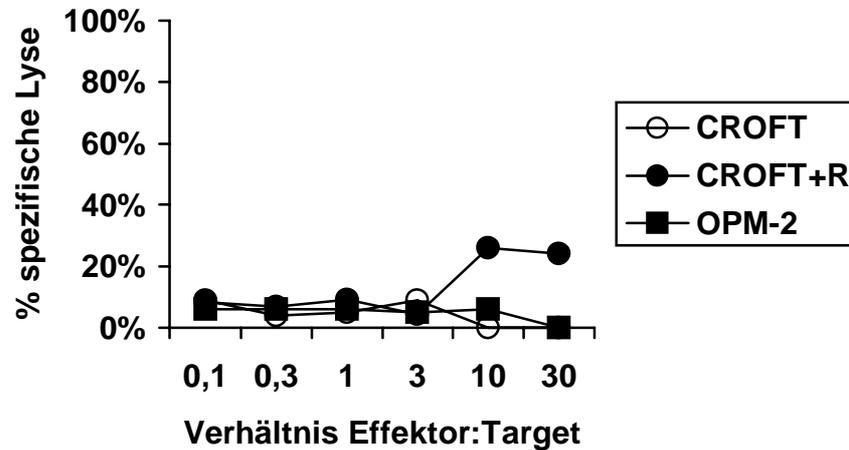
Die Peptid R-spezifischen CTL erkannten die Zellen CROFT nicht, und es kam zu keiner Lyse. Die CROFT-Zellen, die mit dem Peptid R beladen worden waren, wurden geringgradig lysiert. Gegen die heterozygote Zelllinie OPM-2 wurde ebenfalls keine Antwort gesehen.

Die Peptid H-spezifischen CTL reagierten mit der CROFT-Zelllinie und es kam bis zu einer 36% Lyse bei einem Effektor zu Target Verhältnis von 30:1. Die CROFT-Zellen, beladen mit dem spezifischen Peptid H, wurden bei einem E:T Verhältnis von 30:1 bis zu 86% lysiert. Bei der Zelllinie OPM-2 kam es nur zu einer sehr geringen Lyse.

Spender Nr.01

a)

Peptid R-spezifische CTLs



b)

Peptid H-spezifische CTLs

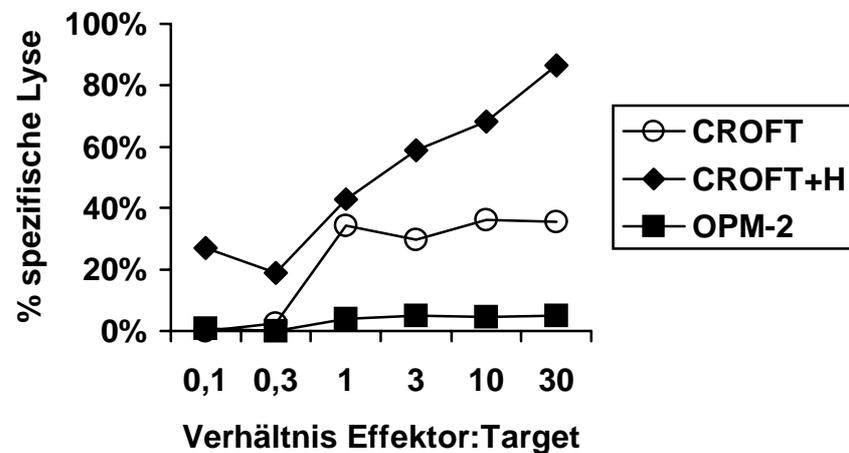


Abbildung 7:

a) Peptid R-spezifische CTL von Spender Nr.01 lysieren weder die HA-1^{H/H} positive Zelllinie CROFT, noch die heterozygote Zelllinie OPM-2. CROFT, beladen mit Peptid R (CROFT+R) wird nur geringgradig lysiert.

b) Peptid H-spezifische CTL erkennen sowohl CROFT, als auch CROFT mit Peptid (CROFT+H) beladen. OPM-2 wird nicht erkannt

4.4 HA-1-spezifische CTL lysieren allogene leukämische Blasten

Beim nächsten Ansatz mit PBL von Spender Nr.118 wurde die Kreuzreaktion der Peptid-spezifischen CTL überprüft, (Abbildung 8). Beide Arten von CTL wurden mit U266 (HA-1^{R/R}), U266 + Peptid R (U266+R), U266 + Peptid H (U266+H) und CROFT (HA-1^{H/H}) in den Assay eingesetzt.

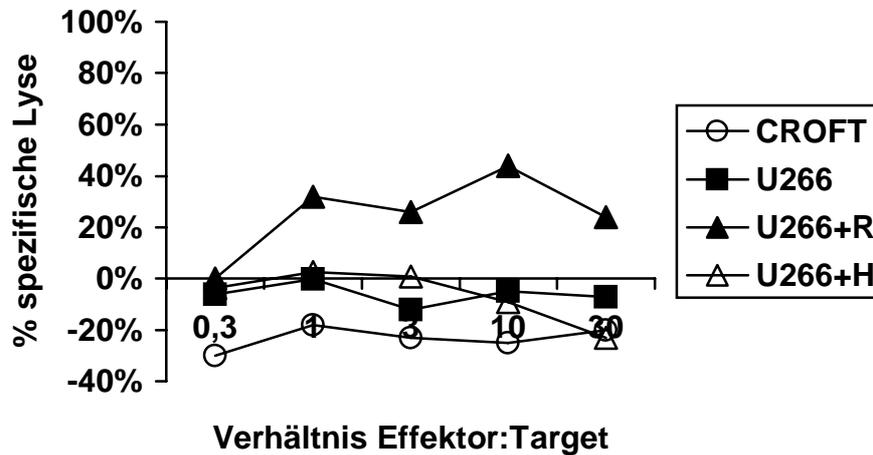
Die Peptid R-spezifischen CTL, die mit dem Peptid R restimuliert wurden, reagierten nur mit den mit Peptid R beladenen U266. Alle anderen Zelllinien wurden nicht lysiert.

Von den Peptid H-spezifischen CTL wurde CROFT mit 60% bei einem Verhältnis von E:T mit 3:1 sehr gut und U266 + Peptid H (U266+H) immerhin bereits zu 55% bei einem Verhältnis von E:T 3:1 lysiert. U266 und U266 + Peptid R (U266+R) wurden nicht lysiert.

Spender Nr.118

a)

Peptid R-spezifische CTLs



b)

Peptid H-spezifische CTLs

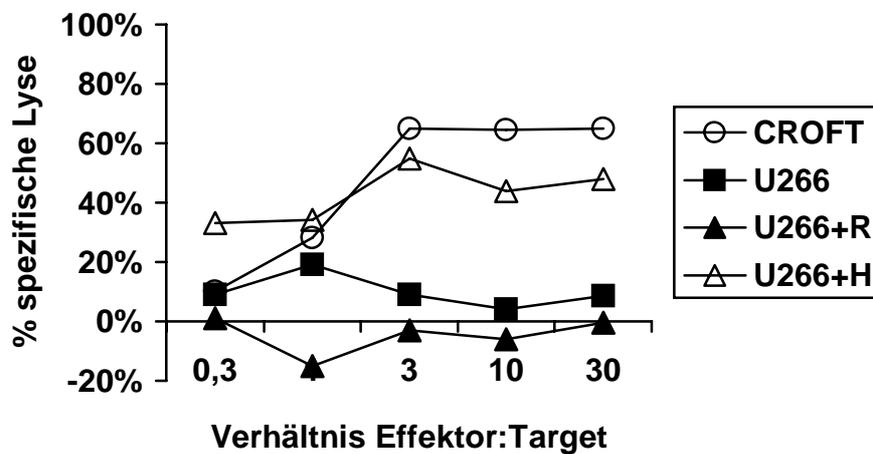


Abbildung 8:

