

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

**Analyse des BCR-ABL-Proteins
als Antigen zur
Induktion von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen**

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Valbona Mirakaj
aus
Djakovica

2007

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Garbe

Publikation der Arbeit:

(Titel der Originalarbeit: BCR-ABL is not an immunodominant antigen in CML

Cancer Research 2006; 66: (11), June 1

Meinem lieben Vater Zef Mirakaj gewidmet

„A vision without action is just a dream.

Action without vision is just a waste of time.

A vision with action is able to change the world!”

Nelson Mandela

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	11
1 Einleitung.....	12
1.1 Leukämien.....	12
1.2 Chronisch myeloische Leukämie.....	13
1.3 Studienziel	16
2 Immunologische Grundlagen.....	17
2.1 Übersicht.....	17
2.2 Angeborene Immunität	18
2.3 Adaptive Immunität	21
2.3.1 T-Lymphozyten	21
2.3.2 B-Lymphozyten	24
2.4 Dendritische Zellen	26
3 Material und Methodik	30
3.1 Verwendete Materialien und Geräte.....	30
3.1.1 Geräte	30
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	31
3.1.3 Reagenzien.....	33
3.2 Tumorzelllinien	37
3.3 Herstellung von dendritischen Zellen aus adhärenenten peripheren Blut-Monozyten	37
3.4 Anreicherung von CD34 ⁺ -Zellen.....	40
3.5 RNA-Isolation.....	40
3.6 Synthetische Peptide	41
3.7 Herstellung der bcr-abl-, MUC1- und EGFP-in-vitro-Transkript (IVT)	41
3.8 RNA-Elektroporation von dendritischen Zellen.....	42

3.9	Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten mit RNA-transfizierte dendritische Zellen.....	43
3.10	Standard ⁵¹ Cr-Release-Assay (CTL-Assay).....	44
3.11	IFN-γ-Elispot-Assay	45
4	Ergebnisse	49
4.1	Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten durch mit Ph ⁺ -K-562-Gesamtumor-RNA transfizierte dendritische Zellen	49
4.2	<i>In vitro</i> Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten durch mit RNA aus Ph ⁺ -CML-Blasten elektroporierte dendritische Zellen.....	53
4.3	<i>In vitro</i> Induktion von <i>BCR-ABL</i> -spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten durch mit reinem <i>bcr-abl</i> -IVT transfizierte dendritische Zellen	56
4.4	<i>In vitro</i> Stimulation von T-Lymphozyten durch Ph ⁺ -CML-RNA-transfizierte dendritische Zellen	59
5	Diskussion	61
6	Zusammenfassung	67
7	Literaturverzeichnis	69
8	Danksagung.....	78
9	Lebenslauf	79

Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
C	Kapazität (μF)
CD	Cluster of differentiation oder cluster determinants
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
CTL	Cytotoxic T lymphocytes (zytotoxische T-Lymphozyten)
DC	dendritic cells (dendritische Zellen)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Flourescence Activated Cell Sorter (Durchflußzytometrie)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
GCS-F	Granulozyten-Kolonien-Stimulationsfaktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-Stimulationsfaktor
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HPLC	high performance liquid chromatographie
HTLV	human T-cell leucemia virus
IL-1 β	Interleukin-1 β
INF- α	Interferon α
INF- γ	Interferon γ

IVT	<i>in vitro</i> transkript (<i>in vitro</i> Transkript)
Kda	Kilodalton
KMT	Knochenmarkstransplantation
MCM	Monocyte conditioned medium
mHag	Minorhistokompatibilitätskomplex
LPS	Lipopolysaccharid
MHC I	Majorhistokompatibilitätskomplex Klasse I
MHC II	Majorhistokompatibilitätskomplex Klasse II
min	Minuten
MNC	Mononuclear cells (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
NO	Stickstoffmonoxid
PBMNC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymereasekettenreaktion)
Ph	Philadelphia Chromosom
PR 3	Proteinase 3
R	Widerstand (Ω)
RNA	Ribonukleinsäure
SCF	Stem cell factor (Stammzellfaktor)
sec	Sekunden
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
U	Spannung (Volt)
Upm	Umdrehungen pro Minute

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Philadelphia-Chromosom als charakteristisches Merkmal der CML	13
Abb. 2.1:	Dendritische Zellen	25
Abb. 2.2:	Interaktion zwischen den dendritischen Zellen und den T-Lymphozyten über 3 charakteristische Signalwege	27
Abb. 2.3:	Schematischer Überblick über den Studienablauf	38
Abb. 2.4:	Karte des Vektors pCMV-Script-p210-poly(A)	41
Abb. 2.5:	Schematische Übersicht über den Ablauf eines IFN- γ Elispot-Assays zur Quantifizierung der Zytokinsekretion von T-Lymphozyten	46
Abb. 3.1.A:	Induktion antigenspezifischer CTL durch DC, die mit K-562-RNA elektroporiert wurden	49
Abb. 3.1.B:	Induktion antigenspezifischer CTL durch DC nach Transfektion mit differenter Leukämieblasten-RNA	50
Abb. 3.1.C:	Induktion antigenspezifischer CTL durch DC nach Transfektion mit normaler Knochenmarksstammzellen-CD34 ⁺ -RNA	51
Abb. 3.2.A:	Interaktion antigenspezifischer CTL durch DC, die mit Gesamt-RNA aus Ph ⁺ -CML-Blasten elektroporiert wurden	52
Abb. 3.2.B:	Induktion antigenspezifischer CTL durch DC, die mit reinem <i>bcr-abl</i> -IVT transfiziert wurden	53
Abb. 3.2.C:	Induktion antigenspezifischer CTL durch DC nach Transfektion mit <i>BCR-ABL</i> -bindendem Peptid	54
Abb. 3.3.A:	Induktion <i>BCR-ABL</i> -spezifischer CTLs durch DCs, die mit reinem <i>bcr-abl</i> -IVT elektroporiert wurden	56
Abb. 3.3.B:	Induktion <i>BCR-ABL</i> -spezifischer CTLs durch DCs, die mit reinem <i>bcr-abl</i> -IVT elektroporiert wurden	57
Abb. 3.4:	<i>In vitro</i> Induktion von IFN- γ -sezernierende T-Lymphozyten durch Ph ⁺ -CML-RNA-transfizierte dendritische Zellen	59

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht der verschiedenen Immunantworten	17
Tab. 3.1.1:	Geräte	29
Tab. 3.1.2:	Verbrauchsmaterialien	30
Tab. 3.1.2.1:	Reagenzien	32
Tab. 3.1.2.2:	Antikörper	32
Tab. 3.1.2.3:	Chemikalien	32
Tab. 3.1.2.4:	Kits	33
Tab. 3.1.2.5:	Medien und Antibiotika	33
Tab. 3.1.2.6:	Puffer und Lösungen	34
Tab. 3.1.2.7:	Peptide	34
Tab. 3.1.2.8:	Plasmide	35
Tab. 3.1.2.9:	Tumorzelllinien	36

1 Einleitung

1.1 Leukämien

Leukämien stellen diffuse autonome maligne Proliferationen einer spezifischen Leukozytenpopulation dar. Die Expansion eines malignen Zellklons führt primär zu einer generalisierten Infiltration des hämatopoetischen Knochenmarks, aus der leukämische Zellen in die Blutbahn ausgeschwemmt und extramedulläre Organe infiltriert werden können.

Die typische Klinik mit allgemeiner Schwäche, Infektanfälligkeit und Blutungen resultiert aus der progredienten Knochenmarkinsuffizienz durch Verdrängung der normalen Hämatopoese mit Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie sowie der Funktionsuntüchtigkeit der leukämischen Zellen durch ihre fehlende Ausdifferenzierung bzw. durch Interferenz mit der spezifischen Immunabwehr des B- und T-Zellsystems.

Nach der Herkunft des malignen Zellklons wird zwischen lymphatischen oder myeloischen Leukämien unterschieden, nach dem Krankheitsverlauf zwischen akuten Leukämien (akute lymphatische Leukämie (ALL), akute myeloische Leukämie (AML)) und chronischen Leukämien (chronische lymphatische Leukämie (CLL), chronische myeloische Leukämie (CML)). Hierbei wird die CLL zu den Non-Hodgkin-Lymphomen, die CML zu den myeloproliferativen Syndromen gerechnet.

Die Ätiologie der Leukämien ist unbekannt. Als auslösende Faktoren gelten jedoch virale Infektionen (HTLV-1), diffuse Knochenmarkschädigungen durch chemische Agenzien (Benzol, Zytostatika) oder ionisierende Strahlung sowie genetische Faktoren.

Die Behandlung der Leukämien erfolgt bisher zumeist primär chemotherapeutisch, alternativ oder zusätzlich mittels autologer oder allogener Stammzelltransplantation. Für

die Therapie der CML steht mittlerweile auch der spezifische Tyrosinkinase-Inhibitor (Imatinib - Glivec[®], Novartis Pharma) zur Verfügung, dessen klinische Einführung 2001 als das erste Medikament gegen eine Krebserkrankung durch spezifische Enzyminhibition eine neue Ära der Behandlung hämatologischer und onkologischer Erkrankungen einleitete. Weitere immuntherapeutische Ansätze sind Gegenstand aktueller Forschungsaktivitäten, zu denen diese Arbeit einen Beitrag liefern soll (27, 29).

1.2 Chronisch myeloische Leukämie

Der chronisch myeloischen Leukämie (CML) als eine Unterform der myeloproliferativen Erkrankungen liegt eine maligne Entartung der pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks zugrunde. Sie ist durch eine exzessive Produktion noch funktionstüchtiger Granulozyten gekennzeichnet und zeigt einen meist längeren dreiphasigen Krankheitsverlauf mit chronisch stabiler Phase, Akzelerationsphase und schließlich dem Blastenschub, der Ähnlichkeiten zu akuten Leukämien aufweist (40).

Charakteristisches zytogenetisches Merkmal der CML ist bei nahezu 90% der Patienten das Vorhandensein eines Philadelphia-Chromosoms (Ph), das als eine spezifische chromosomale Veränderung der leukämischen Zellen erstmals 1960 beschrieben und nach dem Ort der Entdeckung benannt wurde (36). Das Ph ist ein verkürztes Chromosom 22, das durch eine reziproke Translokation zwischen den langen Armen der Chromosome 9 und 22 ($t(9;22)(q34;q11)$) entstanden ist (36). Diese Translokation des zellulären Onkogens c-abl von Chromosom 9 in die Bruchpunktregion („breakpoint cluster region“) des Chromosoms 22 verschmilzt einen Teil des bcr-Gens mit bisher unbekannter Funktion mit einem Teil des abl-Gens, das als Genprodukt eine Protein-Thyrosin-Kinase codiert.

Dieses translokatorisch neu entstandene bcr-abl-Onkogen erzeugt ein chimäres 210 kDa Protein (p210) mit konstitutiver ABL-Kinase-Aktivität (3,16,18,30).

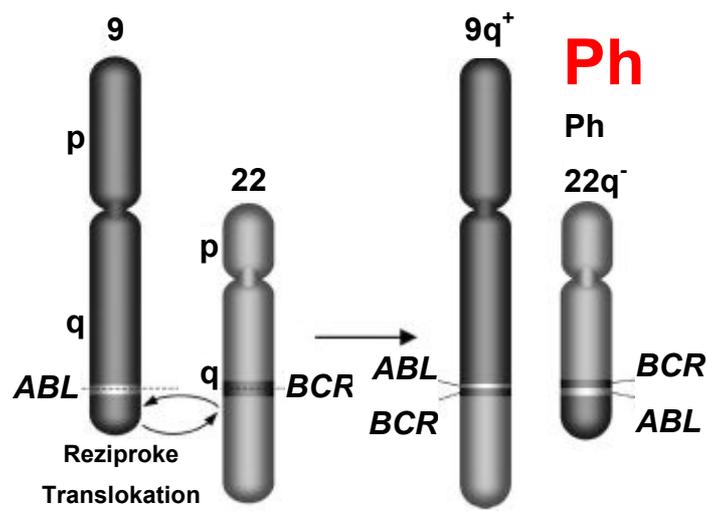


Abbildung 1.1: Philadelphia-Chromosom als charakteristisches Merkmal der CML
 Das Philadelphia Chromosom ist ein verkürztes Chromosom 22, entstanden durch die reziproke Translokation zwischen den langen Armen der Chromosome 9 und 22 (t(9;22) (q34;q11)) mit Verschmelzung eines Teil des bcr-Gens mit einem Teil des abl-Gens.
 (Quelle: http://freenet.meome.de/app/fn/artcont_portal_news_article.jsp?catId=84849)

Die Konkordanz zwischen der klinischen Entität CML und der Detektion der deregulierten Tyrosinkinase legt nahe, dass diese bcr-abl Translokation das ätiologische Ereignis bei der Entstehung der CML darstellt (2,28). Daher ist dieses tumorspezifische, bei gesunden Individuen nicht vorkommende und nur in malignen Zellen exprimierte BCR-ABL-Protein mittlerweile ein bevorzugtes Objekt bei der Entwicklung neuerer therapeutischer Strategien für die CML. Dies führte bereits zur erfolgreichen klinischen Anwendung von

STI 571 (Imatinib - Glivec[®], Novartis Pharma), einem selektiven kompetitiven Inhibitor der ABL-Tyrosinkinase (41), der das natürliche Substrat ATP aus der Bindungstasche der Tyrosinkinase BCR-ABL verdrängt. Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch Glivec[®] das Wachstum von CML-Zelllinien und Ph⁺-Kolonien selektiv unterdrückt wird (20,21,22) und nach erfolgter Zulassung durch die FDA 2001 wurde hiermit eine neue Ära der Behandlung hämatologischer und onkologischer Erkrankungen eingeleitet.

In diversen neueren Studien konnte gezeigt werden, dass das BCR-ABL-Protein als ein tumorspezifisches Antigen fungiert und *in vitro* oder *in vivo* induzierte T-Zellen dieses Neo-Antigen oder davon abgeleitete Proteine in CML-Zellen, die das BCR-ABL-Protein exprimieren, erkennen können. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden klinische Vakzinierungsstudien durchgeführt, mit dem Ziel CML-spezifische T-Zellen zur Elimination maligner Zellen einzusetzen. In der Mehrzahl dieser Studien wurden dendritische Zellen, die als die potentesten antigenpräsentierenden Zellen die Fähigkeit zur Induktion und Unterhaltung einer primären Immunantwort besitzen, verwendet (1,7,8,11, 14,37,39,50). Diese dendritischen Zellen wurden aus Ph⁺-Zellen hergestellt, die BCR-ABL exprimierten und beinhalteten die gesamte antigene Information der malignen Zellen. Bcr-abl-spezifische T-Zell-Antworten wurden jedoch seltener nachgewiesen, was darauf hinweist, dass die Antigenität von bcr-abl gering ist. Es zeigten sich Übereinstimmungen mit diesen Beobachtungen bei CML-Patienten, die mit Interferon γ (IFN- γ) behandelt wurden. Ebenso wurde erkannt, dass antigenspezifische zytotoxische T-Lymphozyten, welche überexprimierte Antigene wie die Proteinase 3 (PR3) erkennen, einen Beitrag zur Eliminierung maligner Zellen leisten (15,48).

1.3 Studienziel

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, welche Rolle das BCR-ABL-Fusionsprotein bei der Induktion antigenspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten spielt. Dabei sollte die Rolle des BCR-ABL-Fusionsproteins als tumorspezifisches Antigen analysiert werden, mit dem Ziel, CML-spezifische T-Zellen zu induzieren, die in der Lage sind, die malignen Zellen zu eliminieren.

