

Aus dem
Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie
Direktor: Professor Dr. H.-G. Rammensee

Identifizierung von neuen CD8⁺ T-Zell-Epitopen aus dem
Tumorantigen Zytokeratin 7

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Dietrich Alexander RUESS

aus

Filderstadt

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Salih

...in Him we live and move and have our being.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
I. Einleitung.....	9
I.1. Krebsimmuntherapie.....	9
I.1.1. Geschichte, Chancen und Hürden.....	9
I.1.2. Spektrum der Immuntherapie.....	12
I.2. Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit: ein „case report“.....	17
I.3. Zytokeratin 7 als Tumorantigen.....	20
I.3.1. Zytokeratine im allgemeinen und speziellen (CK7).....	20
I.3.2. Tumorantigene.....	23
I.3.3. Konklusion.....	24
I.4. Immunologische Grundlagen	25
I.4.1. Major histocompatibility complex	25
I.4.2. T-Zellen.....	30
I.4.3. Dendritische Zellen	37
I.4.4. Priming.....	38
I.5. Fragestellung.....	40
I.6. Methodischer Hintergrund.....	41
I.6.1. SYFPEITHI.....	42
I.6.2. PBMC-Isolierung.....	43
I.6.3. Magnetische Zellseparation.....	43
I.6.4. In vitro Erzeugung von aus Monozyten abgeleiteten DC.....	44
I.6.5. In vitro priming und Expansion von T-Zellen.....	44
I.6.6. Durchflusszytometrie.....	45
I.6.7. Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	46
I.6.8. Zytotoxizitätstests.....	46
II. Material und Methoden	49
II.1. Material.....	49
II.1.1. Geräte.....	49
II.1.2. Reagenzien, Reagenzgefäße, Verbrauchsmaterialien.....	49
II.1.3. Angesetzte Zellkulturmedien und Puffer.....	51
II.1.4. PBMC-Quellen.....	51
II.1.5. Peptide.....	52
II.1.6. Zytokine und DC-Reifungssignale.....	52
II.1.7. Antikörper und Färbereagenzien.....	53
II.1.8. Tumorzelllinien.....	54
II.1.9. Plasmidvektor.....	54
II.2. Methoden.....	54
II.2.1. Epitopvorhersage mit „SYFPEITHI“	54
II.2.2. Peptid-Synthese.....	54
II.2.3. PBMC-Isolierung	55
II.2.4. Zellzahlbestimmung.....	55
II.2.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	56
II.2.6. Magnetische Zellseparation mit MACS® MicroBeads.....	57

II.2.7. Erzeugung von Dendritischen Zellen aus Monozyten.....	58
II.2.8. Priming und Restimulation.....	59
II.2.9. Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	60
II.2.10. Anreicherung und Expansion spezifischer CD8+ Populationen.....	62
II.2.11. Kultivierung und Charakterisierung von Tumorzelllinien.....	64
II.2.12. HLA-Transfektion.....	65
III. Ergebnisse.....	69
III.1. PeptidAuswahl.....	69
III.2. Priming und Restimulation.....	71
III.3. Anreicherung und Expansion.....	76
III.3.1. Anreicherung.....	76
III.3.2. Expansion.....	79
III.4. Vorbereitung einer Tumorzelllinie für Zytotoxizitätsassays.....	81
III.4.1. HLA-A*02-Durchflusszytometrie.....	83
III.4.2. CK7-Zytospin.....	83
III.4.3. Transfektion.....	84
III.5. Patient.....	84
IV. Diskussion.....	85
IV.1. Allgemeine Strategie.....	85
IV.2. Priming und Restimulation.....	87
IV.3. Anreicherung und Expansion.....	89
IV.4. Transfektion.....	90
IV.5. Ausblick.....	90
V. Zusammenfassung.....	91
VI. Literaturverzeichnis.....	93
Danksagung.....	101
Curriculum Vitae	103

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
Aire	<i>autoimmune regulator</i> (Transkriptionsfaktor)
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Tandemkonjugat Allophycocyanin + cyano dye Cy7
CA19-9	Carbohydrat-Antigen 19-9
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>cell dependent cytotoxicity</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CF	<i>cystic fibrosis</i>
CK	<i>cytokeratin</i>
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP	<i>good manufacturing practice</i>
GVHD	<i>graft versus host disease</i>
GVL	<i>graft versus leukemia (effect)</i>
GVT	<i>graft versus tumor (effect)</i>
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HS	Humanserum
HSCT	<i>hematopoietic stem cell transplantation</i>
hTERT	<i>human telomerase-reverse-transkriptase</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
ICOS	<i>inducible co-stimulator</i>
ICS	<i>intracellular cytokine staining</i>
iDC	<i>immature dendritic cell</i>
IDO	Indoleamindioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ii	invariante Kette
IL	Interleukin

IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
kDa	kilo-Dalton
kRas	<i>Kirsten sarcoma virus homologous rat sarcoma oncogene</i>
LICOS	<i>ligand of ICOS</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
LTA	<i>lipoteichoic acid</i>
MACS®	<i>magnetic activated cell sorting (Miltenyi Biotech)</i>
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
mDC	<i>mature dendritic cell</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MICA	<i>MHC class I chain related protein A</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTEC	<i>medullary thymic epithelial cell</i>
MUC	Mucin
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
PaBlue	<i>Pacific Blue</i>
PAS	<i>Periodic Acid Schiff stain</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBL	<i>peripheral blood lymphocytes</i>
pDC	<i>plasmacytoid dendritic cell</i>
PD-L1	<i>programmed death ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein Komplex
PGE2	Prostaglandin E2
RAG2	<i>recombinase activating gene 2</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Zellkulturmedium</i>
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
TSA	Tumorspezifisches Antigen

I. Einleitung

I.1. Krebsimmuntherapie

I.1.1. Geschichte, Chancen und Hürden

Auch wenn ihm der immunologische Hintergrund und die exakte Wirkungsweise seiner Therapie weitgehend verborgen blieb, geht die erste systematische Rekrutierung des Immunsystems in der Behandlung von Malignomen auf William B. COLEY zurück¹⁻⁴. Als Chirurg am *Memorial Hospital* in *New York City* begann er, schon vor über einhundert Jahren, nach Observation eines Falles in seiner Klinik und ermutigt durch weitere Beschreibungen in den hauseigenen Akten und der anglophonen Literatur, Patienten eine Inokulation mit den Erysipeleregern *Streptokokkus pyogenes* und *Serratia marcescens* bzw. später mit deren Toxinen anzubieten. Es war aufgefallen, dass einige Krebspatienten, vor allem solche die unter Sarkomen litten, im unmittelbaren Zusammenhang mit einer Erysipelinfektion eine Reduktion der Tumorlast, teilweise sogar komplette Remissionen erfuhren. Schon einige Jahre zuvor wurde im deutschen Sprachraum die selbe Entdeckung gemacht^{5,6} und Friedrich FEHLEISEN bereitete mit seinen Beschreibungen der Erysipelkokken als Verursacher der damals, in der präantibiotischen Ära, noch fatalen Infektionskrankheit den Weg⁷. Die Instrumentierung dieser potentiell letalen Keime und derer Toxine sollte explizit nur für chirurgisch und medizinisch hoffnungslose, austherapierte Krebspatienten zum Einsatz kommen. Trotzdem waren die Erfolge beachtlich und das optimierte „COLEY-Toxin“ und die „Fiebertherapie“ wurden in den USA, trotz ausgeprägter Hostilität durch COLEYS neuen Vorgesetzten James EWING, bis zur gesetzlichen Restriktion durch die FDA nach der Contergantragödie und auch der Etablierung der Chemo- und Strahlentherapie, zumindest für einige Jahre ein wichtiger Bestandteil der systemischen onkologischen Behandlungsmöglichkeiten. COLEYS Erklärungsversuche zur Wirkungsweise stützten sich jedoch nicht auf die unspezifische Stimulation des Immunsystems, sondern hauptsächlich auf eine infektiologische Ätiologie von Krebs und schlussfolgernd auf eine

kompetitive Hemmung jener „residenten Flora“ durch die exogen zugeführten Keime oder eine direkte Schädigung derselben durch die Toxine.

Paul EHRLICH war es, der als erster eine Interaktion zwischen Immunsystem und Krebs beschrieb^{8,9}. Er ging von einer Fähigkeit des Immunsystems aus, direkt maligne Zellen erkennen und beseitigen zu können. Seine Ausführungen mündeten einige Jahre später in erweiterter Form in eine Theorie der „Immunosurveillance“: Lewis THOMAS postulierte¹⁰ und Frank M. BURNET arbeitete aus,^{11,12} dass im Säugerorganismus ständig entartete Zellen entstünden, die in den allermeisten Fällen jedoch immunologisch attackiert und eliminiert würden und nur bei Versagen dieses Kontrollmechanismus in klinisch apparente Malignome auswachsen könnten. Diese herausragende Bedeutung des Immunsystems als Kontrollfaktor bei der Krebsentstehung wurde jedoch immer wieder in Frage gestellt¹³ und mit den sich über die Jahre evolvierenden Methoden in der Immunologie weiteren Überprüfungen unterzogen. Gegen Ende der 1970er Jahre schien sie sogar, vor allem durch die Experimente von Osias STUTMAN an Nacktmäusen, die keinen Thymus entwickeln können, zunächst grundsätzlich widerlegt¹⁴. Später ermutigten neue Kenntnisse über die trotzdem rudimentär vorhandene T-Zellpopulation der Nacktmäuse und über die Existenz der NK-Zellen zu weiteren Experimenten. Zwischenzeitlich war auch mit der Entdeckung der protektiven Rolle des Zytokins Interferon gamma (IFN γ) und der des Perforins als Effektormechanismus von Lymphozyten in Mausmodellen das Interesse an der Immunosurveillance-theorie wieder entfacht worden. Mit Hilfe von RAG-2 *knock-out* Mäusen, die ohne dieses *recombinase activating gene* nicht zum Rearrangement von Antigenrezeptorgenen fähig und somit tatsächlich komplett T-Zell-, B-Zell- und auch NKT-Zell-defizient sind, war es möglich, definitiv die Schutzfunktion des Immunsystems bei Krebsentstehung und -kontrolle darzulegen und die Bedeutung von Lymphozyten und Interferonen in diesem Prozess zu unterstreichen¹⁵.

Die umfangreichen experimentellen Daten aus Mausexperimenten in Zusammenschau mit den klinischen Beobachtungen am Menschen – wie erhöhte Tumorzinidenzen bei immundefizienten Patienten, beispielsweise im Rahmen einer Immunsuppression nach Transplantation; spontane klar definierte Immun-

antworten in Krebspatienten und auch die Bedeutung der Zahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten für die Prognose der Erkrankung – veranlassten zu einer endgültigen Bestätigung und zusätzlichen Verfeinerung der Surveillancetheorie in ein sogenanntes „Immunoediting“¹⁶⁻¹⁸. DUNN et al. beschreiben hierbei den Einfluss des Immunsystems auf Krebsentstehung nicht mehr als *on-off* Phänomen, sondern dreiphasig mit *elimination*, *equilibrium* und *escape*. Diese drei Phasen werden nicht nur der potentiellen Schutz- und Kontrollfunktion des Immunsystems gerecht, die klinisch noch inapparente Entartungen beseitigt oder kontrolliert, sondern beschreiben und erklären anhand des Selektionsdruckes der in diesem Vorgang gleichzeitig auf die Krebszellpopulation ausgeübt wird auch besser das sukzessive Auftreten verminderter Immunogenität bzw. von Toleranz maligner Zellen, sowie die Entstehung von Immuninhibition durch den Tumor selbst. Dieser Vorgang ist als extrinsischer onkogenetischer Faktor ergänzend zu den intrinsischen Vorgängen in der Krebszelle zu verstehen. Jedenfalls zwingt diese Interaktion die entartete Zelle gewissermaßen dazu - vergleichbar mit dem Vorgang der Resistenzentwicklung bei Infektionserregern gegenüber Antiinfektiva - bestimmte Evasionsmechanismen zu entwickeln. Das Arsenal an schon entdeckten Defensivstrategien ist umfangreich und komplex. Die verschiedenen Mechanismen und beteiligte Strukturen sollen hier nur kurz erwähnt, jedoch nicht erschöpfend erklärt und abgehandelt werden. Wo im Rahmen dieser Arbeit detailliertere Behandlungen folgen sind Kapitelreferenzen vermerkt.

Zuerst ist der oben schon genannte Immunogenitätsverlust der Krebszelle infolge beispielsweise einer Herunterregulation der membranständigen Histokompatibilitätskomplexe (*major histocompatibility complex* [MHC]; siehe I.4.1.), der Antigenprozessierungsmaschinerie in Zytosol und endoplasmatischem Retikulum (siehe ebenfalls I.4.1.) oder auch infolge einer verminderten Expression eines Tumorantigens (siehe I.3.2.) selbst zu erwähnen. Zudem kann ein Fehlen von kostimulatorischen Molekülen (siehe I.4.4.) zu T-Zell-Anergie, d.h. zu einer spezifischen Toleranz führen. Auch lokale und systemische Suppression der Immunantwort wird erlernt. Neben der Bereitstellung von, die gewünschte Immunreaktion hemmenden, Zytokinen (IL-4, IL-10, *transforming growth factor-β* [TGF-

β]) und Enzymen (Indoleamindioxygenase [IDO], Arginase-1, Nitritoxidsynthase-2 [NOS-2]) können verschiedene Effektorzellen auch direkt über Rezeptorinteraktion gehemmt (Expression von: *programmed death ligand-1* [PD-L1], *soluble MHC class I chain-related protein A* [sMICA], FasLigand und *tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand* [TRAIL]) oder deren Angriffspunkte moduliert werden (Herunterregulation von MHC und Todesrezeptoren wie CD95/Fas, TRAIL-Rezeptor und Etablierung von intrazellulären Anti-Apoptosemechanismen wie inhibitor of apoptosis proteins [IAPs]). Vor allem auch die Rekrutierung von regulatorischen T-Zell-Populationen spielt eine entscheidende inhibitorische Rolle.¹⁹⁻²¹

Diese Immunevasion ist heute weithin als siebte Säule der Onkogenese etabliert und akzeptiert - neben den grossen „*six hallmarks*“ (1) Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, (2) Ignoranz von Wachstumsinhibitionssignalen, (3) Umgehen von Zelltod, (4) grenzenlose Replikation, (5) Erhaltung der Angiogenese und (6) Metastasierungspotenzial.^{18,21,22}

Vor geschildertem Hintergrund ist es nun durchaus erstrebenswert dieses natürliche und vor allem auch spezifische, nebenwirkungsarme Potenzial des Immunsystems als weiteres ergänzendes Standbein neben Chemotherapie, Chirurgie und Bestrahlung in der onkologischen Therapie zu nutzen und zu etablieren. So ist es im Rahmen vieler Studien Ziel selektiv Krebsantigene anzusteuern, neu eine Immunantwort in Krebspatienten zu induzieren bzw. eine schon vorhandene zu stärken, zu modulieren und/oder *escape*-Mechanismen des Malignoms zu schwächen, ja zu unterbinden. Auch passive Immunisierungen können zur Verfügung gestellt werden. Systemische Wirksamkeit und immunologisches Gedächtnis sind attraktive Charakteristika im Kampf gegen Metastasierung und Rezidiv.

I.1.2. Spektrum der Immuntherapie

Mit wachsender Evidenz der Relevanz des Immunsystems für die Entstehung und Kontrolle von Krebs und der parallel fortschreitenden Entwicklung immunologischer Methoden verbreitert sich auch das Spektrum immuntherapeutischer

Möglichkeiten. Es handelt sich um ein besonders in den letzten drei Jahrzehnten sehr dynamisches, wachsendes Feld mit vielen Herausforderungen. So sollen hier nur in Kürze, für einen groben Überblick, die fünf wichtigsten „Spektralfarben“ mit einigen Beispielen und Referenzen erwähnt werden. Es handelt sich um Antikörper, T-Zell-Immunität, hämatopoetische Stammzelltransplantation, NK-Zellen und Immunmodulation:

Antikörper

Die Antikörper sind klinisch schon sehr umfangreich etabliert und finden nicht nur in der Onkologie ein breites Anwendungsgebiet. Der Begriff selbst geht auf Paul EHRLICH zurück, der die Fähigkeit der spezifischen Erkennung einer Zielstruktur als „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ bezeichnete⁹. Mit der Entwicklung der Hybridomtechnologie durch KOHLER und MILSTEIN²³, bei der Plasmazellen (terminal differenzierte Effektor-B-Zellen) aus der Milz einer immunisierten Maus mit einer Myelomzelllinie fusioniert werden und dann als Hybridom - in der Vereinigung von Immunglobulinproduktion (Plasmazelle) und Immortalität (Myelomzelle) - kontinuierlich monoklonale Antikörper sezernieren, war erstmals der Weg geebnet für einen gezielten spezifischen humoralen „Zauberkegel“-Einsatz. Gentechnische Veränderungen ermöglichen die Herstellung von chimären, partiell oder auch komplett humanisierten Antikörpern, die eine deutlich verringerte Angriffsfläche für Unverträglichkeitsreaktionen bieten.

Die natürlichen Funktionen eines Antikörpers sind divers und abhängig von der Subklasse. Dazu gehören (1) Neutralisierung eines Pathogens oder Toxins, (2) Opsonisierung, d.h. Phagozytosevermittlung, (3) Zelltod durch Komplementaktivierung (CDC: *complement-dependent cytotoxicity*), (4) *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC), d.h. Vermittlung von zellulärer Zytotoxizität vor allem durch NK-Zellen,²⁴ aber auch (5) direkte Apoptoseinduktion und (6) Blockade von Signaltransduktionswegen. All diese Mechanismen spielen in der Onkologie eine Rolle. So neutralisiert beispielsweise Bevacizumab den angiogenetischen und immunsuppressiven Wachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor* [VEGF] und so markieren repräsentativ Trastuzumab und Rituximab die Oberflächenmarker HER2/neu (*human epidermal growth factor recep-*

I. Einleitung

tor 2/neu) bzw. CD20, die verschiedenen zytotoxischen Mechanismen hauptsächlich an (eine Untergruppe von) Brustkrebszellen bzw. B-Zell-Lymphome vermittelnd.

Zusätzlich können Konjugate mit Chemotherapeutika, Radioisotopen oder Toxinen hergestellt werden, die deren tödliche Wirkung an klar definierte Zielstrukturen transportieren sollen. Außerdem vermögen bispezifische Konstrukte Effektorzellen wie T-Lymphozyten oder NK-Zellen und Zielzellen zusammen zu führen. Auch funktionell kann inhibierend oder stimulierend in Regulationsmechanismen eingegriffen werden. Hier sollen stellvertretend Cetuximab, Inhibitor der Wachstumsfaktor-Rezeptortyrosinkinase *epidermal growth factor receptor* [EGFR] (auch Trastuzumab hat zusätzlich eine analoge Funktion), und Ipilimumab, ein erst kürzlich in den USA zugelassener immunmodulierender Antikörper der den die T-Zell-Homöostase inhibierend regulierenden B7(CD80/CD86)-Liganden *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4* [CTLA-4] blockiert, erwähnt werden. Besonders bei letzterem erweist sich die Hoffnung, dass Antikörper neben ihren genannten Funktionen auch zelluläre Reaktionen mit Eigendynamik induzieren und verstärken können als berechtigt.^{20,25}

T-Zell-Immunität: Vakzination und adoptiver Transfer

Eine aktive Immunisierung ist nur unter Einbezug des T-Zell-Armes (siehe I.4.2) des adaptiven Immunsystems möglich. Die Vakzinierung hat zum Ziel für ein Tumorantigen (siehe I.3.2.) spezifische T-Zellen zu induzieren, die direkt therapeutisch wirksam sind indem sie Zytotoxizität vermitteln oder auch die Bildung von Antikörpern unterstützen. Idealerweise verkörpern sie dann - zusammen mit den eventuell beteiligten B-Zellen - ein immunologisches Gedächtnis, das Rezidive hinauszögern, verhindern kann.

Individualität, Diversität und Dynamik des Antigenrepertoires eines nicht-viral induzierten Tumors erschwert einen prophylaktischen Ansatz, der nur für das häufig von humanen Papillomviren initiierte Zervixkarzinom oder das sich potentiell aus einer Hepatitis B entwickelnde hepatozelluläre Karzinom schon erreicht ist.

Identifikation geeigneter Zielantigene, Optimierung von Applikationsart, -ort, -dosis, -frequenz, eingesetzten Adjuvantien usw. werden in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien erstrebt. Dieser Prozess ist arbeitsintensiv und weist nur langsam Erfolge auf, denn die Studienpopulationen zeichneten sich bisher meist durch fortgeschrittene Krankheitsstadien, hohe Tumorlast und ein unter anderem durch intensive Vorbehandlung in Mitleidenschaft gezogenes Immunsystem aus. Doch Daten adoptiver Transfers *ex vivo* stimulierter und expandierter T-Zellen vor allem beim malignen Melanom sind überzeugend, bestätigen das therapeutische Potenzial und ermutigen zur Beharrlichkeit.²⁶

Da das T-Zell-Repertoire eines Krebspatienten durch Selbsttoleranz, Anergie und Inhibition kompromittiert sein kann ist auch der adoptive Transfer von Lymphozyten mit transduzierten, für einen bestimmten Epitop:MHC-Komplex spezifischen T-Zell-Rezeptor (siehe I.4.2.) Gegenstand aktueller Forschung.^{20,27}

Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)

Die HLA-idente allogene HSCT ermöglicht schon relativ lange die Restitution der Hämatopoese nach irreversibler Schädigung des Knochenmarks durch Hochdosischemotherapie. Dieses Verfahren erlaubt es Resistenzen verschiedener fortgeschrittener bösartiger Erkrankungen (vor allem von Leukämien und Lymphomen) gegenüber Zytostatika mit für den Patienten eigentlich letalen Dosen zu überwinden und subsequent dessen Blutbildung und Immunsystem mit Stammzellen eines gesunden weitmöglichst HLA-identischen Spenders wieder herzustellen. Heute ist bekannt, dass ein grosser Anteil am Erfolg dieser Strategie gar nicht auf die Medikamente zurückzuführen ist, sondern auf die Wirkung dieses gesunden neuen Immunsystems (*graft versus leukemia/lymphoma effect* [GVL], *graft versus tumor effect* [GVT] durch NK- und T-Zell-Alloreaktivität, Minorhistoinkompatibilität, spezifische T-Zellantworten und eventuell auch B-Zell-Beteiligung). Dies führte zur Einführung einer dosisreduzierten Konditionierung und zum Versuch der Verfügbarmachung der Transplantation auch für labilere Patienten.

Mangel an typisierten identischen Spendern veranlasste außerdem dazu Eltern oder Geschwister als Donoren zu gewinnen, deren Phänotyp ja - bis auf 25%

I. Einleitung

der Geschwister - nur haploid sein kann. Anfängliche ausgeprägte alloreaktive Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen (*graft versus host disease* [GVHD]) sind nun besser unter Kontrolle. Entscheidend beteiligt sind dabei nämlich vor allem die allogenen $\alpha\beta$ -T-Zellen (siehe I.4.2). NK-Zellen und eventuell $\gamma\delta$ -T-Zellen (siehe ebenfalls I.4.2) sind vielmehr in der Lage hauptsächlich als anti-Tumor-Effektoren zu agieren. So werden deshalb haploidente Transplantate vor dem Transfer aufgereinigt, d.h. von T-Zellen befreit. Teilweise untersuchen Studien auch die Kombination mit Antikörpern. Dabei soll das Funktionsspektrum der NK-Zellen um die ADCC erweitert werden.^{20,28}

NK-Zellen

Analog zum oben erwähnten adoptiven T-Zelltransfer könnte es vor dem Hintergrund einer HSCT - besonders im haploidenten Falle - erfolgsversprechend sein bei Rezidiven oder *minimal residual disease* [MRD] einer Leukämie oder eines Lymphoms aufgereinigte NK-Zellpopulationen vom selben Spender zu infundieren. NK-Zellen sind Lymphozyten des angeborenen Immunsystems die ihre Zielzellen ohne vorangehende Aktivierung antigenunabhängig erkennen und lysieren können. Sie verfügen über direkt aktivierende und inhibierende Rezeptoren die ein „verändertes Selbst“ einer Zelle im Rahmen viraler Infektion oder Entartung, verkörpert durch *mismatch* oder Fehlen von MHC Klasse I Molekülen oder verstärkte Expression von stressinduzierten Oberflächenmarkern wie *MHC class I chain-related protein A/B* [MIC A, MIC B], detektieren.

Ihre Fähigkeit haploidente Tumorzellen mit eventueller *down-regulation* des MHC Klasse I Repertoires und Stressstoffwechsel ohne substantielle GVHD-Nebeneffekte bekämpfen zu können liegt also auf der Hand.^{20,29,30}

Immunmodulation

COLEY's eingangs beschriebene Therapieform lässt sich am ehesten unter der Rubrik der Immunmodulation einordnen. Sein Bakterien-Toxin-Cocktail stimulierte wahrscheinlich hauptsächlich über *toll-like*-Rezeptoren [TLR] das angeborene Immunsystem, ermöglichte effektive Antigenpräsentation und somit Rekrutierung und Stimulation der adaptiven Effektoren (siehe I.4.3. und I.4.4.). Heute

macht man sich natürliche *pathogen-associated molecular patterns*, die Liganden der TLRs, und ihre synthetischen Äquivalente als Immunstimulanzien und Adjuvanzen für Vakzinationen zu nutze. Dazu gehören Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren (LTA), Flagellin, bakterielle DNA, virale RNA und viele mehr.

Andere Adjuvanzen wie Aluminiumsalze, Liposomen, ölige Immersionen, Saponine etc. beeinflussen die Pharmakokinetik des Impfstoffes, erleichtern die Aufnahme in die antigenpräsentierenden Zellen (siehe I.4.3.) oder sorgen für eine langlebige Immunantwort.

Rekombinante Zytokine wie IL-2, IL-12, IL-15, IFN α , IFN γ , *granulocyte-macrophage colony stimulation factor* [GM-CSF] werden in Studien systemisch modulierend eingesetzt und auch blockierende Antikörper gegen ungünstige Zytokine (IL-10, IL-23, *transforming growth factor β* [TGF β]) und gewisse Rezeptoren/Liganden (CTLA-4, PD-L1, CD40) oder die Elimination hemmender regulatorischer T-Zellen - mit *low-dose* Cyclophosphamid bzw. eventuell, in den USA, rekombinantem IL-2-Diphtherietoxin das eine gewisse Affinität zu Treg zeigt - sollen zunehmend eine Rolle spielen. Thalidomid und seine Analoga kommen mit ihrem Einfluss auf Zytokinmilieus bei hämatopoetischen Malignomen zum Einsatz. Desweiteren besteht die Möglichkeit oben genannte inhibitorische Enzyme mit blockierenden Pharmaka zu inaktivieren.

Es wird von Vorteil sein Tumorstimmulanzien mit geeigneten immunmodulatorischen Ansätzen zu kombinieren.^{19,20,31}

I.2. Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit: ein „*case report*“

Grundlage der vorliegenden Arbeit ist der Fall eines jungen Patienten der sich mit einem innerhalb von 15 Monaten zweifach extern operierten und unter Chemotherapie weiter progressiven Pankreaskarzinom in der *Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie Tübingen* vorstellte.³²

Zunächst war bei dem ansonsten gesunden 26-jährigen Studenten nach einer Episode von etwa zwei Monaten mit unspezifischen abdominellen Beschwerden ohne Gewichtsverlust und ohne Pankreatitiszeichen per Computertomogramm

I. Einleitung

eine grosse zystische Raumforderung im Pankreasschwanz dargestellt worden. Das histologische Präparat der Pankreaslinksresektion hatte ein radikal reseziertes gut differenziertes intraduktales und zystisch-tubulopapilläres Adenokarzinom des Pankreas ohne desmoplastische Stromareaktion offenbart (siehe **Abb.1**) - Diese ungewöhnliche Diagnose lässt sich schwer den bekannten Entitäten zuordnen und standardisierte Therapiemodalitäten sind deshalb hierfür nicht etabliert.

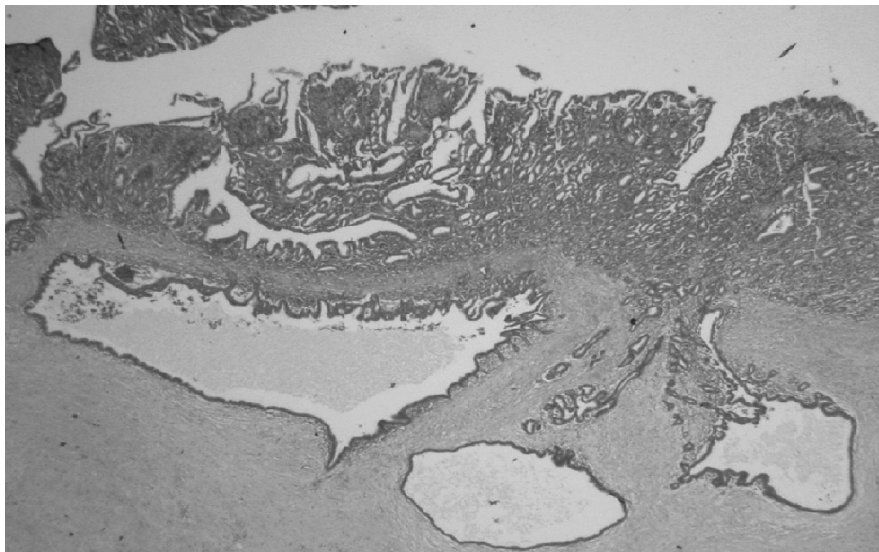


Abb.1 Intraduktales zystisch-tubulopapilläres Pankreasadenokarzinom in gangähnlichen und zystischen Mustern wachsend mit zylindrischen Tumorzellen in tubulopapillären Formationen und lymphozytärem Stroma (Hämatoxylin-Eosin, Originalvergrößerung x200). Aus Ref.32.