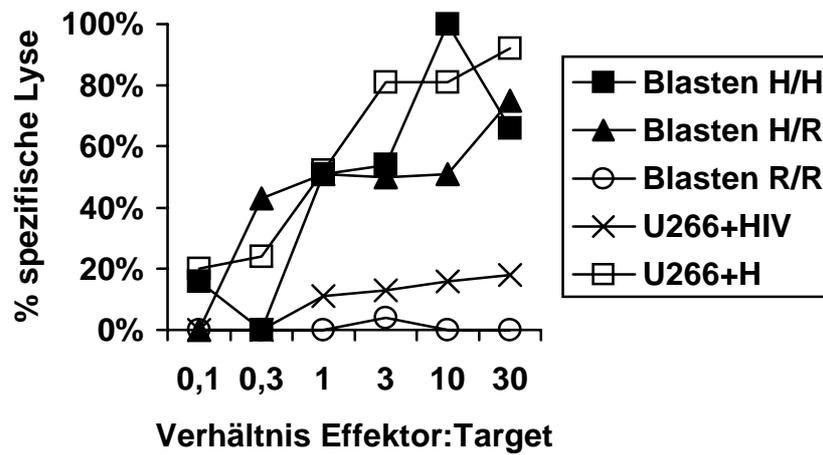
- a) Peptid R-spezifische CTL von Spender Nr.118 lysieren Zellen der Linie U266 (R/R), die mit Peptid R (U266+R) beladen wurden. Alle anderen Zelllinien werden nicht lysiert.
- b) Peptid H-spezifische CTL erkennen sowohl CROFT (H/H), als auch die HA-1 neg. Zelllinie U266, die mit Peptid H (U266+H) beladen wurde.

Beim nächsten Assay wurde untersucht, ob die Peptid H-spezifischen CTL leukämische Blasten erkennen und lysieren können, (Abbildung 9). Als Kontrolle diente U266 beladen mit Peptid H (U266+H) und beladen mit einem unspezifischen HIV-Peptid.

Verwendet wurden die Blasten eines AML-Patienten (Nr.102), mit dem Genotyp (H/H), des weiteren Blasten von zwei ALL-Patienten: Nr.107, heterozygot mit (H/R) und Patient Nr.122 mit dem Genotyp (R/R).

Die Blasten H/H und die Zelllinie U266, die mit dem Peptid H beladen war, wurden sehr gut lysiert. Bei den Blasten H/H wurde sogar bei E:T 10:1 eine 100% Lyse erreicht und schon bei einem E:T Verhältnis von 1:1 wurden die Blasten H/H und H/R, sowie die mit dem Peptid beladenen Blasten R/R 50%ig lysiert. Im Gegensatz zu dem Versuch mit Spender Nr.01, wurden bei diesem Assay auch heterozygote Blasten bis zu 75% lysiert. Die Blasten R/R und U266, beladen mit dem Peptid HIV, wurden nicht erkannt und nicht lysiert.

Peptid H-spezifische CTLs



Blasten H/H: Patient Nr. 102, AML

Blasten H/R: Patient Nr. 107, ALL

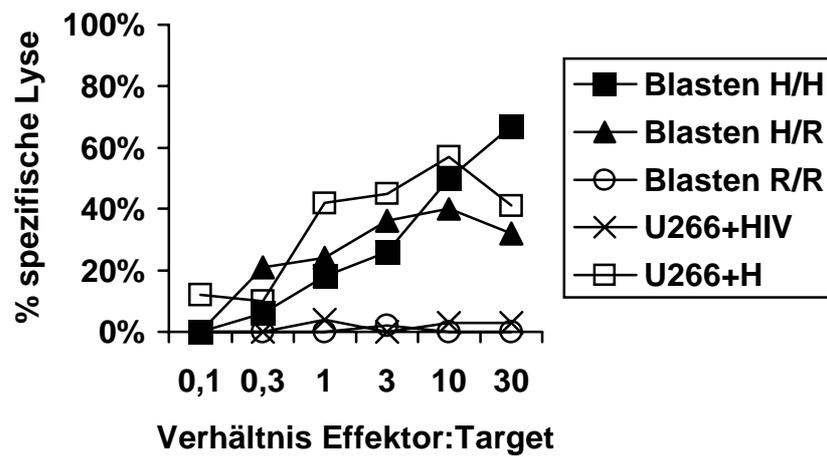
Blasten R/R: Patient Nr. 122, ALL

Abbildung 9:

Peptid H-spezifische CTL des Spender Nr. 120 lysieren leukämische HA-1-positive und heterozygote Blasten, sowie die HA-1-negativen Zellen, die mit Peptid H beladen wurden. HA-1-negative Blasten und Zellen mit dem HIV-Peptid beladen, wurden nicht erkannt.

Dieser Versuch wurde erneut mit Peptid H-spezifischen CTL des Spenders Nr.01 durchgeführt, (Abbildung 10). Da er beim ersten Versuch nur gering gegen die heterozygote Zelllinie OPM-2 reagiert hatte, wurde nun nochmals überprüft, wie er gegen heterozygote Blasten reagieren würde. Wieder wurden Blasten H/H (Patient Nr.18, AML), Blasten H/R (Patient Nr.125, AML) und Blasten R/R (Patient Nr. 114, ALL), sowie U266+HIV und U266 + Peptid H (U266+H) verwendet. Wieder kam es zu einer starken Reaktion gegen die für die CTL spezifischen Blasten H/H und die mit Peptid H beladene HA-1 negative Zelllinie U266. Die Blasten R/R und U266+HIV zeigten keine Lyse. Die Lyse der heterozygoten Blasten war mit maximal 40% bei E:T 10:1 geringer als bei Spender Nr.120, aber stärker als beim ersten Assay des Spenders Nr.01.

Peptid H-spezifische CTLs



Blasten H/H: Patient Nr. 18, AML

Blasten H/R: Patient Nr. 125, AML

Blasten R/R: Patient Nr. 114, ALL

Abbildung 10:

Die CTL wurden von Spender Nr. 1 generiert. Es werden heterozygote Blasten (Blasten H/R), sowie HA-1-positive Blasten (Blasten H/H), bzw. Zellen, die mit HA-1 (U266+H) beladen sind, lysiert.

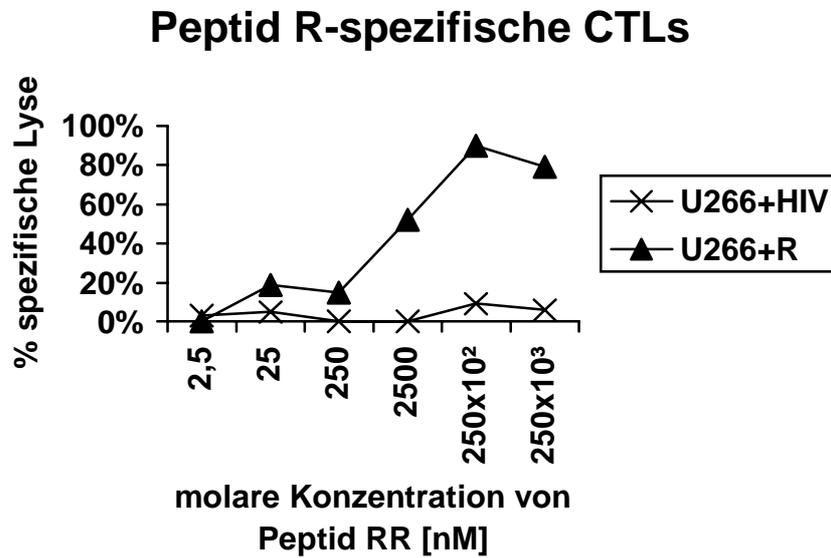
4.5 Sensitivität der HA-1-spezifischen CTL

Zuletzt wurden mit CTL von den Spendern Nr.120 und Nr.01 Peptidverdünnungsreihen durchgeführt (Abbildung 11 nur von Spender 01). Als Targetzellen diente die Zelllinie U266 + Peptid R, bzw. Peptid H und als Kontrolle U266+HIV-1. Die Ergebnisse waren bei beiden Versuchen fast identisch. Das unspezifische HIV-Peptid wurde von beiden CTL Arten nicht erkannt und es erfolgte keine Lyse. Die CTL erkannten jeweils ihr spezifisches Peptid und es kam zu einer Lyse, die mit der Konzentration des Peptides anstieg.