2 Immunologische Grundlagen

2.1 Übersicht

Wie alle lebenden Organismen steht der Mensch in einer kontinuierlichen Interaktion mit seiner Umgebung, die zum Teil einen Angriff auf seine Homöostase und Integrität darstellt. Bedrohungen aus der Umwelt sind vor allem Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze) ebenso wie ein- oder mehrzellige Organismen (Plasmodien, Parasiten, Würmer) oder auch körperfremde infektiöse Proteine (Prionen). Eine weitere große Bedrohung stellen Veränderungen im eigenen Organismus dar, die im Sinne von autonomen Leben als Tumorzellen zwar ursprünglich aus normalen Körperzellen entstanden sind, im Laufe ihrer Entwicklung jedoch ihre normale Funktion und vor allem ihre Wachstumsregulation auf Kosten des Wirtsorganismus verloren haben.

Zur Auseinandersetzung mit diesen Bedrohungen steht dem Mensch ein hochwirksames Immunsystem zur Verfügung, das als Netzwerk aus einem unspezifischen angeborenen und einem spezifischen adaptiven System die Hauptaufgaben der Fremd-Eigen-Differenzierung und der jeweiligen Verteidigung erfüllt. Beteiligt sind an diesen Aufgaben mehrere Zelllinien und humorale Systeme (Tabelle 1).

	Unspezifische Abwehr	Spezifische Abwehr
Zelluläre Immunität	Neutrophile Granulozyten Monozyten Makrophagen Dendritische Zellen Natürliche Killerzellen (NK) Epithelzellen	T-Lymphozyten B-Lymphozyten Plasmazellen
	Unspezifische Abwehr	Spezifische Abwehr
Humorale Immunität	Lysozyme Komplementsystem (C1 – C9) Interferone (INF α , β , γ) Interleukine Kolonie-stimulierende Faktoren Tumornekrosefaktor	Antikörper (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD)

Tab. 1: Übersicht der verschiedenen Immunantworten

2.2 Angeborene Immunität

Das angeborene Immunsystem ist gekennzeichnet durch eine schnelle und unspezifische Reaktionsfähigkeit, die Infektionserreger ohne vorherigen Erregerkontakt bekämpfen kann und etwa 90% der Infektionsabwehr leistet. Die Immunantwort verläuft uniform und auch nach wiederholtem Kontakt mit dem Pathogen identisch.

Ein erster immunologischer Schutzmechanismus besteht an den äußeren Grenzflächen des Organismus durch verschiedenen physikalische, chemische und mikrobiologische Abwehrmechanismen, die gegen ein Eindringen von Fremdorganismen gerichtet sind. Beispiele sind die Epithelbarriere von Haut und Schleimhäuten, die Reinigung durch Schleimbildung und Abtransport über ein Flimmerepithel (Atemwege) oder durch Entleerung und Flüssigkeitsstrom in Harnwegen und Intestinum, die Mureinspaltung durch Lysozym (Muramida-

se) in Speichel/Tränenflüssigkeit, die pH-Wert-Charakteristik in Magen, Duodenum und Vagina sowie die physiologische Bakterienflora im Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt.

Auf zellulärer Ebene wirkt das angeborene Immunsystems über Granulozyten, Monozyten, Gewebsmakrophagen, dendritische Zellen, Epithelzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese Zellen erkennen bestimmte Strukturmerkmale von Angreifern, wie beispielsweise das Flagellin der Salmonellen und das Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien. Allgemein werden diese Merkmale *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) genannt und von verschiedenen Rezeptoren erkannt, darunter dem *toll-like-Rezeptor* (TLR).

Die „Verarbeitung“ der Fremdzellen erfolgt entweder durch Erregeraufnahme und Verdauung (Phagozytose) primär in den neutrophilen Granulozyten und den Monozyten/Makrophagen und/oder durch Antigenpräsentation sowie Immunmodulation mittels Produktion spezifischer Immunmodulatoren und Zytokine. Die unspezifischen Abwehrzellen werden durch diverse Chemokine (z.B. IL 8) angelockt und durch spezifische Chemokinin-Rezeptor-Reaktionen (z.B. CXCR 1 und 2 für IL 8) aktiviert. Nach Andockung am Endothel über Selektine (Margination) durchqueren sie dieses (Diapedese), phagozytieren den Erreger und schädigen ihn durch Lysozym, diverse Proteasen, Oxidantien (H_2O_2), Sauerstoffradikale (O_2^- , OH^-) und Stickstoffmonoxid (NO). Speziell die Makrophagen zerlegen aufgenommene Erregerfragmente in einzelne Peptide (Epitope) und präsentieren diese durch MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche für die T-Zell-Aktivierung. Die Monozyten, Makrophagen und ihre organspezifischen, ortsfesten Derivate wie z.B. Langerhans-Zellen der Haut, Kupffersche Sternzellen der Leber, Synovialzellen, Mikroglia-

azellen, Alveolarzellen werden zusammenfassend als mononukleäres phagozytisches System (MPS) oder retikuloendotheliales System (RES) bezeichnet.

Eine Sonderstellung nehmen die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ein, die über Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche verfügen und hiermit Zellen attackieren, die mit humoralen Antikörpern markiert sind (IgG/IgM-Opsonierung). Dieser Prozess wird als antikörpervermittelte Zytotoxizität bezeichnet (antigen dependent cell-mediated cytotoxicity = ADCC), die Aktivierung der NK-Zellen erfolgt durch $\text{INF } \alpha, \beta, \gamma$, die von Leukozyten, Fibroblasten, aktivierten T-Zellen oder NK-Zellen sezerniert werden. Zusätzlich können sie auch ohne Vermittlung von Antikörpern Zellen abtöten. Beispielsweise führt der Verlust von schützenden MHC-Molekülen bei Tumorzellen dazu, dass sie von NK-Zellen eliminiert werden. Die Funktion von NK-Zellen wird über aktivierende bzw. hemmende Rezeptoren auf den NK-Zellen und die Expression von MHC-Molekülen reguliert.

Auf humoraler Ebene wird das Komplementsystem als ein kaskadisches Aktivierungssystem entweder durch Erreger ausgelöst, die durch Immunglobuline opsoniert sind (klassischer Weg über C1q-C4) oder durch native, nicht opsonierte Erreger (alternativer Weg über C3a, B,D,P). Die Komplementfaktoren C3a, C4a und C5a führen zur Granulozytenaktivierung, während die Faktoren C5b-C9 zur Ausbildung des Membranangriffskomplexes führen, mit dem die Außenwand gramnegativer Bakterien perforiert und deren Zytolyse eingeleitet wird.

Als weitere humorale Faktoren wirken Lysozym (Muramidase), Akutphaseproteine (z.B. CRP, α -1-Antithrypsin) und verschiedene Gruppen von Zytokinen (Interferone, Interleukine, Kolonie-stimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktor), die zusammenfassend die Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten und Makrophagen beeinflussen und

die Entzündungsreaktion modulieren. Interferone wirken speziell hemmend auf die Virusvermehrung (29, 31, 42).

2.3 Adaptive Immunität

Das adaptive oder erworbene ist im Gegensatz zur angeborenen Immunität hochspezifisch für das jeweilige Pathogen durch selektive Erkennung der jeweiligen Oberflächenstruktur und verfügt über ein immunologisches „Gedächtnis“, das bei einem erneuten Antigenkontakt eine schnellere und effektivere sekundäre Immunantwort gewährleistet.

Das adaptive Immunsystem stützt sich dabei auf drei Zelltypen: Antigenpräsentierende Zellen (APC) aus der myeloiden Stammzellreihe und T- und B-Lymphozyten, denen die lymphatische Reihe zugrunde liegt.

2.3.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten, die Träger der spezifischen zellulären Immunität, werden aus lymphatischen Vorläuferzellen im Thymus mittels Wachstumsfaktoren geprägt. Für eine riesige Vielzahl von möglichen Antigenen entstehen jeweils spezifische erkennende T-Lymphozyten, die einen entsprechenden T-Zell-Rezeptor exprimieren und damit gegen ein spezifisches Antigen gerichtet sind. Als negative Selektion wird dabei die Elimination von T-Zellen bezeichnet, die körpereigene Antigene fälschlicherweise als fremd erkennen, während T-Lymphozyten mit niederaffinen Interaktionen den Thymus verlassen können (= positive Selektion).

Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt durch spezifische Erkennung und Bindung des Antigens durch den entsprechenden Rezeptor eines T-Lymphozyten, wobei die Antigene durch antigen-präsentierende Zellen (z.B. Langerhans-Zellen der Haut, Kupffersche Sternzellen der Leber, Synovialzellen, Mikrogliazellen, dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten) spezifisch präsentiert werden. Dazu müssen die Antigene an besondere Moleküle, den MHC (major histocompatibility complex), auf den APC gebunden sein. An der Antigen-Erkennung sind neben dem TCR auch die Korezeptoren CD4 und CD8 beteiligt (CD=cluster of differentiation). Als Reaktion kommt es zur Zellproliferation (klonale Expansion) und nachfolgende Differenzierung in die Effektorzelle. Die Immunantwort auf ein bestimmtes Antigen entspringt durch diese klonale Selektion einigen wenigen Zellen.

Die T-Zell-Aktivierung erfolgt nach Antigenpräsentation durch die APC in vier Schritten: Adhäsion, antigenspezifische Aktivierung, Kostimulation und Zytokinausschüttung.

Im drainierenden Lymphknoten findet die initiale Kontaktaufnahme zwischen APC und T-Zellen durch eine unspezifische Bindung von Adhäsionsmolekülen statt. CD2 der T-Zelle bindet an LFA-3 (=CD58) der APC und LFA-1 der T-Zelle bindet an ICAM-1 und ICAM-2 der APC. In dieser Phase sucht der TCR der T-Zelle die MHC-Peptidkomplexe der APC nach einem passenden Peptid ab. Erkennt die T-Zelle "ihr" Peptid, so resultiert dies in einem engeren Zell-Zell-Kontakt, der durch Erhöhung der Affinität des LFA-1 der T-Zelle zu den ICAM-Molekülen 1- und 2 der APC zustande kommt.

Diese spezifische Interaktion ist zur vollständigen T-Zell-Aktivierung nicht ausreichend. Erst die Bindung der kostimulatorischen Moleküle B 7.1 (=CD80) und B 7.2 (=CD86) der APC an CD28 der T-Zelle führen zur endgültigen T-Zell-Aktivierung. Über diese Bindung wird die Synthese von IL-2 und dessen Rezeptor in der T-Zelle eingeleitet, was einem

autokrinen Stimulationsmodus der T-Zelle entspricht. Diese Aktivierung führt zur Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen in Effektorzellen.

Über das kostimulatorische Molekül CTLA-4 kann die T-Zell-Aktivierung wieder limitiert werden. Nach Aktivierung wird CTLA-4 verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert und bindet mit höherer Affinität als CD28 an die B7-Moleküle B 7.1 und B 7.2. Die T-Zelle empfängt daraufhin kein weiteres aktivierendes Signal. Fehlt das kostimulatorische Signal, so wird die T-Zelle inaktiviert und kann auch auf eine spätere Aktivierung nicht mehr reagieren. Diese Situation wird als Anergie bezeichnet.

Nach Aktivierung der T-Zellen erfolgt ihre Differenzierung in folgende Effektorzellen:

- Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL oder CD8⁺ T-Killer-Zellen), verantwortlich für die Überwachung der Körperzellen und Abtötung virusinfizierter Zellen, Tumorzellen und Transplantatzellen. Sie exprimieren den Korezeptor CD8 und erkennen somit Antigene, die an MHC-Klasse-I Moleküle gebunden sind. Die zytotoxische Wirkung wird dabei entweder durch Freisetzung lytischer Enzyme oder durch Freisetzung zytotoxischer Zytokine (z.B. TNF β) bewirkt. Eine dieser Möglichkeiten besteht in der Freisetzung von Perforin und Proteasen wie Granzym B aus Granula der T-Zelle. Perforin bildet Poren in der Membran der Zielzellen, Granzym B kann so eindringen und die Apoptose induzieren. Der Zelltod kann jedoch auch Rezeptor-vermittelt durch die Aktivierung des fremdzelleigenen Apoptoseprogrammes eingeleitet werden. Zytokine wie TNF- β oder Liganden wie Fas-Ligand binden an ihre Rezeptoren (TNF-Rezeptor, Fas), die eine Kaspase-Kaskade im Inneren der Zellen auslösen. Kaspasen sind Proteasen, die ihre Substrate an der C-terminalen Seite von Aspartatresten schneiden.

- T-Helfer-Zellen, die den Korezeptor CD4 exprimieren und somit Antigene, die an MHC-Klasse-II Moleküle gebunden sind, erkennen. Die T-Helfer-Zellen differenzieren wiederum in 2 Unterformen:
 - T_{H1}-Zellen (inflammatorische T-Helfer-Zellen), die über die Sekretion von Interferon- γ , GM-CSF, TNF- α und Expression des CD40 Liganden die Aktivität von T-Killerzellen, DC und Makrophagen, also Teile der zellulären Immunität, beeinflussen
 - T_{H2}-Zellen, die im wesentlichen IL-4, IL-5 und IL-10 produzieren und über B-Zell-Stimulation und deren Differenzierung zu Plasmazellen die humorale Immunantwort aktivieren (Steigerung der AK-Produktion).
- Regulatorische T-Lymphozyten, die in der Lage sind, die Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen zu unterdrücken (29, 31, 42).
- Durch Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen wie CCR7, CD45 Isoformen, CD27 sowie CD62 Liganden können T-Lymphozyten in weitere Subpopulationen wie memory cells, effector memory cells und effector T cells eingeteilt werden.

2.3.2 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten als Träger der spezifischen humoralen Immunität, reagieren auf einen spezifischen Antigenkontakt ebenfalls mit einer Aktivierung und klonalen Expansion und differenzieren sich in Antikörper-sezernierende Plasmazellen und Gedächtniszellen. Der menschliche Körper verfügt über ein Antikörper-Repertoire mit ca. 10^{12} Spezifitäten, die durch Mechanismen wie Rearrangement oder somatische Mutation entstehen. Jede B-Zelle produziert nur Antikörper, die gegen das eine, von ihr zu erkennende Antigen gerichtet

sind. Zusätzlich exprimiert sie auf ihrer Oberfläche das von ihr produzierte Immunglobulin als Rezeptor.

Die Immunglobuline (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) als Träger der spezifischen humoralen Immunität, können nahezu jede chemische Struktur als Epitop erkennen und erfüllen eine Reihe von Aufgaben, die der Elimination von extrazellulären Pathogenen dienen. Beispielsweise können durch Anlagerung von Antikörpern an Pathogene diese markiert (Opsonisierung) oder durch Bildung von Immunkomplexen lösliche Antigene (z.B. Toxine) neutralisiert werden (31, 42).

2.4 Dendritische Zellen

In dieser Untersuchung wurden zur *in vitro* Induktion von antigenspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten aus humanen Blut-Monozyten hergestellte, dendritische Zellen verwendet, die zur Antigenproduktion oder -präsentation mit RNA unterschiedlicher Herkunft transfiziert wurden.