Schon fünf Monate später fühlte sich der Patient wieder durch eine deutliche abdominelle Raumforderung gestört, präsentierte sich jedoch in ordentlichem Allgemeinzustand. Das am Omentum majus und peripankreatisch lokalisierte histologisch identische Rezidiv war zu diesem Zeitpunkt nur noch marginal resektabel, es folgte die Einleitung einer adjuvanten Chemotherapie mit Gemcitabin und 5-Fluorouracil. Progression trotz dieses Regimes veranlasste dann zur Überweisung an die Universitätsklinik Tübingen.

Dort zeigte die erneute Bildgebung zahlreiche lokale zystische Rezidive in Pankreaskopf, Magen, Colon transversum und Leberhilus, unsicher auch peritoneal im rechten oberen Quadranten. Distant Metastasen konnten nicht entdeckt werden und der Patient war unter Entlastung der großen Zysten mit perkutanen Drainagen weiterhin in überraschend gutem Allgemeinzustand. Es fiel - zehn

Monate nach dem zweiten Eingriff - die Entscheidung zur radikalen Multiviszeralresektion von Magen, Duodenum, Restpankreas, extrahepatischen Gallengängen und Colon transversum, intraoperativ ergänzt durch partielle Peritonektomie und intraabdominale Chemotherapie für 90 Minuten mit Mitomycin C 40mg/m². Die Bildgebung vor Entlassung konnte keinen Tumor mehr nachweisen. Histologisch bestätigte sich erneut der Befund. Dichte perifokale Lymphozyteninfiltrate ergänzten das Bild. Seröses, PAS negatives (*periodic acid Schiff stain*: färbt Proteoglykane, Mucoproteine und Glykoproteine), gut differenziertes papillär und tubulopapillär angeordnetes Zylinderepithel exprimierte kräftig Zytokeratin 7 (siehe **Abb.2**), nur schwach Zytokeratin 8 und 20, war positiv für MUC1, und zu 30% für Ki-67, einem Proliferationsmarker zur Abschätzung der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation. Nicht nachgewiesen werden konnten CA19-9, MUC2, HER2/neu, c-kit (u.a. ein proto-Onkogen) und EGFR. Die drei Letzgenannten sind allesamt Wachstums- und Proliferationssignale vermittelnde Rezeptortyrosinkinasen für die gezielte Therapiestrategien wie Antikörper oder *small molecules* zur Verfügung stehen.

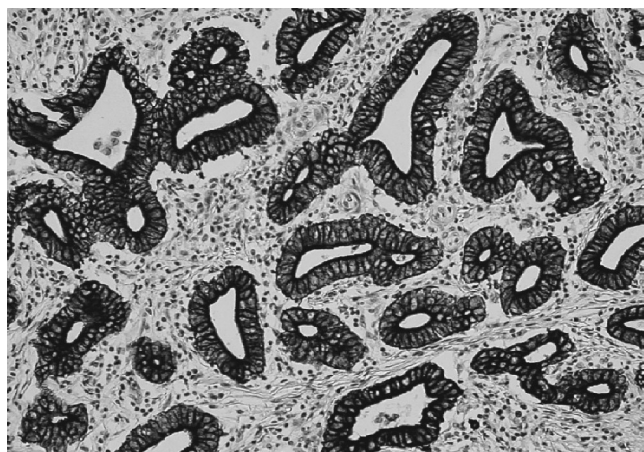


Abb.2 Immunohistochemisch zeigen die Tumorzellen eine ausgeprägte zytoplasmatische Expression von Zytokeratin 7 (anti-Zytokeratin 7, Originalvergrößerung x400). Aus Ref.32.

Sieben Monate später behinderte ein weiteres Rezidiv die Jejunumpassage. Infiltrationen der Arteria hepatica und Vena portae beschränkten den vierten Eingriff auf eine palliative Kontinuitätswiederherstellung. Unter sich anschließender palliativer Chemotherapie mit Oxaliplatin und 5-Fluorouracil zeigte der Tumor langsame Progredienz, sodass das Platinagens durch Irinotecan ersetzt wurde.

I. Einleitung

Obwohl der Verlauf über drei Jahre bis zu diesem Zeitpunkt ohne Metastasierung und mit weiterhin ordentlichem Allgemeinzustand immer noch als günstig zu bezeichnen war, befand sich der noch sehr junge Patient am Ende einer therapeutischen „Sackgasse“. Könnte sich durch eine Tumorstimulation - auch vor dem Hintergrund der ausgeprägten lymphozytären Infiltrate - ein weiterer Horizont erschließen lassen?

Das membranständige Proteoglykan MUC1 sowie das ebenfalls detektierte Apoptoseinhibitorprotein *survivin* – beides auch funktionell relevante Tumorantigene - konnten sofort als Zielstrukturen anvisiert werden. Sie sind etablierte immunogene Tumorantigene für die auch schon publizierte T-Zell-Epitope (die kleinsten immunogenen Einheiten eines Proteins – siehe I.5.) passend zu einzelnen HLA-Allelen des Patienten existierten.^{33,34} Um das Spektrum der Immunantwort jedoch möglichst breit zu gestalten und eine Tumorevasion zu vermeiden, sollte als zusätzliches Tumorantigen das hier kräftig überexprimierte Zytokeratin 7, für das bisher noch keine Epitope bekannt waren und keine Daten zur Immunogenität vorlagen, genutzt werden.

I.3. Zytokeratin 7 als Tumorantigen

I.3.1. Zytokeratine im allgemeinen und speziellen (CK7)

Allgemein

Zytokeratine gehören als Intermediärfilamente zu den Strukturproteinen des eukaryoten Zytoskeletts. Die fadenförmigen Strukturen, die das dreidimensionale Netz dieses Zytoskeletts ausbilden, werden in drei Gruppen unterteilt. Zwischen den für Zellbeweglichkeit und -kontraktion essentiellen actinhaltigen Mikrofilamenten (Durchmesser ca. 6nm) und den Mikrotubuli (ca. 12nm), die bei Mitose, Vesikeltransport und Zilienmotilität entscheidend sind, ordnen sich, anhand ihres Durchmessers beurteilt - und wie der Name auch suggeriert - die 8-12nm starken Intermediärfilamente ein. Sie sind als Stützgerüst hauptsächlich für Stabilität verantwortlich, die sie für Epithelien und Muskulatur, mündend in die membranständigen Adhäsionskomplexe der Desmosomen und Hemidesmosomen, auch über Zellgrenzen hinaus zu vermitteln vermögen. Es existieren

sechs Untergruppen von denen die ersten beiden (I und II) die in Epithelzellen aufzufindenden sauren respektive neutral-basischen Zytokeratine für sich beanspruchen. Die Intermediärfilamente der Muskelzellen (Desmin), Astrozyten und anderer Gliazellen (*glial fibrillary acidic protein* [GFAP]), peripherer Neuronen (Peripherin) und Zellen mesenchymalen Ursprungs (Vimentin) machen die dritte Gruppe (III) aus. Neuronale Neurofilamente (IV), die Lamine der Zellkerne (V) und das in (neuronalen) Stammzellen nachgewiesene Nestin (VI) komplettieren das Spektrum.

Die Familie der Keratine ragt jedoch durch ihre molekulare Diversität heraus. Insgesamt 54 funktionelle Gene sind bekannt. Die etwas leichteren (ca. 40-64kDa) und sauren Typ I Keratine werden hauptsächlich von Chromosom 17q kodiert, die größeren (ca. 52-67kDa) basisch-neutralen Typ II Keratine von Chromosom 12q. Die Proteinketten der Moleküle sind sich strukturell jedoch sehr ähnlich und weisen alle zentral eine 310-350 Aminosäuren lange Domäne reich an α -Helices auf. Diese Region ermöglicht eine spontane spiralförmige Dimerisierung einer Typ I mit einer Typ

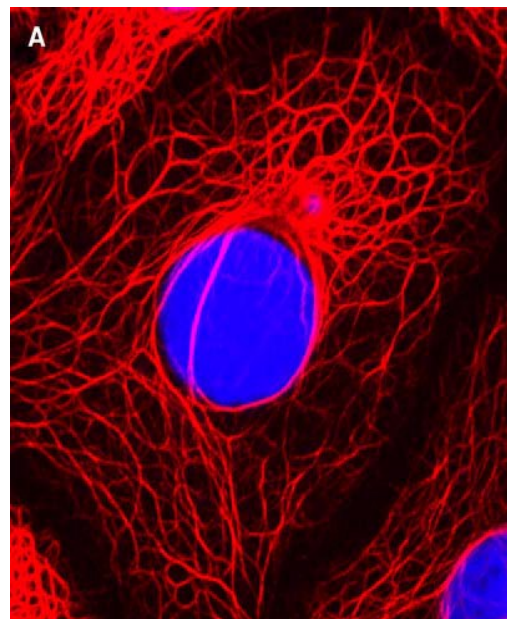


Abb.3 Immunfluoreszenzmikroskopie einer Lebezellkarzinomlinie (Zytokeratin 18 rot, DNA blau) *Aus Ref.36.*

II Kette. Zwei dieser ca. 50nm langen Dimere können sich antiparallel zusammenlagern und ein Tetramer bilden, den Hauptbaustein des Protofilaments. Jenes wiederum verwickelt sich mit einer weiteren solchen Tetramerkette zur Protofibrille, die sich dann letztendlich zusammen mit drei ihrer Art in das fertige Keratinfilament verflechtet. Dieser Vorgang geschieht für zytoplasmatische Keratine *in vitro* auch ohne Hilfsproteine, muss also in der Sequenz selbst „kodiert“ sein.

Nicht alle Gene kommen simultan in einer bestimmten Epithelzelle zum Einsatz, vielmehr findet man abhängig von der Art des Epithels und vom Differenzierungszustand ein bestimmtes Muster, das immer aus einer Koexpression min-

destens eines Vertreters beider Typen besteht. Weil dieses Zytokeratinprofil auch in malignen Zellen sehr häufig konserviert bleibt hat es in der immunhistopathologischen Diagnostik von Karzinomen besondere Bedeutung erlangt. Besonders hilfreich ist es bei niedrig differenziertem Gewebe oder einer Metastase mit unbekanntem Primärtumor.^{35,36}

In den letzten Jahren verstärkten sich die Hinweise darauf, dass gewisse Zytokeratine neben ihrer Bedeutung für Zellintegrität und -stabilität auch bei Zellmotilität, -signaltransduktion, -wachstum und Proteinsynthese eine Rolle spielen. Bei Krebs scheinen manche sogar als Regulatoren der Tumorigenese in Erscheinung zu treten und Zellinvasion bzw. Metastasierungspotenzial beeinflussen zu können. Desweiteren sind Auswirkungen auf die Chemotherapiesensitivität beschrieben. So könnten in Zukunft in gewissen Fällen anhand des Zytokeratinprofils auch Aussagen zur Prognose getroffen werden.³⁷

Zytokeratin 7 (CK7)

Mit seinem Molekulargewicht von 54kDa und einem isoelektrischen Punkt bei pH 6.0 ist das Zytokeratin 7 den schwereren und mehr neutral-basischen Typ II Keratinen zugehörig. Das kodierende Gen *KRT7* befindet sich auf Chromosom 12q13.13 und beinhaltet Information für eine Kette von 469 Aminosäuren (Sequenz siehe III.1.). Physiologisch exprimiert wird CK7 in Kombination mit dem Typ I Keratin CK19 vor allem in duktalem Epithelien wie Gallen- und Pankreasgängen, Brustdrüsengängen und den Sammelrohren der Nieren. Aber auch in Urothel, Mesothel und luminalen Zellen respiratorischen Epithels ist es zu finden.

Die große Mehrzahl der Pankreasadenokarzinome, cholangiozellulären Karzinome, Adenokarzinome der Ovarien, des Uterus, der Lunge und des Ösophagus ist CK7 positiv. Außerdem trifft dies zu für papilläre und chromophobe Nierenzellkarzinome, duktales und lobuläre Mammakarzinome, Urothelkarzinome und für viele Speicheldrüsen- und Schilddrüsentumoren.^{35,36}

In Pankreasadenokarzinomen ist CK7 regelmäßig überexprimiert.^{38,39}

I.3.2. Tumorantigene

Entscheidend für die Entstehung bzw. Induktion einer Immunantwort gegen Malignome ist deren Andersartigkeit im Vergleich zu Normalgewebe. Die Tumorzellen präsentieren aufgrund ihrer Entartung ein vom gesunden Zustand abweichendes Proteinrepertoire. Folgende Kategorien unphysiologischer Proteinexpression haben Antigencharakter, kann das Immunsystem also als „fremd“ erkennen und werden deshalb bekämpft: tumorspezifische Antigene (TSA) oder tumorassoziierte Antigene (TAA) wie Differenzierungsantigene, *cancer-testis-antigens*, überexprimierte Antigene und viral assoziierte Antigene.

Tumorspezifische Antigene

TSA sind Strukturen die so nur in oder auf einer Tumorzelle zu finden sind. Zu ihnen zählen distinkte Mutationen die über eine Deletion mit Verschiebung des Leserasters oder über einen Basenaustausch mit Veränderung eines kodierenden Triplets zu Modifikationen des *open-reading-frames* und/oder der Aminosäuresequenz eines Proteins führen. Auch Spleißvarianten oder chromosomale Aberrationen - beispielsweise translokationsbedingte Genfusionen - können abnormale Proteine herbeiführen.

Andere sind Produkt einer Reaktivierung ontogenetischer Gene, die physiologisch nur in der Embryogenese aktiviert und im adulten Organismus üblicherweise stillgeschaltet sind.

Die TSA sind „echt fremd“, tatsächlich spezifisch für das maligne Gewebe und deshalb optimale Ziele für eine nebenwirkungsarme Vakzination.

Tumorassoziierte Antigene

Die Gruppe der TAA ist etwas größer. Ihre Expression ist jedoch nicht auf das Tumorgewebe restringiert. Somit ist die Kapazität des T-Zellrepertoires (siehe I.4.2.) eines Patienten die Struktur als „fremd“ zu erkennen geringer und sind autoimmune Nebeneffekte häufiger.

Differenzierungsantigene finden sich beispielsweise beim Melanom. Bestimmte für die Melanozytendifferenzierung reservierte Gene werden eventuell in Krebszellen kontinuierlich exprimiert. Spontane oder induzierte T-Zell Immunität kann

I. Einleitung

mit Vitiligo einhergehen, Autoimmunität ist aber auf die Melanozytenreihe beschränkt.

Cancer-testis-antigens kommen, wie der Name schon sagt, nicht nur in verschiedenen Tumorgeweben sondern auch in Keimzellen vor. Eigentlich handelt es sich um Produkte von Genen die nur in Keimzellen exprimiert, aber wahrscheinlich durch epigenetische Veränderungen (z.B. Demethylierung) in Krebszellen aktiviert werden können.

Virale Antigene können unter Umständen auch tumorspezifische Antigene sein, jedenfalls stammen sie von onkogenetisch relevanten Viren wie humanen Papillomviren, Hepatitis B/C Virus oder Epstein-Barr-Virus.

Überexprimierte Antigene sind ubiquitär verbreitete Proteine, die jedoch in stark überdurchschnittlichen Mengen von malignen Zellen produziert werden. Vorteil ist eine hohe Präsentationsfrequenz über den MHC-Apparat (siehe I.4.1.), Nachteil eine eher niedrige Wahrscheinlichkeit für hochaffine T-Zellen im Patientenrepertoire, bedingt durch die Selektion im Thymus (siehe I.4.2.). Im Erfolgsfall ist außerdem das Risiko für Autoimmunität relativ hoch.^{19,20,40,41}

Eine regelmäßig aktualisierte Sammlung publizierter von T-Zellen auf menschlichen Tumoren erkannter Tumorantigene und derer T-Zell-Epitope findet sich unter: <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>

I.3.3. Konklusion

Zytokeratin 7 ist somit als überexprimiertes Protein geeignet für eine Tumoringpfung - vor allem als Ergänzung zu weiteren, möglichst tumorspezifischen Antigenen im Rahmen einer Multiepitopvakzine. Eine Kombination verbreitert das Spektrum der Zielstrukturen und verringert das Risiko für Tumorescape. Diese Strategie ist trotz Beschreibungen von „*Epitopspreading*“, der selbständigen kaskadenartigen Ausweitung der Immunantwort auf weitere Antigenepitope in einem inflammatorischen Milieu nach Immunisierung mit einem einzelnen Epitop, sinnvoll.

Profitieren könnten nicht nur der junge Patient aus der Fallvorstellung, sondern womöglich noch viele weitere Pankreaskarzinompatienten. Auch ein Einsatz

bei einer Reihe anderer Tumoren die häufig CK7 exprimieren, somit möglicherweise überexprimieren, wäre denkbar. Die Immunhistochemie für CK7 gehört in der Pathologie zum Routinerepertoire der Karzinomdiagnostik. Anhand der Färbemuster lassen sich von erfahrenen Kollegen gezielt Aussagen zur Expressionsquantität treffen. Es bedarf also keiner zusätzlichen Mittel oder Methoden.

Die vorliegende Arbeit begleitet das Zytokeratin 7 auf dem Weg vom Tumorantigen zum Impfstoff. Vor der Formulierung der exakten Fragestellung sollen jedoch nun noch einige für diesen Weg relevante immunologische Grundlagen betrachtet werden.

I.4. Immunologische Grundlagen

I.4.1. *Major histocompatibility complex*

Der *major histocompatibility complex* (MHC) ist ein beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiertes Gencluster, das hauptsächlich die verschiedenen Klassen der humanen leukozytären Antigene (HLA) kodiert. Die Identifizierung dieser nicht nur in Leukozyten sondern ubiquitär im menschlichen Organismus exprimierten Proteine und ihrer Gene erfolgte im Rahmen von Gewebstransplantationen.⁴² Ihr bedeutender Einfluss auf die Induktion einer anti-Transplantat Immunantwort gegen „inkompatible“ Gewebe begründet auch die Namensgebung.

Erst später konnte die so wichtige physiologische Funktion als eine Art „Zellschaufenster“ in der interzellulären Kommunikation von Lymphozyten untereinander oder mit ihren Zielzellen entdeckt werden: Die MHC-Proteine präsentieren für T-Zellen aufbereitete intra- und extrazelluläre Proteinfragmente, Peptide genannt, die endogenen aber auch exogenen Ursprungs sein können, und spielen somit eine zentrale Rolle bei der Vermittlung und Aktivierung des adaptiven Immunsystems.^{43,44} (Das adaptive Immunsystem charakterisiert sich durch antigenspezifische Erkennungsmechanismen und immunologisches Gedächtnis, der Fähigkeit eine Fremdstruktur bei wiederholtem Kontakt beschleunigt eliminieren zu können. Das angeborene Immunsystem dagegen ist, als das entwicklungs geschichtlich betrachtet ältere, dazu nicht in der Lage, aber in den ersten

Phasen einer Abwehrreaktion zur Initiierung einer adaptiven Antwort unabdingbar. Beide sind letztendlich eng miteinander verwoben.)

Der gesamte *major histocompatibility complex* beinhaltet Information für drei Klassen. Die Klassen I und II stellen die typischen antigenpräsentierenden Strukturen, auf die im Folgenden weiter eingegangen werden soll, während Klasse III, im genetischen Code umrahmt von den beiden erstgenannten, verschiedene andere Proteine mit Relevanz in der Immunologie kodiert.

Besonderheit des MHC ist seine – im menschlichen Genom einzigartige – genetische Variabilität. Die Information für die antigenpräsentierenden HLA- (oder MHC-) Moleküle ist nicht nur polygen, d.h. es existieren drei *loci* für Klasse I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) und drei *loci* für Klasse II (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ; HLA-DR kann in vielen Individuen jedoch zwei HLA-Moleküle bereitstellen), sondern zusätzlich extrem polymorph. Für jeden *locus* sind also in der humanen Gesamtpopulation eine große Anzahl an Varianten bekannt. Es handelt sich um die beeindruckendste multiple Allelie im Genom überhaupt. Immer noch wächst die Anzahl der entdeckten Allele. Im April 2011 betrug sie laut *European Bioinformatics Institute* (EBI) des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) – Klasse I und II zusammengezählt - mehr als 6400 Varianten (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>)⁴⁵.

Jedes Individuum erbt aus diesem Pool von Varianten mit dem diploiden Chromosomensatz sechs MHC Klasse I und sechs bis acht MHC Klasse II Sequenzen, die zur Hälfte mit der Hälfte jeweils eines Elternteils identisch sind. Es ist nicht verwunderlich, dass sich die Suche nach einem weitgehend identischen Spender vor allem hämatopoetischer Stammzellen aber auch von Organen für Patienten oft schwierig gestaltet - besonders wenn keine Geschwister existieren oder sie leider nicht die selben Allele geerbt haben. Die Größenordnung der Wahrscheinlichkeit eines Jackpotgewinns im „6-aus-49“ Lotto ist im - wenn auch vielleicht banalen - Vergleich zum (mindestens) „12-aus-6400“ der Identifizierung eines genomisch komplett identischen Spenders fast exorbitant. Umso wichtiger ist die Arbeit von Typisierungsorganisationen wie der DKMS (Deutsche Knochenmarkspenderdatei) in Deutschland oder des *Anthony-Nolan-Insti-*

tute in England die durch ihre Arbeit weitgehende Übereinstimmungen ermöglichen.

Letztendlich ist diese hohe Diversität jedoch nicht zuerst Last, sondern hauptsächlich ein entscheidendes und kraftvolles Instrument in der Abwehr pathogener Erreger. Mit ihr assoziiert ist nämlich auch ein Spektrum an individuellen Peptidbindungsvorlieben jedes einzelnen MHC-Moleküls, also die Fähigkeit jeweils andere Facetten eines Pathogens zu präsentieren. Die Polygenie erschwert auf diese Art und Weise eine Immunevasion im Einzelindividuum, der ausgeprägte Polymorphismus begegnet auf der Populationsebene Resistenzentwicklungen.²⁴

Beide, sowohl MHC Klasse I als auch MHC Klasse II, werden zusammen mit einem in ihrer Bindungsfurche platzierten Peptid vom T-Zell-Rezeptor (siehe I.4.2.) erkannt. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Verteilung im Organismus, in ihrer Struktur, in Peptidquelle und -länge und in Präferenz einer T-Zell Subgruppe:

MHC Klasse I

Sie ist auf den Membranen annähernd aller kernhaltiger Zellen zu finden und setzt sich aus einer α -Kette (aus den *loci* HLA-A,-B,-C des MHC) und dem nicht polymorphen β_2 -Mikroglobulin (kodiert auf Chromosom 15) zusammen. Das non-kovalent gebundene Heterodimer formiert vier Domänen von denen drei zur α -Kette gehören. α_1 und α_2 stehen peripher und bilden in ihrer Mitte eine hochvariable Region mit der Peptidbindungsfurche aus⁴⁶, α_3 gesellt sich mit dem β_2 -Mikroglobulin zum membranständigen Anteil zusammen und sorgt für die dortige Verankerung (siehe **Abb.4**). Synthetisiert werden die beiden Ketten einzeln, wie alle exozytotischen und membranständigen Proteine, von Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER). Dort im ER findet dann mit Unterstützung verschiedener Chaperone die Zusammenlagerung statt. Die letzte Konformationsänderung ist ausschließlich in Anwesenheit von 8-10 Aminosäuren langen Peptiden (Okta-, Nona- und Dekamere), die aufgrund ihrer Sequenz und sogenannter Aminosäurenanker in der Bindungsfurche einer distinkten α -Kette gebunden werden können^{47,48}, möglich. Die fertiggestellten

I. Einleitung

Peptid:MHC-Komplexe wandern über den Golgi-Apparat bis an die Zelloberfläche und stehen zur Interaktion mit T-Zell-Rezeptoren der CD8⁺ T-Zellen zur Verfügung. Während der TCR mit der hochvariablen distalen Einheit des MHC in Verbindung mit dem Peptid interagiert, stabilisiert nämlich der Co-Rezeptor CD8 diesen Vorgang durch Bindung an eine konstante membranernahe Region des MHC Klasse I Moleküls.⁴⁹

Die Peptide entstehen hauptsächlich durch Recyclingvorgänge im Zytosol und repräsentieren deshalb dessen gesamtes Proteinspektrum. Veraltete, gesunde Proteine, fremde z.B. virale Proteine, aber auch entartete, mutierte Ketten werden vom Proteasom in oben beschriebene Längen gekürzt. Die Aktivität des Proteasoms ist in inflammatorischem Milieu vor allem über IFN γ modulierbar. Von Chaperonen vor weiterer Verdauung geschützt, finden die Peptide durch das Zytosol den Weg zu einem Transporterkomplex (transporters associated with antigen processing-1 and -2 [TAP1 und TAP2]) der sie ins ER transferiert.

Auch extrazelluläre Proteine können aus Endosomen ins Zytosol vermittelt werden und dann den selben Weg beschreiten. Dieser Vorgang wird als *cross-presentation* bezeichnet weil endosomale Strukturen üblicherweise auf MHC Klasse II präsentiert werden.²⁴

MHC Klasse II

Alle MHC Klasse II *loci* enthalten Information für eine α - und eine β -Kette (HLA-DR öfter auch für zwei β -Ketten) die zusammen ein dem MHC-I-Molekül ähnli-

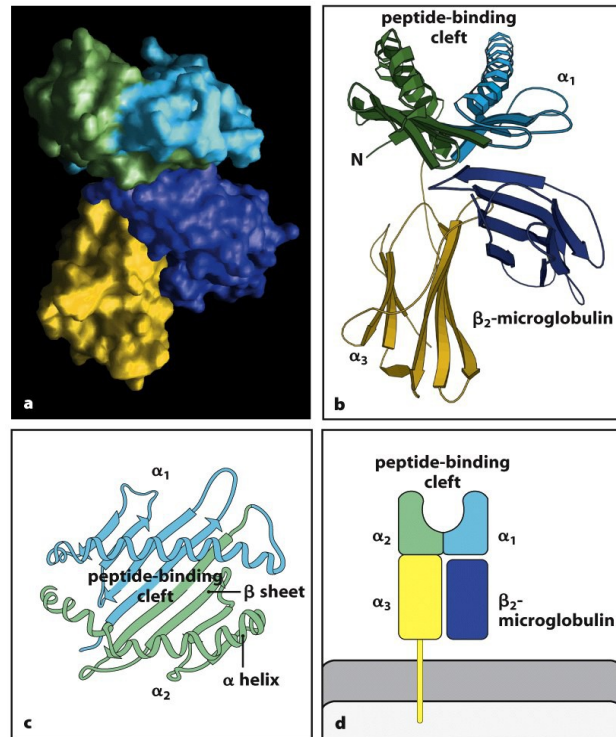


Abb.4 MHC Klasse I. **a** Computergrafik und **b** Ribbondiagramm der Quartärstruktur; **c** Ribbondiagramm der α 1- und α 2-Domänen mit Aufsicht auf die Peptidbindungsfurche die sich auf einer β -Faltblatt-Basis zwischen zwei α -Helices erstreckt; **d** Schema. Aus Ref.24.

ches non-kovalentes Dimer bilden. Jede Kette bildet zwei Domänen aus (α_1 , α_2 ; β_1 , β_2). α_1 und β_1 sorgen für die distale, variable, Peptid bindende Furche; α_2 und β_2 mit jeweils einem Membrananker für die proximale Region. Jede α -Kette kann sich mit einer β -Kette eines beliebigen *locus* zusammenlagern und umgekehrt. Deshalb können theoretisch weit mehr als sechs Klasse II Moleküle in einem Individuum zu finden sein. Exprimiert werden sie hauptsächlich in antigen-präsentierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und Dendritischen Zellen (siehe I.4.3.) sowie von Thymusepithel. Der Syntheseweg entspricht dem der Klasse I, jedoch werden die Komplexe mit der invarianten Kette (Ii) vor zu frühzeitiger Peptidbeladung geschützt. Diese findet nämlich auf dem Weg zur Zellmembran im endosomalen Kompartiment, wo die extrazellulären Antigene abgebaut werden, statt.⁵⁰ Da die Peptidbindungsfurche des MHC Klasse II Moleküls zu den Seiten hin – im Gegensatz zur Klasse I – geöffnet ist, vermag es längere Peptide zu binden. Meist zählen sie 13-17 Aminosäuren, sie können aber auch noch länger sein.^{48,51}

Präsentiert werden Peptide für TCRs auf CD4⁺ Zellen, da, analog zu oben, für MHC Klasse II CD4 als Co-Rezeptor und Stabilisator der Bindung fungiert.^{24,52}

Nomenklatur

Um der Vielzahl der Variationen gerecht werden zu können wurde die Nomenklatur in den vergangenen Jahren erweitert und angepasst.

Der Name für ein Allel besteht aus dem *locus*-Namen und einer mindestens vierstelligen Zahl wobei die ersten beiden Ziffern für die Allelgruppe, die folgenden beiden für das spezifische Protein dieser Gruppe stehen. Ein Beispiel soll dies verdeutlichen:

HLA-A*0201 = Protein 01 der HLA-A Gruppe 02

Eine weitere Ziffergruppe signalisiert Abweichungen der Gensequenz die jedoch die Aminosäurekodierung nicht beeinflussen und die letzte Veränderungen in den nicht kodierenden Genabschnitten (Introns oder untranslatierte Regionen). Schlussendlich werden selten noch Expressionsbesonderheiten mit Buchstaben („N“ für *null* oder *not expressed*, „L“ für *low expression*, „C“ für *cytoplasmic*, „S“ für *secretory*,...) angegeben. Im folgenden Beispiel sind die ein-

I. Einleitung

zelenen Gruppen zur besseren Übersicht mit Doppelpunkten voneinander getrennt:

HLA-A*02:01:01:02N \triangleq locus*Allelgruppe:spezifisches Protein:Abweichung in der kodierenden Sequenz ohne Aminosäurentausch:
Abweichung in nicht kodierenden Sequenzen und
Expressionsbesonderheit

Auf Proteinebene ist also die Information der ersten vier Ziffern ausreichend. Sind sie deckungsgleich, handelt es sich auch um identische Moleküle.⁵³

I.4.2. T-Zellen

Im Knochenmark haben alle Immunzellen ihren Ursprung. Dort entstehen aus einer gemeinsamen pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle die myeloide und die lymphoide Linie. Während Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sowie die meisten dendritischen Zellen (siehe I.4.3.) neben den Erythrozyten und Thrombozyten Endprodukte der myeloiden Reifung sind, stehen ihnen auf lymphoider Seite die B-, NK(natürliche Killer-)- sowie T-Zellen gegenüber. Auch einige dendritische Zellen können wohl auf den lymphoiden Progenitor zurückgehen.