Die Peptid R-spezifischen CTL haben eine geringere Affinität zu HA-1R als die Peptid H-spezifischen CTL zu HA-1H. Bei ersteren war eine Peptidkonzentration von fast 2500 nM nötig, um eine 40%ige Lyse zu erreichen, bei den CTL^{HH} war eine Lyse von 40% bereits bei einer Konzentration von nur 250 nM vorhanden.

Spender Nr.1/2b

a)



b)

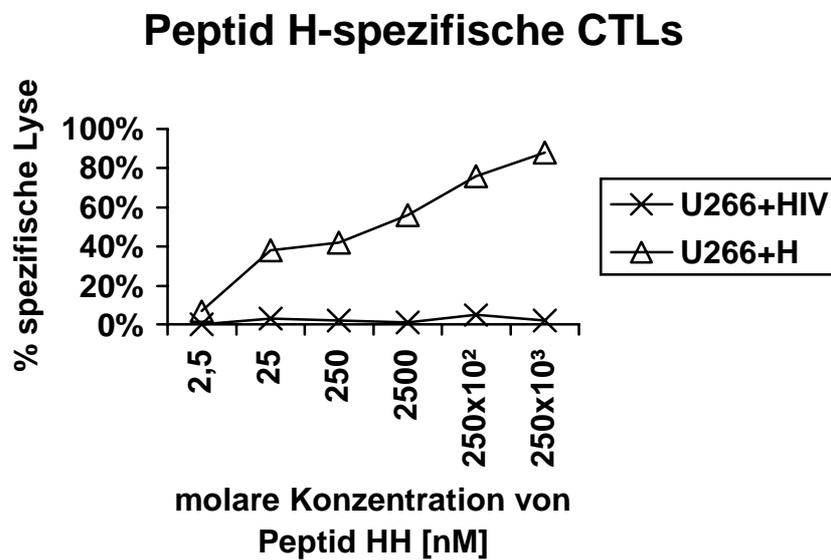


Abbildung 11:

Prozentuale Lyse bei steigender Peptidkonzentration. Beide CTL-Klone reagieren spezifisch mit ihrem Peptid, keine Reaktionen gegen die HIV-Peptid beladenen Zellen. Bei den Peptid H-spezifischen CTL ist die Affinität deutlich höher: 40% Lyse der Peptid H-spezifischen CTL bereits bei einer molaren Konzentration von 250 nM gegenüber 40% Lyse bei fast 2500 nM bei Peptid R-spezifischen CTL.

4.6 Zusammenfassung der Assay-Ergebnisse

Zusammenfassend kann man sagen, daß CTL, die mit dem Peptid VLHDDLLEA (Peptid H = HA-1H) induziert wurden, HLA-A2 positive Zelllinien und primäre leukämische Blasten, die dieses Peptid auf ihrer Oberfläche exprimieren, spezifisch erkennen und lysieren können. Ebenso werden Zellen lysiert, die mit HA-1H beladen werden. Beim Einsetzen von heterozygoten Zellen gab es Unterschiede in der Stärke der Immunantwort.

Interessanterweise konnten wir HA-1R-spezifische CD8⁺ T-Zellen bei allen Individuen induzieren, wobei diese Zellen nur Targetzellen lysieren konnten, die mit dem Peptid R beladen waren. Zellen oder Blasten mit Genotyp (R/R) wurden von Peptid R-spezifischen CTL nicht erkannt und lysiert.

5. Diskussion:

5.1 Diskussion der PCR-Ergebnisse

Mittels RT-PCR wurde bei 64 HLA-A2 positiven Personen und bei 3 HLA-A2 positiven Zelllinien der HA-1-Genotyp untersucht.

Da mit dieser Methode kleinste Mengen an cDNA sichtbar gemacht werden können, ist sie sehr anfällig für Kontaminationen. Um falsch positive Ergebnisse sicher zu erkennen, wurden bei jedem Ansatz eine Negativkontrolle mit einer cDNA-Leerprobe und drei Positivkontrollen mit den Zelllinien KG-1 (H/R), 6574803 (R/R) und 6574805 (H/H) eingesetzt.

16% der untersuchten Personen waren homozygote Träger des HA-1^H Allels, 54% waren mit HA-1^{H/R} heterozygot und 30% homozygot HA-1^{R/R}.

Da in früheren Arbeiten angenommen wurde, daß HA-1R nicht auf der Oberfläche exprimiert wird, (den Haan et al., 1998), konnte man annehmen, daß die heterozygoten Träger nur HA-1H auf der Oberfläche exprimieren. Dies konnte im weiteren Verlauf auch mit Hilfe unserer Ergebnisse der ⁵¹Cr-Release Assays bestätigt werden.

Aufgrund der Resultate der PCR-Untersuchungen kann man davon ausgehen, daß 70% aller HLA-A2 positiver Personen HA-1H auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, darunter 16% als homozygote und 54% als heterozygote Träger. Diese Zahl entspricht fast genau der Angabe von früheren Veröffentlichungen, in denen gezeigt wurde, daß 69% der HLA-A2 positiven Bevölkerung HA-1H exprimieren, (den Haan et al., 1998).

Die PCR-HA-1 war leicht durchzuführen und ergab regelmäßig eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse. Sie entspricht dem Zeitaufwand anderer bereits etablierten PCR-Untersuchungen und könnte ohne Probleme routinemäßig durchgeführt werden. Es wäre denkbar, die Menge der eingesetzten RNA, oder die Zyklenzahl zu erhöhen, da die Banden manchmal etwas schwach in der Gelelektrophorese erschienen. Jedoch waren die Ergebnisse meistens mit der oben genannten Menge ausreichend informativ. Selbst bei einer eingesetzten

RNA-Menge von nur 0,4 µg war eine zwar schwache, aber eindeutige Bande zu erkennen.

5.2 Herstellung der dendritischen Zellen und FACS

Im Gegensatz zu der Arbeit von Mutis et al., 1999, die als APC dendritische Zellen aus dem peripheren Blut verwendeten, bzw. DC aus CD34⁺ Vorläuferzellen generierten, haben wir dendritische Zellen aus CD14⁺, adhärennten Monozyten hergestellt.

Aus allen vier Monozytenansätzen wurden mit der Zytokinkombination GM-CSF, IL-4 und TNF- α immer erfolgreich und reproduzierbar reife DC gezüchtet. Brossart et al. haben 1998 bereits gezeigt, daß der Ertrag an DC bei Verwendung von IL-4, TNF- α und GM-CSF höher ist, als bei der Verwendung von Flt-3L und IL-4.

Mittels FACS wurde der Phänotyp der generierten DC überprüft. Bei den vier DC-Ansätzen wurden zumeist relativ konstante Prozentverteilungen der Oberflächenantigene erreicht. Die HLA-DR positiven und CD14 negativen Zellen schwankten zwischen 97% und 99%. Es waren ebenfalls regelmäßig kaum B- oder T-Zellen vorhanden (zwischen 82% und 96% CD3 und CD19 negative Zellen).

Ein Nachteil bei der Generation der DC war laut Mutis et al. die Verwendung von FCS anstelle autologer Seren im Kulturmedium der DC. Xenogenes Material kann T-Helferzellen aktivieren, und so unspezifisch die Induktion HA-1-spezifischer CTL verstärken. Verwendung von autologem Plasma anstelle von FCS macht allerdings die Züchtung reifer DC erheblich schwieriger, (Antwort von Mutis et al. an Brossart et al., 1999b).

Es konnte aber inzwischen gezeigt werden, daß man zur Generation von DC, ohne eine Einschränkung der Ergebnisse, FCS-haltiges RPMI durch serumfreies X-VIVO 20 Medium ersetzen kann, (Brossart et al., 2000).

5.3 Diskussion der Ergebnisse der ^{51}Cr - Release Assays

5.3.1. Diskussion der eigenen Ergebnisse

Wir haben gezeigt, daß HA-1H-spezifische CTL (CTL^{HH}) in vitro reproduzierbar von drei verschiedenen HA-1-negativen, HLA-A2-positiven Spendern generiert werden konnten, indem dendritische Zellen (DC) als antigenpräsentierende Zellen (APC) mit dem jeweiligen synthetisch hergestellten Peptid beladen und mit mononukleären Zellen des Blutes (PBMNC) inkubiert wurden. Wie im Ergebnisteil gezeigt, besaßen die CTL^{HH} zytolytische Aktivität gegen HA-1-positive Zielzellen (Abbildungen 7b, 8b), einschließlich leukämischer Blasten von AML- und ALL-Patienten (Abbildungen 9, 10). Beide Leukämiearten waren bisher resistent gegen eine Behandlung mit Donor Lymphozyten Infusionen (DLI), (Mutis et al., 1999a).