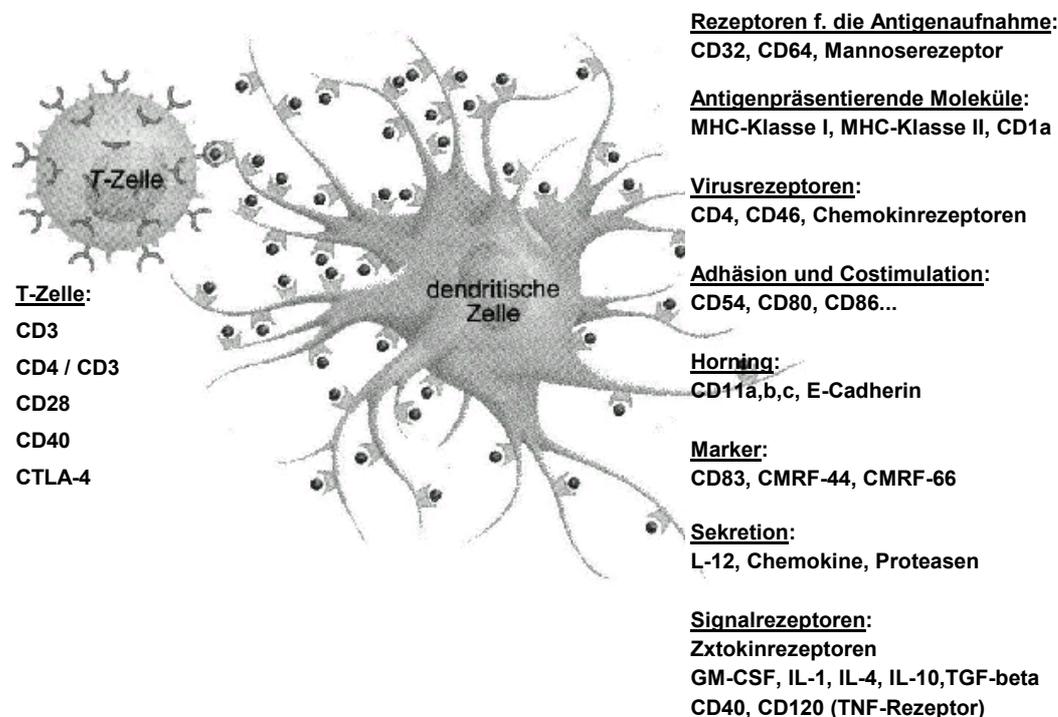


Abbildung 2.1: Dendritische Zelle

Dendritische Zelle mit den charakteristischen Fortsätzen und einer Aufstellung über die spezifischen exkretorischen und inkretorischen Fähigkeiten. (Quelle: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/maerten-angela-2000-05-31/HTML/maerten-ch1.html>)

Die dendritischen Zellen (DC), die erstmals in den 70er Jahren von Steinmann und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben und nach ihrem charakteristischen mikroskopischen

Erscheinungsbild benannt wurden (44), haben seither vermehrt wissenschaftliches Interesse gefunden und gehören immunologisch zur unspezifischen zellulären Abwehr. Sie sind, ebenso wie die Langerhans-Zellen der Haut, Makrophagen und B-Lymphozyten, primär antigenpräsentierende Zellen und besitzen ein sternförmiges Aussehen mit zahlreichen baumartig verzweigten und hochbeweglichen Fortsätzen, den Dendriten. Die dendritischen Zellen sind die potentesten hochspezialisiertesten antigenpräsentierenden Zellen mit der Fähigkeit, direkt eine primäre Immunantwort zu initiieren und zu unterhalten. Als typische Wächter des Immunsystems lokalisieren sich ihre unreifen Vorformen im Bereich der Eintrittspforten des Organismus (12).

Nach Antigenkontakt und zellulärer Prozessierung exprimieren die dendritischen Zellen die Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle, die auf allen kernhaltigen Zellen zu finden sind, wie auch über MHC-Klasse-II-Moleküle, die vorwiegend auf B-Lymphozyten und Makrophagen an der Zelloberfläche vorkommen. Dieser unreife Zustand der dendritischen Zellen ist gekennzeichnet durch ihre Spezialisierung auf die Antigenaufnahme, während demgegenüber die Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation noch gering ausgeprägt ist.

Die Stimulierung der unreifen Vorstufen durch die Pathogene, aktivierte T-Zellen, Zytokine (Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin (IL)-1 β , Lipopolysaccharide (LPS)) oder CD40-Liganden führt initial zur Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (CD80, CD86) sowie zur Sekretion von Zytokinen wie Interleukin (IL)-12 und resultiert in einer Veränderung des Phänotyps der dendritischen Zellen und ihrer antigenpräsentierenden Fähigkeiten.

Dieser sogenannte Reifungsprozess führt im weiteren Ablauf einer Immunreaktion durch Produktion verschiedener Chemokine, durch Hochregulation von CCR7 und einer größeren Empfindlichkeit gegenüber ELC (MIP-3 β) und SLC (6CKine) zur Migration der

zunehmend reifen dendritischen Zellen in die sekundären lymphatischen Organe und der Aktivierung und Einbeziehung der spezifischen Immunabwehr durch die Antigenpräsentation an die spezifischen T-Lymphozyten (9). Die spezifische zelluläre Immunreaktion erfolgt dann entweder über zytolytische Aktivität der $CD8^+$ T-Zellen oder über $CD4^+$ T-Helferzellen durch Induktion der humoralen Immunantwort mittels B-Zell-Stimulation und wird als „priming“ bezeichnet.

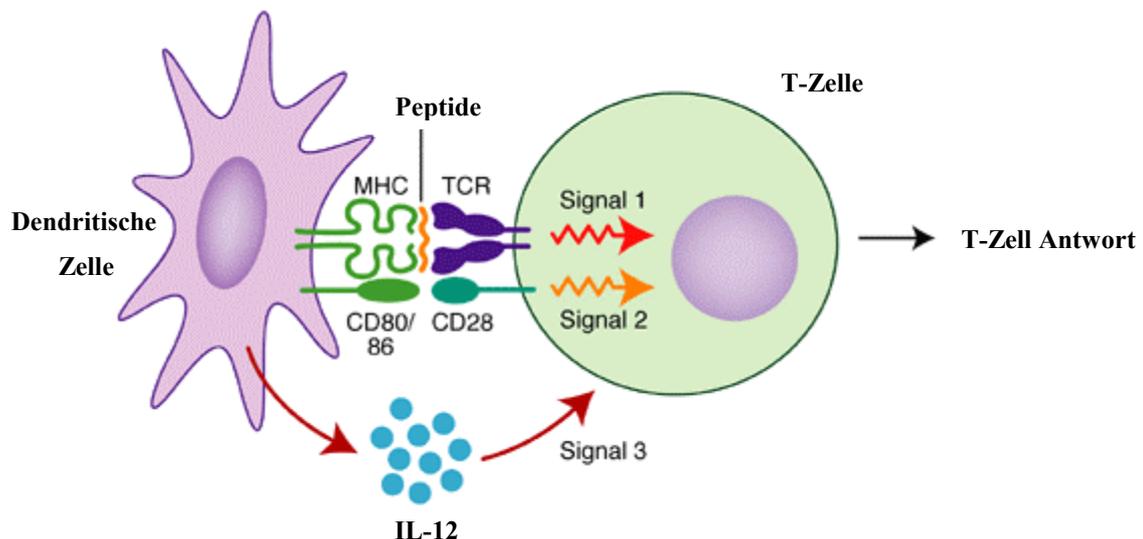


Abbildung 2.2: Interaktion zwischen den dendritischen Zellen und den T-Lymphozyten über 3 charakteristische Signalwege.

Signalweg 1: Interaktion zwischen den MHC-Molekülen auf den dendritischen Zellen, die Peptidfragmente gebunden haben mit den T-Zell-Rezeptoren.

Signalweg 2: Interaktion zwischen den kostimulatorischen Molekülen (z. B. CD80/86) an der Oberfläche der DC mit Liganden (z. B. CD28) an der Oberfläche der T-Zellen.

Signalweg 3: Sekretion von Interleukin 12 (IL-12) durch DC.

Diese Signale induzieren zusammen eine T-Helferzell-Antwort.

(Quelle: <http://www.expertreviews.org/02004301h.htm>)

Für wissenschaftliche und therapeutische Zwecke ist eine *in vitro*-Generierung der DC aus menschlichen $CD34^+$ Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, Nabelvenenblut und dem

peripherem Blut nach Kultur mit unterschiedlichen Zytokinkombinationen (GM-CSF, TNF- α , SCF, FLT-3 Ligand und IL-3) möglich (35). Ebenso können dendritische Zellen aus CD14⁺ Blut-Monozyten unter der Zugabe von Interleukin (IL)-4 und GM-CSF entstehen. Diese unreifen DC werden durch Entzündungsfaktoren wie TNF α , IL-1, LPC, Monocyte-Conditioned Medium (MCM) oder CD40 Ligation zur Reifung induziert (9).

3 Material und Methodik

3.1 Verwendete Materialien und Geräte

3.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav Varioklav® Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim Deutschland
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000	MDS Nordion, Bucks, Großbritannien
Betaplatte liquid scintillation counter 1205	Perkin Elmer Wallac, Freiburg, Deutschland
Durchflusszytometer: FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektroporationsgerät Easyjet Plus™	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Elispot Lesegerät	Immunospot Analyzer, CTL Analyzers LLC, Cleveland, USA
Gefrierschrank - 85°C UF 300	Napco, Winchester, USA
Lichtmikroskop Olympus CK 30-F200	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Geräte	Hersteller
Pipetten 10 ml , 20 ml, 200 ml. 1000 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV-Reader Biometra Bio Doc Analyze	Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Sterilbank	Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH+Co.KG Schwabach, Deutschland
Zellkultur-Brutschrank	NuAire, Inc., Plymouth, USA
Zentrifugen Multifuge 3 S-R	Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Eppendorf-Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Combitips plus 2,5 ml und 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalspritze 2-teilig, 10 ml, 20 ml, 50 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Luma Plate TM -96	Packard Bioscience BV, Groningen, Niederlande
NUNC Cryo Tube TM Vials 1 ml und 1,8 ml	Nalge Nunc International, Rochester, USA

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Pipetten 2 ml Falcon®, Polystyrol, steril, gestopft 5 ml, Polystyrol, steril, gestopft 10 ml, Polystyrol, steril, gestopft 25 ml, Polystyrol, steril, gestopft 50 ml, Polystyrol, steril, gestopft	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland Corning Inc., Corning, New York, USA Corning Inc., Corning, New York, USA Corning Inc., Corning, New York, USA Corning Inc., Corning, New York, USA
Polypropylenröhrchen Falcon®, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
6-Well-Zellkulturplatte Falcon® Multi-well™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatte U-shape Cellstar®, with lid, TC-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen Falcon® Tissue Culture Flask 0.2 □m <i>Vented Blue Plug Seal Cap</i> , 75 cm ² , 250 ml 0.2 □m <i>Vented Blue Plug Seal Cap</i> , 25 cm ² , 70 ml Nunclon™ Zellkulturflaschen 250 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

3.1.2.1 Reagenzien**3.1.2.2 Antikörper**

Antikörper	Hersteller
Anti-Humaner IFN- γ Antikörper I	Hölzel Diagnostika, Köln, Deutschland

3.1.2.3 Chemikalien

Nicht aufgeführte Chemikalien und Biochemikalien wurden von den Firmen Merck (Hohenbrunn, Deutschland), Carl Roth & Co (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemic (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

Chemikalien	Hersteller
51-Cr-Natrium-Chromat	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland
DMSO	Sigma, St. Louis, USA
EDTA, 0,5M	Sigma, St. Louis, USA
Ficoll Biocoll Separating Solution	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Fetal Bovine Serum 10082	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS Dulbeccos Phosphate Buffered Saline 0,0095 M (PO ₄)	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
Penicillin.Streptomycin 100 ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
RPMI 1640 mit Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma, St. Louis, USA
X-Vivo 20	Bio Whittaker, Wakersville, USA
Zytokine GM-CSF Leukine® Liquid IFN- α , IFN- γ IL-4 TNF- α	Berlex® Laboratories Inc., Richmond, USA R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

3.1.2.4 Kits

Kits	Hersteller
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden

3.1.2.5 Medien und Antibiotika

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
RP10-Medium	Medium RPMI 1640 mit Glutamax-I, 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin

3.1.2.6 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösung	Zusammensetzung
Einfriermedium	10% (v/v) DMSO in FCS
FACS-Puffer	0,5% (v/v) FCS in PBS
MACS-Puffer	0,5% FCS (v/v) 2 mM EDTA in PBS
TBS	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl
TBST, 0,5%	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 0,5% (v/v) Tween-20
TBST, 3%	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 3% (v/v) Tween-20

3.1.2.7 Peptide

Peptide	Bereitgestellt von:
BCR-ABL- A2 AS-Sequenz SSKALQRPV	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfa- kultäres Institut für Zellbiologie, Unversität Tübingen, Deutschland
BCR-ABL- A3 AS-Sequenz KQSSKALQR	PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfa- kultäres Institut für Zellbiologie, Unversität Tübingen, Deutschland

3.1.2.8 Plasmide

Bezeichnung / (Größe in kb)	Beschreibung	Promoter Linearisierung mit RE Transkript-Länge (kb)	Referenz
Δ pGEM5-mod- p210-wt (ca. 10,0 kb)	<i>BCR-ABL</i> -p210-cDNA, 6,304 kb- <i>EcoRI</i> -Fragment in pGEM-5Zf		B. J. Druker, K. Johnson, Portland, USA
pCMV-Script (4,3 kb)	eukaryontischer Expressi- onsvektor	CMV, T3, T7	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
pCMV-Script- mod-p210-wt- Poly(A) ₃₀	<i>BCR-ABL</i> -p210-cDNA, 6,304 kb- <i>EcoRI</i> -Fragment in pCMV-Script. Am 3'-Ende zusätzlich ein synthetischer Poly(A) ₃₀ - Schwanz, mit 3'-Ende singulär. <i>NdeI</i> -Schnittstelle	T7 <i>NdeI</i> 6,3 kb	F. Grünebach, Universität Tübingen
pSP64 Poly(A)-PEM- tm (6,782 kb)	“human polymorphic epithelial mucin”-cDNA, 3,752 kb- <i>BamHI</i> -Fragment in pSP64 Poly(A)	SP6 <i>EcoRI</i> 3,838 kb	S. J. Gendler, Imperial Cancer Research Fund, London, UK/ F. Grünebach, Universität Tübingen
pSP64-EGFP-2 (3,791 kb)	0,761 kb enhanced green fluorescent protein cDNA- Fragment kloniert in modifizierten pSP64 Poly(A)	SP6 <i>NdeI</i> 1,065 kb	V. F. I. Van Tendeloo Universität Antwerpen, Belgien

3.1.2.9 Tumorzelllinien

Tumorzelllinie	Herkunft
K 562	Chronisch myeloische Leukämie HLA-A2 ATCC

3.2 Tumorzelllinien

Die CML-Tumorzelllinie K-562 (CML im Stadium der Blastenkrise, ATCC Nr. CCL-243) wurden in RP10-Medium (RPMI 1640 supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 50 µM 2-Mercaptoethanol und Antibiotika (Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 µg/ml)) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die K-562 Zellen, stabil mit einem Plasmid transfiziert, das für HLA-A2.1 kodiert, waren ein freundliches Geschenk von Thomas Wölfel (3.Medizinische Klinik /Abteilung für Immunologie, Universität Mainz, Deutschland).

3.3 Herstellung von dendritischen Zellen aus adhärenenten peripheren Blut-Monozyten

Die dendritischen Zellen wurden aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMNC), wie in diversen früheren Arbeiten schon beschrieben, generiert (39,50). Die Isolierung der PBMNC erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll/Paque (Biochrom, Berlin, Deutschland) aus dem Buffy Coat von gesunden Blutspendern aus der

Blutbank der Universität Tübingen (Abteilung für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Tübingen) (9,10,12).

Die isolierten PBMNC wurden anschließend mit einer Dichte von 1×10^7 Zellen/3ml serumfreies X-Vivo 20[®]-Medium/Well (BioWhittaker, Apen, Deutschland) in 6-Well-Platten (Corning, Cambridge, MA, USA) ausplattiert. Nach einer Inkubationsperiode von 2h bei 37° C und 5% CO₂ wurden die nichtadhärenten Lymphozyten entfernt, ausgezählt und dann in einem Einfriermedium (DMSO, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei -80°C für die spätere Verwendung bei der CTL-Restimulation oder bei der Zellstimulation in Kryo-Röhrchen (Schraubverschluß, Greiner, Deutschland) tiefgefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen später zügig im 37°C-Wasserbad erwärmt und anschließend mit 10 ml X-Vivo-Medium gewaschen, um das zytotoxische DMSO zu entfernen.