B- und T-Zellen sind die Effektoren des adaptiven Immunsystems, zeichnen sich also durch ihre zellindividuellen spezifischen Antigenrezeptoren und die Fähigkeit ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln aus. Während die B-Zellen dazu angeregt werden können ihre (modifizierten) Rezeptoren in großer Quantität als Antikörper zu sezernieren und somit die humorale Immunantwort verkörpern, bilden die T-Zellen den zellulären Teil der adaptiven Reaktion. Sie können, vermittelt durch ihren T-Zell-Rezeptor, entweder selektiv Zellen direkt vernichten oder über Zell-Zell-Kontakte und Botenstoffe wie Zytokine die Immunantwort auf ein spezifisches Antigen modulieren.

Der α : β -T-Zell-Rezeptor

Als die Spezifität und Identität definierende Struktur einer T-Zelle hat der TCR und sein Genlocus Ähnlichkeit mit dem der Immunglobuline der B-Zellen (siehe **Abb.5**). Nur eine kleine Minderheit der T-Zellen bildet sein TCR-Heterodimer aus einer γ - und einer δ -Kette ($\gamma\delta$ -T-Zellen), alle übrigen tragen den α : β -T-Zell-

Rezeptor, der sich non-kovalent aus α - und β -Kette zusammensetzt. Wie auch bei den Immunglobulinen findet sich in jeder Kette eine konstante und eine variable Region. Die beiden variablen Domänen bilden gemeinsam den distalen Rezeptorabschnitt, der für die spezifische Interaktion mit dem Peptid:MHC-Komplex entscheidend ist. Hier liegt auch der wichtige Unterschied zu den Antikörpern: die MHC-Restriktion des α : β -T-Zell-Rezeptors (der γ : δ -TCR hat eher eine Sonderstellung, für ihn trifft dies nicht zu – sein Aufbau und die Kettenstrukturen sind aber dem α : β -TCR ähnlich). Dieser erkennt also ein Antigenpeptid nur in Vereinigung mit einem präsentierenden MHC-Molekül, bindet gleichzeitig Peptid und distale MHC-Strukturen (vgl. **Abb.6**). Deshalb kann er nicht nur

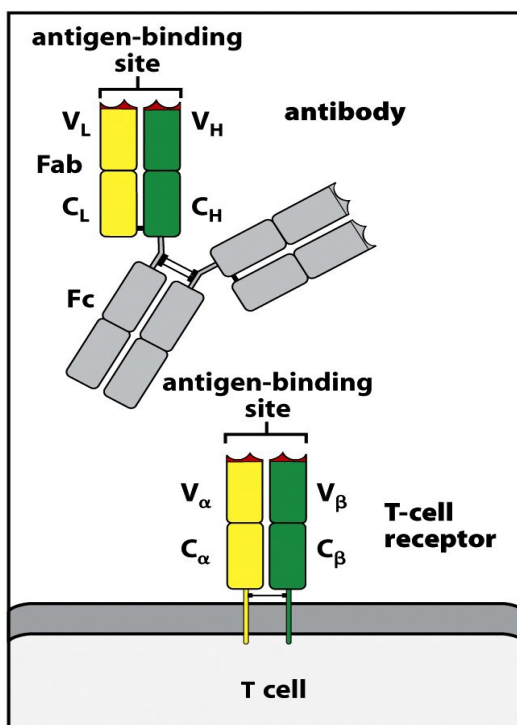


Abb.5 Oben: sezernierter Antikörper; unten: membranständiger α : β -T-Zell-Rezeptor. Der TCR mit den variablen (V_α , V_β) und konstanten (C_α , C_β) Regionen der α - bzw. β -Kette hat Immunglobulincharakter und ähnelt einem antigenbindenden Fragment (Fab) des Antikörpers, das sich aus dem distalen Teil einer schweren Kette und einer leichten Kette zusammensetzt. V_L , V_H : variable Domänen der leichten (light) und schweren (heavy) Kette; C_L , C_H : konstante Domäne der leichten bzw. distales Drittel der konstanten Domäne der schweren Kette; F_c : konstantes Fragment. Aus Ref.24.

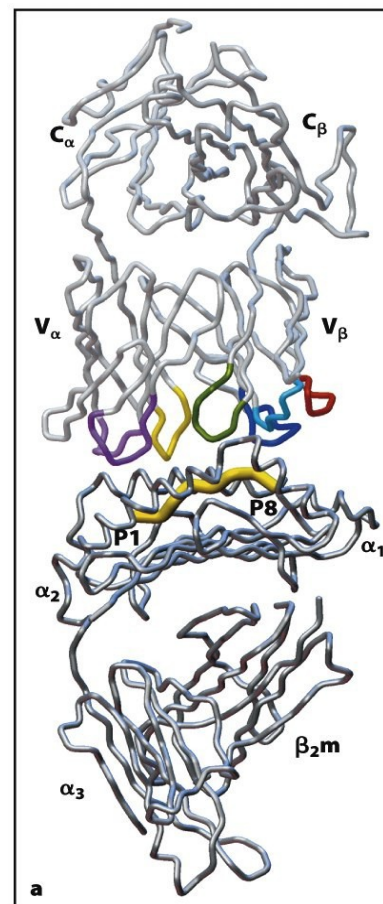


Abb. 6 Backbone-Kettenschema eines an einen peptid:MHC Klasse I-Komplex (unten; mit α_1 - α_3 sowie β_2 -Mikroglobulindomäne; Peptidoktamer in gelb) gebundenen α : β -TCR (oben; mit variablen V_α , V_β und konstanten C_α , C_β Regionen der α - bzw. β -Kette; hypervariable loops der V-Regionen in bunt). Aus Ref.24.

Peptide sondern auch allogene MHC-Proteine als „fremd“ detektieren und macht so die α : β -T-Zellen zu den zentralen Akteuren der akuten und chronischen Transplantatrejektion.

Die hohe Diversität an für jede T-Zelle einzigartigen TCR kommt wie bei den Immunglobulinen der B-Zellen durch somatische Rekombination, durch Genrearrangement, während der Entwicklung der Zelle (siehe folgender Abschnitt) zustande. Der Genlocus der β -Kette befindet sich auf Chromosom 7 und ähnelt im Aufbau mit V- (*variable*), D- (*diversity*), J- (*joining*) und C-Gensegmenten (*constant*) dem der schweren Immunglobulinkette. Die variable Region des β -Proteins speist sich aus dem durch Rekombinaseenzyme^{54,55} zusammengesetzten Code jeweils eines V- (von 52), D- (von 2) und J- (von 13) Segments, die konstante Region schließt sich, sich eines der beiden C-Segmente bedienend, an. Chromosom 14 trägt die Information für die α -Kette. Vergleichbar mit der leichten Immunglobulinkette stehen hier nur V- (ca. 70) und J-Segmente (61) für die variable Region zur Auswahl. Das D-Segment fehlt komplett, nur ein C-Segment existiert (vgl. **Abb.7**)

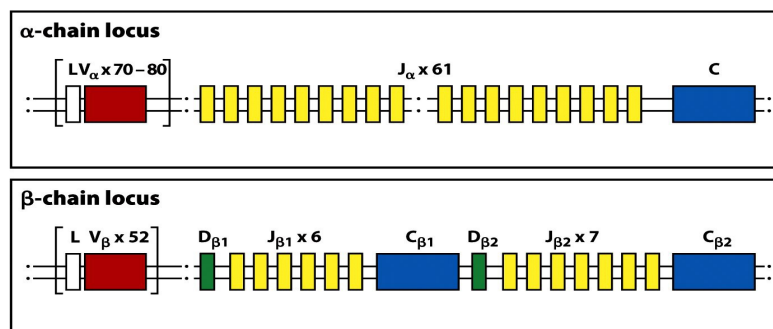


Abb. 7 Schema des α - und β -locus mit den verschiedenen Gensegmenten. L: leader; V: variable; D: diversity; J: joining; C: constant. Aus Ref.24.

Im Prozess der Rekombination werden nicht nur die überflüssigen Genabschnitte exzidiert, sondern an den Nahtstellen zur Wiederverknüpfung des DNA-Stranges benötigte Nukleotide in zufälliger Anordnung eingebaut. Zusätzlich kann das D-Segment häufig in allen drei Leserastern transkribiert werden. Diese beiden Sachverhalte erhöhen die Diversität zusätzlich bis auf etwa eine Trillion(!) möglicher individueller α : β -TCR-Dimere.

Ein erfolgreiches Rearrangement in der T-Zellentwicklung ist irreversibel und der daraus hervorgehende TCR definiert die Spezifität der jungen T-Zelle. Diese

Weichenstellung ereignet sich im Thymus – wo sich auch das weitere Schicksal der Zelle entscheidet.²⁴

Reifung der T-Zelle im Thymus

Im Gegensatz zu den B-Lymphozyten, deren Entwicklung komplett im Knochenmark erfolgt (*bone marrow*; ursprünglich jedoch nach der *Bursa fabricii* in Vögeln benannt), reifen T-Lymphozyten im Thymus heran.

Einige der gemeinsamen Vorläuferzellen emigrieren aus dem Knochenmark in dieses mediastinale Organ und erhalten vom dort ansässigen Stroma Signale für die Differenzierung in Richtung der T-Zell-Linie. Nach einer Proliferationsphase und Expression von Markern wie CD2 werden sie als Thymozyten bezeichnet. Weil ihnen sowohl CD4 als auch CD8 noch fehlt bekommen sie das Attribut „doppelt-negativ“. Im voll entwickelten Thymus stellt die doppelt-negative Population etwa 5% aller Thymozyten, wobei hierzu auch die schon weiter differenzierten, kleinen Populationen der $\gamma\delta$ -T-Zellen und der NKT-Zellen (natürliche Killer-T-Zellen: exprimieren neben NK-Rezeptoren zusätzlich $\alpha\beta$ -TCRs limitierter Diversität) zählen, für die keine typische MHC-Restriktion gilt. Sie gehen wie auch die dominierende Gruppe der $\alpha\beta$ -T-Zellen, für die der Reifeprozess nun weiter erläutert werden soll, aus den unreifen doppelt-negativen Thymozyten hervor.

Sobald in der zukünftigen $\alpha\beta$ -T-Zelle das Rearrangement der Gensegmente des β -locus erfolgreich ist, vereinigt sich die exprimierte Kette mit der invarianten pT α (prä-TCR- α -Kette) und der signalvermittelnden Komponente CD3 zu einem prä-TCR. Über diesen Rezeptor wird die Zelle, die sich noch im Thymuskortex befindet, zu weiterer Proliferation, Expression von CD4 und CD8 und Stopp der β -Rekombination angeregt. Die nun „doppelt-positiven“ Thymozyten beginnen nach diesem Proliferationsschub, der sie zur mit Abstand stärksten Population im gesamten Thymus macht, mit dem Genrearrangement für die richtige α -Kette und wandern langsam in Richtung Thymusmark. Mit der Fertigstellung des finalen $\alpha\beta$ -TCR beginnt die Positivselektion: In Interaktion mit dem kortikalen Thymusepithel wird geprüft ob der neue Rezeptor *self-peptide: self-MHC*-Komplexe binden kann. Ist dies der Fall, wird die Bindung je nach MHC-

Klasse durch CD4 (für MHC II) oder CD8 (für MHC I) gestützt und die Expression des nicht benötigten Co-Rezeptors abgeschaltet. Eine Zelle deren TCR nicht dazu in der Lage ist geht den Weg des programmierten Zelltods, der Apoptose. Durch diesen Vorgang wird die MHC-vermittelte Kommunikationsfähigkeit gesichert und ab hier sind die Zellen einfach-positiv: CD4⁺ oder CD8⁺.

Im Thymusmark findet zusätzlich eine Negativselektion statt. Neben den medullären Epithelzellen [mTEC]⁵⁶ sind hierfür auch die im Mark ansässigen dendritischen Zellen und Makrophagen verantwortlich.⁵⁷ Vor allem der Transkriptionsfaktor AIRE (*autoimmune regulator*) ermöglicht den mTEC ektopische Genexpression fast aller körpereigenen Proteine.^{58,59} Zeigt eine T-Zelle nun eine zu starke Affinität für ein Autoantigen wird sie deletiert, das Risiko für Autoimmunität reduziert.

Positiv- und Negativselektion sorgen also für ein *self-MHC*-restringiertes und möglichst selbsttolerantes T-Zell-Repertoire.

Nach diesen Vorgängen ist die Maturation abgeschlossen. Nur etwa 2% der vormals doppelt-positiven Population verlassen als reife naive T-Zellen den Thymus in Richtung Milz, Lymphsystem und Blut. Homöostaseprozesse sorgen, auch im fortgeschrittenen Alter, wenn das Organ an Funktion verliert, für eine konstante periphere Zellzahl.²⁴

Subpopulationen von T-Zellen

Voll ausgereifte, naive CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen patrouillieren die sekundären lymphatischen Organe - auf der Suche nach dem ersten Kontakt mit einem aktivierenden Antigen der ihre weitere Differenzierung und Aktivierung in Effektorzellen triggert. Dieser Prozess des „primings“ ist in Abschnitt I.4.4. genauer beschrieben. An dieser Stelle erfolgt die Vorstellung der resultierenden unterschiedlich ausdifferenzierten Subgruppen:

Alle **CD8⁺** T-Zellen differenzieren zu **zytotoxischen T-Zellen** (auch *cytotoxic lymphocytes* [CTL] genannt), die den Großteil der Zellen des Körpers aufgrund ihrer MHC Klasse I Restriktion auf „fremd“-Peptide absuchen und im positiven Fall gezielt töten können indem sie fokussiert ihre zytotoxischen Granula entlee-

ren. Zwischen Effektor- und Zielzelle bildet sich hierfür die sogenannte immunologische Synapse aus^{60,61} – ein Zellzwischenraum der von Adhäsionsmolekülen, deren Bindung sich durch TCR:Peptid:MHC-Komplex-Signale verstärkt, begrenzt wird. Der Inhalt der Granula besteht aus einem Apoptose induzierenden Enzym, dem Granzym B, Granulysin, und dem Perforin, das deren Translokation ins Zielzellinnere ermöglicht. Ein alternativer Weg bietet der FasLigand (CD178), der über Kontakt mit Fas (CD95) auf einer Zielzelle ebenfalls die Apoptose zu triggern vermag. Diese Interaktion scheint jedoch wichtiger zu sein für die T-Zell-Homöostase und Reduzierung einer Effektorpopulation nach z.B. Beseitigung eines Pathogens.

Zusätzlich produzieren CTL auch proinflammatorische Zytokine (IFN γ , TNF α , Lymphotoxin α [LT α]) und ihren eigenen Wachstumsfaktor (IL-2), die auto- und parakrine Wirkung entfalten. IFN γ kann die Replikation einiger Viren blockieren, stimuliert Makrophagen, verbessert die Antigenpräsentation über Augmentation der MHC Klasse I- und TAP-Expression und moduliert das Proteasom. TNF α und LT α stimulieren Makrophagen, vermitteln Inflammation und teilweise Apoptosesignale.²⁴

CTL sind die zentralen T-Zell-Effektoren für Tumorlyse.

Die heterogene Gruppe der **CD4⁺** Effektoren besteht aus „Helferzellen“ und regulatorischen Zellen.

Zu den **Helferzellen** zählen die T_H1-, T_H2-⁶² und T_H17-Gruppen. **T_H1** Zellen sind zusammen mit den CD8⁺ Zellen für die zelluläre Immunantwort verantwortlich. Sie stimulieren T-Zell-Proliferation (IL-2), aktivieren Makrophagen (IFN γ , CD40L)^{63,64}, induzieren Makrophagendifferenzierung im Knochenmark (IL-3, GM-CSF), optimieren die CD8⁺ T-Zell Aktivierung (CD40L: APC-Stimulation⁶⁵), können zytotoxische Signale vermitteln (FasL, LT α), hemmen die T_H2-Antwort (IFN γ) und spielen zusätzlich eine Rolle beim Immunglobulin *class-switching* zu IgG (IFN γ). Der Schwerpunkt der **T_H2** Zellen liegt auf der humoralen Immunität, also der Aktivierung der B-Zell-Linie (IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, CD40L)^{66,67}. Außerdem exprimieren sie Zytokine die die eigene Entwicklung vorantreiben (IL-4) und die T_H1-Antwort unterdrücken (IL-10, TGF β , IL-13). **T_H17** Helferzellen sind

weniger lange bekannt^{68,69}, sezernieren vor allem IL-17 und spielen wohl eine Rolle in der Neutrophilenrekrutierung und frühen Bekämpfung gewisser extrazellulärer Bakterien aber auch bei Autoimmunkrankheiten und Allergien.^{24,70}

Regulatorische T-Zellen können natürlichen oder adaptiven Ursprungs sein. Die natürlichen (**nTreg**) entstehen schon im Thymus und sind FoxP3⁺ und CD25^{hi} ^{71,72}, die adaptiven (**aTreg: TH3 und Tr1**)^{73,74} in der Peripherie aus der mit allen Helferzellen gemeinsamen Vorläuferzelle T_{H0}. Sie sind wichtig für die Immunbalance, supprimieren Autoimmunantworten und vermitteln ihre Effekte über Zell-Zell-Kontakte und Zytokine (IL-10, TGFβ).^{72,74}

Nach Überstehen einer Infektion kontrahiert sich die durch klonale Expansionen entstandene gemischte T-Zell-Population und zurück bleibt nur eine kleine Anzahl an CD8⁺ sowie CD4⁺ Zellen die als immunologisches Gedächtnis fungieren. Diese *memory cells* (**Gedächtniszellen**) sind dazu in der Lage bei erneuter Konfrontation mit ihrem Antigen zügiger und kräftiger zu proliferieren und Effektorfunktion auszuüben.^{75,76} Im Gegensatz zu naiven T-Zellen benötigen sie kein co-stimulatorisches Signal mehr.⁷⁷ Phänotypisch unterschieden werden *central memory* (T_{CM}) und *effector memory* (T_{EM}) T-Zellen. Die T_{CM} (CCR7⁺, CD62L⁺, CD45RA⁻) exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7 und das L-Selectin (CD62L) – beide erhalten ihnen als „*homing*“-Rezeptoren die Rezirkulation in lymphatische Gewebe und somit die Ähnlichkeit mit dem Wanderungsverhalten naiver T-Zellen. Auf T_{EM} (CCR7⁻, CD62L⁻, CD45RA⁻) trifft dies nicht zu. Sie sind eher in der Peripherie zu finden.⁷⁸⁻⁸⁰

Zwei weitere kleine Populationen die einen TCR tragen, jedoch nicht der MHC-Restriktion unterliegen und keine Aktivierung benötigen wurden schon kurz erwähnt. Die **γδ-T-Zellen** exprimieren das gering diverse γ:δ-Heterodimer und sind hauptsächlich in GI-Mukosa und Epidermis anzutreffen.⁸¹ Ihr Funktionsspektrum ist vielseitig und wird weiterhin diskutiert. Sie erkennen, vor allem MHC-unabhängig, eine Vielzahl an unterschiedlichen Strukturen - unter anderem auch Lipidantigene.⁸² **NKT-Zellen** beherbergen nicht nur den NK1.1 Rezeptor sondern zusätzlich auch einen semi-invarianten α:β-TCR, der Lipid- und Gly-

kolipidantigene auf dem der MHC Klasse I verwandten, nicht polymorphen CD1d-Molekül detektiert. Sie sezernieren als potente Immunmodulatoren auf Stimulation hin IL-2, IFN- γ , TNF- α , und IL-4.^{83,84}

Zusammen scheinen sie gewissermaßen eine Zwischenstellung einzunehmen; umrahmt von den schnellen, unspezifisch Fremdartigen erkennenden Zellen des angeborenen Immunsystems (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten, NK-Zellen) und den später reagierenden, hochspezifischen, zu Gedächtnis fähigen Zellen der adaptiven Immunität (B-Zellen, α : β -T-Zellen).

I.4.3. Dendritische Zellen

Wenn zusätzlich auch Zellgruppen wie die Monozyten, Makrophagen und B-Zellen zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC: *antigen presenting cells*) zählen, so ist doch die Gattung der dendritischen Zellen (DC) mit ihren Eigenschaften in dieser Domäne der Aktivierung naiver T-Zellen einzigartig potent.

APC und eben besonders die DC vermögen die Brücke von initialer angeborener zur adaptiven Immunantwort zu schlagen. Sie verarbeiten und präsentieren Antigen und liefern die zusätzlich notwendigen Signale für eine Ausdifferenzierung in Effektoren.

Es handelt sich um eine heterogene Gruppe mit unterschiedlichen Wurzeln, Phänotypen, Gewebsverteilungen und Stimulationseigenschaften.

Ob manche dendritische Zellen auch auf einen lymphoiden Präkursoren zurückgehen scheint noch umstritten, sicher ist dagegen dass aus der myeloiden Vorläuferzelle im Knochenmark ein den dendritischen Zellen und Monozyten/Makrophagen gemeinsamer Präkursor entspringt. Obwohl sich an dieser Stelle deren Schicksal teilt, können auch Monozyten in der Peripherie in entzündlicher Umgebung in inflammatorische DC differenzieren. Die klassischen und plasmacytoiden DC (cDC; pDC) gehen jedoch auf den DC-Arm zurück. Während die langlebigen pDC eher atypisch einen Schwerpunkt auf der Bekämpfung viraler Infektionen durch Produktion beeindruckender Quantitäten an Interferonen (IFN α , IFN β) legen, verkörpern kurzlebige inflammatorische DC und vor allem

cDC die zentralen Kompetenzen der Antigenpräsentation und T-Zellmodulation. Sie sind lokal in allen Geweben sowie auch im Blut zirkulierend zu finden.

Als zunächst unreife Zellen (iDC: *immature* DC) verfügen sie über eine ausgeprägte Phagozytoseaktivität (Makropinozytose, Rezeptor vermittelte Endozytose) die durch ausladende Zellausläufer, die Dendriten, erleichtert wird. Neben niedrigen Expressionsniveaus von MHC-, Co-Stimulations- und Adhäsionsmolekülen zeichnen sie distinkte Chemokinrezeptoren aus, welche sie entlang eines Chemokingradienten hin zu entzündlichen Geweben zu leiten vermögen. Dort führen ein sogenanntes „Gefahrensignal“ über *pattern-recognition receptors* (PRR) wie den *toll-like*-Rezeptoren (TLR) oder/und proinflammatorische Zytokine und Mediatoren zu Reifung und Lizenzierung der dendritischen Zellen. Sie verändern ihre Morphologie zu einer mehr kugelförmigen Struktur mit gefältelter Membran („*veiled*“), verlieren die ausgeprägte Fähigkeit zur Antigenaufnahme und verlagern ihre Prioritäten auf -prozessierung und -präsentation, sowie Zytokinproduktion. An der Zelloberfläche zeigt sich nun eine hohe Dichte an MHC-, Co-Stimulations- (CD40, CD80, CD86) und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, LFA-3). Der neue Chemokinrezeptor CCR7 vermittelt das Ziel für die neu- (bzw. wieder-) gewonnene Mobilität – das lymphatische Gewebe – und der reife DC definierende Marker CD83 ist nachweisbar.

Als alarmierte, professionell ausgebildete, Antigen tragende Botschafter und Rekrutierer betreten die mDC (*mature* DC) über Lymphwege die lokalen lymphatischen Gewebe und initiieren dort die adaptive Antwort im Vorgang des *primings*.^{31,85-87}

I.4.4. Priming

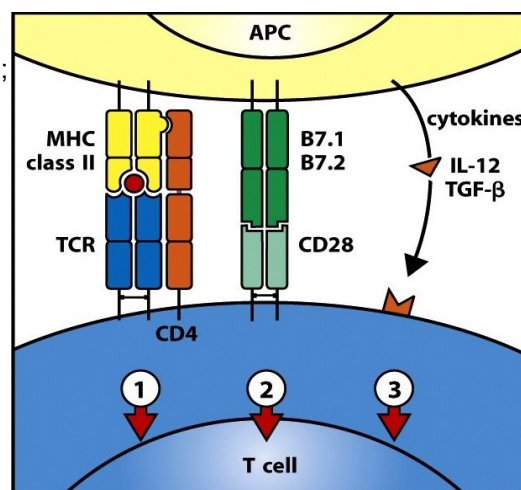
Naive T-Zellen mit ihrem definierten TCR können nicht unmittelbar auf ihr spezifisches Antigen, den passenden Peptid:MHC-Komplex, reagieren, sondern müssen um aktiven Effektorstatus zu erlangen zuerst durch *priming* von professionellen antigenpräsentierenden Zellen aktiviert werden. Dies geschieht durch drei simultane Signale (vgl. **Abb. 8**).

Signal 1 besteht aus der TCR-Peptid:MHC-Interaktion und sichert die Antigen-spezifität. Bei MHC-*mismatch* kann sie auch Grundlage von Alloreaktivität sein.

Dieser Kontakt findet ubiquitär auch mit allen nicht-APC statt. Für die aktivierte T-Zelle ist er ausreichend um deren Effektorfunktion zu triggern; für die naive dagegen bleibt er ohne Folge – im Kontakt mit APC ist er sogar tolerogen und führt, wenn Signal 2 ausbleibt, zu Anergie.⁸⁸

Signal 2 wird als Co-Stimulation bezeichnet. Wichtigster Angriffspunkt ist CD28 auf der T-Zelle. Die Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) erfahren eine verstärkte Expression auf reifen dendritischen Zellen und binden CD28. Somit kommunizieren sie die Fremdstruktur, das „Gefahrenmilieu“, das inflammatorische Umfeld des Ursprungsortes der mDC, knüpfen die adaptive Reaktion daran an und reduzieren das Risiko einer Autosensibilisierung. Signaltransduktion über CD28 induziert in T-Zellen nicht nur die Expression von IL-2 und der α -Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors, sondern auch im Sinne eines negativen *feedback* die von CTLA-4. Dieser höher affine inhibitorische B7-Rezeptor dämpft die Proliferation von frisch aktivierten T-Zellen. Weitere Co-Stimulatoren können den B7-Signalweg modulieren: ICOS (*inducible co-stimulator*), CD70, CD40 und 4-1BBLigand auf DC interagieren beispielsweise mit LICOS, CD27, CD40L und 4-1BB auf T-Zellen – um nur einige zu nennen.^{89,90}

Abb. 8 Priming einer CD4⁺-T-Zelle.
Signal 1: Peptid:MHCII-TCR Interaktion;
Signal 2: B7.1/B7.2 bindet CD28;
Signal 3: Subklassendifferenzierung
definierende Zytokine. Aus Ref.24.



Signal 3 letztendlich entscheidet - vor allem für CD4⁺ T-Zellen - über die Richtung der Ausdifferenzierung in die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen und erfolgt fast ausschließlich über Zytokine. Hierbei ist das lokale Gesamtmilieu entscheidend,^{91,92} das jedoch maßgeblich von der aktivierenden APC beeinflusst wird. Langfristige Toleranz kann aus einem Fehlen von Signal 3 resultieren.^{93,94}

Folgende Tabelle (**Tab.1**) gibt einen Überblick über die wichtigsten Signale dieser Weichenstellung und setzt sie in Bezug zu den resultierenden Effektoren. Eine Übersicht über die T-Zellpopulationen findet sich in I.4.2.²⁴

Tab. 1 Abhängigkeit der Differenzierung in T-Zell-Subpopulationen vom initialen *priming*.
Oben: wichtigste Vertreter der notwendigen dritten Signale; Unten: resultierender T-Zell-Typ.

Signal 3	IL-12, IFN γ	IL-12, IFN γ	Notch-signal, IL-4	IL-1 β , IL-23	TGF β	IL-10	TGF β +IL-10
T-Zelle	CD8+ CTL	CD4+ Th1	CD4+ Th2	CD4+ Th17	CD4+ Th3	CD4+ Tr1	CD4+ CD25hi, FoxP3+

I.5. Fragestellung

Für eine Erweiterung des Spektrums der Tumovakzination des oben vorgestellten jungen Patienten (I.2.) kam nach immunhistopathologischer Diagnostik das kräftig überexprimierte Zytokeratin 7 in Frage. Sicher birgt es als Autoantigen aufgrund seiner mangelnden Spezifität und fehlenden Beschränkung auf das Tumorgewebe Risiken für autoimmune Nebenwirkungen einer Impfung. Prinzipiell benötigt jedoch eine Effektor T-Zelle eine minimale Anzahl an präsentierten Antigenpeptiden auf einer Zielzelle als Schwellenwert. Dies ermöglicht dem Immunsystem eine Unterscheidung zwischen normaler und gesteigerter Expression. Leider ist dieser Schwellenwert jedoch schwer zu bestimmen und somit ist letztendlich auch eine Prognose im Hinblick auf die Sicherheit einer solchen Vakzinierung diffizil. Angesichts der recht aussichtslosen Situation des jungen Patienten und auch der Mehrzahl aller Pankreaskarzinompatienten, die aufgrund früher Dissemination der Tumoren und trotz aller therapeutischen Maßnahmen immer noch meist mit einer sehr schlechten Prognose konfrontiert werden müssen, ist dieses Risiko jedoch tolerabel.