Im Vergleich zu der Arbeit von Mutis et al. (1999a) konnten zusätzlich bei zwei von drei Spendern eine Reaktion der CTL^{HH} gegen heterozygote Zielzellen induziert werden, (Abbildungen 9 und 10 im Gegensatz zu 7b). Dies legt die Vermutung nahe, daß bei heterozygoten Trägern eine unterschiedlich starke Expression des Peptides HA-1H vorliegen könnte.

Da die Reaktionen der Peptid H-spezifischen CTL gegen die HA-1-positiven Zellen in Abbildung 7b ebenfalls relativ gering war, wäre es aber auch denkbar, daß der erste Induktionsversuch mit Spender Nr.01 weniger potente CTL als in den folgenden Versuchen ergeben hatte und normalerweise alle heterozygoten Trägerzellen spezifisch erkannt und lysiert werden.

Außerdem konnten wir zusätzlich zu den Untersuchungen von Mutis et al. (1999a) bei allen Spendern HA-1R-spezifische CTL induzieren, die jedoch nur Zytotoxizität gegen Zielzellen aufwiesen, die mit dem Peptid R beladen waren, aber keine Lyse bei unbeladenen HA-1-negativen Zellen zeigten, (Abbildungen 8a, 9, 10). Dies und die Tatsache, daß HA-1R-spezifische CTL heterozygote Zielzellen nicht lysieren, (Abb. 7a), kann mehrere Ursachen haben: es könnte

die bisherige Annahme bestätigen, daß HA-1^R das Nullallel ist, das nicht oder nur in sehr geringer Anzahl exprimiert wird.

Falls HA-1R doch geringfügig exprimiert werden sollte, besteht wiederum die Möglichkeit, daß es kaum oder gar nicht an die Zelloberfläche transportiert und präsentiert wird. Der Grund hierfür könnte die geringe Bindungsaffinität von VLRDDLLEA an HLA-A2 sein, die nur $1/12$ von VLHDDLLEA beträgt, (den Haan et al., 1998).

Zusätzlich besteht die Wahrscheinlichkeit, daß die CTL^{RR} eine geringere Bindungsaffinität für das Peptid R besitzen und deshalb schwächer reagieren: bei den Peptidverdünnungsreihen konnte gezeigt werden, daß Peptid R-spezifische CTL (CTL^{RR}) HA-1-negative Zellen, die mit Peptid R beladen waren (U266+R), schlechter lysierten, als Peptid H-spezifische CTL (CTL^{HH}) die mit Peptid H beladenen Zellen U266 (U266+H).

In Abbildung 11 ist zu sehen, daß bei einer Beladung mit 250 nM Peptid H bereits eine 40% Lyse der HA-1-negativen Zellen vorhanden ist. Bei Peptid R wird diese Lyserate erst bei einer Peptidkonzentration von fast 2500 nM erreicht. Es ist also fast die zehnfache Menge an Peptid nötig um die entsprechende Zytotoxizität zu erreichen.

Die funktionelle Untersuchung im ⁵¹Cr-Release Assay hatte gezeigt, daß die beiden peptidspezifischen CTL untereinander nicht kreuzreagieren. HA-1H-spezifische CTL reagierten nicht mit dem HA-1R Peptid, da HA-1-negative (HA-1^{R/R}) U266 Zellen, oder U266 Zellen, die mit Peptid R beladen waren, nicht von HA-1H-spezifischen CTL lysiert wurden. Das gleiche galt für den umgekehrten Fall. HA-1R-spezifische CTL zeigten keine Zytotoxizität gegen die homozygoten HA-1^{H/H} Zellen CROFT, oder gegen die heterozygoten OPM-2 Zellen, (Abb. 8a, b). Außerdem konnten keine Reaktionen gegen ein irrelevantes HLA-A2-restringiertes HIV-1 Peptid festgestellt werden, (Abbildungen 9 u. 10).

Autoreaktivität, sowie Reaktionen gegen nicht-hämatopoetische Zellen wurden nicht untersucht, da diese Untersuchungen bereits ausführlich von Goulmys Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, (de Buerger et al., 1992; Dolstra et al., 1997; Mutis et al., 1999a; van Els et al., 1992, s.u.).

Aufgrund der Tatsache, daß auch heterozygote Zellen von den HA-1H-spezifischen CTL lysiert werden und als Empfänger von HA-1-spezifischen Donor-Lymphozyten-Infusionen nach KMT in Frage kommen, wird die Gruppe der potentiell therapierbaren Patienten erheblich ausgeweitet:

von nur 16% homozygoter HA-1^{H/H} Patienten, die für eine Behandlung mit spezifisch induzierten CTL in Frage kommen, steigt die Zahl der möglichen Kandidaten, die HA-1H exprimieren, mit den heterozygoten Trägern auf 70%.

P.J. Martin (1997) und andere haben mittels Populationsstudien berechnet, daß jedoch nur 13% aller HA-1-positiver Patienten einen HA-1-negativen HLA-identen Nachkommen haben, (Schreuder et al., 1993, van Els et al., 1992) und bei nicht verwandten Paaren bei lediglich 20–25% ein Unterschied bzgl. des HA-1 Antigens besteht, (Martin, 1991). Auch wenn dies die Zahl der therapierbaren Patienten wieder stark verringert, so muß man aber berücksichtigen, daß bei Minorantigenen mit mittlerer Phänotypfrequenz, wie HA-1, im Gegensatz zu Minorantigenen mit sehr hoher oder sehr geringer Frequenz, die Wahrscheinlichkeit viel höher ist, Spender- und Empfängerpaare zu finden, die in ihrem Minorantigen differieren, (s. auch 5.3.3., Schreuder et al., 1993).

5.3.2. Mögliche Fehlerquellen und Nachteile der Methode

Durch die relative lange Inkubationszeit von mindestens vier Wochen im Rahmen der CTL-Induktion, steigt das Risiko, die Zellkulturen zu kontaminieren. Für den Fall des klinischen Einsatzes der CTL bei der Immuntherapie, sind solche Zwischenfälle natürlich absolut unerwünscht, da hier durch die Notwendigkeit des erneuten Ansetzens von Kulturen die Therapie des Patienten um Wochen verzögert würde.

Um dieses Risiko zu umgehen, könnte man versuchen, HA-1^H-spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten in vivo zu generieren. HA-1-negative Spender (R/R) müßten dazu mit dem Peptid H immunisiert werden, indem man ihnen direkt das Peptid H, oder aber mit Peptid H beladene DC injiziert. Nach einiger Zeit

könnte man zum Beispiel mit HLA-HA-1-Tetrameren die in vivo gebildeten CTL spezifisch aus dem Blut versuchen zu isolieren.

Tetramere HLA–Peptide bestehen aus vier schweren Ketten eines Klasse I HLA–Moleküls, jeweils assoziiert mit einem β_2 –Mikroglobulin und dem Epitop eines Peptids. Die schweren Ketten enthalten eine Signalsequenz, an die je ein Biotin–Molekül mit Hilfe des Enzyms BirA gebunden wird. Nach dem Zufügen von fluoreszenz-markiertem Streptavidin ist das Tetramer vollständig. HLA–Tetramere binden an CTL, die T–Zell–Rezeptoren (TCR) besitzen, die spezifisch für die verwendete HLA/Peptid Kombination sind. Veränderungen von nur einer Aminosäure führen schon zu einem Nichterkennen. Durch sogenanntes „Clustering“ kann die Sensitivität der Tetramere erhöht werden. Neue Generationen von HLA-Tetrameren binden bis zu einer Sensitivität von 1 : 5000 CD8⁺ T–Zellen.