Zur Generierung unreifer dendritischer Zellen wurden die isolierten PBMNC mit 3ml X-Vivo Medium/Well unter Zugabe von rekombinantem Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-Stimulationsfaktor (GM-CSF, 100 ng/ml, Leukine[®] Liquid Sargramostim, Berlex[®], Richmond, Kalifornien, USA) und Interleukin-4 (IL-4, 20 ng/ml, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) alle 2 Tage inkubiert, Startpunkt war der erste Tag der Kultivierung. Zur Ausreifung wurden die unreifen dendritischen Zellen am Tag 6 der Kultivierung durch Zugabe von Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α ; 10 ng/ml R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) für 24 h eingeleitet.

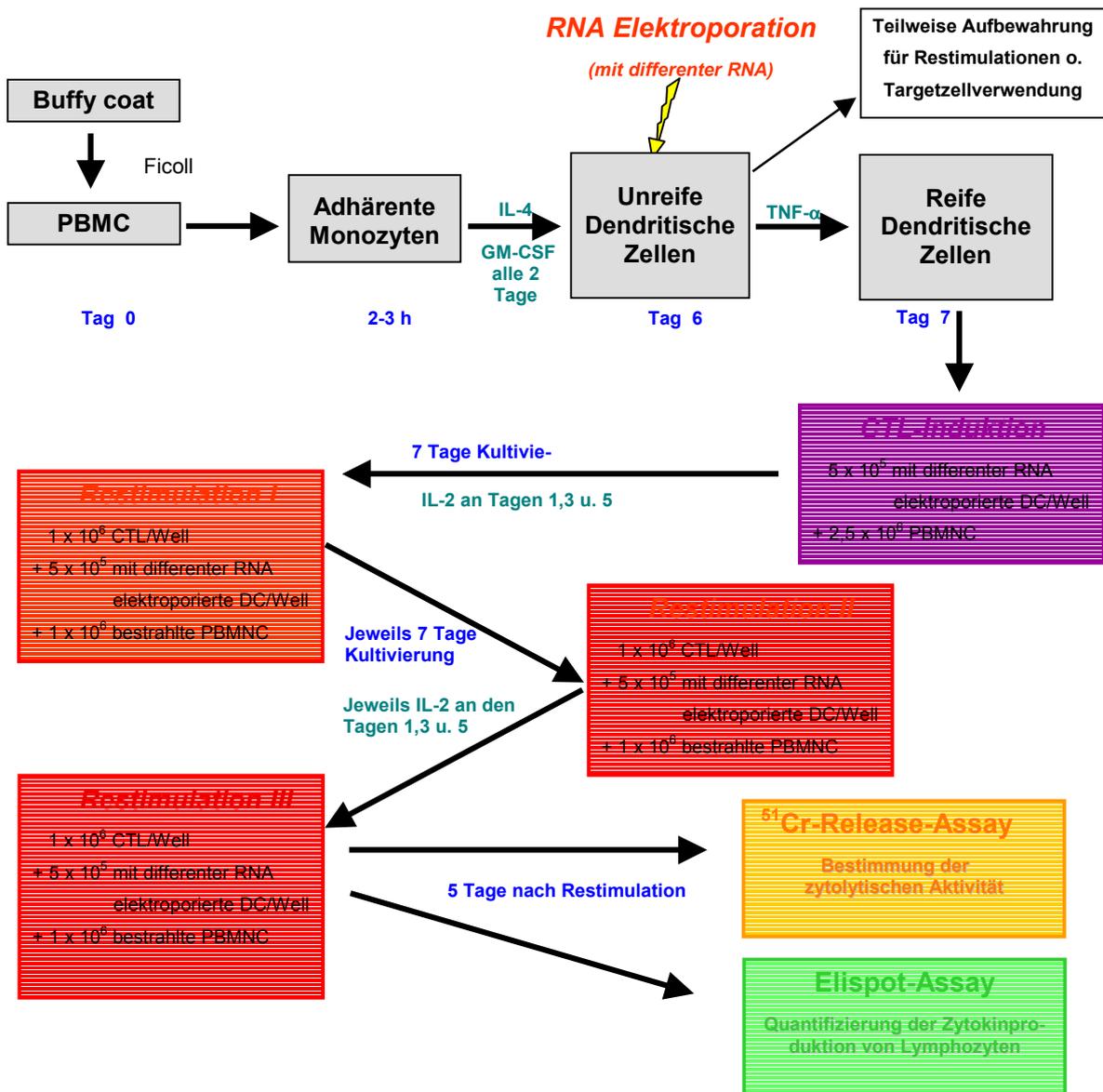


Abbildung 2.3: Schematischer Überblick über den Versuchsablauf

Im oberen grauen Bildteil ist der Ablauf der Gewinnung von DC bis zur CTL-Induktion dargestellt, gefolgt vom weiteren Versuchsablauf mit den Restimulationen bis zur Analytik mittels ^{51}Cr -Release- und Elispot-Assay.

3.4 Anreicherung von CD34⁺-Zellen

Nach persönlicher Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung wurden entsprechend den Leitlinien des Ethikkomitees der Universität Tübingen periphere Blutzellen von freiwilligen Spendern oder von Patienten mit nichthämatologischen malignen Tumorerkrankungen unter Stammzellinduktion mittels Granulozyten-Kolonien-stimulierendem-Faktor (G-CSF) gewonnen. Die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMNC) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll/Paque (Biochrom, Berlin, Deutschland) separiert. Die Anreicherung von CD34⁺ Zellen erfolgte durch Verwendung immunomagnetischer Mikrobeads (MACS system, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) entsprechend der Herstelleranleitung. Durch Passage der Zellen über zwei aufeinanderfolgende Säulen wurden alle Proben dieser Studie zu 96 - 99% gereinigt, bestimmt durch Immunofluoreszenzdoppelfärbung mit CD45- Fluorescein Isothiocyanate (FITC)/CD34- Phycoerythrin (PE) monoklonalen Antikörpern und Flowzytometrie.

3.5 RNA-Isolation

Die Isolierung der Gesamttumor-RNA aus den Tumorzelllysaten erfolgte unter Verwendung des RNeasy[®] Mini Anionenaustauscher Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland), entsprechend dem RNA-Isolationsprotokoll des Herstellers für tierische Zellen. Die Ausbeute und Reinheit der RNA wurden mittels UV-Spektrophotometrie bestimmt. Nach routinemäßiger Bestimmung der Größe und Integrität der isolierten RNA mittels Formaldehyd/Agarosegel-Elektrophorese wurden die Proben bei -80°C in Cryotubes aufbewahrt.

3.6 Synthetische Peptide

Die Synthese der HLA-A3.2/HLA-A11 bindenden Peptide *BCR-ABL-A3* (Aminosäuren KQSSKALQR) (4) erfolgte in einem automatischen Peptidsynthesizer EPS221 (Abimed, Langenfeld, Deutschland) entsprechend der F-moc/tBu-Strategie. Die Analyse wurde mittels HPLC (Varian Star, Zinsser Analytics, München, Deutschland) und MALDI-TOF Massenspektrometrie (Future, GSG, Bruchsal, Deutschland) vorgenommen.

3.7 Herstellung der *bcr-abl*-, *MUC1*- und *EGFP*-in-vitro-Transkript (IVT)

Aus dem Plasmid Δ pGEM5-mod-p210-wt, wurde durch *EcoRI*-Restriktionsverdauung die vollständige *bcr-abl*-p210-cDNA ausgeschnitten (freundlicherweise von B. J. Druker, K. Johnson, Howard Hughes Medical Institute Research Laboratories, Oregon Health & Science University, Portland, Oregon, USA zur Verfügung gestellt) und in die *EcoRI*-Schnittstelle von pCMV-Script (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) ligiert. Danach wurde in die *NotI*-Schnittstelle dieses Vektors ein synthetischer Poly(A)₃₀-Schwanz, der am 3'-Ende eine singuläre *NdeI*-Schnittstelle enthielt, ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde pCMV-Script-mod-p210-wt-Poly(A)₃₀ genannt. Vor der *in-vitro*-Transkription wurde das Plasmid hinter dem Poly(A)₃₀-Schwanz durch Restriktionsverdauung mit *NdeI* linearisiert. Für die *in-vitro*-Transkription unter der Kontrolle des T7-Promotors wurde der T7 mMESSAGE mMACHINE[®]-Kit (Ambion, Huntingdon, Großbritannien) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. *MUC1*- und *EGFP*-IVT wurden entsprechend hergestellt (19,24). Die Reinigung der IVT wurde mit RNeasy[®] Mini Anionenaustauscher-

säulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem „RNA-cleanup“-Protokoll des Herstellers durchgeführt. Menge und Reinheit wurden durch UV-Spektrophotometrie (OD_{260} / OD_{280}) bestimmt und die Größe und Integrität mit Formaldehydagarosegelelektrophorese kontrolliert. Aliquots wurden bei -80°C gelagert. *PR3*-, *Prame*- und *Survivin*-IVT wurden durch die Firma CureVac GmbH (Tübingen, Deutschland) synthetisiert.

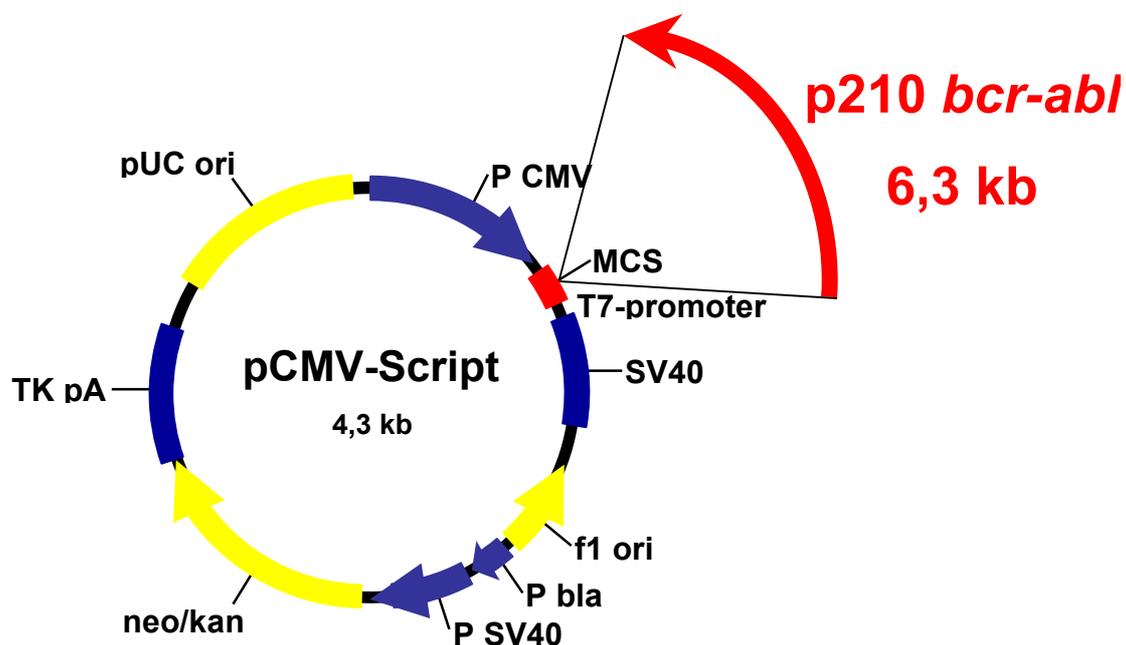


Abbildung 2.4: Karte des Vektors pCMV-Script-p210-poly(A)

(modifiziert nach Quelle: Stratagene, Amsterdam, Niederlande; im Internet unter <http://www.stratagene.com/manuals/211199.pdf>)

3.8 RNA-Elektroporation von dendritischen Zellen

Vor der Elektroporation wurden am 7. Tag der Kultivierung die unreifen dendritischen Zellen geerntet, zweimal mit X-VIVO 20[®] Medium (BioWhittaker, Apen, Deutschland) gewaschen und zu einer Endkonzentration von 2×10^7 Zellen/ml resuspendiert.

Anschließend wurden 200 μ l der vorbereiteten Zellsuspension in einer 4 mm-Küvette mit 10 μ g der zu transfizierenden Gesamttumor-RNA gemischt und mit einem Easyject Plus[®] Elektroporator (EquiBio/Peqlab, Erlangen, Deutschland) elektroporiert. Die hierbei verwendeten physikalischen Parameter waren: $U = 300$ V, $C = 150$ μ F und $R = 1540$ Ω . Nach erfolgter Elektroporation wurden die dendritischen Zellen unverzüglich in RP10-Medium (RPMI 1640 mit Glutamax I, (GIBCO[®], Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), das mit 10% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum, 2 mmol/l L-Glutamin, 50 μ mol/l 2-Mercaptoethanol und Antibiotika (Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 μ g/ml)) supplementiert war, überführt und reinkubiert.

3.9 Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen

Nach Elektroporation der dendritischen Zellen mit RNA unterschiedlicher Quellen und erfolgter Transfektion wurden die dendritischen Zellen in einem serumfreien X-VIVO 20[®] Medium (BioWhittaker, Apen, Deutschland), das mit 10 ng/mL TNF- α supplementiert war, für 24 h zur Ausreifung inkubiert. Zur Induktion spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) wurden 5×10^5 elektroporierte dendritische Zellen mit $2,5 \times 10^6$ autologen PBMNC in 1ml X-VIVO 20[®] Medium/well (BioWhittaker, Apen, Deutschland) für 7 Tage inkubiert. Ein Teil der elektroporierte dendritischen Zellen wurde für spätere Restimulationen oder für die Verwendung als Targetzellen bei -80°C in Kryo-Röhrchen (Schraubverschluß, Greiner, Deutschland) aufbewahrt. Nach 7 Tagen Kultivierung wurden 1×10^6 CTL/well mit 5×10^5 transfizierten autologen dendritischen Zellen und 1×10^6 für 11,7 min. 100% (30Gy) (Gammacell, Gammamaster B.V., Ede, Niederlande) bestrahlte

PBMNC restimuliert und 2 ng/mL IL-2 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) wurde an den Tagen 1, 3 und 5 zugefügt. Insgesamt wurden die CTL drei Mal nach der beschriebenen Methode restimuliert. Die zytolytische Aktivität der induzierten CTL wurde am Tag 5 nach der letzten Restimulation mittels des nachfolgend beschriebenen Standard ^{51}Cr -Release Assay analysiert.

3.10 Standard ^{51}Cr -Release-Assay (CTL-Assay)

Das Chrom [^{51}Cr]-Release-Assay ist eine Methode zur Überprüfung der Zytotoxizität von Effektorzellen (CTL) und wurde analog zu früheren Arbeiten wie nachfolgend erstellt (9). Die eingesetzten Targetzellen wurden mit RNA transfiziert oder mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ synthetischem Peptid für 2 h inkubiert und dann, versetzt mit radioaktivem ^{51}Cr Natriumchromat $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, auf einem X-VIVO 20[®] Medium (BioWhittaker, Apen, Deutschland) für 1 h bei 37°C markiert. Anschließend wurden die vorbereiteten Targetzellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/100 μL X-VIVO 20[®] Medium/Well in 96-Well-Platten transferiert. Unterschiedliche Mengen der induzierten T-Lymphozyten (Effektorzellen) (Effektorzellen:Targetzellen-Verhältnis 1:10, 1:3, 1:1, 3:1, 10:1 und 30:1) wurden bis zu einem Endvolumen von 200 μl zugefügt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die folgende Inkubationsperiode wurden 50 $\mu\text{L}/\text{Well}$ der radioaktiven Überstände auf eine Luma-96-Well-Platte (Packard Bioscience BV, Groningen, Niederlande) transferiert. Die Messung der Lumaplatte erfolgte am folgenden Tag nach vollständiger Eintrocknung der Überstände im beta-plate-counter (1205 Betaplatte liquid scintillation counter, Perkin Elmer Wallac, Freiburg, Deutschland). Der Prozentanteil der spezifischen Lyse wurde wie folgt kalkuliert: $100 \times (\text{Experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) / (\text{Maximale}$

Freisetzung - spontane Freisetzung). Spontane und maximale Freisetzung wurden in Anwesenheit von entweder X-VIVO 20[®] Medium (BioWhittaker, Apen, Deutschland) oder 2% Triton X-100 bestimmt. Die Inhibition von HLA Klasse I Molekülen wurde erreicht durch die Inkubation der Target Zellen über 1 h vor dem Assay mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 (20 µg/ml) gegen HLA Klasse I Moleküle, der freundlicherweise von S. Stevanovic (Universität Tübingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde.