Um das tumorassoziierte Antigen Zytokeratin 7 als Impfstoff zu etablieren ist es erforderlich seine T-Zell-Immunogenität nachzuweisen. Erst wenn eine definierte T-zelluläre Antwort gegen ein Peptid des Antigenproteins dokumentiert werden kann gilt dieses Peptid als T-Zell-EPITOP und steht zum Einsatz als Vakzine bereit – vorausgesetzt der Empfänger exprimiert das entsprechende präsentierende MHC-Molekül. Denkbar sind natürlich dann auch Impfungen mit dem

Gesamtprotein oder DNA/mRNA-Ansätze. Das Peptid besticht allerdings durch einfaches, klar definiertes Immunomonitoring und seine vergleichsweise simple Herstellung nach *good-manufacturing-practice* (GMP).

Ziel der Arbeit war es nun für zwei HLA-Allele unseres Patienten CD8⁺ T-Zell-Epitope aus Zytokeratin 7 zu identifizieren um ihm die entsprechenden Peptide als Ergänzung seines Impfprotokolls anbieten zu können.

Wir wählten hierfür diejenigen aus, die in der westlichen, kaukasoiden Bevölkerung am häufigsten anzutreffen sind, um eine eventuelle Nutzung in weiteren Patienten wahrscheinlicher zu gestalten: HLA A*0201 (Frequenz etwa 25-50%) und HLA B*5101 (Frequenz etwa 5-20%) (www.allelefreqencies.net).

Für beide Allele sollten durch das Epitopvorhersageprogramm „SYFPEITHI“ (siehe I.6.1.) einige Liganden mit hoher immunogener Wahrscheinlichkeit vorausgesagt und anschließend an CD8⁺ T-Zellen gesunder Spender *in vitro* verifiziert werden. Hierfür sollte einem *priming* der im Repertoire der Spenders erhofften spezifischen T-Zelle mit aus Monozyten generierten dendritischen Zellen, wenn möglich, weitere Expansion und Etablierung einer CD8⁺ T-Zelllinie folgen. Der Plan sah vor, anschließend deren Spezifität per Durchflusszytometrie einer intrazellulären Zytokinfärbung zu belegen und ihre zytotoxische Funktionalität sowie die natürliche Prozessierung und Präsentation des Epitops in bzw. auf Tumorzellen anhand von Zytotoxizitätsexperimenten nachzuweisen.

I.6. Methodischer Hintergrund

Zu den Anfangszeiten der T-Zell-Tumorantigendefinierung ging man klassisch von einer spontan *in vivo* entstandenen Population tumorreaktiver T-Zellen aus, klonierte und expandierte diese um sie anschließend an cDNA-Bibliotheken der Tumorzell-mRNA zu testen bis das entscheidende Gen identifiziert war.

Heute bedient man sich meist der nun zur Verfügung stehenden Gen- und Proteinsequenzdatenbanken und des Ansatzes der „reversen Immunologie“⁹⁵. Das Gen oder Protein eines durch Expressionsanalysen, serologisch oder immunhistochemisch identifizierten Tumorantigens durchläuft eine *in silico*-Vorhersage

für potentielle MHC-Liganden bzw. T-Zell-Epitope, welche dann anschließend auf ihre Immunogenität hin, meist *in vitro*, untersucht werden um sie als tatsächliche Epitope zu validieren.

I.6.1. "SYFPEITHI"

Die in Tübingen entwickelte und betreute Datenbank „SYFPEITHI“ (www.syfpeithi.de)⁹⁶ verdankt ihren Namen der Aminosäuresequenz des ersten von einem MHC-Molekül eluierten und sequenzierten Peptids⁴⁷. Sie umfasst mittlerweile mehr als 7000 Peptidsequenzen publizierter natürlicher MHC-Liganden der Klasse I und II verschiedener Spezies sowie veröffentlichter T-Zell-Epitope. Auf der Basis dieser Datenbank lässt sich „SYFPEITHI“ als Instrument zur T-Zell-Epitopvorhersage einsetzen. Anhand von Peptidankermotiven⁴⁸ trifft es eine Aussage über die Bindungswahrscheinlichkeit eines jeglichen Peptids für ein bestimmtes MHC-Molekül. Am Beispiel des HLA A*0201 verdeutlicht bekommen so die Aminosäuren Leucin oder Methionin bzw. Valin oder Leucin an Position 2 bzw. 9 eines Nonamers als Ankeramino-säuren Höchstwerte bis zu maximal 15 zugeschrieben. Ankeramino-säuren sind, aus der Datenbank der publizierten natürlichen Liganden und T-Zell-Epitope abgeleitet, für die Bindung eines Peptids besonders ausschlaggebend. Valin an Position 6 dient als Hilfsanker, bewertet mit einer etwas niedrigeren Zahl; weitere bevorzugte Seitenketten sind an Position 4 bzw. 8 das Glutamat und Lysin bzw. Lysin. Alle übrigen Aminosäuren fließen ebenfalls mit Minimalwerten in den Summenwert ein und können bei besonders ungünstiger Beeinflussung der Bindungseigenschaften sogar negative Vorzeichen (bis -3) annehmen.

Eine beliebige Proteinsequenz kann somit in alle möglichen Peptide (für MHC Klasse I in Okta-, Nona- und Dekamere) *in silico* zerschnitten werden und für jedes einzelne ein dessen Bindungswahrscheinlichkeit für ein bestimmtes MHC-Molekül repräsentierender Summenwert ermittelt werden.

Die physiologische zytosolische Peptidprozessierung durch das Proteasom mit dessen bevorzugten Schnittstellen sowie den Transport über TAP ins endoplasmatische Retikulum - bevor die Peptide überhaupt in Kontakt mit Molekülen der MHC Klasse I kommen - berücksichtigt "SYFPEITHI" jedoch nicht. Trotzdem

beinhalten die höchstpositionierten 2% in der Regel (in etwa 80% der getätigten Vorhersagen) das vom untersuchten MHC-Molekül natürlich präsentierte Epitop. Die Immunogenität eines vorhergesagten Liganden muss mit T-Zell-Experimenten nachgewiesen werden um ihn als Epitop zu validieren.

I.6.2. PBMC-Isolierung

PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) sind die aus Vollblut, *BuffyCoat* oder Leukapheresen gewonnene Zellgruppe mononukleärer Leukozyten, die sich aus Monozyten und Lymphozyten zusammensetzt. Um ein Blutprodukt von (restlichen) Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten zu reinigen wird eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Vorsichtige Schichtung der verdünnten heparinisierten Zellsuspension über ein Lymphozytentrennmedium auf der Basis von Ficoll™ - ein hydrophiles Polymer mit 400 kDa Molekulargewicht und einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml - und folgende Zentrifugation separiert die Zellen entsprechend ihrer eigenen Dichte. Erythrozyten (~1,1 g/ml) und Granulozyten (~1,08 g/ml) finden sich unter der Ficollschicht im Pellet wieder, Monozyten und Lymphozyten (~1,07 g/ml) schwimmen in der Interphase unmittelbar über ihr, gefolgt von den Thrombozyten (~1,05 g/ml) im Restplasma (~1,03 g/ml). Die PBMC können nun behutsam abpipettiert, in Waschschritten von verschlepptem Ficoll gereinigt und weiterverarbeitet werden.

I.6.3. Magnetische Zellseparation

Ein weiteres Instrument zur Zellseparation und -anreicherung ist die magnetische Isolierung mit MACS® MicroBeads. Diese kleinsten paramagnetischen und biologisch abbaubaren Partikel sind mit an sie gebundenen monoklonalen Antikörpern oder anderen spezifischen Proteinen erhältlich. Über eine kleine Metallgittersäule, die in ein magnetisches Feld platziert wird, können Zellpopulationen anhand von Oberflächenmarkern und den daran gebundenen MicroBeads selektiert oder von ungewünschten Gruppen depletiert werden. Partikeltragende Zellen bleiben in der Säule zurück, während alle übrigen sie ungehindert

durchlaufen. Die aus dem Magnetfeld entfernte Säule gibt die retinierte Population wieder frei.

I.6.4. *In vitro* Erzeugung von aus Monozyten abgeleiteten DC

In inflammatorischem Milieu sind Monozyten *in vivo* dazu in der Lage in eine Subgruppe von dendritischen Zellen zu differenzieren. Zahlreiche Protokolle existieren, die diesen Prozess ins Reagenzgefäß übertragen. Meist sorgt ein Zytokinmilieu aus GM-CSF und IL-4 (alternativ IL-13) in fünf bis sieben Tagen für eine Entwicklung von aufgereinigten Monozyten hin zu unreifen dendritischen Zellen. Neuere, optimierte Protokolle kommen sogar mit 48 Stunden aus. Strategien zur sich anschließenden Reifung sind noch vielseitiger und beeinflussen Phänotyp und Funktion - und damit auch die Eigenschaften bezüglich Immunantwortpolarisierung - der resultierenden reifen DC. Am verbreitetsten ist das Zytokincocktail aus TNF α , IL-1 β , IL-6 und ProstaglandinE2. Aber auch andere Kombinationen aus TNF α , Interferonen, Interleukinen und *toll-like*-Rezeptor-Liganden finden Verwendung. Nach weiteren 24-48 Stunden können die reifen DC geerntet werden.^{31,97}

I.6.5. *In vitro* priming und Expansion von T-Zellen

Mit unphysiologisch hohen Konzentrationen an extern zugeführtem synthetischen Peptid lassen sich die natürlich präsentierten Liganden des entsprechenden MHC-Moleküls aus der Bindungsfurche verdrängen und ersetzen. Diesem rein extrazellulären kompetitiven Mechanismus gesellt sich für dendritische Zellen eventuell auch noch der Umweg über das Zellinnere mit Phagozytose und *cross*-Präsentation zu. Jedenfalls sind solche Peptid beladenen DC wunderbar geeignet um *in vitro* (als auch *in vivo*) die für das Peptidantigen spezifische naive T-Zelle zu Differenzierung und Proliferation anzuregen (*priming*).

Durch Zugabe von IL-2, dem T-Zell-Wachstumsfaktor, wird dieser Vorgang unterstützt. Wiederholte Konfrontation, also Restimulation der entstehenden Population mit dem immunogenen Peptid – etwa wöchentlich, oder im Rhythmus von zehn Tagen – konsolidiert und expandiert sie weiter. Hierfür eignen sich, für

CD8⁺ T-Zell-Stimulation prinzipiell alle autologen MHC Klasse I tragenden Zellen, jedoch, am besten autologe PBMC, die B-Zellen und Monozyten mit zusätzlich co-stimulatorischem Potential enthalten und einfach und in ausreichender Quantität zu gewinnen sind. Eine Bestrahlung verhindert ihre unspezifische Proliferation.

Spätestens nach vier Zyklen sollte im Erfolgsfall eine distinkte Population durchflusszytometrisch nachweisbar sein. Gelingt es darüber hinaus diese zu isolieren, können auch kräftige unspezifische Signale wie allogene bestrahlte PMBC, hohe Konzentrationen an IL-2 und aktivierende Antikörper gegen CD3 und CD28 eine zügige Expansion vermitteln.^{98,99}

I.6.6. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein zentrales Instrument in der Immunologie. Sie ermöglicht phänotypische und funktionelle Multiparameteranalysen von Zellsuspensionen auf Einzellzellniveau.

Eine angesaugte Suspension wird vom Gerät zu einem feinen schnell fließenden Strahl verarbeitet, dessen Durchmesser nur für jeweils eine Zelle Raum bietet. Es bedient sich dabei einer vibrierenden Fließkammer und der hydrodynamischen Fokussierung, also der Umrahmung der Zellsuspension im führenden Röhrchen mit einer weiteren fließenden Flüssigkeit, welche engere Durchmesser des Strahls ermöglicht. Jede einzelne Zelle wird nun nacheinander durch einen oder mehrere Laserstrahlen geschickt worauf Photodioden resultierende Streu- und Fluoreszenzsignale aufgreifen, die von einer Software gesammelt und verarbeitet werden. Ohne vorherige Präparation mit Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich die Streusignale des 488nm Lasers detektieren: Das *forward scatter* [FSC] ist das Refraktionssignal entlang der Ausrichtung des Laserstrahls und korreliert grob mit dem Zellvolumen. Als *side scatter* [SSC] wird Streulicht bezeichnet, das von einer senkrecht zu Laser- und Suspensionsstrahl positionierten Photodiode aufgegriffen wird. Es ist ein Maß für die innere Komplexität der Zelle, also Beschaffenheit des Kerns, Anzahl der Vesikel und Granula. Anhand dieser beiden Werte lassen sich Lymphozyten schon von Granulozyten, Erythrozyten und Monozyten unterscheiden. Weitere Differenzierung ist durch

Fluoreszenzfarbstoffe möglich. Manche dieser Farbstoffe binden direkt an bestimmte Moleküle der Zelle, andere sind an spezifische monoklonale Antikörper gekoppelt, die sowohl Oberflächenmarker als auch intrazelluläre Strukturen, nach Permeabilisierung der Zellmembran, markieren können. Verwendung von Lasern verschiedener Wellenlängen und Einbau unterschiedlicher Filter verbreitert das Spektrum an gleichzeitig einsetzbaren Fluoreszenzfarbstoffen und potenziert die Multiparameteranalyse.

Bei den Experimenten zu dieser Arbeit kam das FACS Canto II (Becton Dickinson) zum Einsatz, welches über drei Laser mit den Wellenlängen 488nm, 405nm und 633nm verfügt und bis zu acht Farben gleichzeitig zu detektieren vermag.

I.6.7. Intrazelluläre Zytokinfärbung

Es ist möglich die Zytokinproduktion stimulierter Immunzellen per Durchflusszytometrie zu charakterisieren. Blockade des intrazellulären Proteintransports mit den Antibiotika Monensin oder Brefeldin A relativ zeitnah nach Stimulation resultiert in einer Akkumulation der Botenstoffe in endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat.^{100,101} Schließt sich eine Saponin vermittelte Permeabilisierung der Zellmembran an, können mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper eindringen und an die Zytokine binden. Die Kombination mit Färbungen typischer Zelloberflächenmarker ist in einem Zwischenschritt uneingeschränkt möglich.¹⁰²

I.6.8. Zytotoxizitätstests

Verschiedene Ansätze existieren um das antigenspezifische MHC-restringierte zytotoxische Potential einer CTL Population zu quantifizieren. Gemein ist allen folgendes: Eine Zielzelle muss das relevante MHC Klasse I Molekül an ihrer Oberfläche tragen und auch das Zielantigen exprimieren. Alternative ist die Beladung mit entsprechenden Peptiden.

Ihre Markierung kann nun mit radioaktivem Chrom (⁵¹Cr) oder Fluoreszenzfarbstoffen geschehen. Das Chrom entweicht bei Inkubation mit einer Effektorzellli-

nie aus den getöteten Zellen in den Überstand und dessen Radioaktivität fungiert dann als Maß für spezifische Zytotoxizität. Bei den Fluoreszenzfarbstoffen ist es die Abnahme der markierten Zellpopulation in der Durchflusszytometrie die auf den Grad der Lyse schließen lässt. Hierbei sind gleichzeitig phänotypische und dynamische Analysen - auch der Effektoren - möglich.¹⁰³

II. Material und Methoden

II.1. Material

II.1.1. Geräte

Peptide Synthesizer EPS 221	Abimed
Peptide Synthesizer ABI 433A	Applied Biosystems
Feinwaage	Sartorius
Wasserbad	Braun Biotech
Sterilbank Tecnoflow	Integra Biosciences
Pipettenhalter PipetBoy	Integra Biosciences
Pipetten (1000µl, 200µl, 20µl, 2µl)	Abimed
Mehrkanalpipette (200µl)	Abimed
Zentrifugen Labofuge400; Megafuge2.0R	Heraeus
Vortexer	Scientific Industries
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1mm)	Assistent
Lichtmikroskop	Leica
Einfrierbox für <i>cryo-vials</i>	Nalgene
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	Sanyo
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Inkubator (37°C, 5%CO ₂)	Heraeus
Bestrahlungseinheit (Cs-137) Gammacell 1000 Elite	Nordion International Inc.
MACS®-Magnet	Miltenyi Biotech
Eismaschine	Scotsman
Durchflusszytometer FACS Canto II (Software FACSDiva)	Becton Dickinson
Elektroporator Gene Pulser II	BioRad

II.1.2. Reagenzien, Reagenzgefäße, Verbrauchsmaterialien

Brefeldin A	Sigma
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma/PAA

II. Material und Methoden

<i>CompensationBeads Set</i>	Becton Dickinson
Cryo-Röhrchen (2ml)	Greiner
Cytofix/Cytoperm + <i>PermWash</i> Puffer	Becton Dickinson
Descosept	Dr. Schuhmacher GmbH
ddH ₂ O (doppelt-destilliertes H ₂ O)	eigenes Labor
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
DNase I	Roche
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth
Elektroporationsküvetten (<i>gap</i> 4mm)	Peqlab
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2ml)	Eppendorf
FACS- <i>clean</i> , - <i>rinse</i> , <i>flow</i>	Becton Dickinson
FACS-Röhrchen (5ml)	Becton Dickinson
Falcon-Röhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio One
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Lonza/PAA
Filter 70µm	Becton Dickinson
Fugene®6 <i>Transfection Reagent</i>	Roche
Gentamicin (10mg/ml)	Cambrex Bioscience
Glasflaschen	Schott
GolgiPlug®/GolgiStop® (BrefeldinA/Monensin)	Becton Dickinson
Humanserum (gepoolt, hitzeinaktiviert)	Blutbank/eigenes Labor
IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium)	Lonza
Ionomycin	Sigma
Lipofectamine™2000 <i>Transfection Reagent</i>	Invitrogen
Lymphozytenseparationsmedium LSM1077	PAA
MACS®Säulen	Miltenyi Biotech
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Opti-MEM® I	Invitrogen
PBS ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺	PAA
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA
PHA (Phythämagglutinin)	Sigma
Pipettenaufsätze (1000µl, 200µl, 20µl, 2µl)	Starlab
PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat)	Sigma

Puromycindihydrochlorid	Sigma
Reagenzplatten:	
<i>round-bottom 96-well</i>	Corning Inc.
<i>flat-bottom 96/48/24/12/6-well</i>	Corning Inc.
Reservoirs (50ml, 100ml)	Corning Inc.
RPMI1640 Gibco®	Invitrogen
SEB (Staphylokokken Enterotoxin B) S4881	Sigma
Streptavidin MicroBeads	Miltenyi Biotech
Trypanblau	Merck
TrypsinEDTA (200mg/L Versene)	Lonza
Zellkulturflaschen (250ml/550ml)	Nunc
Zellkulturflaschen (50ml/250ml)	Greiner Bio One

II.1.3. Angesetzte Zellkulturmedien und Puffer

Kulturmedium:	RPMI1640 + 10%HS + 1%Gentamicin/PenStrep
Adhärenzmedium:	RPMI1640 + 1%HS
DC-Einfriermedium:	FCS + 5%Glucose + 10%DMSO
T-Zell-Einfriermedium:	FCS + 10%DMSO
Tumorzellmedien:	
<i>Capan-1</i>	IMDM + 20%FCS + 1%PenStrep
<i>CF-PAC-1</i>	IMDM + 10% FCS + 1%PenStrep
<i>YPAC</i>	RPMI1640 + 10%FCS + 1%PenStrep
<i>K562(A2⁺)</i>	RPMI1640 + 10%FCS + 1%PenStrep
PBS+EDTA:	PBS + 5mM EDTA
FACS Puffer:	PBS + 2mM EDTA + 2%FCS + 0,01%NaN ₃
FACS Fix:	FACS Puffer + 1% Formaldehyd
MACS Puffer:	PBS + 2mM EDTA + 0,5% BSA

II.1.4. PBMC-Quellen

Aus dem Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin GmbH, HLA-Labor Universitätsklinikum Tübingen stellte uns Frau Prof. Dr. Wernet 22 Leukapheresepro-

II. Material und Methoden

dukte von 18 verschiedenen gesunden Spendern (siehe **Tab.2**) zur Verfügung. Zusätzlich wurde eine heparinisierte Vollblutspende verarbeitet.

Tab. 2 Auflistung der Blutspenden (22 Leukapheresen, eine Vollblutspende [D19]) mit zugehöriger Spendernummer, -blutgruppe und -HLA-Typisierung.

Spenden-Code	Spenderausweis-Nr. HLA-Labor	Blutgruppe	MHC Klasse I Allele
D1	?	?	A2
D2	BSD46525530	0+	B51 , A3, A30, B18, Cw2, Cw5
D3	A10810	B+	A2 , A29, B60, Cw3
D4	A36659	A+	B51 , A26, A28, B14, Cw8
D5/D9/D10/D15/D15.2	A8102	A+	B51 , A1, A24, B7, Cw3
D6/D7	BSD21681725	A+	A2 , B51, A3, B44, Cw5
D8/D8.2	A301	B+	A2 , A1, B49, B62, Cw3, Cw7
D11	A7278	A Rh?	A2 , B35, B44, Cw4, Cw5
D12/D12.2	A20142	AB-	B51 , A2, A28, Cw1, Cw2
D13	BSD46529646	A+	B51 , A2, A1, B37, Cw6
D14/D14.2	A33125	AB+	A2 , B39, B49, Cw7
D16	BSD46539795	0+	A2 , A3, B7, Cw7
D17	A26811	A+	B51 , A24, Cw1
D18	A2848	0 Rh?	A2 , B51, A3, B35, Cw4
D19	keine	A-	A2

II.1.5. Peptide

Auswahl: siehe Abschnitt III.1.

Synthese: siehe Abschnitt II.2.2.

II.1.6. Zytokine und DC-Reifungssignale

IL-1 β	Strathmann Biotech
rIL-2 (Proleukin®)	Chiron
rHuIL-4	PromoKine
rHuIL-7	PromoKine
rHuIL-15	PromoKine
GM-CSF	PromoKine
TNF α	PromoKine
PGE2	Sigma
poly Inosin:Cytosin	Amersham

Lipopolysaccharid	Sigma
R848 (Resiquimod)	Alexis Biochemicals
IFN γ	PromoKine

II.1.7. Antikörper und Färbereagenzien

Tab.3 Zusammenstellung der verwendeten Antikörper und Färbereagenzien für Durchflusszytometrie, magnetische Zellseparation und unspezifische T-Zell-Expansion.

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Klon	Hersteller	Verdünnung
ICS-Durchflusszytometrie				
α CD3	FITC	UCHT1	BD	1:50
α CD8	PerCP	SK1	BD	1:25
α CD4	APC	SK3	BD/Immunotools	1:50
α CD4	APC-Cy7	RPA/T4	BD	1:100
α IFN γ	PE	n.a.	BD	1:120
α TNF α	PaBlue	Mab11	Biolegend	1:120
α IL-2	APC	n.a.	BD	1:120
α CD107a	FITC	n.a.	BD	1:100
-	Aqua-live/dead®	-	Invitrogen	1:400
Zellliniencharakterisierung				
α HLA-A/B/C	-	W6.32	eigenes Labor	1:100
α HLA-A*02	-	BB7.2	eigenes Labor	1:500
Goat-anti-mouse IgG F(ab') ₂ Fragment	FITC	n.a.	Jackson IR	1:100
Magnetische Separation				
α CD8 biotinyliert	-	OKT8	eigenes Labor	-
CD14MicroBeads	-	n.a.	Miltenyi	-
Magnetische Anreicherung IFN γ -sezernierender Zellen				
IFN γ -Secretion-Assay kit	(PE)	n.a.	Miltenyi	-
Schnelle Expansion				
α CD3	-	OKT3	ebioscience	-
α CD28	-	H9.3	eigenes Labor	-

II.1.8. Tumorzelllinien

Tab.3 Liste der untersuchten und angewendeten Tumorzelllinien.

Name	Ursprung	Referenz	Quelle
Capan-1	Pankreasadenokarzinom, Lebermetastase	Fogh 1977	eigenes Labor
YAPC	Pankreaskarzinom, maligner Aszites	Yamada 1998	Med. Klinik Universität Erlangen, H. Ocker
CF-PAC-1	Pankreasadenokarzinom, Lebermetastase, CF-Patient	Schoumacher 1990	Biologisches Institut Universität Kopenhagen, Fr. Olsen
K562 A2 ⁺	CML, erythroleukämische Blastenkrise, HLA-A2 transfiziert	Andersson 1979	eigenes Labor

II.1.9. Plasmidvektor

Das PvuI-linearisierte *pIRESpuro*-DNA-Plasmid mit Puromycinresistenzgen und HLA-A*0201-Sequenz wurde freundlicherweise vom Laborkollegen *Ludger Grosse-Hovest* zur Verfügung gestellt.

II.2. Methoden

II.2.1. Epitopvorhersage mit „SYFPEITHI“

Anhand unseres *online* frei verfügbaren Epitopvorhersage-*tools* (www.syfpeithi.de) erfolgte die Prädiktion für wahrscheinliche HLA A*0201- und HLA B*5101-restringierte CD8⁺ T-Zell-Epitope aus der 469 Aminosäuren langen Sequenz des Zytokeratins 7. Eine Auswahl der Peptide mit den höchsten Summenwerten wurde synthetisiert.

II.2.2. Peptid-Synthese

Patricia Hristic und *Stefan Stefanovic* synthetisierten freundlicherweise alle von uns gewünschten Peptide in unserem eigenen Labor. Die Produkte der *Fmoc*-Schutzgruppen-Chemie aus ABIMED *Economy Peptide Synthesizer* EPS 221 und ABI 433A *Peptide Synthesizer* durchliefen eine organisch-chemische Aufar-

beutung und anschließend eine qualitative Überprüfung im MALDI-Massenspektrometer. Lyophilisierung ermöglichte eine längerfristige Aufbewahrung bei 4°C.

Vorbereitung für den *in vitro* Einsatz

(1) Etwa 1mg mit der Feinwaage abgewogenes Lyophilisat kam zur Lösung in DMSO für eine Endkonzentration von 10mg/ml. Eppendorfalliquots von jeweils 10µl wurden bei -80°C tiefgekühlt.

(2) Zugabe von 90µl PBS in ein Aliquot kurz vor der Verwendung lieferte eine einsatzbereite Peptidlösung mit 1µg/µl, die bei 4°C maximal für vier Wochen aufbewahrt werden konnte.

II.2.3. PBMC-Isolierung

Nach 1:2-Verdünnung des Leukaphereseprodukts bzw. der heparinisierten Vollblutspende mit PBS in Zimmertemperatur unter sterilen Bedingungen erfolgte die vorsichtige Schichtung dieser Suspension auf jeweils 10-15ml Ficoll™ in ca. vier 50ml-Falcon-Röhrchen. Zentrifugation bei Zimmertemperatur mit 2000rpm für 30 Minuten und deaktivierter Bremse lieferte die typische Phasenschichtung und ermöglichte vorsichtiges Einsammeln der PBMC-haltigen Interphase mit einer Pipette direkt über der Ficoll™-Schicht. Dreimaliges gründliches Waschen in kaltem PBS und gekühlter Zentrifuge (4°C) - nun mit aktivierter Bremse und sukzessiv abnehmenden Rotationsgeschwindigkeiten (1600rpm, 1400rpm, 1200rpm) jeweils für zehn Minuten - befreite die PBMC-Fraktion weitgehend von Plasma- und Ficoll™-Resten, sowie Thrombozytenverunreinigungen. Die erhaltenen Zellen wurden gezählt, direkt weiterverarbeitet oder zum späteren Einsatz tiefgefroren (siehe II.2.5.) aufbewahrt.

II.2.4. Zellzahlbestimmung

Nach Verdünnung einer Zellsuspensionsprobe mit Trypanblau konnte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop deren Zellzahl bestimmt werden. Trypanblau vermag die intakte Zellmembran nicht zu durchdringen, färbt somit nur die Proteine nicht-vitaler Zellen an und lässt die viablen Zellen

hell auf blauem Hintergrund erscheinen. Aufgrund der Zytotoxizität des Farbstoffes muss die Auszählung immer unmittelbar nach Anfärbung erfolgen. Bei korrekt aufgebrachtem Deckgläschen sind Newtonsche Ringe sichtbar und es bildet sich über jedem Großquadrat der Zählkammer ein definiertes Volumen von 0,1µl (Fläche 1mm², Tiefe 0,1mm) aus. Die Zellzahl der gesamten Suspension berechnet sich dann nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} = \frac{(\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Gesamtvolumen der Zellsuspension})}{(\text{Anzahl der betrachteten Großquadrate} \times \text{Volumen über einem Großquadrat})}$$

Bei Auszählung von vier Großquadraten und einer Verdünnung von 1:2 lässt sich vereinfachen:

$$\text{Zellzahl} = \text{gezählte Zellen} \times (5000/\text{ml}) \times \text{Gesamtvolumen der Zellsuspension in ml}$$

II.2.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Resuspendierung von Zellpellets die für den späteren Gebrauch tiefgefroren werden sollten erfolgte im entsprechenden 4°C kalten Einfriermedium; für PBMCs in Aliquots von 10⁸/2ml oder 2x10⁷/1ml, für DCs in einer Zelldichte von 1-2x10⁷/ml. Die sofortige Überführung der Röhrchen in eine Umgebung von -80°C unterstützte ein Isopropanolkontainer, der schonendes Abkühlen um ca. 1°C/min ermöglicht.

Beim Auftauvorgang wurden die Zellen direkt in 10ml 4°C kaltes DNase-haltiges Auftaumedium aufgenommen: Der Inhalt des tiefgefrorenen Röhrchens konnte bei gleichzeitiger vorsichtiger Handwärme Stück für Stück mit Auftaumedium angespült, eingesaugt und in ein 15ml Röhrchen überführt werden. Es folgten Waschvorgang (PBMC: 1200rpm, 10min; DC: 1500rpm, 7min) und Aufnahme in warmes Kulturmedium.