Das Quantifizieren Antigen–spezifischer CD8⁺ T–Lymphozyten war bisher entweder durch das Messen der zytolytischen Aktivität, z.B. mit dem ⁵¹Cr–Release Assay, (s. 3.2.7), oder durch Nachweis zellspezifischer Zytokine, z.B. mit dem ELISPOT, möglich. Der ELISPOT ist eine Modifikation des ELISA: Zellen werden auf einer Oberfläche inkubiert, an die auch zytokin-spezifische Antikörper gebunden sind. Setzen die Zellen Zytokine frei, werden diese an die Antikörper gebunden. Nach Abwaschen der Zellen können die Zytokine durch Zugabe einer zweiten Art von markierten Anti-Zytokin-Antikörper sichtbar gemacht werden. Es zeigen sich dann deutliche „Spots“, (Janeway C.A., Travers P.: Immunobiology, 3. Ausgabe, Current Biology Ltd./ Garland Publishing Inc., London, New York, 1997).

Voraussetzungen für diese Assays war nicht nur die Kultivierung der Zellpopulationen über einige Wochen, sondern auch, daß die Effektorzellen in vitro überlebensfähig waren, sich teilten und funktionierten.

Tetramere HLA–Peptide erlauben nun die direkte ex vivo Visualisierung von in vivo induzierten Ag–spezifischen CTL und NK–Zellen mit Durchflußzytometrie. Zusätzlich kann man durch „Multicolour–Analyse“ Daten über die Zelloberfläche und das Zellinnere erhalten, direkt Zellen sortieren und gereinigte Zellpopulationen gewinnen, (Ogg et al., 1998).

Man könnte also hochspezifische CTL gewinnen, die an Anzahl die in vitro hergestellten überragen und diese jederzeit, zumindest nach erneuter Peptidboosterung, wieder isolieren, (siehe auch Mutis et al., 1999b).

Da in mehreren Veröffentlichungen die gewebespezifische Verteilung der Minorantigene HA-1 und HA-2 beschrieben und Autoreaktivität ausgeschlossen wurde, haben wir von der wiederholten Überprüfung dieser Aussagen abgesehen.

De Buerger et al. haben schon 1992 gezeigt, daß HA-1 (und HA-2) nur auf T- und B-Zellen, Monozyten, Thymozyten, PHA-Blasten und EBV-BLCL nachgewiesen werden konnten, nicht aber auf Melanozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, PTEC (proximal tubular epithelial cells) und HUVE (human umbilical venous endothelial cells). Hier waren die Lysen unter 5%.

Van der Haarst et al. haben 1994 HA-1 auf lymphatischen und myeloischen Leukämiezellen nachgewiesen und mit Hinweis auf die Gewebespezifität damals schon die Möglichkeit einer adjuvanten Immuntherapie erwähnt.

Mutis et al. hatten in ihrer Arbeit im April 1999 nur noch Fibroblasten eingesetzt, die selbst nach Stimulation der CTL mit TNF- α oder INF- γ nicht lysiert wurden. Ansonsten verwiesen sie auf andere Publikationen, in denen Hautfibroblasten, Keratinozyten und Leberzellen als Targetzellen eingesetzt und nicht lysiert wurden, (s.o., sowie Niederwieser et al., 1993; Faber et al., 1995 und Falkenburg et al., 1991).

Allerdings gibt es eine neue Publikation von Tseng et al., 1999, in der beschrieben wird, daß HA-1-Mismatch mit einer GvHD der Haut und des Darmes korreliert (siehe auch Abschnitt 5.3.4.).

Bei einigen Versuchen war bei dem höchsten E:T Verhältnis von 30:1 ein Abfall der Lyserate zu beobachten. Zum Beispiel in Abbildung 8a: bei U266 + Peptid R ergibt sich bei einem E:T von 10:1 eine 44% Lyse und bei 30:1 eine 24% Lyse, Abbildung 9: bei den Blasten H/H besteht bei E:T mit 10:1 eine 100%ige Lyse und bei 30:1 nur eine 66%ige. Bei Abbildung 10 ist bei der Zelllinie U266 +

Peptid H bei E:T von 10:1 eine 57%ige Lyse, bei 30:1 nur zu 41% lysiert worden.

Man könnte sich vorstellen, daß ab einer gewissen Effektorzell-Konzentration die CD8⁺ T-Zellen sich gegenseitig behindern, und so eine Bindung an ihre spezifischen Antigene verhindert wird.

5.3.3. Vorteile HA-1-spezifischer CTL beim Einsatz in der Immuntherapie:

Die Expression von HA-1 spezifisch nur auf hämatopoetischen Zellen ist sicherlich der Hauptgrund für die Möglichkeit einer Immuntherapie mit HA-1-spezifischen CTL nach SZT bei Leukämiepatienten. Da ein HA-1-Mismatch eventuell jedoch mit einer GvHD der Haut und des Darmes korreliert, (Tseng et al., 1999), ist die Gefahr einer GvHD zwar noch gegeben, aber viel geringer, als bei Immunantworten gegen Minorantigene, die auf Zellen der Haut, der Leber und der Niere präsentiert werden.

CTL gegen das Minorantigen HA-2, das ebenfalls nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, könnten deshalb ebenfalls zur Immuntherapie eingesetzt werden. Mutis et al. haben ihre Daten hierzu bereits veröffentlicht und sehen die Möglichkeit HA-1- und HA-2-spezifische CTL einzusetzen, ebenfalls als bestätigt, (1999a).

HA-1 hat gegenüber HA-2 den Vorteil, daß es mit 69% eine mittlere Häufigkeitsverteilung hat. So ist die Wahrscheinlichkeit, ein ungleiches Spender-/Empfängerpaar zu finden, bei ihm höher, als bei Minorantigenen mit sehr hoher, bzw. sehr geringer Phänotypfrequenz, wie gerade HA-2 mit 95% (de Buerger et al., 1992), oder z.B. HA-4 mit 16% oder HA-5 mit 7%, (Goulmy et al., 1996 ; Schreuder et al., 1993).

Obwohl die Zahl der Minorantigene sehr hoch ist, gibt es wahrscheinlich wenige immunodominante mHags, die Immunreaktionen auslösen können. HA-1 ist eines dieser immunodominanten Minorantigene. Diese Immundominanz ist die Voraussetzung, überhaupt CTL induzieren zu können, (Goulmy et al., 1996).

5.3.4. Mögliche Probleme bei der Immuntherapie mit HA-1-spezifischen CTL

Obwohl HA-1 nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (de Buerger et al., 1992 usw. s.o. Abschnitt 5.3.2.), gibt es eine deutliche Korrelation zwischen HA-1-negativen Spendern und HA-1-positiven Empfängern und der Entwicklung einer GvHD Grad II oder höher nach Knochenmarktransplantation bei Erwachsenen, jedoch nicht bei Kindern. Auch in neuesten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß es bei HA-1-Mismatch zu Reaktionen auf der Haut und im Darm kommt, es aber keine Korrelation bezüglich HA-1-Ungleichheit und Reaktionen der Leber gibt, (Tseng et al., 1999). Dies scheint zunächst der gewebespezifischen HA-1 Expression zu widersprechen.

Goulmy erklärt diese Problematik so, daß HA-1 zwar nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, dendritische Zellen und Langerhanssche Zellen der Haut aber auch aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entstehen, und so peripher HA-1 exprimieren können. DC können sich als antigenpräsentierende Zellen im Darm aufhalten und hämatopoetische Stammzellen besitzen die Fähigkeit in Gewebe einzuwandern, (van Lochem et al., 1996). So kann man sich gut erklären, wieso es trotz der Gewebespezifität zu einer Immunreaktion in der Haut und im Darm kommen kann. Da die Aufgabe der DC außerdem gerade das Präsentieren von Antigenen und das Induzieren einer Immunantwort ist, verstärkt dies die Reaktionen, (Goulmy et al., 1996).

Bei Kindern scheint es keine Korrelation zwischen der HA-1-Ungleichheit und der Entwicklung von GvHD zu geben, (Goulmy et al., 1996). Allerdings wurden bei der Arbeit von Goulmy et al. nur fünf Kinder mit HA-1-Mismatch untersucht, von denen jedoch nur zwei eine GvHD entwickelten.