3.11 IFN- γ -Elispot-Assay

Der Elispot-Assay stellt eine hochempfindliche Methode zur Quantifizierung der zellulären Immunantwort spezifischer T-Lymphozyten im Sinne der Zytokinproduktion auf Einzelzellebene nach Stimulation dar.

In dieser Arbeit wurden *in vitro* generierte T-Zellen mittels autologer dendritischer Zellen, die mit RNA aus Ph⁺-CML-Blasten transfiziert worden waren, mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/Well, gecoatet mit einem Anti-Humanen IFN- γ Antikörper (10 µg/ml; Hölzel Diagnostika, Köln, Deutschland) auf einer 96-Well Platte mit 5×10^4 autologen PBMNC, elektroporiert mit RNA verschiedener Herkunft, für 40 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Während dieser definierten Inkubationszeit produzieren die T-Zellen IFN- γ -Zytokine, die an den Primärantikörper gebunden wurden. Danach erfolgt die Detektionsreaktion für das Zytokin mit einem zweiten, Biotin-belegten Anti-Humanem IFN- γ Antikörper (2 µg/ml; Hölzel Diagnostika, Köln, Deutschland). Der Nachweis des Antikörper-Zytokin-Komplexes erwies sich als Farbreaktion auf der Mikrotiterplatte ("Spots").

Die Spots wurden unter Verwendung eines automatisierten Elispot Lesegerätes (Immunospot Analyzer, CTL Analyzers LLC, Cleveland, USA) ausgezählt. Die Anzahl der Spots kann als Maß für die Reaktivität des Immunsystems auf einen bestimmten Stimulus interpretiert werden und ermöglicht so eine standardisierte Beurteilung der Immunreaktion im Therapieverlauf. Als Positivkontrolle benutzten wir elektroporierte dendritische Zellen mit CML-RNA, bcr-abl-IVT, *Prame*-IVT, *Survivin*-IVT sowie *PR-3*-IVT und als Negativkontrollen wurden dendritische Zellen, die mit irrelevanter RNA wie *MUC1*- oder *EGFP*-IVT transfiziert worden waren, verwendet.

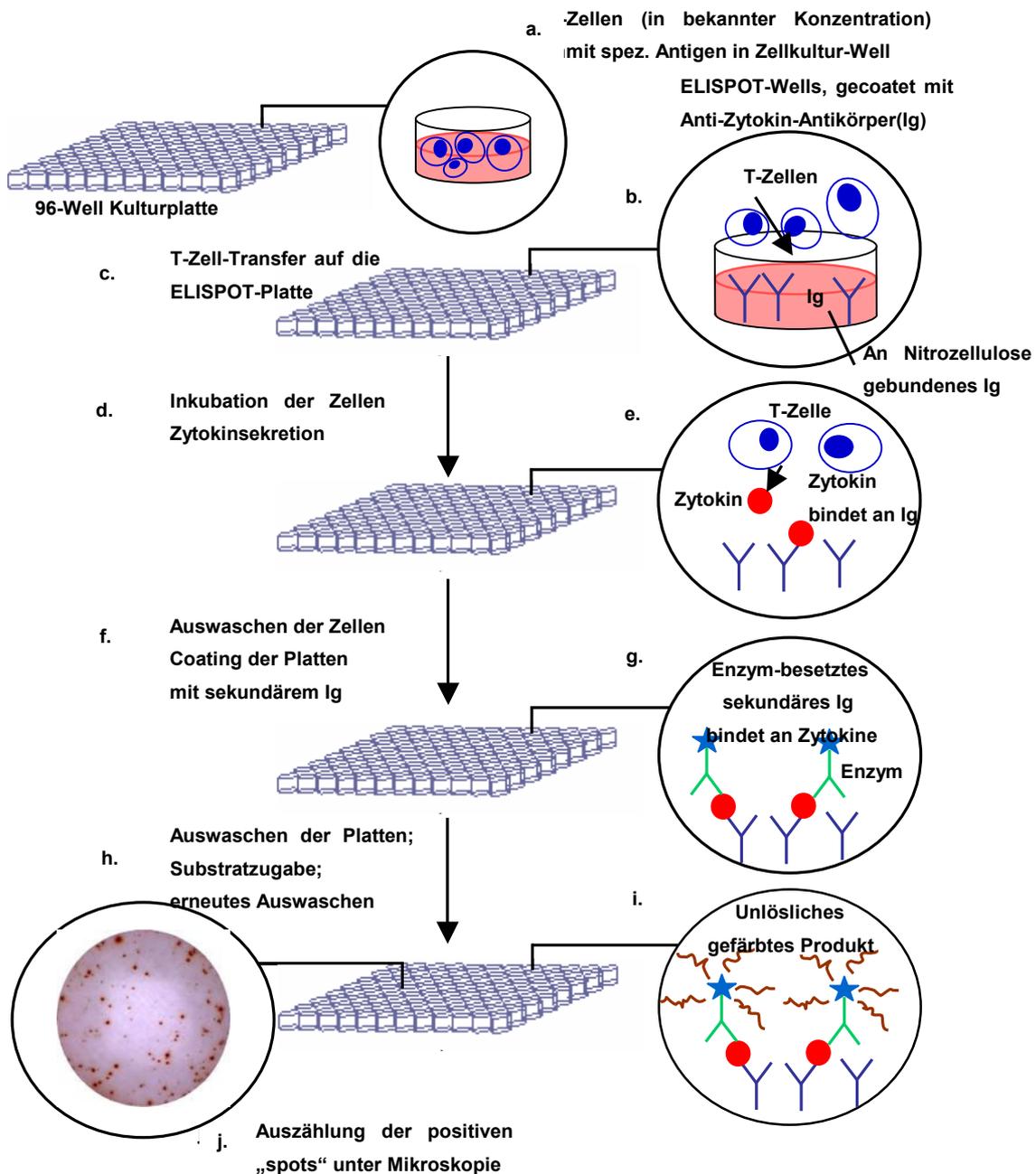


Abbildung 2.5: Schematische Übersicht über den Ablauf eines IFN- γ Elispot-Assays zur Quantifizierung der Zytokinsekretion von T-Lymphozyten.

T-Zellen werden in vitro durch Kultivierung mit Antigenen aktiviert. (b) Die Wells der ELISPOT-Platte werden mit einem Antikörper (Ig) – spezifisch für das zu detektierende Zytokin – gecoatet und binden an die Nitrocellulose-Basis. Nach Zugabe der aktivierten T-Zellen (c) werden während der Inkubationsperiode die Zytokine (d) freigesetzt. Diese um die T-Zellen lokal sezernierten Zytokine binden an den spezifischen Antikörper (e). Nach Auswaschung der Zellen und eines etwaigen Zytokinüberstandes erfolgt der Zusatz eines weiteren zytokinspezifischen Antikörpers (g), der an ein Enzym mit der Fähigkeit zur

Konversion eines Substrates in ein unlösliches Farbprodukt gekoppelt ist. Nach erneutem Waschen und dieser Substratzugabe erfolgt die Farbreaktion (i) im Bereich der gebundenen Zytokinareale. Abschließend erfolgt die Zählung der „spots“ unter dem Mikroskop oder per digitalem Bildverarbeitungssystem.

(modifiziert nach Quelle: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/jhc/fig003jhc.htm>)

4 Ergebnisse

4.1 Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten durch mit Ph⁺-K-562-Gesamtumor-RNA transfizierte dendritische Zellen

In ersten Experimenten wurden unreife, aus Blut-Monozyten gesunder Blutspender hergestellte, dendritische Zellen mit Gesamt-RNA der Ph⁺-Tumorzelllinie K-562 elektroporiert und als Antigen präsentierende Zellen (APC) für die Induktion antigenspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten verwendet. Nach mehrmaliger wöchentlicher Restimulation (3-4x) erfolgte die Bestimmung der zytolytischen Aktivität der so generierten T-Lymphozyten in einem Standard ⁵¹Cr-Release-Assay. Als Targetzellen wurden dendritische Zellen verwendet, die mit reiner K-562-Gesamt-RNA oder mit Gesamt-RNA aus Ph⁺-CML-Blasten zweier Patienten (Pat. 1, Pat. 2) elektroporiert worden waren.

Wie in Abb. 3.1A dargestellt, wurden diese drei verschiedenen DC-Targets effektiv lysiert, während die mit irrelevanter *MUC1*-IVT transfizierten dendritischen Zellen verschont wurden. Die spezifische Lyse der mit K-562-RNA transfizierten Targetzellen konnte durch Zugabe eines monoklonalen Antikörpers gegen HLA-Klasse-1-Moleküle blockiert werden und weist damit auf die HLA-Klasse-I-Restriktion der erzielten T-Zell-Antwort hin. Folglich konnte mit der IgG Kontrolle die Lyse der K-562-RNA-transfizierten dendritischen Zellen nicht inhibiert werden.

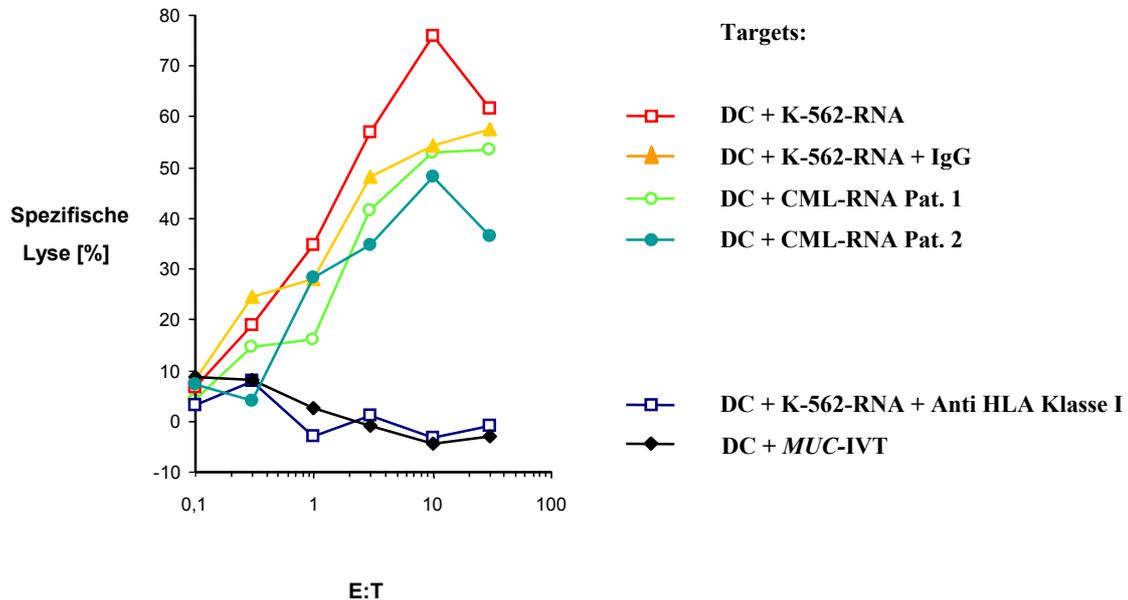


Abbildung 3.1A: Induktion von antigenspezifischen CTL durch DC, die mit K-562-RNA elektroporiert wurden.

Dendritische Zellen, die mit K-562-RNA (—□—) oder mit RNA aus Ph⁺-CML-Blasten von zwei verschiedenen Patienten (Pat. 1 —○—, Pat. 2 —●—) elektroporiert wurden, sind als Targets in einem Standard-⁵¹Cr-Release-Assay eingesetzt worden. DC, elektroporiert mit irrelevanter *MUC1*-IVT, wurden als Kontrolle verwendet (—◆—).

Interessanterweise erkannten diese zytotoxischen T-Lymphozyten ebenfalls die mit Gesamttumor-RNA aus Ph⁻-AML-Blasten transfizierten dendritischen Zellen, während die dendritischen Zellen, elektroporiert mit RNA aus Ph⁺-ALL-Blasten oder aus Lymphozyten Ph⁻-CLL zweier verschiedener Patienten (Pat. 1, Pat. 2) nicht lysiert wurden (Abb. 3.1B).

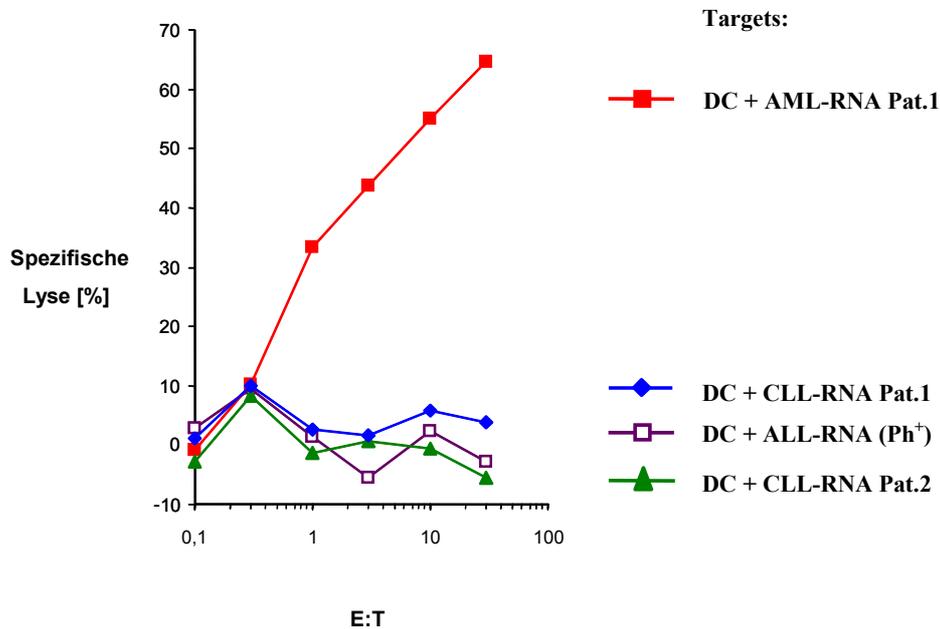


Abbildung 3.1B: Induktion antigenspezifischer CTL durch DC die mit differenter Leukämieblasten-RNA elektroporiert wurden.

Standard-⁵¹Cr-Release-Assay von dendritischen Zellen, elektroporiert mit Ph⁻-AML-Gesamtumor-RNA (Pat. 1 ■).

Ziel des weiteren Vorgehens war die Beantwortung der Frage, ob die in gleicher Weise wie vorher gewonnenen zytotoxischen T-Lymphozyten dendritische Zellen erkennen können, die mit Gesamt-RNA aus CD34⁺-Knochenmarkstammzellen elektroporiert wurden. Wie in Abb. 3.1C gezeigt, lysierten die zytotoxischen T-Lymphozyten effektiv die mit K-562-RNA transfizierten dendritischen Zellen, während sowohl die mit CD34⁺-RNA elektroporierte DC, als auch die DC nach Elektroporation mit RNA von Buffy Coat Zellen verschont blieben, ebenso wie die DC, die mit irrelevanter *MUC1*-IVT elektroporiert wurden.