II.2.6. Magnetische Zellseparation mit MACS® MicroBeads

Magnetisch separiert wurden ab Spende D6 die CD8⁺ T-Zellen unmittelbar vor dem *priming* sowie teilweise Monozyten (CD14⁺) für die *in vitro* Erzeugung von dendritischen Zellen.

Alle Bearbeitungsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen auf Eis. Bis zu 2×10^9 Zellen können mit einem Ansatz durch eine MACS® LS Säule geschickt werden wobei maximal 10^8 Zellen mit MicroBeads markiert sein dürfen. Die gewünschte Anzahl an PBMC kam also nach Zentrifugation (1500rpm, 5min, bei 4°C) in MACS Puffer zur Resuspension - mit einer Zielkonzentration von 2×10^8 /ml - und dann in Kontakt mit 5µg/ml biotinyliertem OKT8 (anti-CD8) Antikörper. Nach 15min Inkubation bei 4°C folgte die Zugabe von weiteren 10ml MACS Puffer und zwei Waschschrte in der weiterhin kalten Zentrifuge (1200rpm, 10min, 4°C; 1500rpm, 5min, 4°C). Resuspension, Inkubation und Waschschrte wurden gleichermaßen für die Streptavidin-Beads (10µl/ 2×10^7 -Zellen) wiederholt. Streptavidin verfügt über vier Bindungsstellen für Biotin und koppelt die paramagnetischen Beads an den biotinylierten OKT8 Antikörper.

Die in 500µl MACS Puffer resuspendierten Zellen konnten nun auf eine im Magnetfeld platzierte, mit 2x3ml Puffer equilibrierte Säule gegeben werden. Drei Spülvorgänge mit jeweils 3ml schlossen sich an. Der Puffer sollte hierbei immer vollständig die Säule durchlaufen haben bevor ein frisches Volumen zugegeben wurde. Unmarkierte Zellen fing ein 15ml Falcon Röhrchen unter der Säule stehend auf. Anschließend gab die vom Magneten gelöste Säule die markierten Zellen wieder in ein weiteres 15ml Falcon Röhrchen frei indem 4ml Puffer zügig unter Stempeldruck hindurchgepresst wurden. Zwei Waschvorgänge für beide Fraktionen (1500rpm, 10min, 4°C), Bestimmung der Zellzahl und geplante Weiterverarbeitung schlossen sich an.

Die Separation von CD14⁺ Monozyten geschah in gleicher Weise – bis auf den Einsatz des Streptavidins, denn die anti-CD14 Antikörper sind direkt an MicroBeads gekoppelt. Eine Titration offenbarte hier vergleichbare resultierende Reinheiten mit 10µl/ 10^7 Zellen wie mit den vom Hersteller empfohlenen 20µl/ 10^7 Zellen, sodass mit dem geringeren Volumen gearbeitet wurde.

II.2.7. Erzeugung von Dendritischen Zellen aus Monozyten

Gewinnung einer aufgereinigten Monozytenpopulation aus PBMC erfolgte überwiegend über Zelladhärenz, für einzelne Spender jedoch mit Hilfe magnetischer Zellseparation.

Bei der Zelladhärenz macht man sich die Fähigkeit der Monozyten an Plastik- oder auch Glasoberflächen haften zu können zu Nutzen.¹⁰⁴ Inkubation einer PBMC-Suspension von $120\text{-}150 \times 10^6$ Zellen in 10ml Adhärenzmedium in einer liegenden 75cm^2 Kulturflasche für zwei Stunden (bei 37°C und $5\%\text{CO}_2$) genügt um die Lymphozyten danach mit vorsichtiger Spülung per Pipette und Medium bzw. PBS auswaschen zu können.

Die magnetische Zellseparation stützt sich in diesem Falle auf das Monozyten-spezifische Oberflächenmolekül CD14 für das an paramagnetischen Beads gekoppelte Antikörper zur Verfügung stehen. Die prinzipielle Methodik und der Versuchsablauf ist in Abschnitt II.2.6 weiter erläutert.

In beiden Fällen mussten die PBL (*peripheral blood lymphocytes* = monozyten-depletierte PBMC) für die bevorstehenden Stimulationsversuche entweder analog der Verfahrensweise für PBMC tiefgefroren oder aber über die Zeit der Erzeugung der DC für acht Tage in Kultur genommen werden. Letzteres erfolgte bei einer Zelldichte von $10^7/\text{ml}$ und der Versorgung mit T-Zell Wachstumsfaktoren - jeweils an Tag 0 und Tag 3/4 50U/ml IL-2 und 5ng/ml IL-7.

Die in den Kulturflaschen verbliebenen bzw. nach magnetischer Zellseparation dorthin überführten Monozyten erhielten an Tag 0 in 10ml warmem Kulturmedium 35ng/ml IL-4 und 250U/ml GM-CSF. Die Zytokingabe wiederholte sich für Tag 2, 4, (6) bevor an Tag 5 (bzw. 7) die Reifung der nun vorliegenden iDC (*immature dendritic cells*) initiiert werden konnte. Zwei verschiedene Protokolle kamen hier im Verlaufe der Experimente zum Einsatz. Zunächst ein weit verbreitetes Zytokincocktail (1), später dann mehrere TLR-Liganden (2):

- (1) 20ng/ml IL-4 + 800U/ml GM-CSF + 10mg/ml TNF- α , 10ng/ml IL-1 β , 10ng/ml IL-6, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PGE2;
- (2) 35ng/ml IL-4 + 250U/ml GM-CSF + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly I:C (synthetischer TLR3-Ligand), 100ng/ml LPS (natürlicher TLR4-Ligand), 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ R848 (synthetischer TLR7/8-Ligand).

Nach weiteren 48h konnten die reifen DCs, nun zum größten Teil frei flottierend, geerntet werden. Noch adhärenzte Zellen lösten sich nach Zugabe von PBS + 5mM EDTA, wenigen Minuten Inkubation und vorsichtiger Klopfmanipulation. Alle Waschschrirte für DC erfolgten mit 1500rpm für 7min. Die Zellen wurden sofort anschließend für ein *priming* eingesetzt und verbleibende Anteile in DC-Einfriermedium tiefgefroren.

Aufgrund der reichen Erfahrungswerte mit dieser Art von DC-Generation in unserem Labor wurde auf eine durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen verzichtet. Morphologisch konnte der Reifeprozess jedoch anhand eindrücklicher charakteristischer Dendriten- (iDC) und Clusterbildung (mDC) unter dem Lichtmikroskop verfolgt werden.

II.2.8. Priming und Restimulation

Das *priming* erfolgte in 24well-Platten mit $0,5 \times 10^6$ Peptid beladenen reifen DC und 3×10^6 PBL bzw. $2-2,5 \times 10^6$ aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen pro Vertiefung.

Die benötigte Anzahl an DC wurde in Kulturmedium aufgenommen (maximal 5×10^6 /ml, falls nicht ausreichend Wahl eines höheren Volumens), mit vier verschiedenen Peptiden (jeweils 25µg/ml) beschickt und für zwei Stunden bei 37°C/5%CO₂ inkubiert. Währenddessen kamen die PBL bzw. aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen in 1ml/well Kulturmedium zur Aussaat. Die randständigen Vertiefungen wurden ausgespart und mit jeweils 2ml PBS gefüllt um Verdunstungseffekte abzufangen. Nach abgelaufener Inkubationszeit folgte die Verdünnung der Peptid:DC-Suspension auf ein ausreichendes Volumen für ebenfalls 1ml/well und die Zusammenführung mit den T-Zellen. Endvolumen für die acht zentralen wells war somit ebenfalls 2ml. Die Co-Kultur verblieb anfangs für sieben Tage im Inkubator, lediglich ein Farbumschlag des Mediums veranlasste zum Wechsel eines Bruchteils (bis zu 50%) desselben. Im Verlaufe dieser Arbeit kam ein abgeändertes Protokoll zu tragen, welches über zehn Tage ging und zusätzlich an Tag 3 und Tag 5 jeweils 5ng/ml IL-7 und IL-15 zur Optimierung der *in vitro* Bedingungen für die T-Zellen vorsah.

Rekonfrontation mit Peptiden, die **Restimulation**, folgte also an Tag 10 (anfangs an Tag 7). Wenn noch eine ausreichende Zahl an tiefgekühlten autologen

DC vorhanden war wurde sie genutzt, ansonsten fanden die PBMC des selben Spenders Verwendung: analog zum *priming* $0,5 \times 10^6$ DC jedoch auf 2×10^6 Lymphozyten (altes Protokoll: 3×10^6) für jedes *well*, oder 3×10^6 PBMC und $0,5-1 \times 10^6$ Lymphozyten (altes Protokoll: $2,5 \times 10^6$) in jede Vertiefung. Alle *well*-Inhalte wurden vorsichtig mit der Pipette aufgenommen und in Röhrchen gepoolt, abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen, gezählt und entsprechend ausplattiert. Peptidkonzentrationen für Beladung der DC bzw. PBMC, Inkubationszeiten und Volumina entsprachen dem *priming*-Protokoll. Die PBMC mussten vor der Beladung lediglich mit 30 Gray bestrahlt werden um ein mögliches Überwachsen der Kultur durch unspezifische Proliferation zu verhindern. Es schloss sich dann eine erneute zehntägige Inkubation (altes Protokoll: sieben Tage) an, bevor die nächste Restimulation erfolgen konnte. An Tag 1+3+5 bekamen die Zellen immer 50U/ml IL-2, ausschließlich nach der ersten Restimulation gemeinsam mit 5ng/ml IL-7 und 5ng/ml IL-15 (altes Protokoll: Tag 1+3+5 immer 25U/ml IL-2 und 5ng/ml IL-7), wenn nötig in bis zu 1ml frischem Medium. Über die fünf „Ruhetage“ bis zur erneuten Restimulation wurde ebenfalls die Indikatorfarbe des Mediums überwacht und bei Bedarf durch Austausch von meist 1ml aufgefrischt.

Am letzten Tag nach der zweiten sowie, wenn möglich, der vierten Restimulation war der Versuch des Nachweises einer spezifischen Effektorpopulation anhand Durchflusszytometrie einer intrazellulären Zytokinfärbung geplant. Sollte sich bei der ersten Analyse eine distinkte Population für ein bestimmtes Peptid zeigen, würden die folgenden Restimulationen nicht mehr mit den ursprünglichen vier sondern ausschließlich mit diesem einen ausgeführt werden.

Spätestens nach dem vierten Restimulationszyklus, also nach insgesamt 50 Tagen, wurde die Kultur bei negativen Ergebnissen verworfen, bei positiven – teilweise nach Aufreinigung und unspezifischer Expansion – für zukünftige Zytotoxizitätsexperimente tiefgefroren.

II.2.9. Intrazelluläre Zytokinfärbung

Am Tag der zweiten bzw. vierten Restimulation wurden für jedes verwendete Peptid $0,5-1 \times 10^6$ Zellen beiseite genommen, sowie zusätzlich für eine Positiv-

kontrolle, Mediumkontrolle, eine ungefärbte und die *Aqua-live/dead*[®]-Färbung Kontrolle. In jeweils 100µl Kulturmedium kamen sie in einer 96-*well* Platte zur Aussaat. Zugabe der Peptide (25µg/ml für ein Endvolumen von 200µl) jeweils in ein einzelnes *well* und der Positivkontrolle (PMA+Ionomycin: polyklonale Mitogene/Stimulatoren; 50ng/ml bzw. 1µM ebenfalls für ein Endvolumen von 200µl) in ein eigenes *well* initiierte die spezifische bzw. unspezifische Zytokinproduktion. Die drei *wells* der Medium-, ungefärbten und „lebend/tot“-Kontrolle blieben unstimuliert. Nach etwa einer Stunde im Inkubator (37°C/5%CO₂) folgte die Proteintransportblockade mit Monensin (1:1500 verdünnt) und Brefeldin A (1:500 verdünnt) in zusätzlichen 100µl Medium für jedes *well* (inklusive der Kontrollen) und dann fortgesetzte Inkubation für weitere 5-7 Stunden.

Anschließend wurde auf Eis und mit gekühlter Zentrifuge (4°C) gearbeitet. Zentrifugation der Platte (1800rpm, 2min), vorsichtiges Ausklopfen des Überstands um die Pellets nicht zu verlieren und zweimaliges Waschen mit 200µl gekühltem PBS ging der „lebend/tot“-Färbung voraus. *Aqua-live/dead*[®] ist ein Amingruppen bindender Fluoreszenzfarbstoff mit Exzitation bei 405nm Wellenlänge. Er bindet sowohl Zellmembranstrukturen als auch intrazelluläre Gruppen nekrotischer Zellen, deren Membran permeabel für den Farbstoff geworden ist und erlaubt somit eine Unterscheidung von vitalen und toten Zellen. Alle *wells* ausschließlich der ungefärbten Kontrolle (100µl reine PBS) wurden für 30min im Dunkeln auf Eis mit 100µl PBS + 1:400 verdünntem *Aqua-live/dead*[®] inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit 200µl PBS, dann einer mit 200µl gekühltem FACS-Puffer als Vorbereitung zur Oberflächenfärbung. In jeweils 50µl FACS-Puffer kamen CD3-, CD4- und CD8-Antikörper (αCD3-FITC, Verdünnung 1:50; αCD4-APC, 1:50 oder αCD4-APC-Cy7, 1:100; αCD8-PerCP, 1:25) mit den Zellen in Kontakt. Ungefärbte Kontrolle und „lebend/tot“-Kontrolle (zur Kompensation des Zytometers) wurden für die Inkubationszeit von 20min - weiterhin im Dunkeln auf Eis - in 50µl reinem FACS-Puffer resuspendiert. Gewaschen mit zusätzlichen 150µl FACS-Puffer schloss sich dann für alle *wells* die Aufnahme und Inkubation für 20min in 100µl Cytofix/Cytoperm (enthält Formaldehyd) an - zur Fixation und Retention der Zytokine in ihrer Originalposition für alle weiteren Schritte. Auffüllen mit 100µl 1:10 verdünntem *Permwash* (enthält Saponin) führ-

te zu Permeabilisierung der Zellmembran. Aufgrund der Zellschrumpfung als Nebeneffekt dieser Vorgänge mussten die sich anschließenden Zentrifugationschritte nun mit 1800rpm für 3min durchgeführt werden. Nach Abzentrifugation bekamen die in 50µl verdünntem *Permwash* Puffer aufgenommenen Antikörper für die Zytokinfärbung (meist αIFN γ -PE, Verdünnung 1:120; eventuell αTNF α -PaBlue, 1:120; vereinzelt αIL-2-APC, 1:120 und αCD107a-FITC (CD107a ist ein Degranulationsmarker), 1:100) 30min Inkubationszeit; ungefärbte Kontrolle und live/dead Probe wurden hierbei wieder in reinem verdünntem *Permwash* Puffer aufgenommen. Es folgte Auffüllen auf 200µl mit *Perwash* Puffer, Zentrifugation und ein weiterer Waschschrift mit der selben Lösung. Danach konnten die Zellen in 200µl FACS Fix resuspendiert werden und entweder direkt oder in den nächsten 24 Stunden (Aufbewahrung im Dunkeln bei 4°C) am Durchflusszytometer analysiert werden.

II.2.10. Anreicherung und Expansion spezifischer CD8⁺ Populationen

Eine in der Durchflusszytometrie detektierte, spezifisch Zytokin exprimierende Population anzureichern und in der Folge mit stärkeren Signalen unspezifisch zu expandieren geschah wie folgt:

IFN γ -Secretion-Assay

Mit diesem Ansatz lässt sich das von einer Zelle produzierte Zytokin IFN γ an deren Oberfläche, direkt nach Sekretion, mit einem Antikörperkonstrukt festhalten. Das eine der beiden gekoppelten Immunglobuline ist gegen ein ubiquitäres Lymphozytenzellmembranantigen gerichtet, das andere spezifisch für IFN γ . Stimulierte Zellen werden also mit dem Konstrukt markiert und nach einer Sekretionsperiode kann in einem weiteren Schritt das fixierte IFN γ mit PE markiert werden (αIFN γ -PE) und die gefärbten Zellen sind dann über αPE-MicroBeads magnetisch separierbar (vgl. II.2.6.).

Am Ende des letzten Restimulationszyklus wurden die Lymphozyten geerntet, bis zu 6×10^7 für einen Sekretionsansatz eingesetzt und der Rest tiefgefroren. Aussaat in RPMI1640 + 5%HS in passende Platten für eine Konzentration von 10^7 Zellen/ml und Dichte von 5×10^6 Zellen/cm² ging der Stimulation mit dem für

die aufzureinigende Population spezifischen Peptid (25µg/ml), das aus einer ICS-Analyse bekannt war, voran. Eine kleine Anzahl von Zellen ($1-2 \times 10^6$ jeweils) fungierte als Positiv- (10µg/ml SEB; als schwächeres Stimulans im Vergleich zur „Zytokinüberflutung“ bei PMA/Ionomycin hier besser geeignet) und als Negativkontrolle (nur Medium). Nach 3-6 Stunden in $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ wurde mit kaltem MACS-Puffer gewaschen (1200rpm, 10min), der Überstand komplett abpipettiert um Volumenfehler in der Folge zu vermeiden und die Pellets in 80µl/ 10^7 Zellen kaltem Medium (RPMI1640 + 5%HS) aufgenommen – bei Mengen bis zu 10^7 Zellen in ein 15ml, ansonsten in ein 50ml Falcon Röhrchen. Es folgte die Zugabe von 20µl/ 10^7 Zellen „Catch Reagenz“, dem bispezifischen Konstrukt, und eine 5min Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Suspensionen mit vorgewärmtem Medium auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml verdünnt und die geschlossenen Röhrchen für eine Sekretionsperiode unter langsamer Rotation für 45min bei $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ im Inkubator belassen. Die Rotation verhindert die Zusammenlagerung von Zellen und reduziert auf diese Weise ektopre Zytokinbindung. Zwei Waschschrte mit kaltem MACS-Puffer aufgefüllten Röhrchen in kalter Zentrifuge, Abpipettieren des kompletten Überstands und Wiederaufnahme in 80µl/ 10^7 Zellen kaltem Puffer gingen der Inkubation mit dem PE-Antikörper voraus. Die 20µl/ 10^7 Zellen $\alpha\text{IFN}\gamma\text{-PE}$ konnten mit einer Färbung von Oberflächenmarkern wie CD3, CD4, CD8 (Antikörper und Verdünnungen vgl. II.2.9) kombiniert werden. Der Waschschrte nach zehn Minuten Inkubation auf Eis im Dunkeln erfolgte in kaltem Puffer, jedoch nicht vor Separation eines kleinen Anteils der peptidstimulierten Fraktion zum späteren FACS-Vergleich mit dem Zustand nach Anreicherung. Positiv- und Negativkontrolle waren somit bereit für die zytometrische Analyse, die verbleibende Population der Peptidstimulation wurde nochmals in 80µl kaltem MACS-Puffer/ 10^7 Zellen resuspendiert und mit 20µl/ 10^7 Zellen $\alpha\text{PE-MicroBeads}$ im Kühlschrank ($4-8^\circ\text{C}$) für 15min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 10ml Puffer – Zentrifuge weiterhin wie bei allen Schritten mit 4°C , 1200rpm und 10min eingestellt – konnte die finale Aufnahme in jeweils 500µl MACS-Puffer und direkt anschließend die magnetische Separation erfolgen. Vorbereitung der Säulen und Durchführung sind in Abschnitt II.2.6. beschrieben. In diesem Fall sind vom Hersteller

jedoch für jede Probe zwei konsekutive Läufe empfohlen – aus der ersten Säule soll also die markierte Fraktion direkt in die zweite Säule gedrückt werden.

Nach der Zählung wurde ein kleiner Teil der gewonnenen angereicherten Zellen der Zytometrie zugeführt – für den Vergleich mit Positiv-, Negativkontrolle und Zustand vor der Anreicherung – die übrigen unspezifisch expandiert.

Unspezifische Expansion

Die angereicherte Zellpopulation wurde geteilt und der Versuch unternommen verschiedene Ansätze miteinander zu vergleichen. Diese waren hauptsächlich unspezifischer Art, manchmal fand jedoch auch das entsprechende Peptid Verwendung. Folgende Tabelle gibt einen Überblick:

Tab. 3 Verschiedene Protokollalternativen zur (Antigen-unspezifischen) APC-unabhängigen schnellen Expansion von aufgereinigten Effektorpopulationen. Vereinzelt kam jedoch auch das relevante Peptid zum Einsatz.

Tag 0	allogene mit 30Gy bestrahlte PBMC von drei verschiedenen Spendern im Verhältnis bis zu 100:1 (PBMC:Effektoren) +/- Peptid (25µg/ml)	
Tag 1	OKT3 + αCD28 (je 30ng/ml)	PHA (100ng-1µg/ml)
Tag 1+3+5	IL-2 (250U/ml) +/- IL-7 (25ng/ml)	
Tag 10	Restimulation (wie Tag 0)	
oder Tag 12	durchflusszytometrische Analyse per ICS	

Vorgehensweise und Kulturpflege erfolgte entsprechend dem *priming* und der Peptidrestimulation (siehe II.2.8.). Alle Ansätze wurden abschließend zum späteren Einsatz für Zytotoxizitäts-assays tiefgefroren.

II.2.11. Kultivierung und Charakterisierung von Tumorzelllinien

Die drei adhärent wachsenden Pankreaskarzinomzelllinien wurden mit 12-15ml der entsprechenden empfohlenen Medien (siehe II.1.3.) in liegenden 75cm²-Flaschen kultiviert. Kurz vor Konfluenz der Zellkolonien erfolgte Abnahme des Mediums, Inkubation für einige Minuten bei 37°C mit ~5ml Trypsin-EDTA zur vereinfachten Lösung vom Plastik und Herstellung einer Einzelzellsuspension, dann Teilen (1:4-10) und erneute Aussaat.

Ein Kollege aus dem pathologischen Institut in Tübingen, *Herr Hann von Weyhern*, erklärte sich bereit für die drei Linien eine Zytospin-Immunhistochemie auf Zytokeratin 7 durchzuführen.

Die HLA-Analyse für Gesamt-MHC Klasse I und HLA-A*02 im speziellen erfolgte durchflusszytometrisch mit und ohne Vorbehandlung der Zellen für 48 Stunden durch 500U/ml IFN γ , welches die HLA-Expression steigert. Zum Einsatz kamen W6.32 (Verdünnung 1:100), ein α -HLA-ABC Antikörper, und BB7.2 (Verdünnung 1:500), der spezifisch für HLA-A*02 ist. Zur Detektion eignete sich ein F(ab')₂-Fragment-spezifisches Ziege-anti-Maus-IgG gekoppelt an FITC (Verdünnung 1:100). K562(A*02⁺) fungierte als HLA-A*02 Positivkontrolle, PBMC eines Spenders (D9/D10) als HLA-A*02 Negativkontrolle. Für jede Zelllinie wurden Kontrollen ohne Färbung und mit alleinigem sekundärem Antikörper bereitgestellt. Inkubation für jeweils 15min geschah auf Eis im Dunkeln in FACS-Puffer, alle Zentrifugationsschritte verliefen mit 1500rpm für 7min.

Leider stand für HLA-B*5101 kein Antikörper zur Verfügung.

II.2.12. HLA-Transfektion

Im Laufe der Suche nach einer geeigneten Zielzelle für die Zytotoxizitätsexperimente fiel, um HLA-Kompatibilität zu gewährleisten, die Entscheidung für eine Transfektion der Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1. Der Kollege Ludger Grosse-Hovest stellte uns einen HLA-A*0201 kodierenden DNA-Plasmidvektor zur Verfügung und erklärte sich bereit auch ein Konstrukt mit dem selben Plasmid für HLA-B*5101 herzustellen, worauf die synthetische Sequenz hierfür besorgt wurde. Das *pIRESpuro*-Plasmid trägt ein Resistenzgen für das Antibiotikum Puromycin welches als Proteinsyntheseinhibitor nicht nur für prokaryote sondern auch für eukaryote Zellen toxisch wirkt. Linearisierung war mit der Restriktionsendonuklease *PvuI* erfolgt.

Die Transfektion gestaltete sich schwierig, so wurden sukzessive verschiedene Strategien zur DNA-Translokation wie Elektroporation und zwei unterschiedliche Lipidreagenzien (Fugene®6, Lipofectamine™2000) versucht:

Elektroporation

Etwa $10\text{-}20 \times 10^6$ Zellen aus der mittleren bis späten logarithmischen Wachstumsphase wurden nach Trypsinisierung vier Mal mit reinem IMDM gewaschen (1500rpm, 7min) und dann in 300 μ l IMDM in eine Elektroporationsküvette (*gap* 4mm) überführt auf Eis gelagert. Der Elektroporator kam empirisch mit von Experiment zu Experiment unterschiedlichen Einstellungen (0.200-0.230MV, 0,925-0,975 μ F) zuerst zweimal an einer mit PBS beladenen Küvette zur Entladung. Nach Zugabe von 15 μ l Plasmid (entsprechend etwa 15 μ g) in die Capan-1-Küvette und vorsichtiger Vermengung mit einer Pipette erfolgte die Platzierung im Gerät und der Stromstoß. Die zeitliche Dauer des Stromflusses wurde notiert. Dann vorsichtiges Abpipetieren und Ausspülen der Küvette mit anschließender Herstellung einer Verdünnungsreihe in IMDM für acht 96-*well* Platten, wobei bei jedem Schritt eine Halbierung der Zelldichte erzielt wurde. Nach 48 Stunden konnte das Medium durch frisches, puromycinhaltiges Selektionsmedium ausgetauscht werden (Zielkonzentrationsempfehlung: 5-10 μ g/ml; Titrationsexperimente für Capan-1 zeigten gute Wirksamkeit bis zu 2 μ g/ml). Alle zwei bis vier Tage erfolgte ein neuer Mediumwechsel und behutsames Auswaschen von Zelldebris. Die Platten hatten sich für einige Wochen einer Beobachtung zu unterziehen – eine entdeckte Kolonie sollte dann per Durchflusszytometrie betreffend ihrer HLA-Expression (HLA-ABC/HLA-A*02, vgl. II.2.11.) evaluiert werden.

Fugene®6

Einen Tag vor Transfektion wurden 3×10^5 Zellen in Medium ohne Antibiotika in 6-*well* Platten ausplattiert um am Tag des Experiments eine Konfluenz von 50-80% zu erreichen. In serumfreiem Medium erfolgte die Vorbereitung der DNA-Lipid-Komplexe: Zunächst wurde in einem sterilen Eppendorfgefäß direkt in serumfreies Medium das Fugeneagenz zugegeben ohne die Gefäßbewandung zu berühren und dem für 5min bei Raumtemperatur inkubierten Gemisch dann Plasmid hinzupipettiert. Nach mindestens weiteren 15min Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Komplexe tröpfchenweise den vorbereiteten *wells* zugeführt werden. Folgende drei verschiedene Verhältnisse wurden eingesetzt:

3µl Fugene mit 1µg Plasmid in 97µl IMDM; 3µl Fugene mit 2µg Plasmid in 97µl IMDM, 6µl Fugene mit 1µg Plasmid in 94µl IMDM.

Nach 48 Stunden kam es zur Überführung in Selektionsmedium (Zielkonzentration: 2-5µg/ml Puromycin) – meist in 96-*well* Platten ebenfalls als *limiting dilution*.

Lipofectamine™ 2000

Hier erfolgte die Vorbereitung einen Tag vor Transfektion mit 10^5 Zellen je Vertiefung einer 24-*well* Platte. Komplexe in Verhältnissen von 1:1-1:5 (DNA-Plasmid in µg : Lipofectamin in µl) kamen zum Einsatz. In jeweils 50µl Opti-MEM Medium wurden Plasmid und Lipidreagenz getrennt aufgenommen und nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur zusammengeführt. Nach weiteren 25min Inkubation konnte das Gemisch tröpfchenweise den Zellen zugegeben und zwei Tage später die Puromycinselektion begonnen werden. Verarbeitung und Beobachtung entsprachen hierbei den vorangehenden beiden Ansätzen.

III. Ergebnisse

III.1. PeptidAuswahl

Die 469 Aminosäuren tragende Kette des Zytokeratins 7 lässt sich theoretisch in 461 verschiedene Nonamere, 462 Oktamere oder 460 Dekamere zerschneiden. Die höchstplatzierten zwei Prozent der SYFPEITHI-Vorhersage beinhalten als Spitzengruppe mit hoher Wahrscheinlichkeit ein natürliches Epitop und bestanden in diesem Fall also aus den etwa neun erstpositionierten Sequenzen für jede Peptidlänge. Für HLA-A*0201 wurden die vier höchstplatzierten Nona- und Dekamere ausgewählt - HLA-A*0201 bindet kaum Oktamere; für HLA-B*5101 die ersten drei Oktamere und sieben Nonamere - HLA-B*5101 bindet kaum Dekamere. Insgesamt standen nach Synthese demnach 18 Peptide (siehe **Tab.4**) zur Verfügung. Zur Veranschaulichung der Positionierung der Peptide in der Gesamtproteinsequenz dient **Abb.9**.

Tab. 4 Auflistung der ausgewählten, synthetisierten und getesteten Peptide mit korrespondierendem MHC-Allel, Peptidlänge, Aminosäuresequenz, Position in der CK7-Kette, SYFPEITHI-Vorhersagewert und interner Laborkodierung.