Es ist allgemein der Fall, daß Kinder ein viel geringeres Risiko haben, eine GvHD zu entwickeln. Man kennt bis heute noch nicht den genauen Grund für das geringere GvHD Risiko, aber man nimmt an, daß der Körper im Laufe des Lebens durch Infektionen immer mehr Antigene „kennenernt“ und so die Wahrscheinlichkeit steigt, daß ein neues Peptid eine ähnliche

Oberflächenstruktur hat, wie ein bereits bekanntes und es so schneller zur Kreuzreaktion kommt.

Man könnte also, wenn auch mit Vorsicht, annehmen, daß eine Immuntherapie bei Kindern einfacher durchzuführen wäre.

Die Zahl der Minorantigene ist sehr hoch und es wurden erst wenige identifiziert. In Mäusen wurden bisher mehr als 50 Minorantigene beschrieben, (Marijt et al., 1993a). Ursprünglich war die Idee, daß durch die Identifizierung der Minorantigene die Möglichkeit besteht, das Risiko einer GvHD nach KMT zu minimieren, indem man nicht nur HLA-identisch, sondern auch mHag-ident transplantiert. Erst nach und nach wurde die Möglichkeit der Immuntherapie gesehen, (Goulmy, 1997).

Aber selbst wenn alle Minorantigene identifiziert werden, wird es sehr schwierig, wenn nicht gar unmöglich, Spender zu finden, die bezüglich ihrer Minorantigene ident sind. Wenn man dann noch einen einzigen Minorantigen-Mismatch für die Immuntherapie benötigt, wird es noch komplizierter. Das Problem der GvHD durch Minorantigen-Mismatch wird also vorerst weiterhin bestehen, (Goulmy et al., 1996).

5.3.5. Zukunftsprognose

Nach unseren Untersuchungen und den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Mutis et al., 1999a) könnten HA-1H-spezifische CTL HA-1-negativer Spender immuntherapeutisch zur Lyse HA-1H-positiver residueller Blasten nach KMT infundiert werden, um Rezidive HA-1-positiver Leukämiepatienten (HA-1^{H/H}) zu verhindern. Um die GvHD Problematik zu vermeiden, sollte der CTL-Transfer allerdings mit Vorsicht durchgeführt werden. Mutis et al. propagieren aus diesem Grunde einen Transfer der CTL nicht vor Tag 50–60 nach KMT, da nach diesem Zeitraum der Interleukinspiegel im Blut des Empfängers sich wieder einigermaßen normalisiert und ein Teil der hämatopoetischen Zellen in der Peripherie der Empfänger durch die HA-1-negativen Spenderzellen ersetzt

sind. Das Risiko einer GvHD, die durch andere Minorantigen-Unterschiede von Spender und Empfänger induziert werden kann, besteht natürlich nach wie vor. Aber die HA-1-spezifischen zytotoxischen T-Zellen, die mit einer DLI zugeführt werden könnten, würden explizit hämatopoetische Zellen angreifen.

Zum einen könnte man nun also, wie wir es gemacht haben, in vitro CTL induzieren.

Um die Problematik zu umgehen, daß die CTL während der Restimulierungsphase aus verschiedenen Gründen zugrunde gehen, wäre es sicherer, die Spender direkt mit den synthetisch hergestellten Peptid zu immunisieren und so in vivo CTL zu induzieren. So hätte man zu jeder Zeit die Möglichkeit, nach Peptidstimulation erneut CTL zu isolieren. Allerdings wird die Stärke der Immunantwort mit der Zeit immer schwächer werden. Die Bestimmung der Quantität und die Isolation der in vivo und in vitro induzierten CTL könnten mit tetrameren HLA-Peptid Komplexen durchgeführt werden, (Mutis et al., 1999b). So könnte man sichergehen, absolut peptidspezifische CTL in den DLI zu verabreichen.

Bei der in vivo Induktion wäre es zum einen möglich die Spender vor SZT mit dem Antigen zu immunisieren, wobei hierbei nach Transplantation beim Empfänger das erhöhte Risiko der GvHD zum Problem werden könnte. Um dies zu vermeiden, könnte man dem Donor erst nach Stammzellspende das Peptid injizieren und nach einiger Zeit mittels tetrameren HLA-Komplexen die spezifischen Lymphozyten aus dem Blut isolieren und dem Empfänger die Donor-Lymphozyten-Infusion erst an Tag 50 nach Transplantation geben.

Mutis et al. (1999a) haben gezeigt, daß für eine Immuntherapie ausreichende Mengen an zytotoxischen T-Zellen mit einer Ausgangszahl von 5×10^7 Spenderzellen kultiviert werden können. Nach 5 Wochen könnten so 10^9 HA-1 spezifische CTL erhalten werden. Wir hatten pro Peptid $1,5 \cdot 10^6$ DC und $9 \cdot 10^5$ PBL eingesetzt und durchschnittlich 10^7 CTL erhalten. Wir sind der Ansicht, daß es für die Immuntherapie ausreicht, etwa 10^7 spezifisch induzierte CTL zu verabreichen. In anderen Leukämieprotokollen wurden DLI mit $2,5 \cdot 10^5$ T-Zellen/kg Körpergewicht infundiert.

Die Zytotoxizität der T-Zellen kann nach Angaben von Mutis et al. (1999a) erheblich gesteigert werden, indem man leukämische Zellen mit IFN- γ und TNF- α behandelt, da hierbei die HLA-Klasse I Antigene hochreguliert werden. Mutis et al. nehmen weiterhin an, daß diese Zytokinproduktion in vivo bei den HA-1-spezifischen CTL ebenfalls besteht.

Neben der Gabe von DLI wäre es auch möglich, Patienten nach KMT direkt mit dem Peptid zu immunisieren. Hier sehen wir eine vielversprechende Therapieperspektive in der Möglichkeit, Patienten etwa ab Tag 50 nach KMT eines HA-1-negativen Spenders mit Peptid HA-1H-beladenen DC zu impfen. Man würde in vivo HA-1H-spezifische CTL induzieren und bräuchte keinen Transfer der CTL. Es ist anzunehmen, daß eine Impfung mit DC, die mit einem Peptid beladen sind, eine stärkere Immunantwort auslöst als das Peptid alleine und somit eine größere Zahl an CTL induziert wird.

Impfungen mit DC konnten bereits erfolgreich bei B-Zell Lymphomen, (Hsu et al., 1996; Bendandi et al., 1999) Melanomen, (Nestle et al., 1998; Thurner et al., 1999), Brustkrebs und Ovarialkrebs eingesetzt werden (Brossart et al., 2000) und erscheinen auch vielversprechend bei der Immuntherapie basierend auf den Minorantigenen.

Ziele für die Zukunft sind, weitere Minorantigene zu entschlüsseln, die nur auf hämatopoetischen Zellen, oder noch besser nur auf leukämischen Zellen exprimiert werden, wie z.B. das Minorantigen HB-1, das nur auf B-ALL Zellen exprimiert wird. HB-1 wird von HLA-B44 präsentiert, das allerdings nur 23% der kaukasischen Bevölkerung tragen, (Dolstra et al., 1999). Um möglichst viele Patienten behandeln zu können, wäre es natürlich besser, Antigene zu identifizieren, die von HLA-Antigenen präsentiert werden, die häufiger in der Bevölkerung vorkommen, wie z.B. HLA-A2.

Die adoptive Immuntherapie mit in vitro oder in vivo induzierten CTL könnte somit zu dem kurativen Potential einer allogenen Stammzelltransplantation bei malignen hämatologischen Erkrankungen beitragen.

6. Zusammenfassung

Ein großes Problem nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) ist das Risiko des Persistierens von residuellen Leukämiezellen im Knochenmark, der sog. „Minimal Residual Disease“ (MRD), und damit der Entwicklung eines Rezidivs. Ziel immuntherapeutischer Ansätze ist es, derartige MRD-Zellen nach allogener Transplantation spezifisch zu eliminieren, was bereits durch sog. „DLI“ mit Erfolg bei der CML angewendet wird.

Eine attraktive Zielstruktur für Immuntherapie stellen mHags dar, die nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, wie z.B. das mHag HA-1.