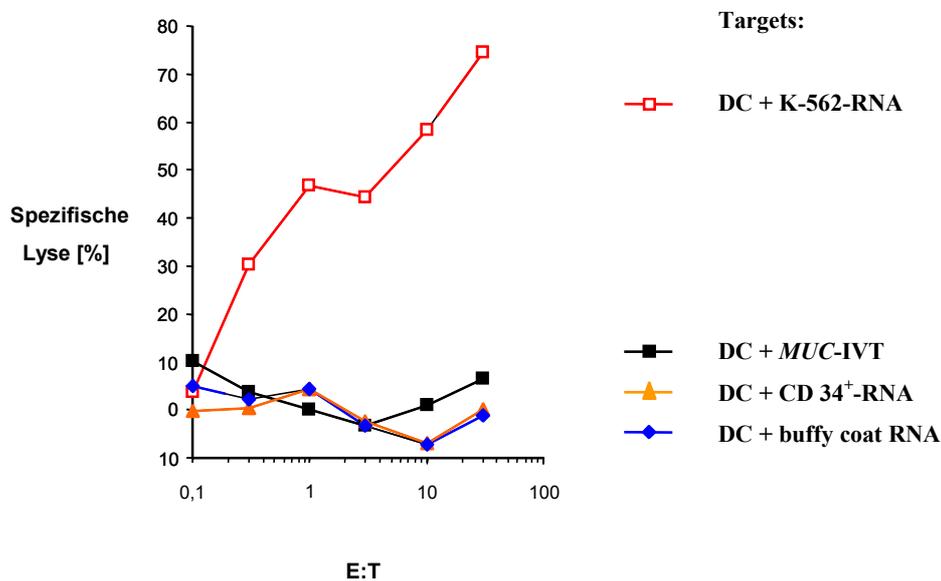


Abbildung 3.1C: Induktion antigenspezifischer CTL durch DC, die mit normaler Knochenmarksstammzellen-CD34⁺-RNA elektroporiert wurden. Standard-⁵¹Cr-Release-Assay von dendritischen Zellen, elektroporiert mit normaler RNA aus gereinigten CD34⁺-Stammzellen (▲) oder von normalen Buffy Coat Zellen (◆).

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Ph⁺-K-562-Gesamtumor-RNA transfizierte dendritische Zellen zur Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten führen können, die Antigene erkennen, die sowohl von Ph⁺ als auch Ph⁻ myeloischen Leukämien exprimiert werden, nicht aber Antigene, die von Ph⁺-ALL, CLL, CD34⁺-Stammzellen oder normalen PBMNC exprimiert werden.

4.2 *In vitro* Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten durch mit RNA aus Ph⁺-CML-Blasten elektroporierte dendritische Zellen

In den folgenden Experimenten wurden die vorigen Untersuchungen unter Verwendung von dendritischen Zellen, die mit RNA aus primären Ph⁺-CML-Blasten elektroporiert worden waren, wiederholt. Die Bestimmung der zytolytischen Aktivität der so generierten CTL erfolgte ebenfalls in einem Standard ⁵¹Cr-Release-Assay.

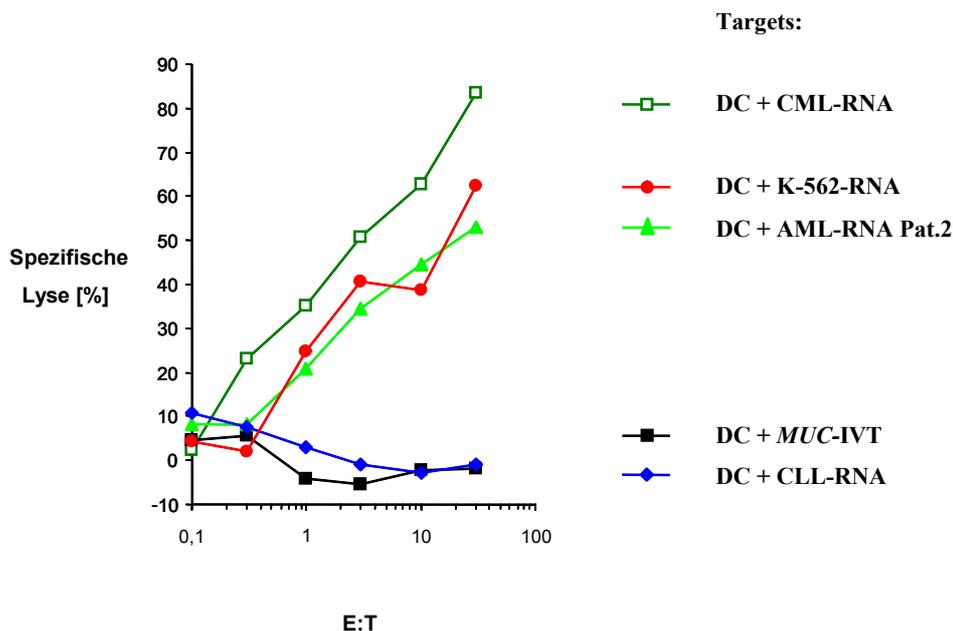


Abbildung 3.2A: Induktion antigenspezifischer CTL durch DC, die mit Gesamt-RNA aus Ph⁺-CML-Blasten elektroporiert wurden.

Standard-⁵¹Cr-Release-Assay von dendritischen Zellen nach Elektroporation mit K-562-Gesamtumor-RNA (—●—) oder mit Gesamtumor-RNA aus Ph⁻-AML-Blasten (Pat. 2 —▲—) und Ph⁺-CML (—□—) wurden effektiv lysiert, während Ph⁻-CLL-Zellen (—◆—) nicht erkannt wurden. DC nach Transfektion mit irrelevanter RNA (—■—) stellten die Kontrolle dar.

Wie in Abb. 3.2A gezeigt, führten diese zytotoxischen T-Lymphozyten zur effektiven Lyse von dendritischen Zellen, die mit RNA aus CML-Blasten oder aus der K-562-Tumorzelllinie transfiziert worden waren. Dendritische Zellen, elektroporiert mit Ph⁻-CLL-RNA ebenso wie mit *MUC1*-IVT wurden nicht lysiert. In Übereinstimmung mit den Voruntersuchungen erkannten diese zytotoxischen T-Lymphozyten die dendritischen Zellen, die mit RNA von AML-Patienten elektroporiert waren (Pat. 2, Pat. 3).

Zusätzlich wurden als Targetzellen DC, die mit reinem *bcr-abl*-IVT elektroporiert worden waren, eingesetzt. Diese Targets wurden ebenso wie dendritischen Zellen, die mit irrelevantem *MUC1*-IVT elektroporiert waren, von den zytotoxischen T-Lymphozyten ignoriert (Abb. 3.2B).

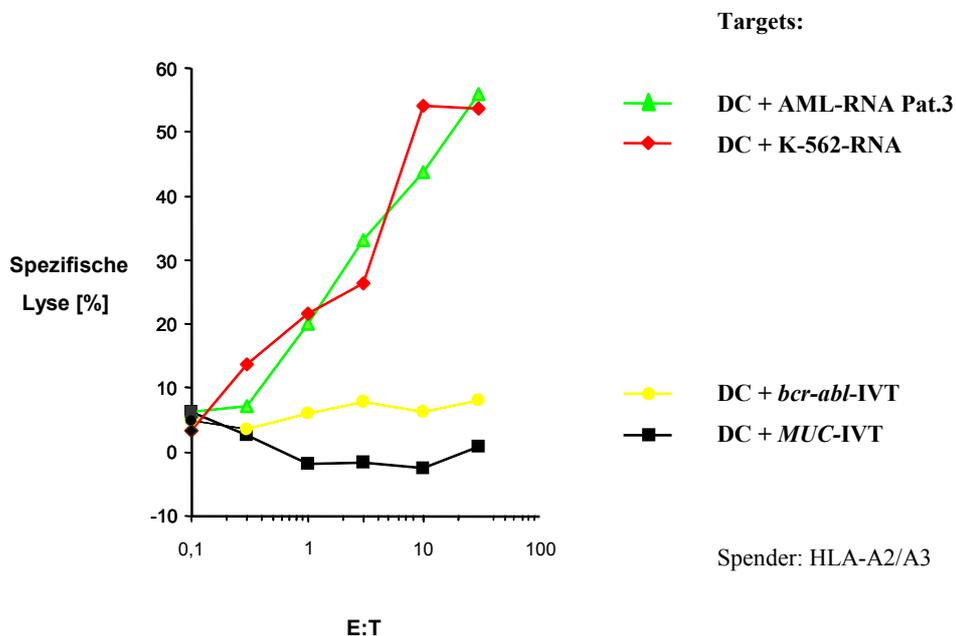


Abbildung 3.2B: Induktion antigenspezifischer CTL durch DC, die mit *bcr-abl*-IVT transfiziert wurden.

Fehlende zytolytische Reaktion bei dendritischen Zellen nach Transfektion mit reinem *bcr-abl*-IVT (—●—). Negativkontrolle durch DC mit Transfektion irrelevanter RNA (—■—).

Zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse wurden autologe dendritischen Zellen, die mit HLA-A3 bindendem *BCR-ABL* abgeleiteten Peptid A3 gepulst waren, als Target in einen ^{51}Cr -Release Assay eingesetzt. Dabei wurden die zytotoxischen T-Lymphozyten aus der Induktion von HLA-A2⁺-oder HLA-A3⁺-Spendern verwendet.

Diese Zellen wurden von den zytotoxischen T-Lymphozyten nicht lysiert wie die dendritischen Zellen, die mit einem irrelevanten HIV-Peptid beladen waren oder wie die K-562-Linie. Im Gegensatz hierzu wurden die als Positivkontrolle verwendeten K-562-Zellen, die mit einem HLA-A2-Plasmid transfiziert waren, effektiv lysiert (Abb. 3.2C).

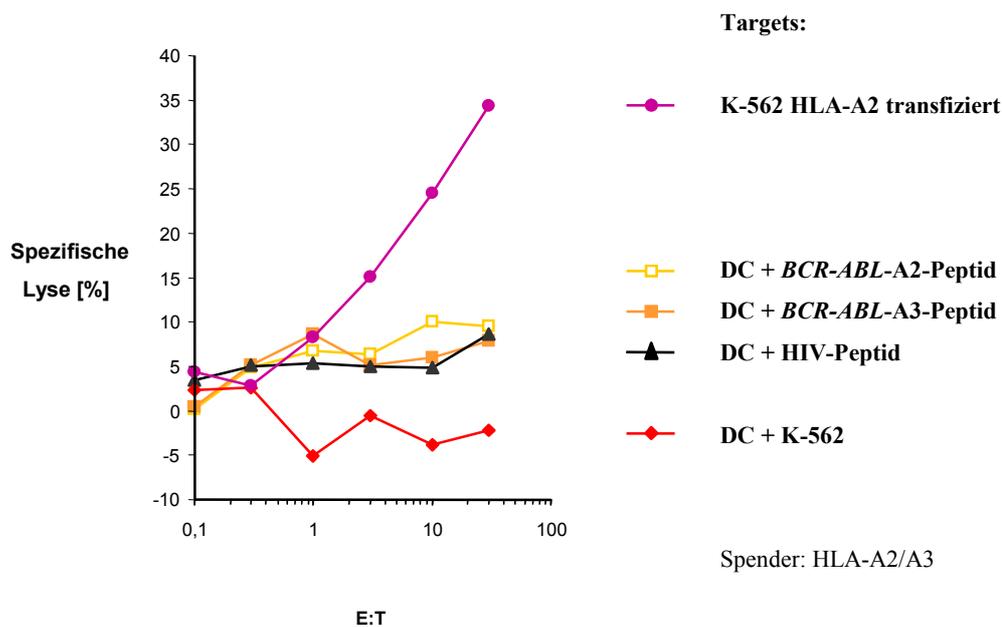


Abbildung 3.2C: Induktion antigenspezifischer CTL durch DC, die mit RNA aus Ph⁺-CML-Blasten transfiziert wurden.

Verwendung von dendritischen Zellen als Target nach Beladung mit aus *BCR-ABL* abgeleitetem HLA-A2- (□) und HLA-A3-bindendem Peptid (■).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die dendritischen Zellen, die mit Ph^+ -CML-RNA transfiziert waren, keine zytotoxischen T-Lymphozyten induzieren, die spezifisch sind für aus *BCR-ABL* abgeleiteten T-Zell-Epitope.

4.3 *In vitro* Induktion von *BCR-ABL*-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten durch mit reinem *bcr-abl*-IVT transfizierte dendritische Zellen

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob durch dendritische Zellen, die mit reinem *bcr-abl*-IVT elektroporiert wurden, *BCR-ABL*-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten induzieren können. Die dendritischen Zellen wurden wieder aus Blut-Monozyten von HLA-A2⁺/A3⁺ gesunden Spendern hergestellt. Wie in dem Standard ⁵¹Cr-Release-Assay gezeigt (ABB. 3.3A), lysierten die generierten zytotoxischen T-Lymphozyten sowohl die mit *bcr-abl*-IVT transfizierten dendritischen Zellen, als auch die dendritischen Zellen, die mit K-562-RNA oder mit Ph^+ -CML-RNA elektroporiert worden waren. Nicht erkannt wurden dendritische Zellen nach der Transfektion mit Ph^- -AML-RNA oder irrelevantem *MUC1*-IVT.

Die Spezifität der *BCR-ABL*-CTL wurde ferner durch Verwendung von mit Ph^+ -ALL-RNA transfizierten dendritischen Zellen bestätigt, außerdem durch dendritischen Zellen, die mit dem *BCR-ABL*-abgeleiteten HLA-A3 Peptid beladen waren (Abb. 3.3B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit reinem *bcr-abl*-IVT elektroporierte dendritischen Zellen zur Induktion von *BCR-ABL*-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten führen, die Ph^+ -Targetzellen erkennen können.

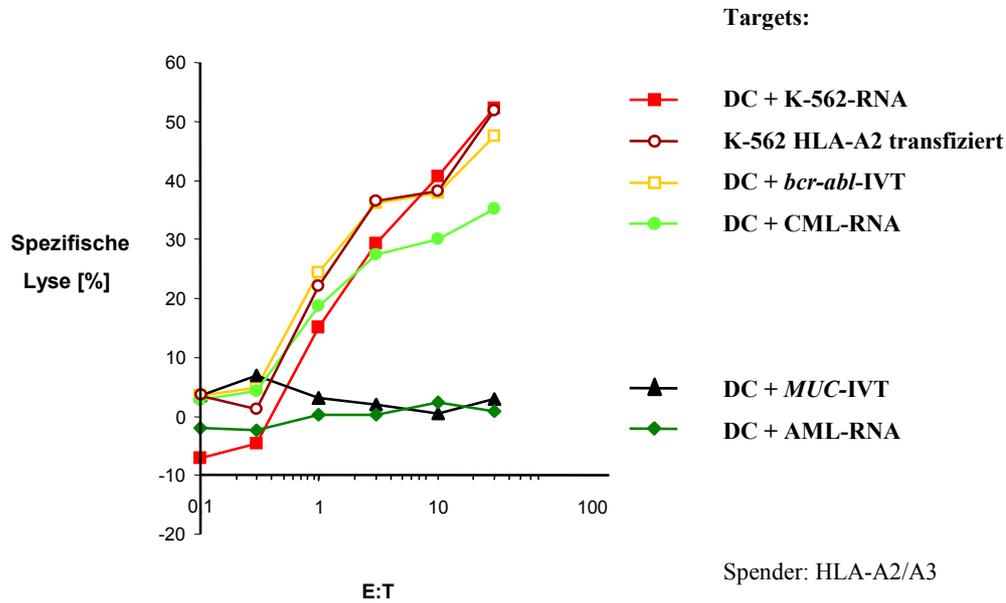


Abbildung 3.3A: Induktion *BCR-ABL*-spezifischer CTL durch DC, die mit reinem *bcr-abl*-IVT elektroporiert wurden.