MHC-Allel	Länge	Sequenz	Position	SYFPEITHI-score	Labor-Code
A*0201	Nonamer	DLDGIIAEV	256-264	29	80289
A*0201	Nonamer	ALNDEINFL	217-225	29	80294
A*0201	Nonamer	GLRGQLEAL	147-155	28	81114
A*0201	Nonamer	KLLETKWTL	117-125	27	81101
A*0201	Dekamer	TLNETELTEL	227-236	29	80290
A*0201	Dekamer	RLAGDGVGAV	402-411	29	80293
A*0201	Dekamer	DIFEAQIAGL	139-148	27	81100
A*0201	Dekamer	GLGSSSLYGL	33-42	27	81102
B*5101	Oktamer	DAAYMSKV	202-209	24	81108
B*5101	Oktamer	FASFIDKV	102-109	24	81104
B*5101	Oktamer	DVGAVNI	406-413	23	81113
B*5101	Nonamer	DADPSLQRV	79-87	25	81107
B*5101	Nonamer	TAAENEFVV	188-198	24	81117
B*5101	Nonamer	GAGIREVTI	60-86	23	81122
B*5101	Nonamer	LAGDGVGAV	403-411	23	80303
B*5101	Nonamer	AAYMSKVLEL	203-211	22	80301
B*5101	Nonamer	DARAKQEEL	349-357	22	81126
B*5101	Nonamer	LPDIFEAQI	137-145	22	81127

III. Ergebnisse

10	20	30	40	50	60
MSIHFSSPVF	TSRSAAFSGR	GAQVRLSSAR	PGGLGSSSSLY	GLGASRPRVA	VRSA YGGPVG
MSIHFSSPVF	TSRSAAFSGR	GAQVRLSSAR	PGGLGSSSSLY	GLGASRPRVA	VRSA YGGPVG
70	80	90	100	110	120
AGIREVTINQ	SLLAPLRLDA	DPSLQVRQE	ESEQIKTLNN	KFASFIDKVR	FLEQQNKLL <u>E</u>
AGIREVTINQ	SLLAPLRLDA	DPSLQVRQE	ESEQIKTLNN	KFASFIDKVR	FLEQQNKLL <u>E</u>
130	140	150	160	170	180
TKWTL LQE QK	SAKSSRLPDI	FEAQIAGLRG	GLEALQVDGG	RLEAELRSMQ	DVVEDFKNKY
TKWTL LQE QK	SAKSSRLPDI	FEAQIAGLRG	QLEALQVDGG	RLEAELRSMQ	DVVEDFKNKY
190	200	210	220	230	240
EDEINHRTAA	ENEFVVLKGD	VDAAYMSKVE	LEAKVDALND	EINFLRTLNE	TELTELQSQI
EDEINHRTAA	ENEFVVLKGD	VDAAYMSKVE	LEAKVDALND	EINFLRTLNE	TELTELQSQI
250	260	270	280	290	300
SDTSVVLSDM	NSRSLDL DGI	IAEVKAQYEE	MAKCSRAEAE	AWYQTKFETL	QAQAGKHGDD
SDTSVVLSDM	NSRSLDL DGI	IAEVKAQYEE	MAKCSRAEAE	AWYQTKFETL	QAQAGKHGDD
310	320	330	340	350	360
LRNTRNEISE	MNRAIQRLQA	EIDNIKNQRA	KLEAAIAEAE	ERGELALKDA	RAKQEELEAA
LRNTRNEISE	MNRAIQRLQA	EIDNIKNQRA	KLEAAIAEAE	ERGELALKDA	RAKQEELEAA
370	380	390	400	410	420
LQRGKQDMAR	QLREYQELMS	VKLALDIEIA	TYRKLLEGEE	SRLAGDGVGA	VNISVMNSTG
LQRGKQDMAR	QLREYQELMS	VKLALDIEIA	TYRKLLEGEE	SRLAGDGVGA	VNISVMNSTG
430	440	450	460		
GSSSGGGIGL	TLGGTMSNA	LSFSSSAGPG	LLKAYSIRTA	SASRRSARD	
GSSSGGGIGL	TLGGTMSNA	LSFSSSAGPG	LLKAYSIRTA	SASRRSARD	

Einbuchstaben-code	Aminosäure
A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
V	Valin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Abb.9 Oben: Aminosäuresequenz des Zytokeratin 7 Monomers. Die Sequenz ist doppelt angegeben. In der oberen Reihe sind mit gelb die vorhergesagten HLA-A*0201-Liganden markiert, in der unteren Reihe mit grün die HLA-B*5101-Liganden. Dort wo Peptidsequenzen einer HLA-Restriktion sich überschneiden ist das eine unterstrichen, das andere fett gedruckt dargestellt.

Quelle: <http://www.uniprot.org/>.
 UniProt (*Universal Protein Resource*) ist eine von den Instituten *European Bioinformatics Institute (EBI)*, *Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)* und der *Protein Information Resource (PIR)* zusammengestellte Datenbank.

Tab.5 Links: Einbuchstaben-code der 20 proteinogenen Aminosäuren.

III.2. Priming und Restimulation

Kompensation des FACS Canto II geschah mit den entsprechenden, an *CompensationBeads* gekoppelten, fluoreszierenden Antikörpern und mit der *Aqua-live/dead*® gefärbten Kontrolle. Zur Einstellung der *voltage* eignete sich die ungefärbte Kontrolle. Folgende *gating*-Strategie wurde verfolgt: Auswahl der Lymphozyten über ein FSC/SSC *dotplot* (Punktauftragung), untergeordnet die Se-

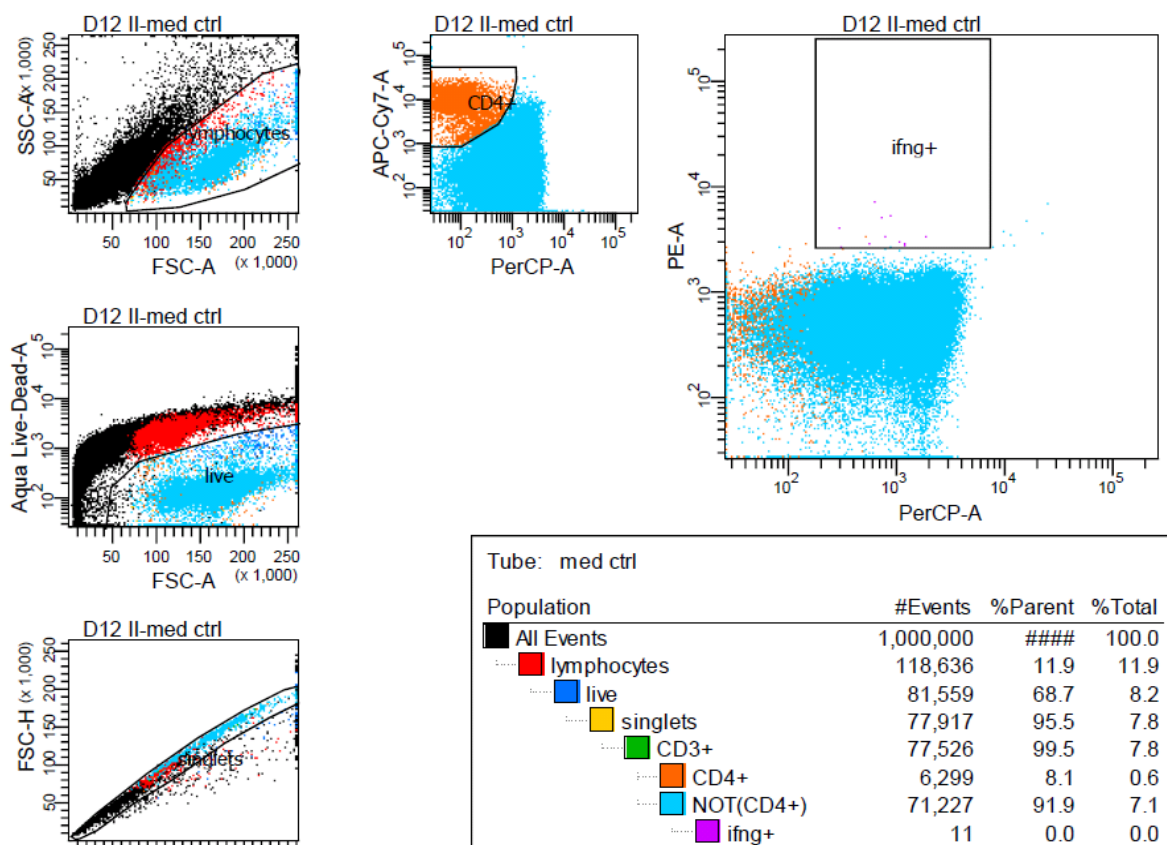


Abb.10 *Gating*-Strategie verdeutlicht am Beispiel der Analyse einer Mediumkontrolle der Spende D12.

Hierarchische Gliederung von oben links nach unten links über oben Mitte nach oben rechts. Selektion der Lymphozyten über Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A); Auswahl der schwächer *Aqua-live/dead* gefärbten vitalen Population; Ausschluss von Dubletten über den FSC-A/FSC-H *plot*; Selektion der FITC-CD3⁺ Zellen; Markierung der CD4⁺CD8⁻ (APC-Cy7⁺PerCP⁻) Zellen; Markierung eines inversen *gates* für die übrigen CD3⁺ Zellen. Im letzten Schritt rechts oben Selektion der IFN γ ⁺CD8⁺ (PE⁺PerCP⁺) Untergruppe. Unten rechts: Hierarchieschema mit Zahlenwerten für die absolut gemessenen Ereignisse sowie die prozentualen Anteile der einzelnen Untergruppen an ihrer übergeordneten Gruppe und der Gesamtzahl.

III. Ergebnisse

lektion von lebenden Zellen in einer FSC/Aqua-live/dead Auftragung und anschließend ein *gating* auf Singletten, d.h. Einzelzellen, um Fluoreszenzüberlappungen aneinander haftender Zellen (Dubletten) ausschließen zu können. Dies erfolgte mit einem FSC-A/FSC-H *plot* in welchem Durchmesser bzw. Höhe des gemessenen Korpuskels über der Fläche desselben aufgetragen wird. Weiter dann die Selektion von T-Zellen über ein CD3 Histogramm, in der Folge Exklusion von CD4⁺CD8⁻ Zellen und abschließend die Auswahl der für intrazelluläres Zytokin positiven CD4⁻ (CD8⁺) Subgruppe (siehe **Abb.10**). Im Vergleich mit einer Mediumkontrolle ohne Stimulationsreiz und einer Positivkontrolle mit den unspezifischen T-Zell Mitogenen/Stimulantien PMA und Ionomycin konnte die Reaktion auf ein distinktes Peptid quantitativ eingeordnet werden. Ein irrelevantes Peptid wurde nicht in die Analysen mit eingeschlossen. **Abb.11** veranschaulicht den Vergleich und **Tab.6** fasst die Ergebnisse zusammen.

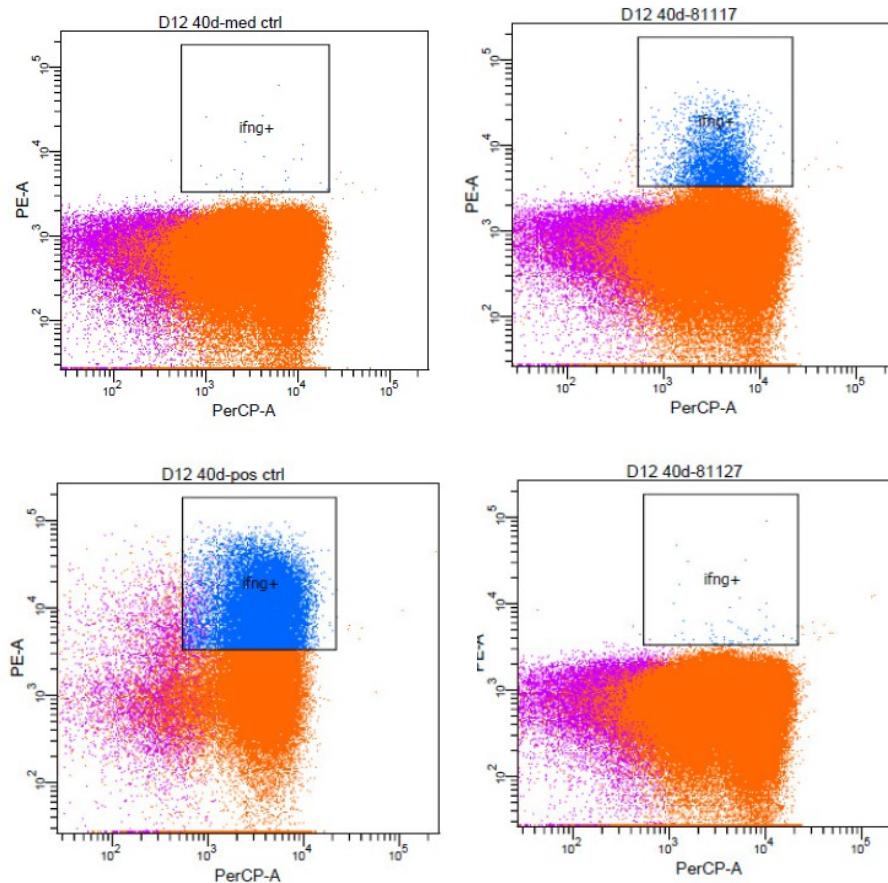


Abb.11 Finale *gates* der Analyse der Spende D12 nach 40 Tagen Stimulation mit u.a. den HLA-B*5101 restringierten Peptiden 81117 und 81127. Links oben die Mediumkontrolle mit 0,01% IFN γ ⁺ (PE) Zellen in der CD8⁺ (PerCP) Population. Links unten die Positivkontrolle PMA/Iono mit 38,65%. Rechts oben eine deutliche PE⁺ Population (1,83%) nach Stimulation mit dem Peptid 81117 und rechts unten keine relevant vermehrte Zytokinproduktion auf Stimulation mit dem Peptid 81127 hin (0,03%) im Vergleich zur Mediumkontrolle.

Spende	HLA-Allel	getestete Peptide	Tag der ICS-Färbung	positives Peptid	prozentualer Anteil der IFN γ ⁺ -Zellen aller CD8 ⁺ -Zellen (%)			Anmerkung	eingefrorene Zellen (x10 ⁶)
					Peptide	Medium	PMA/Iono		
D1	A*0201	80289, 80290, 80293, 80294	21	~	alle neg	0.05	0.3		1,2 [#]
D2	B*5101	81104, 81107, 81108, 81113	28	~	alle neg	0.08	2.1		3,4 [#]
D3	A*0201	81100, 81101, 81102, 81114	35	~	alle neg	0.03	?		5,5 [#]
D4	B*5101	81117, 81122, 80301, 80303	data lost	~	alle neg	?	?		9 [#]
D5	B*5101	80301, 80303, 81126, 81127	21	~	alle neg	0.03	?		12,4 [#]
D6*	A*0201	81100, 81101, 81102, 81114	20	~	alle \leq 0.02	0.01	5.2	preMACS	18 (30 für MACS)
			40	81101	0.13	0.00	8.7		
			50	81101	12.97	0.53	3.4(SEB)		
D7	A*0201	80289, 80290, 80293, 80294	20	80293	0.06	0.01	30.08		5
			40	80293	0.4	0.02	14.8		
D8	A*0201	81100, 81101, 80293, 80294	20	80293	0.28	0.04	25.18	nach 40d negativ	23
			20	81100	0.22	0.04	25.18		
			40	80293	20.24	0.07	35.5		
D9	B*5101	81104, 81107, 81108, 81113	20	~	alle neg	0.02	32.55		0
			40	~	alle \leq 0.01	0.02	26.6		
D10	B*5101	80301, 80303, 81126, 81127	20	~	alle \leq 0.02	0.01	25.48		0
			40	~	alle \leq 0.04	0.02	23		
D11	A*0201	81102, 81114, 80289, 80290	20	~	alle \leq 0.02	0.01	21.35		120
			40	80290	6.19	0.01	37.6		
D12*	B*5101	81126, 81127, 81117, 81122	20	~	alle \leq 0.02	0.01	2.05	preMACS	40 (63 für MACS)
			40	81117	1.83	0.01	38.7		
			50	81117	22.3	0.18	16.11(SEB)		

Tab.6 Fortsetzung und Text: nächste Seite

Spende	HLA-Allel	getestete Peptide	Tag der ICS-Färbung	positives Peptid	prozentualer Anteil der IFN γ ⁺ -Zellen aller CD8 ⁺ -Zellen (%)			Anmerkung	eingefrorene Zellen (x10 ⁶)
					Peptide	Medium	PMA/Iono		
D13*	B*5101	81108, 81113, 81117, 81122	20	~	alle \leq 0.03	0.01	51.43	preMACS	180 (88 für MACS)
			40	81113	0.06	0.01	36.3		
			40	81108	0.03	0.01	36.3		
			50	81113	5.2	0.1	>0.5(SEB)		
D14	A*0201	81101, 80293, 81100, 80290	20	~	alle \leq 0.02	0.01	17.86		46
			40	80293	6.91	0.01	15.1		
D15*	B*5101	81113, 81117, 81126, 81107	20	~	alle \leq 0.02	0.01	12.0	preMACS	(alle 8.4 für MACS)
			40	81113	0.64	0.02	14.9		
			50	81113	7.61	2.0	6.81(SEB)		
D16	A*0201	81101, 80293, 81114, 80289	20	~	alle \leq 0.02	0.02	12.49	In Klammern: TNF α	60
			40	80293	0.04(0.97)	0.01(0.03)	6.6(22.11)		
D17	B*5101	81113, 81117, 81104, 81108	20	81108	0.03(0.23)	0.01(0.02)	12.3(22.83)	In Klammern: TNF α	11.5
			40	81108	0.06(1.82)	0.01(0.00)	4.1(12.41)	In Klammern: TNF α	
D18	A*0201	81101, 80293, 81102, 81100	20	~	alle \leq 0.01	0.01	9.41		0
			40	~	alle \leq 0.02	0.01	22.3		
D19	A*0201	81101, 80293, 80290, 81100	20	~	alle neg	0.81	12.45		67
			40	80293	12.0	0.02	15.94		
			40	80290	0.55	0.02	15.94		

Tab.6 Zusammenfassung der ICS-Durchflusszytometrie-Ergebnisse aller Stimulationsexperimente. Die einzelnen Ansätze wurden an Tag 20 bzw. Tag 40 einer intrazellulären Zytokinfärbung unterzogen. Für D1 bis D5 war dies noch nach drei, vier oder fünf Wochen vorgesehen - nach dem ersten Protokoll, welches aufgrund Erfolglosigkeit dann verlassen wurde ("#": Zellen nicht tiefgefroren sondern verworfen). Die mit Spende D6 veränderte Strategie einschließlich TLR-DC-Reifung, verlängertem Stimulationszyklus und alteriertem Zytokinschema schien besser geeignet, sodass die Positivkontrolle deutlich vitalere Zellen aufzeigen und einige Peptid-spezifisch IFN γ -produzierende CD8⁺ Populationen nachgewiesen werden konnten. Bei allen Spenden wird ersichtlich, dass vor der zweiten und dritten Restimulation, also an Tag 20, eine Beurteilung der Kultur noch verfrüht wäre, an Tag 40 jedoch mit einer deutlichen spezifischen Population gerechnet werden darf und im negativen Fall der Abbruch gerechtfertigt ist. D6, D12, D13 und D15 (mit "*" gekennzeichnet) unterliefen an Tag 50 einen IFN γ -secretion-assay zur Aufreinigung der spezifischen Effektoren. Die Werte vor magnetischer Separation sind mit aufgenommen. Positivkontrolle stellte in diesem Fall SEB dar. Für D16 und D17 war zusätzliche Färbung von TNF α hilfreich zur Detektion einer distinkten Population. Die Werte sind in Klammern hinter denen für die in diesen Fällen gering ausgeprägten IFN γ ⁺ Populationen angegeben. Vielversprechende Peptide sind gelb (HLA A*0201) und grün (HLA B*5101) markiert.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten und zunächst entmutigenden Ergebnissen mit den ersten fünf verarbeiteten Spenden D1-D5 entschieden wir, das Protokoll zu ändern. Es waren keine verwertbaren Peptid-spezifischen Populationen in der Durchflusszytometrie nachweisbar gewesen, sogar die Positivkontrolle war stets mit Werten unter 5% IFN γ -produzierender CD8⁺ Zellen deutlich zu niedrig ausgefallen und wies auf suboptimale Kulturbedingungen hin. Mit dem Wechsel auf den Zehntageszyklus für die Restimulationen und die TLR-Liganden gesteuerte DC-Reifung stellten sich gewünschte Resultate ein.

*HLA-A*0201*

Peptid **80293** mit der Sequenz **RLAGDGVGAV** induzierte für fünf verschiedene HLA A*0201⁺ Spender (D7, D8, D14, D16, D19) bis zum Tag 40 eine deutliche spezifisch IFN γ -produzierende Population die einmal bis zu 20% aller CD8⁺ Zellen ausmachte (D8), jedoch auch bei anderen Spendern kräftig ausfiel (D14: 6,91%; D19: 12%). In einem Falle erwies sich die zusätzliche TNF α -Färbung als hilfreich zur Identifikation (D16). Ein weiterer HLA-A*0201 restringierter Ligand, **80290: TLNETELTEL** führte zu einer schönen, annähernd 7% starken Population (D11) mit begleitender exzessiver Proliferation. In einem weiteren Spender zeigte sich eine schwächere aber trotzdem deutlich abgrenzbare Antwort (D19: 0,55%), die vor allem vor dem Hintergrund der Konkurrenz mit der parallel induzierten 80293-spezifischen Population (D19: 12%) aussagekräftig ist. Im weiteren Kreis der HLA-A*0201 Epitopkandidaten platzierte sich Peptid **81101: KLETKWTL**. Zwar zeigte es nur für einen einzelnen Spender – und auch nur schwach – Resultate (D6, d40: 0,13%), die vierte Restimulation scheint aber noch einen Schub gegeben zu haben, da bei der IFN γ -secretion-assay-Analyse mehr als zehn Prozent vor Aufreinigung verzeichnet werden konnten. Für D8 induzierte auch **81100: DIFEAQIAGL** eine kleine distinkte Population bis Tag 20 welche jedoch dann bis zur zweiten Auswertung überwachsen worden und verschwunden war.

*HLA B*5101*

In zwei Leukapheresespenden konnte mit Peptid **81113: DGVGAVNI** eine abgrenzbare, wenn auch schwache Antwort erzeugt werden (D13, d40: 0,06%; D15, d40: 0,64%), die aber vor Anreicherung schon stabilisiert war (D13: 5,2%;

III. Ergebnisse

D15: 7,61%) und für D13 von einer ausgeprägten Gesamtzellzahl begleitet wurde. Peptid **81117** mit der Sequenz **TAAENEFVV** vermochte für D12 bis Tag 40 1,83% aller CD8⁺ T-Zellen zur IFN γ -Produktion anzuregen, vor Anreicherung waren es sogar schon erstaunliche 22,3%. Ein weiterer B*5101-Ligand zeigte bei zwei Spenden, wenn auch geringes, Potential: **81108: DAAYMSKV** erzeugte bei D17 eine mit Hilfe von zusätzlicher TNF α -Färbung klar identifizierbare Population und bei D13 ebenfalls eine schwache, mit 81113-spezifischen Zellen in Konkurrenz stehende Zellgruppe.

Somit sind für beide HLA-Allele mindestens zwei Liganden identifiziert (HLA A*0201: 80293, 80290; HLA B*5101: 81117, 81113), die spezifisch CD8⁺ T-Zellen über ihren TCR zu Zytokinproduktion anzuregen vermögen und nach Nachweis endogener Prozessierung und Präsentation als Epitope gelten dürfen.

Alle Prozentwerte sind immer in Relation zu Medium- und Positivkontrolle zu betrachten und zu bewerten, die im Text der Einfachheit halber nicht erwähnt werden. Sie sind in Tab.6 zu finden.

Mehrmals kam die parallele, im Vergleich mit IFN γ etwas sensitivere aber unspezifischere Färbung von TNF α zum Einsatz (im Vergleich mit IFN γ größere zytokinpositive Populationen für Peptidstimulation *und* Positivkontrolle nachweisbar). In einzelnen Fällen schien sie sich für kleinere Populationen als hilfreich zu erweisen. Ein Multizytokinassay wurde nur einmalig und versuchsweise durchgeführt. INF γ , TNF α , IL-2 und CD107a waren hierbei anvisiert. Weil Polyfunktionalität mit der Qualität der T-Zell-Antwort korreliert¹⁰⁵ ist diese Methode - mit weiteren zusätzlichen Zielstrukturen – verbreitet und geschätzt. Für einen screening-Ansatz wie in unseren Experimenten ist der Informationsgehalt eines Multizytokinassays aber nicht unbedingt notwendig.

III.3. Anreicherung und Expansion

III.3.1. Anreicherung

Der IFN γ -*secretion*-assay ist laut Hersteller für eine Zellprobe mit maximal 5% auf Stimulation hin sezernierende Zellen optimiert. Da in den Kultursuspensio-

nen aufgrund der CD8⁺ Selektion vor *priming* und Restimulation meist mehr als 80% aller viablen Zellen CD8⁺ T-Zellen waren, ließ sich der in den durchflusszytometrischen Analysen dokumentierte Wert für Peptid-spezifische CD8⁺-IFN γ -Produktion direkt als Orientierungswert übernehmen. Stimulationsansätze, die gute Zellzahlen aufwiesen und gut proliferierten, deren spezifische Population jedoch verhältnismäßig klein war (<5% aller CD8⁺) wurden für die Anreicherung ausgewählt um sie ebenfalls einem Zytotoxizitäts-assay zuführen zu können, für den wir mindestens 5-10%, jedoch so viele wie möglich, spezifische CD8⁺ T-Zellen in der Effektorfraktion als nötig veranschlagten.

Das *gating* für die Durchflusszytometrie entsprach dem für die Messungen der ICS (siehe III.2.) - mit einer Änderung: Es kam keine lebend/tot Färbung mit Aqua *live/dead* zum Einsatz, sodass dieses *gate* einfach übersprungen bzw. ausgelassen wurde. Letztendlich stellte sich die Hierarchie wie folgt dar: Lymphozyten (FSC/SSC), Singletten (FSC-A/FSC-H), FITC-CD3 Histogramm, Aus-

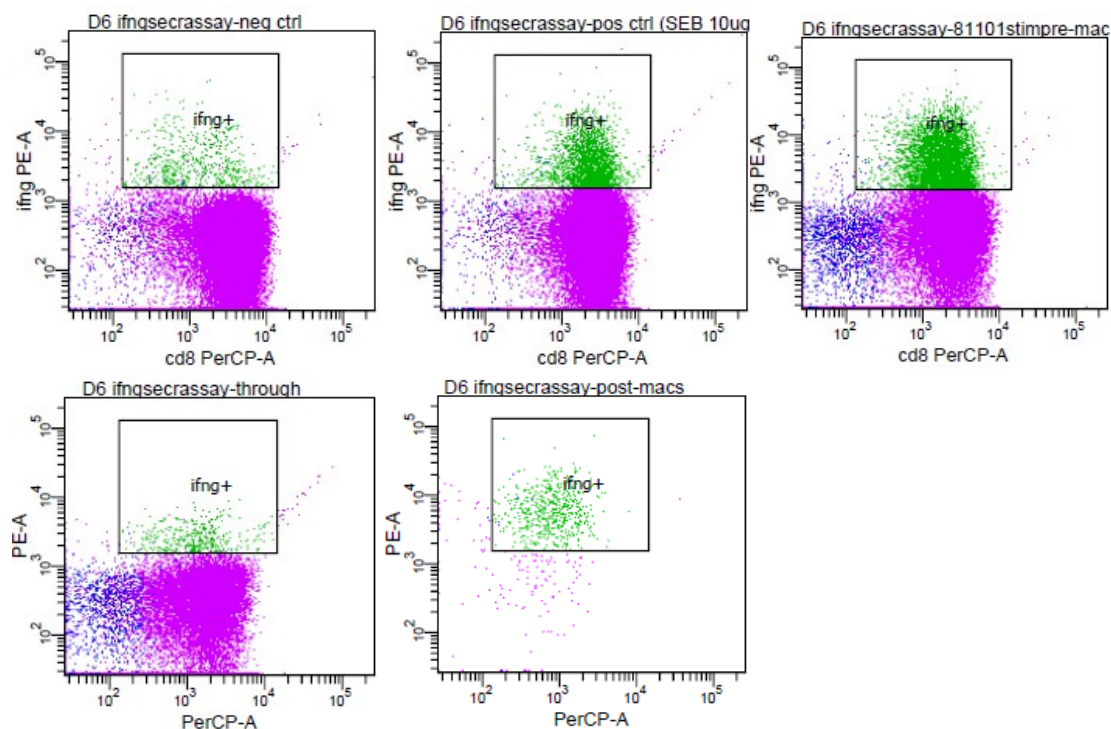


Abb.12 Finale *plots* der IFN γ -secretion-assay FACS-Auswertung von D6 nach 50d Kultur. Von links oben nach rechts unten: Mediumkontrolle mit 0,7% IFN γ ⁺(PE) aller CD8⁺ (PerCP) Zellen; SEB-Positivkontrolle (3,4%); mit 81101 peptidstimulierte Probe vor der Aufreinigung (12,9%), Säulendurchlauf (1,7%) und magnetisch angereicherte Probe (78,3%). Das IFN γ -gate ist bewusst etwas breiter gehalten um der Herunterregulation von CD8 nach Aktivierung Rechnung tragen zu können. Die Hierarchie gewährleistet aber den Ausschluss der CD4⁺CD8⁻ Zellen bei der Berechnung. Die Positivkontrolle mit SEB war bei allen vier Experimenten in niedrigeren Prozentbereichen als die Peptidstimulation vor Anreicherung angesiedelt.

III. Ergebnisse

schluss der CD4⁺CD8⁻ Zellen (CD4-APC-Cy7 und CD8-PerCP), Umkehrung des letzten *gates* und Selektion der IFN γ ⁺CD8⁺ Zellen (PE⁺PerCP⁺).

Mediumkontrolle, SEB-Positivkontrolle, eine Probe der Stimulation mit relevantem Peptid vor sowie nach Aufreinigung und der Säulendurchlauf wurden für die vier behandelten Spenden (D6, D12, D13, D15) analysiert. Zur Veranschaulichung vergleicht **Abb.12** die finalen *plots* eines Ansatzes, **Tab.7** zeigt die Werte aller Experimente.