Da HA-1 von MHC-Klasse I restringierten CTL spezifisch erkannt wird, ist dieses Peptid ein interessanter Angriffspunkt für die Entwicklung einer spezifischen Immuntherapie gegen Leukämie nach allogener SZT. Vor kurzem wurde die Peptidsequenz des HLA-A2 restringierten Minorantigens HA-1 (HA-1H) identifiziert. Es konnte gezeigt werden, daß sie sich nur in einer Aminosäuresequenz in Position 3 von der bereits bekannten AS-Sequenz KIAA0223 unterscheidet. Auf cDNA-Ebene hat der HA-1 Locus 2 Allele.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurden 64 HLA-A2 positive Personen bezüglich ihres HA-1 Genotyps mittels RT-PCR untersucht. 16% waren homozygote Träger des Minorantigens HA-1^H, 54% waren heterozygot mit HA-1^{H/R} und 30% waren HA-1 negativ mit HA-1^{R/R}.

Für die Induktion von zytotoxischen T-Zellen gegen HA-1 benötigten wir gesunde HA-1-negative Spender und HA-1-positive Leukämiepatienten.

Aus mononukleären Zellen der Spender wurden reife dendritische Zellen als APC hergestellt und mit den synthetisch hergestellten Peptiden HA-1H und HA-1R beladen und mit mononukleären Zellen inkubiert. Damit konnten sowohl HA-1H-, als auch HA-1R-spezifische CTL induziert werden. Im ⁵¹Cr-Release Assay lysierten HA-1H-spezifische CTL mit HA-1H-Peptiden beladene, aber auch von Natur aus HA-1-exprimierende Zellen, leukämische Blasten und sogar heterozygote Zellen mit HA-1^{H/R}. HA-1R-spezifische CTL hingegen konnten nur HA-1-negative Zellen lysieren, die mit dem Peptid HA-1R beladen waren. Kreuzreaktionen und Reaktionen gegen unspezifische Peptide wurden nicht beobachtet.

Die Resultate zeigen, daß möglicherweise HA-1H-spezifische CTL von HA-1-negativen Spendern im Sinne einer Immuntherapie bei HA-1-positiven und heterozygoten Leukämiepatienten nach allogener SZT zur Vermeidung von Rezidiven bei MRD infundiert werden können.

7. Literaturverzeichnis:

Bendandi M., Gocke C. D., Kobrin C. B., Benko F. A., Sternas L. A., Pennington R., Watson T. M., Reynolds C. W., Gause B. L., Duffey P. L., Jaffe E. S., Creekmore S. P., Longo D. L., Kwak L. W. (1999)

Complete molecular remission induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma.

Nat. Med., 5: 1171-1177

Brossart P., Grünebach F., Stuhler G., Reichardt V. L., Möhle R., Kanz L., Brugger W. (1998)

Generation of functional dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD 40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

Blood, 92: 4238-4247

Brossart P., Heinrich K. S., Stuhler G., Behnke L., Reichardt V. L., Stevanovic S., Muhm A., Rammensee H.-G., Kanz L., Brugger W. (1999a)

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., Spahlinger B., Grünebach F., Stuhler G., Reichardt V. L., Kanz L., Brugger W. (1999b)

Induction of minor histocompatibility antigen HA-1-specific cytotoxic T cells for the treatment of leukemia after allogeneic stem cell transplantation.

Blood, 94: 4374-4376

Brossart P., Wirths S., Stuhler G., Reichardt V. L., Kanz L., Brugger W. (2000)

Induction of cytotoxic T lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells.

Blood, 96:3102-3108

Chien A., Edgar D. B., Trela J.M. (1976)

Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*.

J. Bacteriol., 127: 1550-1557

De Buerger M., Bakker A., van Rood J. J., van der Woude F., Goulmy E. (1992)

Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens.

J. Immunol., 149: 1788-1794

Den Haan J. M. M., Sherman N. E., Blokland E., Huczko E., Koning F., Drijfhout J. W., Skipper J., Shabanowitz J., Hunt D. F., Engelhard V. H., Goulmy E. (1995)

Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen.

Science, 268: 1476-1480

Den Haan J. M. M., Meadows L. M., Wang W., Pool J., Blokland E., Bishop T. L., Reinhardus C., Shabanowitz J., Offringa R., Hunt D. F., Engelhard V. H., Goulmy E. (1998)

The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism.

Science, 279: 1054-1057

Dolstra H., Fredrix H., Preijers F., Goulmy E., Figdor C. G., de Witte T. M., van de Wiel-van Kemenade E. (1997)

Recognition of a B cell leukemia-associated minor histocompatibility antigen by CTL.

J. Immunol., 158: 560

Dolstra H., Fredrix H., Maas F., Coulie P. G., Brasseur F., Mensink E., Adema G. J., de Witte T. M., Figdor C. G., van de Wiel-van Kemenade E. (1999)

A human minor histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic leukemia.

J. Exp. Med., 189: 301-308

Faber L. M., van der Hoeven J., Goulmy E., Hooftman-den Otter A. L., van Luxemburg-Heijs S. A. P., Willemze R., Falkenburg J. H. F. (1995)

Recognition of clonogenic leukemic cells, remission bone marrow and HLA-identical donor bone marrow by CD8+ or CD4+ minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.

J. Clin. Invest., 96: 877-883

Falkenburg J. H. F., Goselink H. M., van der Harst D., van Luxemburg-Heijs S. A., Kooy-Winkelaar Y. M., Faber L. M., de Kroon J., Brand A., Fibbe W. E., Willemze R., Goulmy E. (1991)

Growth inhibition of clonogenic leukemic precursor cells by minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.

J. Exp. Med., 174:27

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

Clinical observations, interventions and clinical trials: Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia reactive cytotoxic T lymphocytes.

Blood, 94: 1201-1208

Goulmy E., Pool J., van den Elsen P. J. (1995)

Interindividual conservation of T cell receptor β chain variable regions by minor histocompatibility antigen-specific HLA-A*0201-restricted cytotoxic T cell clones.
Blood, 85: 2478-2481

Goulmy E., Schipper R., Pool J., Blokland E., Falkenburg J. H. F., Vossen J., Gratwohl 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. England J. Med., 334: 281-285

Gubarev M. I., Jenkin J. C., Leppert M. F., Buchanan G. S., Otterud B. E., Guilbert D. A., Beatty P. G. (1996)

Localization to chromosome 22 of a Gene encoding a human minor histocompatibility antigen.
J. Immunol. , 157: 5448-5454

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

Imanishi T., Akaza T., Kimura A., Tokunaga K., Gojobari T. (1992)

Alleles and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups.
Oxford Science: 1065

Kaledin A. S., Sliusarenko A. G., Gorodetskii S. I. (1980)

[Isolation and properties of DNA polymerase from extreme thermophilic bacteria *Thermophilus aquaticus* YT-1].
Biokhimiia., 45: 644-651

Katagiri S., Yonezawa T., Kuyama J., Kanayama Y., Nishida K., Abe T., Tamaki T., Ohnishi M., Tarui S. (1985)

Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma.
Int. J. Cancer, 36: 241-246

Koeffler H.P., Golde D.W. (1978)

Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity.
Science, 200: 1153-1154

Linz U., Delling U., Rübsamen-Waigmann H. (1990)

Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chain reaction.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 28: 5-13

Marijt E. A. F., Veenhof W. F. J., Goulmy E., Kluck P. M. C., Brand A., Willemze R., van Rood J. J., Falkenburg J. H. F. (1993)

Multiple minor histocompatibility antigen disparities between a recipient and four HLA-identical potential sibling donors for bone marrow transplantation.

Hum. Immunol., 37: 221-228

Marijt W. A. F., Veenhof W. F. J., Goulmy E., Willemze R., van Rood J. J., Falkenburg J. H. F. (1993)

Minor histocompatibility antigens HA-1-, -2-, and -4-, and HY-specific cytotoxic T cell clones inhibits human hematopoietic progenitor cell growth by a mechanism that is dependent on direct cell-cell contact.

Blood, 82: 3778-3785

Martin P. J., Hansen J. A., Torok-Storb B., Durnam D., Przepiorka D., O'Quigley D., Sanders J., Sullivan K. M., Witherspoon R. P., Deeg H. J., Appelbaum P., Steward P., Weiden P., Doney K., Buckner C. D., Clift R., Storb R. (1988)

Effects of in vivo depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts.