Dendritische Zellen wurden nach Elektroporation mit K-562-Gesamtumor-RNA (—■—) oder mit Gesamtumor-RNA, isoliert aus Ph⁺-CML-Blasten (—●—) oder isoliert aus Ph⁻ AML-Zellen (—◆—) ebenso wie DC aus der Reaktion mit reiner *bcr-abl*-IVT (—□—) als Targets in einem Standard-⁵¹Cr-Release-Assay eingesetzt. Als Kontrolle dienten DC, die mit MUC1 oder EGFP-RNA transfiziert wurden (—▲—).

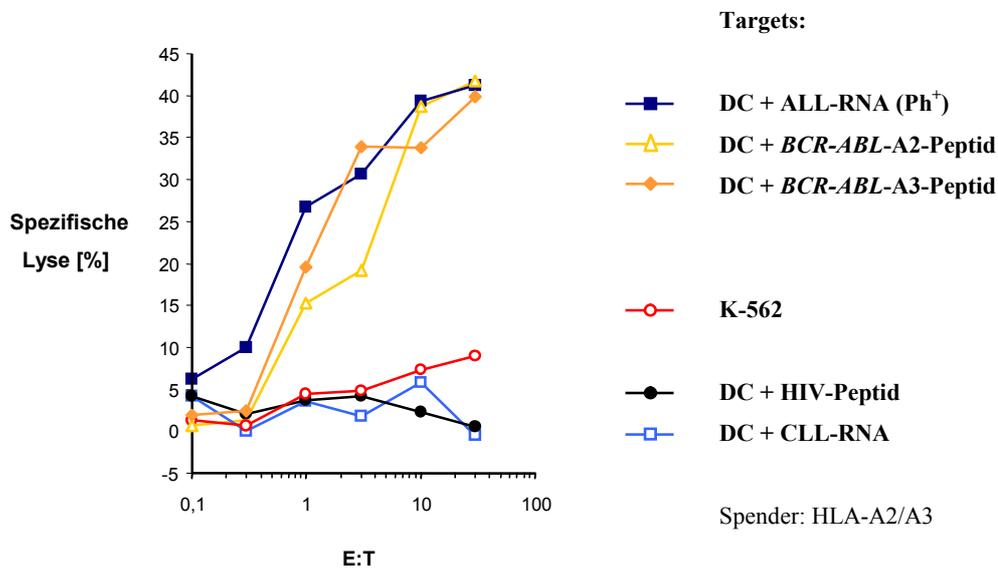


Abbildung 3.3B: Induktion *BCR-ABL*-spezifischer CTL durch DC, die mit reinem *bcr-abl*-IVT elektroporiert wurden.

Standard-⁵¹Cr-Release-Assay von dendritischen Zellen nach Transfektion mit Ph⁺-ALL-RNA (—■—) oder Ph⁻-CLL-RNA (—□—) ebenso wie von DC nach Beladung von *BCR-ABL* abgeleitetem HLA-A2- (—△—) und HLA-A3-Peptid (—◇—) bei der Inkubation mit zytotoxischen T-Lymphozyten aus Monozyten HLA-A2⁺/A3⁺ gesunder Spender. Kontrolle durch DC mit Beladung durch HIV-Peptid (—●—), oder K-562-Zellen (—○—).

4.4 *In vitro* Stimulation von T-Lymphozyten durch Ph⁺-CML-RNA-transfizierte dendritische Zellen

Zur *in vitro* Analyse der Induktion und Expansion polyklonaler T-Zell-Antworten bei Ph⁺-CML-RNA-transfizierten dendritischen Zellen wurden aus Monozyten hergestellte dendritische Zellen eines Ph⁺-CML-Patienten in kompletter zytogenetischer Remission durch IFN- α Behandlung unter serumfreien Bedingungen generiert und als APC nach Elektroporation mit RNA aus autologen CML-Zellen verwendet. Nach zwei durchgeführten Restimulationen wurden die T-Lymphozyten in einem IFN- γ ELISPOT-Assay unter Verwendung von PBMNC als APC, die mit RNA verschiedener Herkunft elektroporiert worden waren, analysiert. Negativkontrollen waren mit irrelevanter RNA wie *MUC1*- oder *EGFP*-IVT transfizierte PBMNC.

Wie in Abb. 3.4 illustriert, resultierte die Transfektion von dendritischen Zellen mit Ph⁺-CML-RNA in der Induktion von T-Zellen, die spezifisch autologe, mit CML-RNA, *PR-3*-IVT oder *Prame*-IVT elektroporierte PBMNC erkannten. PBMNC die mit irrelevantem Kontroll-IVT transfiziert waren, sezernierten signifikant weniger IFN- γ . Überdies zeigten die T-Lymphozyten eine signifikant geringere IFN- γ Antwort auf mit *Survivin*-IVT oder *bcr-abl*-IVT elektroporierte PBMNC im Vergleich zu PBMNC aus der Transfektion mit CML-RNA, *PR-3*- oder *Prame*-IVT.

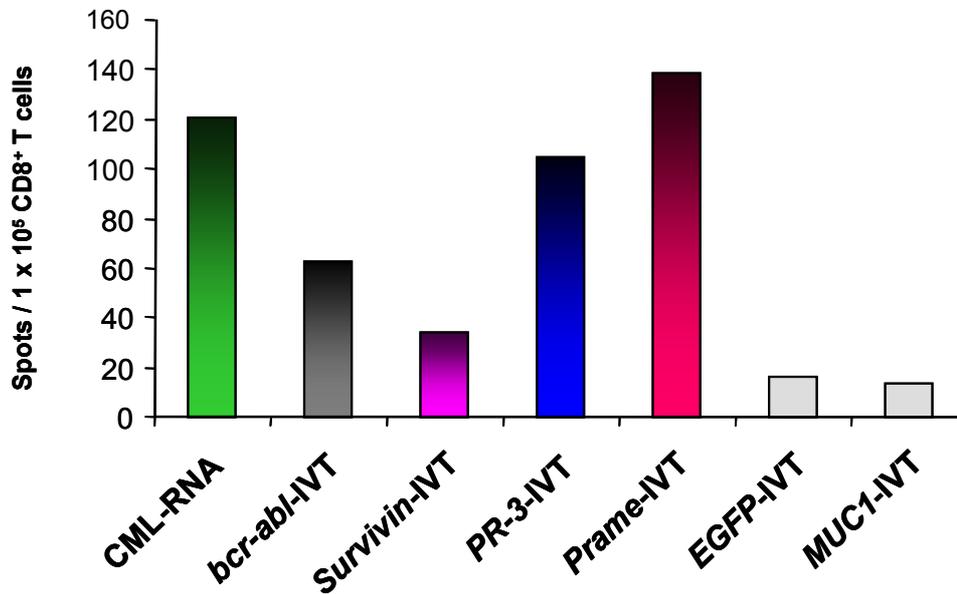


Abbildung 3.4: *In vitro* Induktion von IFN- γ -sezernierenden T-Lymphozyten durch mit Ph⁺-CML-RNA-transfizierten dendritischen Zellen.

Aus Monozyten abgeleitete DC von einem Ph⁺-CML-Patient waren unter serumfreien Bedingungen generiert und als APC nach Elektroporation mit gereinigter RNA der autologen CML-Blasten verwendet worden. Nach zwei Restimulationen wurden die generierten T-Lymphozyten in einem IFN- γ -ELISPOT-Assay unter Verwendung von PBMNC nach Elektroporation mit RNA verschiedener Quellen analysiert. Als Negativkontrollen fungierten PBMNC nach Transfektion mit irrelevanter RNA wie *MUC1*- oder *EGFP*-IVT. Die Werte im Diagramm zeigen die Anzahl der Spots per 1 x 10⁵ CD8⁺ T-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Ph⁺-CML-RNA elektroporierte dendritische Zellen eine starke T-Lymphozytenantwort spezifisch für *PR-3* und *Prame* abgeleitete Epitope induzieren und damit auf die Immundominanz dieser präsentierten Epitope hinweisen.

5 Diskussion

Das spezifische zytogenetische Merkmal der chronischen myeloischen Leukämie (CML) ist in der überwiegenden Zahl der Fälle (>90%) die Chromosomen-Translokation t(9;22)(q34;q11) (36), die nach ihrem Entdeckungsort als Philadelphia-Chromosom benannt wird. Diese, für die CML einzigartige molekulare Abnormität führt als Genprodukt zur Synthese eines intrazellulären chimären Fusionsproteins, des p210-BCR-ABL-Proteins (3,16,18,30), und eröffnet damit die Möglichkeit eines spezifischen therapeutischen Angriffspunktes. In diesem Sinne führte die pharmakologische Forschung zur Entwicklung des spezifischen ABL-Tyrosin-Kinase Inhibitors Imatinibmesylat (Glivec[®], Novartis Pharma), der seither einen Durchbruch in der Therapie von CML-Patienten im Stadium der chronischen Erkrankungsphase erbrachte (17,20-23).

Eine andere Strategie der therapeutischen Nutzung dieser CML-spezifischen Tumordeterminante stellt die Induktion einer T-Zell-Antwort gegen die BCR-ABL-Protein exprimierenden Tumorzellen dar. Im Jahr 1995 konnte erstmals gezeigt werden, dass von Leukämie-Onkogenen abgeleitete „Bruchpunkt-Peptide“ die Fähigkeit zur Bindung an HLA-Klasse-I-Molekülen besitzen (4,47). In der Folge wurden vier Peptide gefunden, die alle aus der bcr-Exon 3 – abl-Exon 2 (b3a2) Verbindung des Fusionsgens stammen, und entweder mit mittlerer oder hoher Affinität an gereinigtes HLA-A3, HLA-A11, HLA-B8 oder an beide HLA-A3/HLA-A11-Moleküle binden. Diese Peptide induzierten *in vitro* eine spezifische, HLA-Klasse-I-restringierte, zytotoxische T-Zell-Reaktion in peripheren mononukleären Zellen (PBMNC) bei vier von sieben gesunden Spendern mit entsprechendem HLA-Typ (5,26). Weiterhin wurde gezeigt, dass ein aus 17 Aminosäuren bestehendes Peptid, aus der b3a2 Region, auch durch DRB1*0401 Moleküle als Antigen präsentiert

wird und *in vitro* zur Induktion antigenspezifischer, HLA-Klasse-II wie DR2- und DR4 restringierter, CD4⁺-T-Zelllinien führen kann (6,17). Es blieb jedoch weiterhin unklar, ob das intrazelluläre BCR-ABL-Protein prozessiert wird und abgeleitete Peptide an der Oberfläche frischer CML-Zellen präsentiert werden.

Yotnda *et al.* identifizierten ein HLA-A2.1-restringiertes Peptid aus der b3a2 BCR-ABL Fusions-Region welches **a.** an HLA-A2.1 Moleküle bindet **b.** *in vitro* spezifische zytotoxische T-Zell-Antworten unter Verwendung von PBMNC sowohl von gesunden Blutspendern, als auch von CML-Patienten stimuliert und **c.** spontan intrazellulär prozessiert und an der Oberfläche von CML-Zellen einiger Patienten präsentiert wird (48). Eine derartige Antigenpräsentation an der Zelloberfläche führte bei einigen Patienten zur Expansion von CML-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Lymphozyten. Manche b3a2 BCR-ABL spezifische, *in vitro* induzierte CD8⁺ zytotoxische T-Zelllinien von verschiedenen Individuen konnten entweder HLA-identische transfizierte K-562-(b3a2 BCR-ABL⁺) oder autologe CML-Leukämiezellen lysieren. Dies deutet darauf hin, dass Tumorzellen die p210 b3a2 BCR-ABL Fusionsmoleküle prozessieren und entweder mit HLA-A3, HLA-A11, HLA-A2.1 oder mit HLA-B8 Klasse-I-Molekülen präsentieren können. Jedoch gelang es den Autoren in annähernd 75% der Fälle nicht, sowohl bei gesunden Blutspendern, als auch bei CML-Patienten *in vitro* starke zytotoxische T-Zell-Reaktionen auszulösen (20,48).

Scheinberg *et al.* verwendeten die vier oben beschriebenen, aus der bcr-Exon 3 – abl-Exon 2 (b3a2) Bruchpunktregion stammenden, Peptide (5) zur subkutanen Impfung von CML-Patienten in klinischen Phase-1 und Phase-2-Studien. Diese Impfungen führten durchweg zu einer peptidspezifischen CD4⁺-Antwort und nur zu einer schwachen CD8⁺-Antwort (gezeigt durch ELISPOT Interferon- γ -Assays) bei Patienten mit HLA-A*0301 oder HLA-

A*1101. Jedoch konnten Scheinberg et al. nicht aufzeigen, dass diese Immunantwort in der Lage war, native CML-Blasten oder Vorläuferzellen zu erkennen. (13,21,22,38). Demgemäß demonstrierten Molldrem et al., dass offenbar andere in CML-Blasten überexprimierte Antigene (Proteinase 3) zur Kontrolle der Krankheit in Interferon- α behandelten Patienten beitragen können (5,34).

Die hier vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die mögliche Rolle des bcr-abl-Antigens bei der *in-vitro* Induktion von antigenspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten mittels RNA transfizierten humanen, aus Blut-Monozyten hergestellten, dendritischen Zellen zu analysieren. Die hierbei verwendeten Quellen der Ph⁺-Gesamtumor-RNA waren sowohl die Tumorzelllinie K-562 als auch primäre Ph⁺-CML-Blasten aus Patientenblut. Zusätzlich wurde reine, *in vitro* transkribierte RNA, die für das p210 BCR-ABL Protein kodierte, in die Untersuchung eingeschlossen.

In ersten Experimenten wurden dendritische Zellen mit Ph⁺-K-562-Gesamtumor-RNA verschiedener Herkunft elektroporiert und als Antigen-präsentierende Zellen für die Induktion zytotoxischer T-Zellen verwendet. Diese zytotoxischen T-Lymphozyten lysierten sehr wirksam die mit HLA-A2-Plasmid transfizierten K-562-Zellen, die mit K-562-RNA elektroporierte dendritischen Zellen und ebenso die mit Ph⁺-CML-RNA transfizierten dendritischen Zellen. Die Lyse der dendritischen Zellen konnte durch Zugabe von Anti-HLA-I-Antikörpern wirksam blockiert werden, was zeigt, dass die Erkennung der Targetzellen HLA-Klasse-I restringiert ist. Bemerkenswerterweise erkannten diese zytotoxischen T-Lymphozyten ebenso dendritische Zellen, die mit Gesamtumor-RNA aus Ph⁻-AML-Blasten transfiziert worden waren. Wurden dendritische Zellen verwendet, die mit RNA aus lymphatischen Leukämien elektroporiert waren - wie mit Ph⁺-ALL-RNA,

Ph⁻-CLL-RNA oder mit reinem bcr-abl-IVT - so erfolgte keine Erkennung und Lyse durch die zytotoxischen T-Lymphozyten. Ebenso wurden dendritische Zellen, die mit RNA aus normalen CD34⁺ oder aus Buffy-Coat-Zellen elektroporiert wurden, von diesen CTL nicht erkannt. Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass dendritische Zellen, die mit Ph⁺-Gesamtumor-RNA elektroporiert worden waren, zytotoxische T-Lymphozyten induzieren, die spezifisch sind für Antigene aus Ph⁺ und Ph⁻ myeloischen Leukämien, nicht jedoch aus lymphatischen Leukämien. Die bei diesen zytotoxischen T-Lymphozyten erkannten Antigene werden nicht auf normalen CD34⁺ Vorläuferzellen präsentiert, sind aber auf neoplastisch transformierten myeloischen Leukämiezellen (über-) exprimiert. Teilergebnis bei diesen hier erfolgten Untersuchungen ist, dass BCR-ABL hier kein dominantes Antigen darstellt, das zu einer BCR-ABL spezifischen zytotoxischen T-Zellantwort führt. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass bis zum heutigen Zeitpunkt bei in vivo Untersuchungen kein BCR-ABL spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten-Klon mit hochaffinem T-Zell-Rezeptor isoliert werden konnte.