Tab.7 Zellzahlen und durchflusszytometrische Ergebnisse der vier einer IFN γ -*secretion-assay*-Anreicherung zugeführten Ansätze. Werte sind für vor (preMACS) und nach (postMACS) magnetischer Anreicherung an Tag 50 sowie zum Vergleich erneut (vgl. Tab.6) für die vierte Restimulation an Tag 40 angegeben. Die Differenz in den Zahlen der für MACS bereitgestellten Zellen (z.B. bei D6: 30 vs. 28x10⁶) wurde für Medium- und Positivkontrolle verwendet.

Spende	HLA-Allel	Tag der Auswertung	Peptid	prozentualer Anteil der IFN γ ⁺ -Zellen aller CD8 ⁺ -Zellen (%)			Zellzahlen (x10 ⁶)
				Peptid	Medium	Positiv	
D6	A*0201	40 (ICS)	81101	0.13	0.00	8.7 (PMA/Iono)	48 (30 für MACS)
		50 preMACS	81101	12.97	0.53	3.4 (SEB)	28
		50 postMACS	81101	78.26			0.525
D12	B*5101	40 (ICS)	81117	1.83	0.01	38.7 (PMA/Iono)	103 (63 für MACS)
		50 preMACS	81117	22.30	0.18	16.1 (SEB)	60
		50 postMACS	81117	51.24			1.25
D13	B*5101	40 (ICS)	81113	0.06	0.01	36.3 (PMA/Iono)	268 (88 für MACS)
		50 preMACS	81113	5.20	0.10	>0.5 (SEB)	85
		50 postMACS	81113	56.98			1.625
D15	B*5101	40 (ICS)	81113	0.64	0.02	14.9 (PMA/Iono)	8.4 (8.4 für MACS)
		50 preMACS	81113	7.61	2.00	6.8 (SEB)	7
		50 postMACS	81113	61.65			0.15

Durchgängig zeigte sich die Peptidstimulation vor Aufreinigung als potenter im Vergleich zur Positivkontrolle mit SEB. Außerdem scheint es, dass bei allen vier Spenden durch die vierte Restimulation an Tag 40 noch einmal eine kräftige Expansion der Peptid-spezifischen Population erfolgt war. Jedoch handelt es sich, auch wenn in beiden Fällen nach Stimulation das selbe Zytokin detektiert wird, um zwei verschiedene Analysemethoden die nur vorsichtig miteinander in Bezug gesetzt werden dürfen.

Es konnten für die vier Ansätze Reinheiten von ~51% bis 78% erzielt und Zellzahlen von 0,15x10⁶ bis zu 1,625x10⁶ gewonnen werden.

III.3.2. Expansion

Die erste angereicherte Zellgruppe aus **D6** wurde mit bestrahlten (30Gy) allogenen PBMC dreier verschiedener Spender im Verhältnis 50-100:1 (PBMC:Effektoren) co-kultiviert, mit Zugabe von jeweils 30ng/ml α CD3- und α CD28-Antikörper an Tag 1 sowie 250 U/ml IL-2 an Tag 1, Tag 3 und Tag 5. Splitting und Mediaauffrischung erfolgte bei Bedarf. Nach Pooling, Waschen und Wiederholung der Co-Kultur an Tag 10 unter den selben Bedingungen schloss sich eine ICS-Analyse an Tag 22 an. Es zeigte sich, dass das gute Wachstum der Kultur von $0,5 \times 10^6$ auf 200×10^6 Zellen annähernd ausschließlich auf die unspezifische Zellfraktion zurückzuführen war (Tab.8, erste Zeile). Beim zweiten Versuch (**D12**) verglichen wir die Antikörper mit 100ng/ml PHA und evaluierten auch den zusätzlichen Einfluss des relevanten Peptids. Alle übrigen Parameter blieben unverändert. Durchflusszytometrie erfolgte nach einem Zyklus an Tag 15. Die vier Fraktionen offenbarten den bei D6 schon angewendeten, jetzt etwas erfolgreicherem Ansatz als den überlegenen – trotzdem erwiesen sich die Resultate angesichts der Reinheitsverluste alles andere als befriedigend. Die schwache Proliferation in den PHA-Ansätzen war hauptsächlich durch $CD4^+$ Wachstum bedingt (FACS *plots* nicht abgebildet). Der Einsatz des Peptids schien nicht hilfreich zu sein (Tab.8, zweite bis fünfte Zeile).

So sollten für **D13** weitere Veränderungen erprobt werden: Erhöhung der PHA-Konzentration auf 1 μ g/ml und Hinzunahme von 25ng/ml IL-7 an Tag 1, 3 und 5 sowie der Vergleich mit ausschließlicher Zytokingabe. Außerdem versuchten wir einer anderen Fraktion der Effektorpopulation nach dem Stress der Stimulation und magnetischen Separation einige Tage Ruhe in reinem Medium zu gönnen, bevor wir bestrahlte PBMC und Stimulantien an Tag 3 hinzugaben. Diese Vorgehensweise erwies sich als völlig inpraktikabel und resultierte in verschwindend geringen Zellzahlen, sodass auf durchflusszytometrische Analysen und die Aufnahme in Tab.8 verzichtet wurde. Mit der erhöhten PHA-Konzentration und dem zusätzlichen Zytokin IL-7 stellten sich zum ersten Mal gute Erfolge ein – die Zellzahl konnte bei nur geringem Reinheitsverlust innerhalb von zwölf Tagen ver Hundertfacht werden (Tab.8, neunte Zeile). Wiederholung des Vergleichs anhand der **D15**-Aufreinigung relativierte jedoch die Überlegenheit des

Tab.8 Zusammenfassung der verschiedenen Expansionsansätze nach IFN γ -secretion-assay-Anreicherung.

Zeile	Spende	HLA-Allel	Peptid	Expansionsansatz	Tage nach Beginn der unspez. Exp.	ICS-FACS: prozentualer Anteil der IFN γ + Zellen aller CD8+-Zellen (%)				Zellzahlen (x10 ⁶)		
						postMACS Peptid	nach unspezifischer Expansion Peptid	Medium	Positiv	vor	nach	
1	D6	A*0201	81101	allogene bestrahlte PBMC	Abs + IL-2	22	78,26	0,06	0,02	31,4	0,472	210
2	D12	B*5101	81117		Abs + IL-2	15	51,24	36,58	0,01	39,5	0,28	10,3
3					Abs + P + IL-2			19,87	0,02	45,3	0,28	9,6
4					PHA ^{low} + IL-2			0,44	0,06	16,4	0,28	1,6
5					PHA ^{low} + P + IL-2			0,4	0,15	17	0,28	1,2
6					D13			B*5101	81113	Abs + IL-2	15	56,98
7	Abs + IL-2 + IL-7	16,27	0,16			39,3	0,14			15,4		
8	PHA ^{high} + IL-2	37,48	0,23			39,8	0,14			8,6		
9	PHA ^{high} + IL-2 + IL-7	39,54	0,18			44	0,14			15,2		
10	IL-2	3,14	0,07			16,1	0,14			3,2		
11	IL-2 + IL-7	1,15	0,06			25,6	0,14			6		
12	D15	B*5101	81113		Abs + IL-2	15	61,65	12	0,04	33	0,037	5,4
13					Abs + IL-2 + IL-7			14	0,02	32	0,037	5,3
14					PHA ^{high} + IL-2			18	0,03	24	0,037	3,5
15					PHA ^{high} + IL-2 + IL-7			12	0,03	40	0,037	5,3

Abs: Antikörper: 30ng/ml α CD3 und 30ng/ml α CD28 an Tag 1

IL-2: 250U/ml Interleukin-2 an Tag 1/3/5

P: relevantes Peptid (25 μ g/ml)

IL-7: 25ng/ml Interleukin-7 an Tag 1/3/5

PHA^{low}: 100ng/ml PHA an Tag 1

PHA^{high}: 1 μ g/ml PHA an Tag 1

höher konzentrierten PHA gegenüber den Antikörpern. Hier konnten beide Alternativen, ob mit oder ohne IL-7, nicht wirklich überzeugen (Tab.8, Zeilen 12-15).

III.4. Vorbereitung einer Tumorzelllinie für Zytotoxizitätsassays

Auf der Suche nach einer Zytokeratin 7 (über-)exprimierenden Pankreaskarzinomzelllinie mit möglichst den beiden gewünschten MHC-Allelen HLA-A*0201 und HLA-B*5101 stießen wir auf lückenhafte und teilweise widersprüchliche Daten. Schüssler et al.¹⁰⁶, Sipos et al.¹⁰⁷ und Neureiter et al.¹⁰⁸ berichten alle von kräftiger CK7-Expression durch die Zelllinie Capan-1¹⁰⁹. Bei Neureiter zeigt eine weitere Linie, YAPC¹¹⁰, noch stärkere Überexpression dieses Intermediärfilaments. Agrawal et al.¹¹¹ und Pollack et al.¹¹² beschreiben Capan-1 als serologisch bzw. chromatographisch HLA-A*02 positiv, was durch eine neuere Publikation von Zhu et al.¹¹³ umfassend in HLA-UNITRAY-Typisierung (PCR+Elektrophorese), HLA-Serologie, -Sequenzierung und CD8⁺-Zytotoxizitätsexperimenten widerlegt wurde. Zwei andere Tumorzelllinien konnten auf diese Art jedoch als eindeutig HLA-A*0201 positiv identifiziert werden: Panc-1, die leider laut Sipos und Neureiter kein CK7 exprimiert, und CF-PAC-1¹¹⁴ für die noch keine CK7-Daten vorlagen.

Die Literaturrecherche lieferte leider keine Informationen zur HLA-B*5101-Expression verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien und ließ auch den HLA-Typ von YAPC offen.

Zunächst wurden die drei Zelllinien (Capan-1, YAPC, CF-PAC-1) mit einem deutlich ausgeprägten Merkmal aus den drei erwünschten (HLA-A*0201⁺; HLA-B*5101⁺; CK7⁺⁺⁺) ausgewählt und für HLA-A*02 und CK7 durchflusszytometrisch/immunhistochemisch evaluiert – in der Hoffnung beide Charakteristika für eine Linie nachweisen zu können. Eine Transfektion mit an einen Marker gekoppelter HLA-B*5101-DNA (es war leider kein HLA-B*51-Antikörper verfügbar) sollte sich dann für diese anschließen.

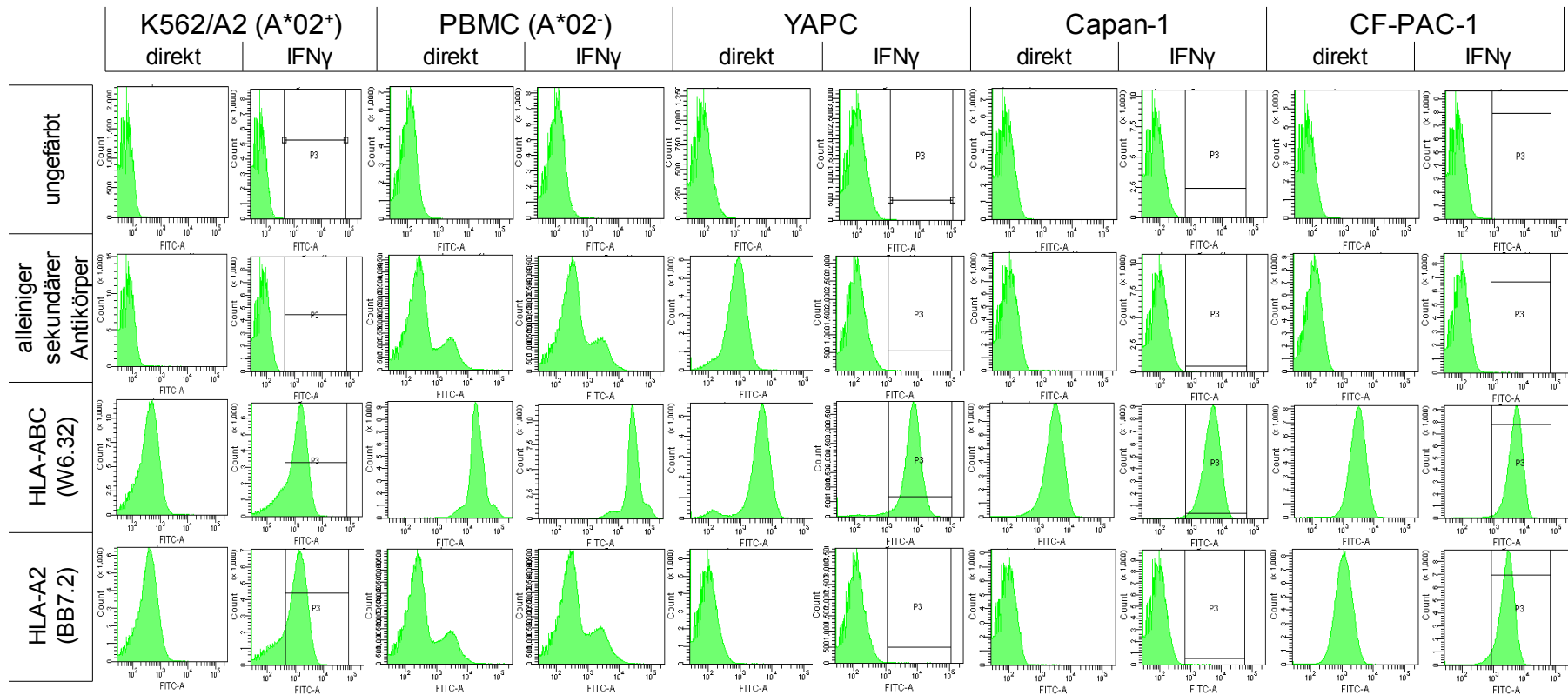


Abb.13 Durchflusszytometrische Analyse für HLA Klasse I und HLA-A*02 der Pankreastumorzelllinien YAPC, Capan-1 und CF-PAC-1. Als Positivkontrolle diente die HLA-A*02-transfizierte lymphoblastoide Zelllinie K562, als Negativkontrolle PBMC aus Spende D9/D10. Alle Analysen wurden direkt aus der Kultur und nach 48h Inkubation mit 500U/ml IFN γ zur Induktion der HLA-Expression durchgeführt. Die primären nicht fluoreszenzmarkierten Antikörper W6.32 für HLA Klasse I (HLA-ABC) und BB7.2 für HLA-A2 markierte der sekundäre FITC-gekoppelte Ziege-anti-Maus Antikörper. Für ihn ist eine Kontrolle mitgefärbt (zweite Zeile), die besonders für die PBMC zu berücksichtigen ist. YAPC und Capan-1 reagieren kaum auf das IFN γ , CF-PAC-1 und vor allem K562 zeigen eine deutliche Zunahme der Expression. Alle Linien tragen HLA Klasse I auf ihrer Zelloberfläche, die negativen BB7.2-Resultate für YAPC und Capan-1 können also nicht auf eine allgemeine Herunterregulation zurückgeführt werden. CF-PAC-1 stellt sich als die einzige HLA-A*02-tragende Linie der drei untersuchten dar.

III.4.1. HLA-A*02-Durchflusszytometrie

Die HLA-A*02-transfizierte lymphoblastoide Zelllinie K562/A2¹¹⁵ fungierte als Positiv-, PBMC eines passenden typisierten Spenders als Negativkontrolle. Alle drei Pankreastumorlinien zeigten gute, durch 48h-Inkubation mit IFN γ leicht intensivierte HLA Klasse I Expression, nur CF-PAC-1 aber war auch positiv für HLA-A*02. YAPC erwies sich leider, und Capan-1 nach Zhu et al. erwartungsgemäß, als negativ (siehe **Abb.13**).

III.4.2. CK7-Zytospin

Die Bilder einer PAS- und CK7-Zytospin-Färbung stammen aus dem *Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen*.

Genannte drei Tumorzelllinien sowie eine Negativkontrolle (PBMC) stellten sich wie in **Abb.14** gezeigt dar.

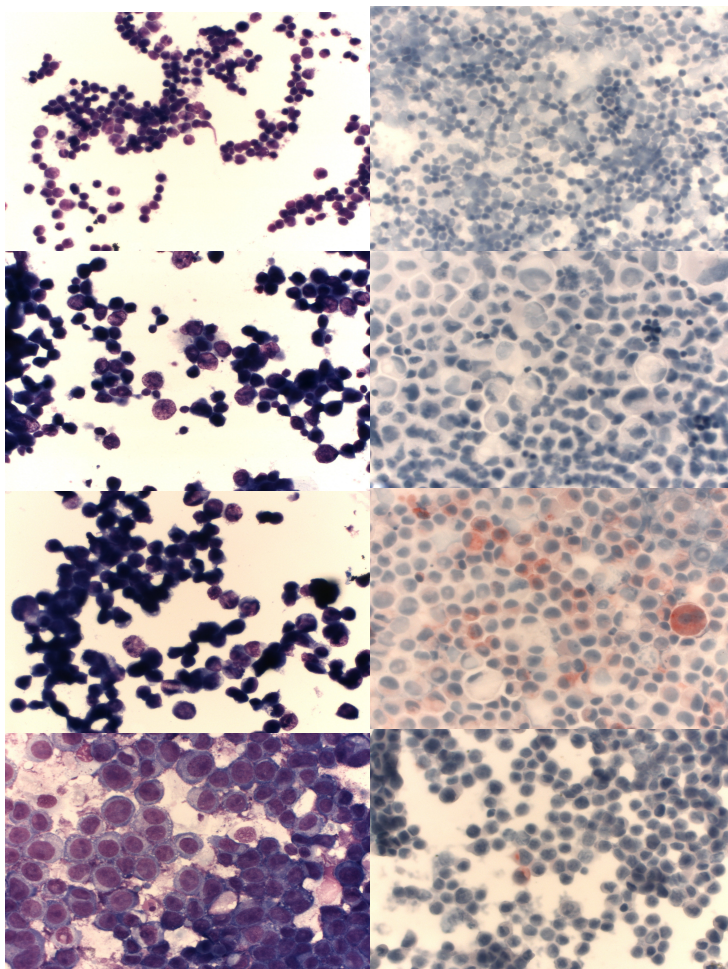


Abb.14

Linke Spalte PAS-Färbung (Originalvergrößerung x400); rechte Spalte CK7-Färbung (rot) (Originalvergrößerung x400).

Oben: Negativkontrolle - PBMC aus Spende D9/D10.

Mitte oben: CF-PAC-1 – kein Anhalt für CK7-Expression.

Mitte unten: Capan-1 – deutliche, mäßig bis starke intrazelluläre Rotfärbung: CK7 positiv.

Unten: YAPC – vereinzelte Zellen mit CK7-Expression: Schwach CK7 positiv.

III. Ergebnisse

Zusammenfassend erwies sich nur Capan-1 mit seiner guten CK7-Expression als potentieller Kandidat; die HLA-A*02 positive CF-PAC-1-Linie war leider deutlich negativ für CK7, YAPC dagegen konnte für beide Merkmale nicht überzeugen. Wir fällten die Entscheidung zur doppelten Transfektion von Capan-1. Zunächst mit HLA-A*0201 und später dann, wenn möglich, mit HLA-B*5101.

III.4.3. Transfektion

Leider sollte es nicht gelingen beginnend mit mehreren Elektroporationsansätzen und dann in wiederholten Versuchen unter Verwendung der Fugene®6 und Lipofectamine2000™ Lipidreagenzien eine Capan-1-Transfektante mit dem PvuI-linearisierten HLA-A*0201-*pIRESpuro*-Plasmid unter Puromycinselektion zu erzeugen. In den Fugene®6-Ansätzen wuchsen unter niedrigen Puromycin-konzentrationen (2µg/ml; empfohlen 5-10µg/ml), die sich in Titrationsexperimenten für Capan-1 eigentlich als ausreichend gezeigt hatten, zwei Kolonien aus, deren durchflusszytometrische HLA-Analyse jedoch keinen Transfektionserfolg offenbarte.

Diese unerwarteten Schwierigkeiten verhinderten bedauerlicherweise - hauptsächlich aus Zeitgründen - den Transfektionsversuch mit HLA-B*5101 und die geplanten Zytotoxizitätsexperimente.

III.5. Patient

Eine inguinale Lymphknotenschwellung nach einigen Zyklen der Vakzinierung machte Hoffnung auf Erfolg, brachte nach Exstirpation zur Evaluation derselben aber eine Metastase des Tumors zum Vorschein. Leider schritt die Progression trotz laufender Vakzination recht zügig voran, sodass der junge Patient verstarb bevor diese Arbeit abgeschlossen war und er eventuell von einem zusätzlichen Epitop hätte profitieren können.

IV. Diskussion

IV.1. Allgemeine Strategie

Auch für das Pankreaskarzinom haben sich schon verschiedene Impfstherapieansätze in frühen klinischen Studien als sicher und teilweise wirksam erwiesen - zwar mit variabler Immunogenität, aber doch mit substantiellen Immunantworten auf einige Impfstoffe in nicht wenigen Patienten. Zudem konnte in den meisten Studien in gewisser Weise eine Korrelation von Immunantwort mit verlängertem Überleben dokumentiert werden. In Kombination mit Chemotherapie scheinen synergistische Effekte möglich. Als wichtige Antigene dieser Studien sind *survivin*, hTERT (humane Telomerase-Reverse-Transkriptase), mutiertes Kras, MUC1 und CEA zu nennen.¹¹⁶

Daher lag es nahe unserem Patienten eine Impfung – gewissermaßen als Heilversuch – anzubieten und das Spektrum derselben mit dem Zytokeratin 7 zu erweitern um Immunevasion des Tumors¹¹⁷ unwahrscheinlicher zu gestalten. Dass auch stark überexprimierte, nicht Tumor-spezifische, ubiquitäre Proteine, wie das Zytokeratin 7 in diesem Fall, als Antigene geeignet sein können wurde wiederholt gezeigt. Eine regelmäßig aktualisierte Sammlung der bisher publizierten T-Zell-Epitope überexprimierter Antigene ist *online* zu finden (<http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/overexpressed.htm>). Sicher ist im Vergleich zu den TSA eher mit Fehlen, Toleranz oder Anergie einer spezifischen T-Zelle und bei Impferfolg mit einem höheren Risiko von Autoimmunität zu rechnen, trotzdem gilt es als möglich, sichere und effektive Immunität auch gegen TAA auslösen zu können.¹¹⁸ Sollte sich eine funktionelle Relevanz für Tumorigenese wie für einige andere Zytokeratine kürzlich beschrieben³⁷ auch für CK7 herausstellen, würde es als Tumorantigen noch aufgewertet werden.

Die Vorgehensweise der reversen Immunologie ist etabliert^{95,119} und der Einsatz von SYFPEITHI hat sich nicht nur in unserem Labor vielfach bewährt. Ungewisser schien zunächst die Präsenz eines CK7-reaktiven TCR im Repertoire der gesunden Spender, sollte doch im Thymus die autoreaktive T-Zelle per Negativelektion eliminiert worden sein. Sollte sie trotzdem existieren, blieb weiter die Unsicherheit ob sie dann auch in der untersuchten Leukozytenspende auf-

zufinden sein würde. Zu Beginn bestätigten die mageren Ergebnisse diese Annahme der „Suche nach der Nadel im Heuhaufen“. Mit dem abgeänderten Protokoll stellten sich aber dann überraschend gute Erfolge ein und in elf von vierzehn Spenden konnte nach Stimulation eine mehr oder weniger kräftige spezifische Population detektiert werden. Es ist beschrieben^{120,121}, dass trotz hoher Spezifität des individuellen TCR eine gewisse Promiskuität und Crossreaktivität, wenn auch weniger für CD8⁺- als für CD4⁺-T-Zellen, möglich ist. Gerade TCR mit geringerer Affinität für einen Peptid:MHC-Komplex scheinen diese Eigenschaft zu haben. Experimente und Vakzinationen mit an einer Aminosäureposition modifizierten Epitopsequenzen - zur Verstärkung der MHC-Bindung und damit der Immunogenität - belegen diese Promiskuität. Hierbei vermögen die induzierten „spezifischen“ CD8⁺-Populationen oft sowohl die modifizierte als auch die „Wildtyp“-Sequenz als Epitop zu erkennen¹²²⁻¹²⁴. Umgekehrt wurde auch gezeigt, dass die spezifische *in vivo* CD8⁺-T-Zell-Antwort auf ein definiertes Epitop mehrere Klone mit individuell rearrangierten TCR beinhalten kann¹²⁵. Verständlich, dass Flexibilität des TCR auch im Zusammenhang mit Autoimmunität diskutiert wird¹²⁶⁻¹²⁹. Es ist somit also eigentlich eher zu erwarten, dass unter bestimmten Bedingungen wie dem reichhaltigen Peptid:MHC-Komplex-Angebot, der hohen Dichte an co-stimulatorisch aktiven Zellen und dem fördernden Zytokinmilieu in unseren optimierten *in vitro* Ansätzen eine auch niedriger affine T-Zelle, sei sie nun wirklich promiskuitiv oder nicht, zur spezifischen Population ausreift.

Zu erwähnen ist außerdem eventuell noch die Beschreibung einer in etwa 15% von 33 getesteten gesunden Spendern *ex vivo* nachgewiesenen CK18-spezifischen HLA-A*0201-restringierten CD8⁺-T-Zellpopulation mit Effektorphänotyp¹³⁰. Obwohl diese per Tetrameranalyse identifizierte Zellen durch Stimulation mit dem spezifischen Peptid nicht zu Zytokinproduktion oder Zytotoxizität angeregt werden konnten, also keine typischen Effektorfunktionen zeigten, und ihre Rolle weiter unklar bleibt, unterstreichen sie doch die Möglichkeit der Präsenz einer Zytokeratin spezifischen Zelle im Spenderblut.

IV.2. Priming und Restimulation

Mit der Spende D6 änderten wir unsere Vorgehensweise bezüglich DC-Reifung und Stimulationszyklen und begannen zusätzlich die CD8⁺-T-Zellen vor dem *priming* aufzureinigen. Resultate waren, wie an den ICS-Positivkontrollen zu sehen ist, eindeutig höhere Viabilitäten (die fehlenden Werte für D1-D5 bewegten sich alle in dem selben Rahmen wie die angegebenen) und regelmäßige Detektion einer peptidspezifischen Population. Es ist schwer zu sagen welche Protokollmodulation die wichtigste Rolle bei diesen positiven Veränderungen spielte. Während die Strategie zur Monozytenaufreinigung ohne größeren Einfluss auf Reifung und Funktionalität der aus ihnen erzeugten dendritischen Zellen bleibt^{31,131} und die magnetische Separation der Plastikadhärenz lediglich bezüglich Reinheit der selektierten Population überlegen zu sein scheint, differenzieren verschiedene Reifungssignale die unreifen dendritischen Zellen eindeutig in unterschiedliche funktionelle, reife Phänotypen. Diese nehmen direkten Einfluss auf die Polarisation der Immunantwort in die für zelluläre Krebsimmuntherapie eher gewünschte T_H1- oder weniger geeignete T_H2-Richtung. TLR-Liganden, vor allem LPS, erwiesen sich, zusammen mit Interferonen, der Cocktailreifung mit IL-1 β , IL-6, TNF α und PGE₂ gegenüber in dieser Hinsicht, also bezüglich der Potenz antigenspezifische CD4⁺-T_H1- und CD8⁺-T-Zellen zu stimulieren, als überlegen⁹⁷.

Aber auch die Verlängerung des Stimulationszyklus auf zehn Tage mag einen erholsamen Effekt auf die T-Zellen vermittelt, ihnen mehr Zeit gegeben haben die durch Aktivierung verringerte Expression ihrer TCR-Komplexe und Co-Rezeptoren¹³² vor der nächsten Stimulation wieder hochzuregulieren und damit für einen erneutes Signal empfänglicher zu sein. Die Hinzunahme von IL-15 mag zusätzlich einen positiven Effekt auf Entwicklung und Erhalt unserer entstehenden peptidspezifischen Populationen gehabt haben, spielt es doch nicht nur für Antigen-unabhängige Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen^{133,134} sondern auch als Mediator von CD4⁺-T-Zell-Hilfe für funktionell effektive und langlebige CD8⁺-Antworten ein Rolle¹³⁵.

Außerdem mag die Aufreinigung für CD8⁺-Zellen von Vorteil gewesen sein. Da CD8⁺-T-Zell-Aktivierung, zumal in Gegenwart künstlich gereifter potenter APC,

durchaus ohne CD4⁺-Hilfe möglich ist, – wenn auch die Effektivität der APC-Co-stimulation, die Zytokinproduktion der Effektorzelle und die Nachhaltigkeit ihrer Gedächtnisfunktion unter CD4⁺-Einfluss deutlich zunimmt^{24,33,136} – ist denkbar, dass Elimination von unspezifischer CD4-Proliferationskonkurrenz die Etablierung der gewünschten Population erleichterte.

Die Kulturdauer von 50 Tagen (ab D6) erwies sich als sinnvoll, war doch zwischen den Analysen an Tag 20 und Tag 40 in vielen Ansätzen noch ein deutliches Wachstum der spezifischen Populationen nachweisbar. Für zwei der Spenden (D16, D17) war die gemeinsame intrazelluläre Färbung von IFN γ und TNF α hilfreich zur Detektion schwächerer Antworten (<0,1% IFN γ ⁺ aller CD8⁺), deren Dynamik und Funktionalität jedoch nicht weiter verfolgt werden konnten und somit fraglich bleiben. Mehrmals zeigten anfangs zwei von vier Peptiden reaktive Populationen an (D8, D13, D19) von denen aber eine im Laufe der Restimulationen überwachsen wurde. Auffallend war außerdem eine häufig nachweisbare CD4CD8 doppelt-positive Zellgruppe im FACS, die, IFN γ -negativ, keinen Anteil an der peptidspezifischen Proliferation hatte. Es sind Bezüge zu antiviraler Immunantwort aber auch Autoimmunität und chronisch entzündlichen Erkrankungen für diesen Phänotyp beschrieben^{137,138}.

Der wiederholte Nachweis von spezifischen Populationen für **RLAGDGVGAV (80293)**, **CK7**₄₀₂₋₄₁₁, in fünf Spenden (D7, D8, D14, D16, D19) mit teilweise erstaunlich starker Ausprägung bis zu über 20% aller CD8⁺ Zellen an Tag 40, aber auch für **TLNETELTEL (80290)**, **CK7**₂₂₇₋₂₃₆, in zwei Spenden (D11, D19) wovon eine (D8) nicht nur kräftige 6,19% an Tag 40 erreichte sondern gleichzeitig mit exzessiver Proliferation auf 120x10⁶ Zellen überzeugen konnte, bezeugen die Immunogenität dieser beiden Peptide und machen sie zu vielversprechenden HLA-A*0201-restringierten Epitopkandidaten. Die Antworten in den HLA-B*5101-Ansätzen fielen generell schwächer aus, trotzdem dürfen **DGVDAVNI (81113)**, **CK7**₄₀₆₋₄₁₃, mit den in zwei Spenden (D13, D15) erzeugten, besonders vor Anreicherung (5,2% bzw. 7,61% IFN γ ⁺ aller CD8⁺) distinkten Populationen und **TAAENEFVV (81117)**, **CK7**₁₈₈₋₁₉₈, als Stimulans der schönen 1,83% starken

IFN γ ⁺-Population in D12, die sich ebenfalls bis zur Anreicherung noch weiter und deutlich etablieren konnte (22,3%), als immunogen gelten.

Für eine weitere Evaluation haben sich KLETKWTL (81101), CK7₁₁₇₋₁₂₅ [A*0201] und DAAYMSKV (81108), CK7₂₀₂₋₂₀₉ [B*5101], empfohlen. Sie konnten immerhin jeweils in einer einzelnen Spende eine kleine Population induzieren.

IV.3. Anreicherung und Expansion

Wenn auch der IFN γ -*secretion-assay* meist befriedigende Reinheiten von ~60-78% IFN γ ⁺ CD8⁺ Zellen hervorbrachte schien der unspezifische Anteil stets sensibler für die verwendeten Expansionsreize zu sein. Ob mit α CD3- und α CD28-Antikörpern oder PHA stimuliert verlor die expandierte Kultur immer deutlich an Reinheit. Der Vergleich ist aufgrund der nur wenigen Experimente nur eingeschränkt möglich, doch als akzeptabel erwiesen sich am ehesten die Ergebnisse nach Verwendung von 1 μ g/ml PHA. Trotzdem erwarteten wir mit den erhaltenen, minimal etwa 10% peptidspezifischen Zellen unter geeigneten Effektor-Zielzell-Verhältnissen Zytotoxizitätsexperimente durchführen zu können. Hierfür ist sicher die verfügbare Gesamtzellzahl ausschlaggebender als der relative Anteil der Effektoren.

Prinzipiell sind nur geringe Unterschiede im Expansionspotential der verwendeten Agentien beschrieben¹³⁹. Für PHA gibt es jedoch im Vergleich mit α CD3/ α CD28 Hinweise auf funktionelle Nachteile bezüglich der Antwort auf virale Antigene¹⁴⁰. Andere Gruppen verwenden bis zu 6000U/ml IL-2 - anstatt unserer 250U/ml - in Kombination mit α CD3 und allogenen bestrahlten PBMC zur *in vitro* Expansion von patientenautologen tumorinfiltrierenden Lymphozyten für den adoptiven Transfer¹⁴¹. Erhältlich sind auch α CD3/ α CD28-beladene *beads* die sich als potent erwiesen haben^{98,142}.

Weitere vergleichende Experimente zur Identifizierung eines optimalen Protokolls für die Expansion nach magnetischer Anreicherung, das den prozentualen Anteil der peptidspezifischen Population aufrechterhält, sind also wünschenswert.

IV.4. Transfektion

Nachdem Versuche mit Elektroporation und Fugene®6-Reagenz erfolglos blieben strebten wir an die Transfektion mit einem weiteren in mehreren Veröffentlichungen für Capan-1 als geeignet bewährten Lipidreagenz, dem Lipofectamine™2000^{143,144}, zu erreichen. Da die Konzentration des Selektionsantibiotikums Puromycin austitriert worden war und so niedrig wie möglich gehalten wurde sind die Gründe für den Mißerfolg mit allen drei Methoden am ehesten in der Plasmidqualität zu erwarten.

IV.5. Ausblick

Obwohl die Immunogenität, die Fähigkeit zur Aktivierung einer naiven CD8⁺-T-Zelle, für jeweils zwei der für HLA-A*0201 und HLA-B*5101 vorhergesagten Peptide nun nachgewiesen ist steht der Beleg ihrer endogenen Prozessierung und Präsentation noch aus. Leider war es nicht möglich ihn im Rahmen dieser Arbeit zu erbringen. Um eine geeignete Zielzelle für Zytotoxizitätsversuche zur Verfügung zu stellen wären weitere Transfektionsversuche mit Capan-1 und einem frischen Plasmid denkbar. Alternativ könnte auch eine andere Tumorzelllinie gewählt werden. Ovcar-3 beispielsweise, eine Ovarialkarzinomzelllinie, ist laut Literaturangaben schon HLA-A*02 und auch CK7 positiv^{145,146}. Möglich wäre alternativ die Fütterung autologer DC mit synthetischem Zytokeratin 7 oder die Transfektion einer HLA-A*0201⁺ und HLA-B*5101⁺ Zelllinie mit CK7-DNA.

In der Folge ist die Evaluation der Bedeutung dieser Epitope *in vivo*, beginnend mit einem *screening* auf spontane Immunantworten und spezifische CD8⁺-Populationen in Pankreaskarzinompatienten, sinnvoll.

Einige der Epitopkandidaten (80290, 81101, 81117, 81108) liegen innerhalb der alpha-Helix-reichen Domäne des Zytokeratins 7 (Aminosäuren 90-399) die eine starke Sequenzhomologie mit den übrigen Typ II Keratinen (CK1-CK8) aufweist. Mit Kreuzreaktivität ist hier nach Induktion einer Immunantwort eventuell zu rechnen.

V. Zusammenfassung

Große Fortschritte in der Tumorimmunologie über die letzten ein bis zwei Dekaden ermöglichen die Erwägung der Krebsimmuntherapie als ernsthafte Ergänzung des onkologischen Behandlungsspektrums für unterschiedlichste Malignomentitäten. Trotz vieler Rückschläge und weiter bestehender Herausforderungen sind doch einige Ansätze – vor allem Antikörper – schon klinisch etabliert. Aktive Immunisierungen befinden sich noch in klinischen Studien, die bisher, auch für das Pankreaskarzinom, unterschiedlichen Vakzinationen generell Sicherheit und in einigen Patienten Induktion von Immunantworten attestieren, welche nicht selten mit verlängertem Überleben korrelieren.

Motivation zu vorliegender Arbeit nährte sich aus dem Los eines chirurgisch und chemotherapeutisch erschöpfend therapierten noch sehr jungen Patienten mit histologisch atypischem, duktalem Pankreaskarzinom, für den ein Heilversuch per Tumoringpfung gewagt worden war. Die Immunhistochemie des malignen Gewebes empfahl das stark überexprimierte Zytokeratin 7 als zusätzliches Tumorantigen. Nun sollten aus diesem Protein neue CD8⁺ T-Zell-Epitope identifiziert werden um sie als Peptide zur Vakzinierung zur Verfügung stellen zu können. Einer *in silico*-Prädiktion anhand des Vorhersagetools „SYFPEITHI“ von HLA-A*0201- bzw. HLA-B*5101-restringierten, wahrscheinlichen Epitopen folgte eine *in vitro*-Verifikation dieser Peptide: Aus Monozyten erzeugte, mit synthetischem Peptid beladene dendritische Zellen gesunder Spender fungierten als aktivierende, professionelle antigenpräsentierende Zellen für eine gesuchte, naive, peptidspezifische CD8⁺ T-Zelle im Lymphozytenpool des identischen Spenders. Nach repetitiver Stimulation und Proliferation erfolgte die Analyse der Kultur auf eine distinkte spezifische Population über intrazelluläre IFN γ -Färbung. Zum Nachweis der endogenen Prozessierung und Präsentation der untersuchten Epitopkandidaten sowie der zytotoxischen Kapazität der erzeugten Effektorpopulation waren Tumorzelllyseexperimente geplant.

Von den acht bzw. zehn HLA-A*0201- bzw. HLA-B*5101-restringierten vorhergesagten Kandidaten erwiesen sich in neunzehn verschiedenen untersuchten Leukozytenspenden jeweils zwei als immunogen und konnten distinkte

peptidspezifisch IFN γ -produzierende CD8⁺-T-Zellpopulationen, teilweise in mehreren, unterschiedlichen Spenden, induzieren:

RLAGDGVGAV, CK7₄₀₂₋₄₁₁ und **TLNETELTEL, CK7₂₂₇₋₂₃₆** (HLA-A*0201-restringiert) sowie **DGVDAVNI, CK7₄₀₆₋₄₁₃** und **TAAENEFVV, CK7₁₈₈₋₁₉₈** (HLA-B*5101-restringiert) sind somit als hochkarätige Epitopkandidaten identifiziert. Lediglich der Nachweis ihrer natürlichen Prozession und Präsentation steht noch aus. Die Zytotoxizitätsexperimente konnten bisher aufgrund leider erfolgloser – obwohl umfangreicher – HLA-Transfektionsbemühungen einer potentiell geeigneten Zielzelle, der Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1, noch nicht angeschlossen werden.

Zukünftige Zytotoxizitäts-assays und die Evaluation der spontanen *in vivo*-Relevanz dieser vier Epitopkandidaten in Patienten mit Zytokeratin 7 überexprimierenden Tumoren sollten diese Lücke jedoch schließen können und den Weg zum Einsatz als Vakzine bei Pankreaskarzinomen aber auch anderen Entitäten bereiten.

Bedauerlicherweise konnte unser Patient nicht mehr wie erwünscht von der Impfung profitieren.

VI. Literaturverzeichnis

- 1 Coley, W. B. Further observations upon the treatment of malignant tumors with the toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus*, with a report of 160 cases. *Bull Johns Hopkins Hosp* **7**, 157-162 (1896).
- 2 Coley, W. B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. . *American journal of the Medical Sciences* (1893).
- 3 Kienle, G. S. K., H. Die Coley'sche Fiebertherapie der Krebserkrankung - historischer Markstein oder heute noch Vorbild? *Der Merkurstab* **56**, 355-364 (2003).
- 4 Martin, W. Coley's Toxins: A cancer treatment history. *Townsend letter for doctors and patients* **271/272**, 113-115 (2006).
- 5 Bruns, P. Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwülste. *Beiträge zur klinischen Chirurgie* **3**, 443-466 (1888).
- 6 Busch, W. VI. Verhandlungen ärztlicher Gesellschaften. *Berliner Klinische Wochenschrift* **23**, 245, 255 (1866).
- 7 Fehleisen, F. Über die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **8**, 553-554 (1882).
- 8 Ehrlich, P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung *Ned Tijdschr Geneesk* **53**, 273-290 (1909).
- 9 Ehrlich, P. On immunity with special reference to cell life. *Proceedings of the Royal Society London* **66**, 424-448 (1900).
- 10 Thomas, L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* **55**, 329-333 (1982).
- 11 Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* **13**, 1-27 (1970).
- 12 Burnet, M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* **1**, 779-786 (1957).
- 13 Prehn, R. T. Immunosurveillance, regeneration and oncogenesis. *Prog Exp Tumor Res* **14**, 1-24 (1971).
- 14 Stutman, O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* **183**, 534-536 (1974).
- 15 Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107-1111 (2001).
- 16 Dunn, G. P., Koebel, C. M. & Schreiber, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* **6**, 836-848 (2006).
- 17 Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**, 137-148 (2004).
- 18 Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* **22**, 329-360 (2004).
- 19 Finn, O. J. Cancer immunology. *N Engl J Med* **358**, 2704-2715 (2008).
- 20 Huber, C., Rammensee, H.-G., Wölfel, T. & Britten, C. M. *Krebsimmuntherapien - Standards und Innovationen*. (Deutscher Ärzte-Verlag, 2008).

VI.Literaturverzeichnis

- 21 Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* **6**, 715-727 (2006).
- 22 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
- 23 Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
- 24 Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Janeway's immunobiology 7th edition*. (Garland Science, Taylor&Francis Group, 2008).
- 25 Hodi, F. S. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**, 711-723 (2010).
- 26 Rosenberg, S. A. & Dudley, M. E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* **21**, 233-240 (2009).
- 27 Frankel, T. L. *et al.* Both CD4 and CD8 T cells mediate equally effective in vivo tumor treatment when engineered with a highly avid TCR targeting tyrosinase. *J Immunol* **184**, 5988-5998 (2010).
- 28 Storb, R. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation--yesterday, today, and tomorrow. *Exp Hematol* **31**, 1-10 (2003).
- 29 Ruggeri, L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **295**, 2097-2100 (2002).
- 30 Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Martelli, M. F. & Velardi, A. Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* **17**, 211-217 (2005).
- 31 Tuyraerts, S. *et al.* Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 1513-1537 (2007).
- 32 Konigsrainer, I., Glatzle, J., Kloppel, G., Konigsrainer, A. & Wehrmann, M. Intraductal and cystic tubulopapillary adenocarcinoma of the pancreas--a possible variant of intraductal tubular carcinoma. *Pancreas* **36**, 92-95 (2008).
- 33 Brossart, P. *et al.* Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* **93**, 4309-4317 (1999).
- 34 Schmitz, M. *et al.* Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res* **60**, 4845-4849 (2000).
- 35 Chu, P. G. & Weiss, L. M. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* **40**, 403-439 (2002).
- 36 Moll, R., Divo, M. & Langbein, L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* **129**, 705-733 (2008).
- 37 Karantza, V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* **30**, 127-138 (2011).
- 38 Iacobuzio-Donahue, C. A. *et al.* Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res* **63**, 8614-8622 (2003).
- 39 Laurell, H. *et al.* Identification of biomarkers of human pancreatic adenocarcinomas by expression profiling and validation with gene expression analysis in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *World J Gastroenterol* **12**, 3344-3351 (2006).

- 40 Dermime, S., Armstrong, A., Hawkins, R. E. & Stern, P. L. Cancer vaccines and immunotherapy. *Br Med Bull* **62**, 149-162 (2002).
- 41 Rosenberg, S. A. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* **10**, 281-287 (1999).
- 42 Snell, G. D. Studies in histocompatibility. *Science* **213**, 172-178 (1981).
- 43 Townsend, A. R. *et al.* The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* **44**, 959-968 (1986).
- 44 Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* **248**, 701-702 (1974).
- 45 Robinson, J. *et al.* The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* **39**, D1171-1176 (2011).
- 46 Bjorkman, P. J. *et al.* The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* **329**, 512-518 (1987).
- 47 Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**, 290-296 (1991).
- 48 Rammensee, H. G. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* **7**, 85-96 (1995).
- 49 Gao, G. F. & Jakobsen, B. K. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol Today* **21**, 630-636 (2000).
- 50 Pieters, J. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **9**, 89-96 (1997).
- 51 Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., Barlow, A. & Janeway, C. A., Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**, 622-627 (1991).
- 52 Moldovan, M. C. *et al.* CD4 dimers constitute the functional component required for T cell activation. *J Immunol* **169**, 6261-6268 (2002).
- 53 Marsh, S. G. *et al.* Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* **75**, 291-455 (2010).
- 54 Agrawal, A., Eastman, Q. M. & Schatz, D. G. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* **394**, 744-751 (1998).
- 55 Willerford, D. M., Swat, W. & Alt, F. W. Developmental regulation of V(D)J recombination and lymphocyte differentiation. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 603-609 (1996).
- 56 Webb, S. R. & Sprent, J. Tolerogenicity of thymic epithelium. *Eur J Immunol* **20**, 2525-2528 (1990).
- 57 Matzinger, P. & Guerder, S. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* **338**, 74-76 (1989).
- 58 Anderson, M. S. *et al.* The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* **23**, 227-239 (2005).
- 59 Derbinski, J. *et al.* Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* **202**, 33-45 (2005).
- 60 Bossi, G. *et al.* The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev* **189**, 152-160 (2002).

- 61 Krummel, M. F. & Davis, M. M. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol* **14**, 66-74 (2002).
- 62 Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-2357 (1986).
- 63 Munoz-Fernandez, M. A., Fernandez, M. A. & Fresno, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* **33**, 35-40 (1992).
- 64 Stout, R. D. & Bottomly, K. Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J Immunol* **142**, 760-765 (1989).
- 65 Andreasen, S. O., Christensen, J. E., Marker, O. & Thomsen, A. R. Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. *J Immunol* **164**, 3689-3697 (2000).
- 66 Croft, M. & Swain, S. L. B cell response to T helper cell subsets. II. Both the stage of T cell differentiation and the cytokines secreted determine the extent and nature of helper activity. *J Immunol* **147**, 3679-3689 (1991).
- 67 Parker, D. C. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* **11**, 331-360 (1993).
- 68 Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* **278**, 1910-1914 (2003).
- 69 Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**, 233-240 (2005).
- 70 Louten, J., Boniface, K. & de Waal Malefyt, R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* **123**, 1004-1011 (2009).
- 71 Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
- 72 Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* **6**, 345-352 (2005).
- 73 Apostolou, I. & von Boehmer, H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* **199**, 1401-1408 (2004).
- 74 Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V. F. & Berneman, Z. N. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* **2007**, 89195 (2007).
- 75 Rogers, P. R., Dubey, C. & Swain, S. L. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* **164**, 2338-2346 (2000).
- 76 Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A. & Rocha, B. Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* **1**, 47-53 (2000).
- 77 London, C. A., Lodge, M. P. & Abbas, A. K. Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells. *J Immunol* **164**, 265-272 (2000).

- 78 Lefrancois, L. Development, trafficking, and function of memory T-cell subsets. *Immunol Rev* **211**, 93-103 (2006).
- 79 Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* **22**, 745-763 (2004).
- 80 Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712 (1999).
- 81 Hayday, A. C., Roberts, S. & Ramsburg, E. gammadelta cells and the regulation of mucosal immune responses. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, S161-163 (2000).
- 82 Champagne, E. gammadelta T cell receptor ligands and modes of antigen recognition. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **59**, 117-137 (2011).
- 83 Berzins, S. P., Smyth, M. J. & Baxter, A. G. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 131-142 (2011).
- 84 Wu, L. & Van Kaer, L. Natural killer T cells in health and disease. *Front Biosci (Schol Ed)* **3**, 236-251 (2011).
- 85 Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18** (2000).
- 86 Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656-661 (2010).
- 87 Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* **3**, 984-993 (2003).
- 88 Guerder, S., Meyerhoff, J. & Flavell, R. The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen. *Immunity* **1**, 155-166 (1994).
- 89 Appleman, L. J., Berezovskaya, A., Grass, I. & Boussiotis, V. A. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol* **164**, 144-151 (2000).
- 90 Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* **23**, 515-548 (2005).
- 91 Murphy, K. M. & Reiner, S. L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 933-944 (2002).
- 92 Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* **46**, 111-147 (1989).
- 93 Curtsinger, J. M., Lins, D. C. & Mescher, M. F. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* **197**, 1141-1151 (2003).
- 94 Mescher, M. F. *et al.* Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* **211**, 81-92 (2006).
- 95 Viatte, S., Alves, P. M. & Romero, P. Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: advantages and hurdles. *Immunol Cell Biol* **84**, 318-330 (2006).
- 96 Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. & Stevanovic, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213-219 (1999).

VI.Literaturverzeichnis

- 97 Castiello, L. *et al.* Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunol Immunother* **60**, 457-466 (2011).
- 98 Li, Y. & Kurlander, R. J. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *J Transl Med* **8**, 104 (2010).
- 99 Riddell, S. R. & Greenberg, P. D. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods* **128**, 189-201 (1990).
- 100 Klausner, R. D., Donaldson, J. G. & Lippincott-Schwartz, J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* **116**, 1071-1080 (1992).
- 101 Mollenhauer, H. H., Morre, D. J. & Rowe, L. D. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim Biophys Acta* **1031**, 225-246 (1990).
- 102 Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C. & Rieger, C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* **159**, 197-207 (1993).
- 103 Shacklett, B. L. Beyond 51Cr release: New methods for assessing HIV-1-specific CD8+ T cell responses in peripheral blood and mucosal tissues. *Clin Exp Immunol* **130**, 172-182 (2002).
- 104 Bennett, S. & Breit, S. N. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *J Leukoc Biol* **56**, 236-240 (1994).
- 105 Seder, R. A., Darrah, P. A. & Roederer, M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* **8**, 247-258 (2008).
- 106 Schussler, M. H., Skoudy, A., Ramaekers, F. & Real, F. X. Intermediate filaments as differentiation markers of normal pancreas and pancreas cancer. *Am J Pathol* **140**, 559-568 (1992).
- 107 Sipos, B. *et al.* A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch* **442**, 444-452 (2003).
- 108 Neureiter, D. *et al.* Different capabilities of morphological pattern formation and its association with the expression of differentiation markers in a xenograft model of human pancreatic cancer cell lines. *Pancreatology* **5**, 387-397 (2005).
- 109 Fogh, J., Fogh, J. M. & Orfeo, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**, 221-226 (1977).
- 110 Yamada, T., Okajima, F., Adachi, M., Ohwada, S. & Kondo, Y. Growth dependency of a new human pancreatic cancer cell line, YAPC, on autocrine interleukin-1alpha stimulation. *Int J Cancer* **76**, 141-147 (1998).
- 111 Agrawal, B. *et al.* The anti-MUC1 monoclonal antibody BCP8 can be used to isolate and identify putative major histocompatibility complex class I associated amino acid sequences. *Cancer Res* **58**, 5151-5156 (1998).
- 112 Pollack, M. S., Heagney, S. D., Livingston, P. O. & Fogh, J. HLA-A, B, C and DR alloantigen expression on forty-six cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* **66**, 1003-1012 (1981).

- 113 Zhu, K. *et al.* HLA-A0201 positive pancreatic cell lines: new findings and discrepancies. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 719-724 (2007).
- 114 Schoumacher, R. A. *et al.* A cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4012-4016 (1990).
- 115 Andersson, L. C., Nilsson, K. & Gahmberg, C. G. K562--a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer* **23**, 143-147 (1979).
- 116 Gaudernack, G. Prospects for vaccine therapy for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **20**, 299-314 (2006).
- 117 Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J. & Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* **74**, 181-273 (2000).
- 118 Farkas, A. M. & Finn, O. J. Vaccines based on abnormal self-antigens as tumor-associated antigens: immune regulation. *Semin Immunol* **22**, 125-131 (2010).
- 119 Schirle, M., Weinschenk, T. & Stevanovic, S. Combining computer algorithms with experimental approaches permits the rapid and accurate identification of T cell epitopes from defined antigens. *J Immunol Methods* **257**, 1-16 (2001).
- 120 Wilson, D. B. *et al.* Specificity and degeneracy of T cells. *Mol Immunol* **40**, 1047-1055 (2004).
- 121 Wucherpfennig, K. W. T cell receptor crossreactivity as a general property of T cell recognition. *Mol Immunol* **40**, 1009-1017 (2004).
- 122 Bredenbeck, A. *et al.* Identification of noncanonical melanoma-associated T cell epitopes for cancer immunotherapy. *J Immunol* **174**, 6716-6724 (2005).
- 123 Butler, N. S. *et al.* Prevention of cytotoxic T cell escape using a heteroclitic subdominant viral T cell determinant. *PLoS Pathog* **4**, e1000186 (2008).
- 124 Lipford, G. B., Bauer, S., Wagner, H. & Heeg, K. Peptide engineering allows cytotoxic T-cell vaccination against human papilloma virus tumour antigen, E6. *Immunology* **84**, 298-303 (1995).
- 125 Blattman, J. N. *et al.* Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* **195**, 657-664 (2002).
- 126 Benoist, C. & Mathis, D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* **2**, 797-801 (2001).
- 127 Honeyman, M. C., Stone, N. L., Falk, B. A., Nepom, G. & Harrison, L. C. Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. *J Immunol* **184**, 2204-2210 (2010).
- 128 Markovic-Plese, S. Degenerate T-cell receptor recognition, autoreactive cells, and the autoimmune response in multiple sclerosis. *Neuroscientist* **15**, 225-231 (2009).
- 129 Zhou, D. & Hemmer, B. Specificity and degeneracy: T cell recognition in CNS autoimmunity. *Mol Immunol* **40**, 1057-1061 (2004).
- 130 Walter, S. *et al.* High frequencies of functionally impaired cytokeratin 18-specific CD8+ T cells in healthy HLA-A2+ donors. *Eur J Immunol* **35**, 2876-2885 (2005).
- 131 Dohnal, A. M. *et al.* Comparative evaluation of techniques for the manufacturing of dendritic cell-based cancer vaccines. *J Cell Mol Med* **13**, 125-135 (2009).
- 132 Weyand, C. M., Goronzy, J. & Fathman, C. G. Modulation of CD4 by antigenic activation. *J Immunol* **138**, 1351-1354 (1987).
- 133 Boyman, O., Letourneau, S., Krieg, C. & Sprent, J. Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells. *Eur J Immunol* **39**, 2088-2094 (2009).

VI.Literaturverzeichnis

- 134 Kim, H. R., Hwang, K. A., Park, S. H. & Kang, I. IL-7 and IL-15: biology and roles in T-Cell immunity in health and disease. *Crit Rev Immunol* **28**, 325-339 (2008).
- 135 Oh, S. *et al.* IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5201-5206 (2008).
- 136 Shedlock, D. J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337-339 (2003).
- 137 Nascimbeni, M., Shin, E. C., Chiriboga, L., Kleiner, D. E. & Rehermann, B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* **104**, 478-486 (2004).
- 138 Parel, Y. & Chizzolini, C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev* **3**, 215-220 (2004).
- 139 Lamers, C. H., Willemsen, R. A., Luider, B. A., Debets, R. & Bolhuis, R. L. Protocol for gene transduction and expansion of human T lymphocytes for clinical immunogene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* **9**, 613-623 (2002).
- 140 Duarte, R. F. *et al.* Functional impairment of human T-lymphocytes following PHA-induced expansion and retroviral transduction: implications for gene therapy. *Gene Ther* **9**, 1359-1368 (2002).
- 141 Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Shelton, T. E., Even, J. & Rosenberg, S. A. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother* **26**, 332-342 (2003).
- 142 Trickett, A. & Kwan, Y. L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods* **275**, 251-255 (2003).
- 143 Kreutzer, J. N., Ruzzene, M. & Guerra, B. Enhancing chemosensitivity to gemcitabine via RNA interference targeting the catalytic subunits of protein kinase CK2 in human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* **10**, 440 (2010).
- 144 Shimamura, T. *et al.* Dysadherin expression facilitates cell motility and metastatic potential of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* **64**, 6989-6995 (2004).
- 145 Sinnathamby, G. *et al.* ADAM metallopeptidase domain 17 (ADAM17) is naturally processed through major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and is a potential immunotherapeutic target in breast, ovarian and prostate cancers. *Clin Exp Immunol* **163**, 324-332 (2011).
- 146 Stimpfl, M. *et al.* Expression of mucins and cytokeratins in ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett* **145**, 133-141 (1999).

Internetreferenzen:

<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>

<http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>

<http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/overexpressed.htm>

<http://www.allelefreqencies.net/>

<http://www.syfpeithi.de/>

Danksagung

Herrn Professor Dr. Hans-Georg Rammensee verdanke ich den Vorschlag sowie die Überlassung des Dissertationsthemas und die freundliche Aufnahme in seine Abteilung.

Dr. Stefan Löb ermöglichte mir durch seine außerordentlich kompetente und sympathische Betreuung – die trotz erheblicher klinischer (Dienst-)Belastung immer zuverlässig blieb – ein Zurechtfinden in Methodik und Materie.

Der Arbeitsgruppe um Dr. Cécile Gouttefangeas danke ich für die Bereitschaft Infrastruktur wie Arbeitsplatz, Zentrifugen, Sterilbänke, Mikroskope usw. mit mir zu teilen.

Christina, Thomas, Karo, Melanie und Gabor im Besonderen – aber auch dem gesamten Team der Abteilung Immunologie am Interfakultären Institut für Zellbiologie - verdanke ich kleine Tipps und Hilfen bezüglich der Laborroutine.

Ohne die synthetischen Peptide aus der „Küche“ von Prof. Stevanovic und Patricia Hristic und die Leukapheresen aus dem Zentrum für Transfusionsmedizin unter der Leitung von Prof. Dr. Dorothee Wernet wären die Experimente unmöglich gewesen. Vielen Dank!

Dr. Ludger Grosse-Hovest bereitete freundlicherweise den Plasmidvektor vor; Kollegen aus Erlangen und Kopenhagen überließen uns Pankreaskarzinom-Zelllinienproben. Auch hierfür ein herzliches Dankeschön.

Danksagung

Curriculum Vitae

Dietrich RUESS

* 07. 08. 1983 in Filderstadt

Schulbildung

Grundschule: Wielandschule Filderstadt-Sielmingen (1990-1994)

Gymnasium: Eduard-Spranger-Gymnasium Filderstadt (1994-2003)

Zivildienst (Anderer Dienst im Ausland)

in Gambia mit der „Good Seed Mission“ (2003-2004)

Akademische Ausbildung

Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen (2005-2011)

Erstes Staatsexamen: 26.03.2007

Famulaturen in Stuttgart, Tübingen, Filderstadt und Haifa, Israel.

Praktisches Jahr in Tübingen, Paris und New York.

Zweites Staatsexamen: 21.04.2011

Promotion am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie,
betreut von Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee.

Berufstätigkeit

Weiterbildung Allgemein- und Viszeralchirurgie

am Universitätsklinikum Freiburg, seit Oktober 2011.

Curriculum Vitae