Bone Marrow Transplant., 3: 445

Martin P. J. (1991)

Increased disparity for minor histocompatibility antigens as a potential cause of increased GVHD risk in marrow transplantation from unrelated donor compared with related donors.

Bone Marrow Transplant., 8: 217

Martin P. J. (1997)

Perspective: How much benefit can be expected from matching for minor antigens in allogeneic marrow transplantation?

Bone Marrow Transplant., 20: 97-100

Mutis T., Verdijk R., Schrama E., Esendam E., Brand A., Goulmy E. (1999a)

Neoplasia: Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens.

Blood, 93: 2336-2341

Mutis T., Gillespie G., Schrama E., Falkenburg J. H., Moss P., Goulmy E. (1999b)

Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease.

Nat. Med., 5: 839-842

Nestle F. O., Alijagic S., Gilliet M., Sun M., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D. (1998)

Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells.

Nat. Med., 4: 328-332

Niederwieser D., Grassegger A., Aubock J., Herold M., Nachbaur D., Rosenmayr A., Gachter A., Nussbaumer W., Gaggl S., Ritter M., Huber C. (1993)

Correlation of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes with graft-versus-host disease status and analyses of tissue distribution of their target antigens.

Blood, 81: 2200

Nilsson K., Bennich H., Johansson S.G., Penten J. (1970)

Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient.

Clin. Exp. Immunol., 7: 477-489

Ogg G. S. and McMichael A. M. (1998)

HLA-peptide tetrameric complexes.

Curr. Opin. Immunol., 10 : 393-396

Ostankovitch M., Buzyn A., Bonhomme D., Connan F., Bouscary D., Heshmati F., Dreyfus F., Choppin J., Guillet J.-G. (1998)

Rapid Communication: Antileukemic HLA-restricted T cell clones generated with naturally processed peptides eluted from acute myeloblastic leukemia blasts.

Blood, 92: 19-24

Randolph G. J., Beaulieu S., Lebecque S., Steinman R. M., Muller W. A. (1998)

Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking.

Science, 282: 480-483

& Shortman K., Maraskovsky E.: Developmental Options, 424-425

Rufer N., Starobinski M., Chapuis B., Gratwohl A., Jeannet M., Helg C., Roosnek E. (1998)

Clinical consequences of sensitisation to minor histocompatibility antigens before allogeneic bone marrow transplantation.

Bone Marrow Transplant., 22: 895-898

Saiki R.K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science, 239: 487-491

Schreuder G. M. T., Pool J., Blokland E., van Els C., Bakker A., van Rood J. J., Goulmy E. (1993)

A genetic analysis of human minor histocompatibility antigens demonstrates Mendelian segregation independent of HLA.

Immunogenetics, 38: 98-105

Syvanen A. C., Bengtstrom M., Tenhunen J., Soderlund H. (1988)

Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection.

Nucleic. Acids. Res., 16: 11327-11338

Steinman R. M. (1991)

The dendritic cell system and its role in immunogenicity.

Annu. Rev. Immunol., 9: 271

Steinman R. M., Witmer-Pack M., Inaba K. (1993)

Dendritic cells: Antigen presentation, accessory function and clinical relevance.

Adv. Exp. Med. Biol., 329: 1

Thurner B., Haendle I., Roder C., Dieckmann D., Keikavoussi P., Jonuleit H., Bender A., Maczek C., Schreiner D., van den Driesch P., Brocker E. B., Steinman R. M., Enk A., Kampgen E., Schuler G. (1999)

Vaccination with MAGE-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and includes regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.

J. Exp. Med., 190: 1669-1678

Timmerman J. M., Levy R. (1999)

Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy.

Annu. Rev. Med., 50: 507-529

Tseng L. H., Lin M. T., Hansen J. A., Gooley T., Pei J., Smith A.G., Martin E. G., Petersdorf E. W., Martin P. J. (1999)

Correlation between disparity of the minor antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation.

Blood, 94: 2911-2914

van der Harst D., Goulmy E., Falkenburg J. H. F., Kooij-Winkelaar Y. M. C., van Luxemburg-Heijs S. A. P, Goselink H. M., Brand A. (1994)

Recognition of minor histocompatibility antigens on lymphocytic and myeloid leukemic cells by cytotoxic T cell clones.

Blood, 83: 1060-1066

van Els C. A., D`Amaro J., Pool J., Blokland E., Bakker A., van Elsen P. J., van Rood J. J., Goulmy E. (1992)

Immunogenetics of minor histocompatibility antigens: their polymorphism and immunodominance.

Immunogenetics, 35: 161

van Lochem E., van der Keur M., Mommaas A. M., de Gast G. C., Goulmy E. (1996)

Functional expression of minor histocompatibility antigens on human peripheral blood dendritic cells and epidermal Langerhans cells.

Transpl. Immunol., 4: 151-157

Warren E. H., Greenberg P. D., Riddell S. R. (1998)

Cytotoxic T lymphocyte-defined human minor histocompatibility antigens with a restricted tissue distribution.

Blood, 91: 2197-2207

Wilke M., Pool J., den Haan J. M. M., Goulmy E. (1998)

Rapid publication: Genomic identification of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus by allele-specific PCR.

Tissue Antigens, 52: 312-317

8. Danksagungen:

Professor Dr. Wolfram Brugger für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit.
Privatdozent Dr. Peter Brossart und Dr. Frank Grünebach für ihre hervorragende Betreuung und Hilfe bei meiner Arbeit.
Außerdem Stefanie Marek, Stefanie Kurz, Yvonne Hoffmann und Dipl. Biol. Dipl. Ing. Anke Zobywalski für das Einarbeiten, die Hilfe und die Geduld bei der Einführung in die Methoden,
Frau Antje Petz und ihren Mitarbeitern für ihre Unterstützung bei der Suche nach HLA-Typisierungs-Daten,
Dr. Dorothee Wernet und Frau Lisner für die Organisation von Spenderblut,
Dr. Martina Wilke für Ihre großartige Kooperation und die Sendung von Kontrollzelllinien,
den Mitarbeitern des FACS-Labors für die Überlassung von Zellen,
Dr. Christoph Faul für die Möglichkeit der Einsicht in Transplantationsakten.
Bei allen Mitarbeitern der Abteilung Hämatologie, Onkologie und Rheumatologie der medizinischen Universitätsklinik Tübingen für ihre gute Zusammenarbeit und Antworten auf meine vielen Fragen
Des weiteren geht mein besonderer Dank an Alexander Heinzmann, ohne dessen regelmäßige "Blutspenden" meine Arbeit nicht in diesem Zeitraum möglich gewesen wäre
und natürlich meinen Eltern die mir meine Ausbildung ermöglichen und beratend beistehen.
Zum Schluß noch vielen Dank an alle, die sich durch mein Manuskript gearbeitet und mich beim Schreiben beraten haben.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name:	Spahlinger
Vorname:	Brigitte
Geburtsdatum:	10.05.1977
Geburtsort:	Bietigheim-Bissingen
Eltern:	Dr. med. Berthold Spahlinger Doris Spahlinger, geb. Mattes

Bildungsweg:

1983 - 1987	Kirbach Grund- und Hauptschule in Sachsenheim-Hohenhaslach
1987 - 1996	Gymnasium II im Ellental in Bietigheim-Bissingen
1989	Wahl des naturwissenschaftlichen Zweiges
1994	Wahl der Leistungskurse Mathematik und Chemie
1996	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

1996	Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
08.1998	Ärztliche Vorprüfung
08.1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
14.05.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Hospitationen und Famulaturen:

08.1997	Hanusch Krankenhaus in Wien, Rheumatologie, Osteologie, Geriatrie und Lungendepartment
03.1999	Universitätsklinikum Tübingen, Medizinische Klinik, Abt. II, Hämatologie, Onkologie, Immunologie und Rheumatologie
08.1999	Universitätsklinikum Tübingen, Neurologische Klinik
02.2000	nochmals Medizinische Klinik, Abt. II, Tübingen
08.2000	Praxisfamulatur, Allgemeinmedizin Dr. Spahlinger, Sachsenheim
03.2001	Enzkreis-Kliniken Mühlacker, Gynäkologie und Geburtshilfe