In weiteren Untersuchungen wurde *in vitro* getestet, ob BCR-ABL-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten durch dendritische Zellen induziert werden können, die mit reinem bcr-abl-IVT elektroporiert worden waren. Tatsächlich gelang es, BCR-ABL spezifische zytotoxische T-Lymphozyten durch die RNA-basierende Technik zu generieren. In einem ⁵¹Cr-Release-Assay lysierten diese zytotoxischen T-Lymphozyten sehr effektiv alle Ph⁺-Zielzellen oder mit Ph⁺-RNA transfizierte dendritische Zellen. Im Gegensatz hierzu wurden Targetzellen, die mit Ph⁻-Gesamtumor-RNA entweder von myeloischen oder lymphatischen Leukämien elektroporiert waren, von diesen zytotoxischen T-Lymphozyten nicht erkannt. Diese Resultate zeigen, dass bei diesem experimentellen Design BCR-ABL

durch die APC und Targetzellen prozessiert und auf HLA-Klasse-I-Molekülen präsentiert wird.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Ausweitung der Untersuchungen auf PBMNC von CML-Patienten in kompletter Remission durch IFN- α Behandlung. Die hierbei wesentliche Frage war, welche Antigene bei Ph⁺ und Ph⁻-myeloischen Leukämien, nicht jedoch bei Ph⁺-lymphatischen Leukämien exprimiert werden und in der Lage sind, zytotoxische T-Zellantworten zu induzieren. Eingeschlossen in diese Untersuchungsreihe waren IVT, die für *PR3* (15,32,33,48), *PRAME* oder *Survivin* (23,43) kodierten und bei denen eine Expression in CML und akuter Leukämie nachgewiesen worden war. In IFN- γ -ELISPOT-Assays konnte gezeigt werden, dass mit Ph⁺-CML-RNA elektroporierte dendritische Zellen zytotoxische T-Lymphozyten induzieren, die spezifisch für *PR3* und *PRAME* sind. Interessanterweise zeigten diese Untersuchungen - im Gegensatz zu Experimenten mit PBMNC von gesunden Spendern - dass BCR-ABL spezifische T-Lymphozyten mit durch CML-RNA elektroporierte dendritische Zellen in geringer Anzahl induziert wurden. Eine Ursache für diese Beobachtung könnte die Tatsache sein, dass die T-Zellen in diesen ⁵¹Cr-Release-Assays üblicherweise nach mehreren Zyklen der Restimulation verwendet wurden, während im Gegensatz hierzu die Zellen des IFN- γ -ELISPOT-Assays lediglich zweimalig restimuliert wurden. Eine andere Erklärung könnte sein, dass es einen deutlichen Unterschied im T-Zell-Repertoire des peripheren Blutes von gesunden Spendern und CML-Patienten, die mit INF- α behandelt worden waren, gibt und dies zu einer Expansion von T-Zellen führt, die unterschiedliche T-Zell-Epitope erkennen können. Nichtsdestotrotz waren, in Übereinstimmung mit den ersten Experimenten, die BCR-ABL-abhängigen Reaktionen im Vergleich zu *PR3* und *PRAME* weniger ausgeprägt. Interessanterweise

existierte auch eine gewisse Aktivität gegenüber *Survivin*, was als Hinweis gelten könnte, dass auch dieses Antigen in die Immunantwort gegen CML involviert ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass BCR-ABL durch Ph⁺-Zellen prozessiert und präsentiert wird, aber nicht das immundominante Antigen für die CD8⁺-T-Lymphozyteninduktion im Vergleich zu anderen tumorassoziierten Antigenen darstellt.

6 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung des BCR-ABL Fusionsproteins bei der Induktion antigenspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten untersucht mit der Zielsetzung, für CML-Patienten eine antileukämische Immuntherapie für dieses CML-tumorspezifische Neo-Antigen zu entwickeln.

Zu diesem Zweck wurden *in vitro* dendritische Zellen aus adhärenenten Blut-Monozyten generiert und diese mit verschiedenen RNA-Spezies elektroporiert, welche das spezifische chimäre bcr-abl-Transkript enthielten. Diese genetisch veränderten dendritischen Zellen wurden als Antigen-präsentierende Zellen (APC) für die Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten verwendet.

Durch diesen experimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, dass die durch dendritische Zellen induzierten zytotoxische T-Lymphozyten, die mit RNA aus der bcr-abl-positiven K-562-Zelllinie oder aus Ph⁺-CML-Blasten gewonnen wurden und damit die gesamte Tumor-RNA enthalten, keine BCR-ABL-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten induzieren. Im Gegensatz hierzu waren diese zytotoxischen T-Lymphozyten befähigt, autologe dendritische Zellen, die mit isolierter RNA aus AML-Blasten elektroporiert waren, zu lysieren. Dies indiziert, dass Antigene, die diese malignen Zellen exprimieren, präsentiert und von diesen zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden können. Außerdem gelang die Induktion bcr-abl-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten durch dendritische Zellen, die mit reiner, *in vitro* transkribierter full-length p210 kodierender bcr-abl-RNA elektroporiert worden waren.

Bei Patienten mit CML in kompletter zytogenetischer Remission während einer IFN- α Behandlung ergab sich in IFN- γ -ELISPOT-Assays eine gewisse Reaktivität gegen BCR-

ABL, die aber schwächer ausfiel als die gegen *Proteinase 3 (PR3)*- oder *Prame*-gerichteten T-Zellantworten.

7 Literaturverzeichnis

1. Banchereau J, Steinman RM:
Dendritic cells and the control of immunity.
Nature 1998; 392:245-248

2. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts vK, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith MA, Davies T, Stone M:
Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia.
Nature 1983; 306: 277-280.

3. Ben Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D:
The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene.
Science 1986; 233: 212-214.

4. Bocchia M, Wentworth PA, Southwood S, Sidney J, McGraw K, Scheinberg DA, Sette A:
Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules.
Blood 1995; 85: 2680-2684.

5. Bocchia M, Korontsvit T, Xu Q, Mackinnon S, Yang SY, Sette A, Scheinberg DA:
Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides.
Blood 1996; 87: 3587-3592.

6. Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksa OC:
Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4⁺ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide.
Blood 1996; 88: 3522-3527.

7. Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S, Bevan MJ:
Adenovirus mediated delivery of antigenic epitopes into DC by a means of CTL induction.
J Immunol 1997; 158: 3270.
8. Brossart P, Bevan MJ:
Presentation of exogenous antigens on MHC class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines.
Blood 1997; 90: 1594.
9. Brossart P, Grunebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Mohle R, Kanz L, Brugger W:
Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Blood 1998; 92: 4238-4247.
10. Brossart P, Stuhler G, Flad T, Stevanovic S, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W:
Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes.
Cancer Res 1998; 58: 732.
11. Brossart P, Wirths S, Brugger W, L. Kanz:
Dendritic cells in cancer vaccines.
Exp Hematol 2001; 29: 1247.
12. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W:
Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells.
Blood 2000; 96: 3102.

13. Cathcart K, Pinilla-Ibarz J, Korontsvit T, Schwartz J, Zakhaleva V, Papadopoulos EB, Scheinberg DA:

A multivalent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia.

Blood 2004; 103: 1037-1042.

14. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A:

Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells.

Curr Opin Immunol 1997; 9: 10.

15. Clark RE, Dodi IA, Hill SC, Lill JR, Aubert G, Macintyre AR, Rojas J, Bourdon A, Bonner PL, Wang L, Christmas SE, Travers PJ, Creaser CS, Rees RC, Madrigal JA:

Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein.

Blood 2001; 98: 2887-2893.

16. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR:

A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia.

Nature 1982; 300: 765-767.

17. Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV:

The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells.

Blood 1997; 90: 3691-3698.

18. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV:

The molecular biology of chronic myeloid leukemia.

Blood 2000; 96: 3343-3356.

19. Dorfel D, Appel S, Grunebach F, Weck MM, Muller MR, Heine A, Brossart P:
Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro transcribed MUC1 RNA.
Blood, 2004; 103: 1037-1042.
20. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB:
Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells.
Nat Med 1996; 2: 561-566.
21. Druker BJ, Lydon NB:
Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia.
J Clin Invest 2000; 105: 3-7.
22. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL:
Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia.
N Engl J Med 2001; 344: 1031-1037.
23. Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Mologni L, Fanelli M, Bertazzoli C, Marchesi E, Di Nicola M, Biondi A, Corneo GM, Belotti D, Pogliani E, Lydon NB:
Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis.
Blood Cells Mol Dis 1997; 23: 380-394.

-
24. Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani EN, Wilson D:
Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin.
J Biol Chem 1990; 265: 15286-15293.
25. Grunebach F, Muller MR, Nencioni A, Brossart P:
Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes.
Gene Ther 2003; 10: 367-374.
26. Grunebach F, Muller MR, Brossart P:
RNA transfection of dendritic cells.
Methods Mol Med 2005; 109: 47-54.
27. Harrison TR:
Principles of Internal Medicine.
Mc Graw-Hill, New-York, 1998, 14. Auflage.
28. Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale PK, Groffen J:
Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice.
Nature 1990; 344: 251-253.
29. Herold G.:
Innere Medizin.
Eigenverlag, 2004.
30. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON:
An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity.
Cell 1984; 37: 1035-1042.

31. Löffler G, Petrides PE:

Biochemie und Pathobiochemie

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York, 1998, 6. Auflage.

32. Molldrem JJ, Dermime S, Parker K, Jiang YZ, Mavroudis D, Hensel N, Fukushima P, Barrett AJ:

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

Blood 1996; 88: 2450-2457.

33. Molldrem JJ, Clave E, Jiang YZ, Mavroudis D, Raptis A, Hensel N, Agarwala V, Barrett AJ:

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

Blood 1997; 90: 2529-2534.

34. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, Davis MM: Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia.

Nat Med 2000; 6: 1018-1023.

35. Mutis T, Verdijk R, Schrama E, Esendam E, Brand A, Goulmy E:

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

Blood 1999; 93: 2336-2341.

36. Nowell P, Hungerford DA:

A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.

Science 1960; 132: 1497-1501.

37. Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP:
Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T-lymphocytes against tumor antigen in vivo.
J Exp Med 1996; 183: 317.
38. Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T, Soignet S, Bocchia M, Caggiano J, Lai L, Jimenez J, Kolitz J, Scheinberg DA:
Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses.
Blood 2000; 95: 1781-1787.
39. Porgador A, Gilboa E:
Bone-marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes.
J Exp Med 1995; 182: 255.
40. Sawyers CL:
Chronic myeloid leukemia.
N Engl J Med 1999; 340: 1330-1340.
41. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J:
Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase.
Science 289; 2000: 1938-1942.
- 42.** Schmidt RF, Thews G, Lang F:
Physiologie des Menschen
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York, 2000, 28. Auflage

43. Schmidt SM, Schag K, Muller MR, Weck MM, Appel S, Kanz L, Grunebach F, Brossart P:

Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells.

Blood 2003; 102: 571-576.

44. Steinman RM, Cohn ZA:

Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: Morphology, quantitation, tissue distribution.

J Exp Med 1973; 137: 1142-1162.

45. Takahashi T, Tanaka Y, Nieda M, Azuma T, Chiba S, Juji T, Shibata Y, Hirai H:

Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia.

Leuk Res 2003; 27: 795-802.

46. Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, Van Bockstaele DR, Bernema ZN:

Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells.

Blood 2001; 98: 49-56.

47. Westermann J, Kopp J, Korner I, Richter G, Qin Z, Blankenstein T, Dorken B, Pezzutto A:

Bcr/abl⁺ autologous dendritic cells for vaccination in chronic myeloid leukemia.

Bone Marrow Transplant 2000; 25 Suppl 2: S46-S49.

48. Yotnda P, Firat H, Garcia-Pons F, Garcia Z, Gourru G, Vernant JP, Lemonnier FA, Leblond V, Langlade-Demoyen P:

Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia.

J Clin Invest 1998; 101: 2290-2296.

49. Zhou LJ, Tedder TF:

CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells.
Proc Natl Acad Sci U.S.A 1996; 93: 2588-2592.

50. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ:

Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T-cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines.
J Exp Med 1996; 183: 87.

8 Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Peter Brossart für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes. Er war stets trotz seiner zahlreichen Verpflichtungen als Ansprechpartner präsent, hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und ermöglichte dank optimaler Organisation einen zügigen und reibungslosen Ablauf meiner Dissertation.

Ebenso herzlich danken möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Frank Grünebach für die Einarbeitung in die Labormethodik, für seine kontinuierliche Begleitung der Laborarbeit, für seine Geduld, seine Freundlichkeit und seine Antworten auf viele meiner Fragen sowie für die wissenschaftliche Mitbetreuung im Rahmen der Ergebnisauswertung, des Korrekturlesens und der Publikation.

Allen Labormitarbeiter insbesondere Bruni Drotleff, Regina Heselmaier und Sylvia Stephan danke ich sehr herzlich für die Einarbeitung in die Methodik und die laufende technische Unterstützung während meiner Messungen sowie für ihre sehr freundliche Art.

Von ganzem Herzen danke ich Dr. med. Roland Schlecht für seine vielfältigen Anregungen und Ideen beim Zusammenschreiben der Ergebnisse sowie für seine Unterstützung bei der Formatierung und Graphikerstellung.

Meiner Schwester Valdete Mirakaj danke ich für ihre Idee zu dieser Arbeit, für ihre Einarbeitung, für ihr Engagement und ihre Geduld und ganz einfach für ihre Liebe und ihr Dasein. Dieser Dank gilt in gleichem Maße auch für ihren Freund Alexander Schaub.

Meiner Familie, vor allem meiner Mutter Marija sowie meinen Brüdern Agron und Ekrem danke ich für ihre Liebe, ihr Interesse, ihre liebevolle Unterstützung und Begleitung.

Abschließend herzlichen Dank an meine Freunde für ihre liebevolle Begleitung, insbesondere an meine beste Freundin Eva Huebler für ihre wundervolle Art.

9 Lebenslauf

Name	Valbona Mirakaj	
geboren	26. September 1973 in Djakovica - Kosovo	
Eltern	Zef Mirakaj, geb. 19.10.1942, gest. 06.11.2001 Marija Mirakaj, geb. 04.10.1945	
Familienstand	ledig	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Schulbildung	1981 – 1982	Grundschule Neu-Ulm
	1982 – 1984	Grundschule Djakovica
	1984 – 1985	Grundschule Neu-Ulm
	1985 – 1991	Realschule Elly Heuss Ulm
	1994 – 1995	Berufskolleg Ulm, Abschluß: Fachhochschulreife
	1995 – 1997	Technische Oberschule Ulm, Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
Berufstätigkeit	1991 – 1994	Krankenpflegeausbildung Universitätsklinik Ulm
	1994 – 2006	Teilzeittätigkeit Krankenpflege Universitätsklinik Ulm und Tübingen (Urologie, HNO-Intensivstation, Neurochirurgie)
	1995 – 1998	Teilzeittätigkeit als Buchhalterin WPS-Steuerberatung
	1997 – 1998	Ausbildung zur Buchhalterin Abschluß: Staatlich anerkannte Buchhalterin
	Seit 08 / 2006	Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin UKT - Universitätsklinikum Tübingen

Hochschulbildung	1998 - 2004	BWL Studium Fernuniversität Hagen
	1999 - 2006	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
	Frühjahr 2002	Ärztliche Vorprüfung
	Frühjahr 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	Frühjahr 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	30.05.2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung