

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. Körholz



**Subtraktive *In-vitro*-
Immunisierungsstrategien zur Generierung
tumorspezifischer T-Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Kerstin Reinhardt
geboren am 01.11.1979 in Greifswald

Gutachter: PD Dr. med. Kramm
Prof. Dr. med. Jürgens (Münster)

urn:nbn:de:gbv:3-000013279

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013279>]

Datum der Verteidigung:

16.01.2008

Referat und bibliographische Beschreibung

Zielsetzung: In dieser Arbeit wurde der allogene T-Zell-Transfer als immuntherapeutischer Ansatz zur Behandlung von Tumoren näher untersucht. Dafür wurde zunächst das Bindungsvermögen von 7 verschiedenen Peptiden an HLA-A2 positive T2-Zellen überprüft und mit zwei verschiedenen Vorhersage-Algorithmen (SYFPEITHI- und Bimas-Score) verglichen. Eine Stimulationskinetik der allogenen T-Zellen aktiviert mit den verschiedenen gepulsten T2-Zellen wurde aufgenommen und hinsichtlich peptidspezifischer Unterschiede untersucht. Zur Selektion peptidspezifischer T-Zellen wurden zwei verschiedene Depletionsverfahren analysiert. Abschließend wurde die Funktionalität der depletierten T-Zellen überprüft.

Methoden: Anhand von *in vitro* Experimenten und FACS-Analysen wurde das Bindungsvermögen verschiedener Peptide an T2-Zellen, die Aktivierung von allogenen T-Zellen mittels peptidgepulsten T2-Zellen und die Depletierbarkeit peptidspezifischer T-Zellen durch zwei verschiedene Verfahren (IFN- γ -Sekretionsanalyse und aufeinanderfolgende Stimulationen unter Nutzung des AICDs) untersucht. Im Granzym B-ELISpot wurde die Funktionalität bzw. der Depletionseffekt überprüft.

Ergebnisse: Das gemessene Bindungsvermögen der verwendeten tumor- und gewebespezifischen Peptide an die T2-Zellen korrelierte sehr gut mit dem SYFPEITHI- (Korrelationskoeffizienten $r=0,97$) und geringer mit dem Bimas-Score (Korrelationskoeffizienten $r=0,66$). Die Stimulationskinetik zeigte weder eine Peptid- noch eine HLA-Haplotyp-Spezifität. Das Stimulationsmaximum war nach 5 bis 6 Tagen erreicht. Im Vergleich der beiden untersuchten Depletionsverfahren wurde ein grösserer Depletionseffekt durch AICD-Depletion erzielt. Von den in dieser Arbeit untersuchten Peptiden konnten für das tumorspezifische Peptid 6 (aus EWS/FLI-1) und das gewebespezifische Peptid 2 (aus CD79B) Hinweise auf eine peptidspezifische Aktivierung gewonnen werden. Bezüglich des Nachweises der Funktionalität der depletierten T-Zellen im Granzym B-ELISpot konnte keine Peptidspezifität nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Die Etablierung von peptidspezifischen Zellen vor dem Hintergrund einer ausgeprägten Alloreaktivität ist äußerst problematisch. Auch durch die in der Arbeit vorgestellten Depletionsmethoden konnte keine ausreichend effiziente Trennung von peptidspezifischen und alloreaktiven T-Zellen erreicht werden. Einige Ergebnisse sprechen zwar für die Generierung peptidspezifischer Zellen, dennoch konnte im Granzym B-ELISpot keine peptidspezifische Aktivierung gezeigt werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Geschichte der Tumorimmunologie	1
1.2	Molekulare Grundlagen der Tumorimmunologie	2
1.2.1	Tumorantigene	2
1.2.2	Gewebespezifische Antigene	4
1.2.3	Einsatzmöglichkeiten von tumor- und gewebespezifischen Antigenen	5
1.2.4	MHC-Klasse-I-Moleküle	6
1.2.5	Antigenpräsentierende Zellen	7
1.2.6	Peptidbindungsvermögen	8
1.2.7	Apoptose	9
1.2.8	Stimulation von zytotoxischen T-Zellen	11
1.3	Tumorimmunität und Escape Mechanismen	14
1.4	Aktuelle immunologische Strategien in der Tumorthherapie	15
1.4.1	Zytokintherapie	15
1.4.2	Aktive Immuntherapie	17
1.4.3	Passive Immuntherapie	19
2	Zielsetzung	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Material	27
3.1.1	Medium und Puffer	27
3.1.2	Zellen	27
3.1.3	Peptide	27
3.1.4	Antikörper	28
3.1.5	Verbrauchsmaterialien	29
3.1.6	Geräte	29
3.2	Methoden	29
3.2.1	Allgemeine Zellkultur, Zellzahlbestimmung und Kryokonservierung	29
3.2.2	Isolierung mononukleärer Zellen	30
3.2.3	Pulsen von T2-Zellen mit Peptiden	30
3.2.4	Kokultivierung von T2-Zellen mit allogenen T-Zellen	31
3.2.5	Durchflusszytometrie	31
3.2.6	Möglichkeiten der Depletion von Zellpopulationen	33
3.2.7	Nachweis zytotoxischer T-Zellen mittels Granzym B-ELISpot	35
3.2.8	Internet-Programme	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Bindung von Peptiden an T2-Zellen	36
4.1.1	Punktwerte der Peptide	36
4.1.2	Messung des Peptidbindungsvermögens	38
4.2	Stimulation von allogenen T-Zellen mit T2-Zellen	41
4.2.1	HLA-A2-Zugehörigkeit der T-Zellen	41
4.2.2	T-Zell-Kinetik	42
4.2.3	Peptidspezifische Unterschiede der T-Zell-Aktivierung	45
4.3	Depletion von T-Zellen	47
4.3.1	Depletion mittels IFN- γ -Sekretionsanalyse	47

4.3.2	Depletion durch aufeinanderfolgende Stimulationen (AICD-Depletion) ...	50
4.4	Zytotoxizitätsnachweis mittels Granzym B-ELISpot	57
5	Diskussion	60
6	Zusammenfassung und Ausblick	68
7	Literaturverzeichnis	70
8	Thesen	78
	Lebenslauf	80
	Selbständigkeitserklärung	81
	Danksagung	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Antigenprozessierung bei MHC-Klasse-I.....	7
Abbildung 2:	T2-Zelle	8
Abbildung 3:	T-Zell-Aktivierung	13
Abbildung 4:	Stimulation verschiedener T-Zellen mit einem tumorspezifischen Antigen	23
Abbildung 5:	Stimulation verschiedener T-Zellen mit einem gewebespezifischen Antigen	24
Abbildung 6:	FSC-SSC Diagramm von T2-Zellen	33
Abbildung 7:	FSC-SSC Diagramm der PBMCs.....	33
Abbildung 8:	IFN- γ -Sekretionsanalyse	34
Abbildung 9:	Peptidbindungsvermögen nach SYFPEITHI-Score.....	37
Abbildung 10:	Peptidbindungsvermögen nach Bimas-Score	38
Abbildung 11:	HLA-A2-Floureszenz der mit Peptid 2 gepulsten T2-Zellen	39
Abbildung 12:	HLA-A2-Floureszenz der mit Peptid 5 gepulsten T2-Zellen	39
Abbildung 13:	HLA-A2-Floureszenz der mit 10% DMSO gepulsten T2-Zellen...	40
Abbildung 14:	HLA-A2-Floureszenz der nicht gepulsten T2-Zellen.....	40
Abbildung 15:	N-fache Floureszenzintensität verschiedener gepulster T2-Zellen bei T2=1	41
Abbildung 16:	FACS-Analyse eines HLA-A2 negativen T-Zell-Spenders.....	42
Abbildung 17:	FACS-Analyse eines HLA-A2 positiven T-Zell-Spenders.....	42
Abbildung 18:	T-Zell-Stimulationskinetik am Beispiel von Peptid 6	43
Abbildung 19:	Stimulationskinetik von HLA-A2 negativen T-Zellen.....	44
Abbildung 20:	Stimulationskinetik von HLA-A2 positiven T-Zellen	45
Abbildung 21:	Peptidspezifische T-Zell-Aktivierbarkeit.....	46
Abbildung 22:	Versuchsaufbau zur IFN- γ -Sekretionsanalyse.....	48
Abbildung 23:	Anzahl von CD8 positiven Zellen nach IFN- γ -Depletion	49
Abbildung 24:	N-fache CD8-Floureszenz bei T2=1 nach IFN- γ -Depletion	49
Abbildung 25:	Versuchsaufbau 1 zur Depletion unter Nutzung des AICDs.....	50
Abbildung 26:	Anzahl von CD8 positiven Zellen nach AICD-Depletion.....	51
Abbildung 27:	N-fache CD8-Floureszenz bei T2=1 nach AICD-Depletion	51
Abbildung 28:	Mittlere Floureszenzintensität der CD69 positiven CTLs nach AICD-Depletion	52
Abbildung 29:	Versuchsaufbau 2 zur Depletion unter Nutzung des AICDs.....	53
Abbildung 30:	N-fache CD8+ Events (T2+10%DMSO=1) nach AICD-Depletion	54
Abbildung 31:	N-fache mittlere Floureszenzintensität der CD69+ Zellen (T2+10%DMSO=1) nach AICD-Depletion	55
Abbildung 32:	N-fache mittlere Floureszenzintensität der HLA-DR+ Zellen (T2+10%DMSO =1) nach AICD-Depletion	56
Abbildung 33:	N-fache mittlere Floureszenzintensität der CD25+ Zellen (T2+10%DMSO=1) nach AICD-Depletion	56
Abbildung 34:	Zytotoxizitätsnachweis	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Peptide	28
Tabelle 2:	Verwendete Antikörper	28
Tabelle 3:	Berechnete Punktwerte der Peptide an HLA-A2 im Bimas- und SYFPEITHI-Score	37

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (engl.: antibody-dependent cellular cytotoxicity)
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod (engl.: activation induced cell death)
AK	Antikörper
Allo	Allogen
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl.: antigen presenting cell)
BCG	<i>Mykobakterium Bacillus Calmette Guerin</i>
CAD	Caspaseaktivierte DNase
CD	Differenzierungscluster (engl.: cluster of differentiation)
CDC	Komplementvermittelte Zytotoxizität (engl.: complement dependent cytolysis)
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (engl.: cytotoxic T-lymphocyte)
DED	Todeseffektor Domäne (engl.: death effector domain)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	Todinduzierender Signalkomplex (engl.: death inducing signaling complex)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DNP	Dinitrophenol
DPBS	Puffer (engl.: Dulbecco's phosphate buffered saline)
ELISA	Enzymgekoppelte Immunabsorptionsanalyse (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay)
ELISpot	Enzymgekoppelter Immunospot (engl.: enzyme-linked immunospot)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Floureszenz-aktivierter Zellsortierer (engl.: fluorescence activated cell sorter)
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne (engl.: Fas-associated protein with death domain)
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FITC	Floureszeinisothiozyanat
FSC	Vorwärtsstreuung (engl.: forward light scatter)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (engl.: granulocyte colony stimulating factor)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (engl.: granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (engl.: Graft-versus-Host Disease)
GvH	Transplantat-gegen-Wirt (engl.: Graft-versus-Host)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie (engl.: Graft-versus-Leukemia)
GvT	Transplantat-gegen-Tumor (engl.: Graft-versus-Tumor)
h-IL-2	Humanes Interleukin-2
HLA	Humanes Leukozytenantigen (engl.: human leucocyte antigen)
HPV	Humanes Papillomavirus
IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Kulturmedium (engl.: Iscove's modified Dulbecco's medium)
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte Killerzelle
LDH	Laktatdehydrogenase
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung (engl.: magnetic activated cell sorting)
mHA	Nebenhistokompatibilitätsantigen (engl.: minor histocompatibility antigen)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen

PBMC	Periphere mononukleäre Blutzelle (engl.: peripheral blood mononuclear cell)
PE	Phycoerythrin
pPNET	Peripherer primitiver neuroektodermaler Tumor
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds pro minute)
SCT	Stammzelltransplantation (engl.: stem cell transplantation)
SSC	Seitwärtsstreuung (engl.: sideward light scatter)
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	Antigenprozessierungsassoziiertes Transporter (engl.: transporter associated with antigen processing)
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl.: T-cell receptor)
TIL	Tumorerfiltrierender Lymphozyt
TNF	Tumornekrosefaktor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (engl.: transforming growth factor)
U	Einheit für die Enzymaktivität (engl.: unit)

1 Einleitung

Tumorerkrankungen gehören derzeit zu den häufigsten Todesursachen; insbesondere in den Industrieländern [Statistisches Bundesamt, 2004]. Deshalb kommt der Entwicklung von Methoden zur Bekämpfung maligner Erkrankungen durch „konventionelle“ Therapien, wie der operativen Entfernung von Tumoren, der Strahlentherapie und der Chemotherapie, eine grosse Bedeutung zu. Die Kombination verschiedener Therapien und die stetige Optimierung dieser Therapien ermöglichen eine immer bessere Behandlung der Tumorpatienten. Trotz eines optimalen Behandlungsschemas sind die „konventionellen“ Möglichkeiten häufig mit starken Nebenwirkungen und einer unzureichenden Wirksamkeit verbunden. Daher besteht die Notwendigkeit alternative Konzepte mit einer hohen Effizienz bei geringer Toxizität zu entwickeln. Eine vielversprechende Methode ist die Immuntherapie, die besonders in den letzten Jahren an Bedeutung, Entwicklung und Einsatz gewann. Ihr breites Anwendungsspektrum sowie die erhoffte höhere Spezifität verbunden mit den geringeren Nebenwirkungen sind ihre entscheidenden Vorteile.

1.1 Geschichte der Tumorimmunologie

Die moderne immunologische Tumorthherapie begann Ende des 19. Jahrhunderts. Zu dieser Zeit behandelte der New Yorker Chirurg William Coley die siebzehnjährige Freundin von John D. Rockefeller. Die junge Frau hatte sich ihre Hand verletzt, an welcher sich eine Schwellung ausbildete. Die von Coley entnommene Biopsie ergab, dass es sich um ein rundzelliges Sarkom handelte [Coley, 1891]. Zu dieser Zeit hatte die Patientin bereits Metastasen. Sie verstarb wenig später. Von diesem Schicksal ergriffen publizierte Coley wenig später in *Annales of Surgery*: „Eine Erkrankung, die durch eine unbedeutende Verletzung ausgelöst wurde, kann eine Person in bester Gesundheit und voller Lebensenergie befallen und auf heimtückische, mysteriöse Weise innerhalb von wenigen Monaten das Leben kosten. Daher ist es wichtig, darüber nachzudenken und weiter zu forschen.“ [zitiert nach Coley, 1891].

Er selbst recherchierte sämtliche Aufzeichnungen über die Krankheitsverläufe von Sarkompatienten [Coley, 1893]. Dabei musste er feststellen, dass sich nach operativer Tumorentfernung zumeist ein schnell wachsendes Rezidiv entwickelte. Die wenigen, erfolgreich verlaufenden Fälle erkrankten häufig an einer fieberhaften Infektionserkrankung. Anhand dieser Tatsache überprüfte er alle Unterlagen von Sarkom- bzw. Karzinompatienten, welche in den letzten 15 Jahren im New York Hospital und im New York Cancer Hospital behandelt worden waren. Dabei war ein Fall ganz bemerkenswert: Ein 29 jähriger Mann wurde fünfmal an einem immer wieder

rezidivierenden, rundzelligen Sarkom am Hals operiert. In der fünften Operation war das Sarkom nur partiell entfernbar. Die Prognose für den Patienten wurde damals als sehr schlecht eingestuft. Im weiteren Verlauf entwickelte der Patient eine schwere Erysipelinfektion im Bereich der Wunde. Während sich der Patient von dieser Infektion erholte, verschwand das Sarkom vollkommen. Coley stellte Nachforschungen über diesen Mann an und fand heraus, dass er auch 7 Jahre nach der Tumorremission rezidivfrei geblieben war [Linehan et al., 1999].

Daran anlehnend recherchierte Coley alle verfügbaren Berichte über Tumorpatienten, die ebenfalls an einem Erysipel erkrankt waren. Insgesamt fand er 38 Berichte. Bei 12 Patienten war die Tumorerkrankung völlig oder über viele Jahre verschwunden. Die übrigen Tumorpatienten zeigten zumindest eine Besserung ihres Krankheitszustandes [Kienle & Kiene, 2003].

Coley schlussfolgerte, dass durch die Infektion eine Stimulation des Immunsystems erfolgt sein musste, so dass die entarteten malignen Zellen zerstört werden konnten. Er hatte damit die spontane Tumorregression entdeckt. Diese Beobachtungen berichtete Coley seinem Mentor, Dr. Bull, und bat ihn um die Erlaubnis, Patientenversuche durchführen zu dürfen [Coley, 1906]. Mit dem Einverständnis seines Mentors und dem der Patienten begann Coley am 3. Mai 1891 mit seiner experimentellen Behandlung, indem er den betroffenen Patienten Bakterientoxine in den Tumor injizierte. Dies war der Beginn der Immuntherapie [Linehan et al., 1999].

1.2 Molekulare Grundlagen der Tumorummunologie

Die Voraussetzung für die Entwicklung immunologischer Therapien zur Bekämpfung von Tumoren sind Erkenntnisse über die Identifikation von Tumorantigenen, die Antigenpräsentation und den Mechanismus der T-Zell-Aktivierung sowie der daran beteiligten Moleküle. Nachfolgend sollen diese Grundlagen näher erläutert werden.

1.2.1 Tumorantigene

Für die Entwicklung immunologischer Tumortherapiestrategien war der Nachweis und die Identifikation von Tumorantigenen eine wesentliche Voraussetzung [Boon & van der Bruggen, 1996]. Durch die Fortschritte in der molekularen Immunologie und durch die Entwicklung von Methoden zur Detektion von Tumorantigenen sind bisher eine Reihe von Tumorantigenen bzw. die entsprechenden T-Zell-Epitope für einige Tumoren gefunden und näher beschrieben worden.

Vergleicht man normale und maligne Zellen des gleichen histogenetischen Ursprungs, finden sich qualitative und quantitative Unterschiede in der Expression bestimmter

Antigene [Van den Eynde & van der Bruggen, 1997]. Prinzipiell ist eine Einteilung in tumorspezifische und tumorassoziierte Antigene möglich. Während tumorspezifische Antigene nur von Tumorzellen exprimiert werden, finden sich tumorassoziierte Antigene auch bei nicht entarteten Zellen (meist jedoch entweder in geringerer Expressionsstärke oder nur in einzelnen Zelltypen). Die meisten bisher identifizierten Tumorantigene stellen tumorassoziierte Antigene dar. Tumorspezifische Antigene sind hingegen eher selten.

Tumorantigene lassen sich in Abhängigkeit ihrer Expressionsspezifität und ihrer Genese in sechs verschiedene Kategorien einteilen. Zur ersten Gruppe gehören Tumorantigene, die durch Überexpression eines körpereigenen Proteins hervorgerufen werden. Beispiele dafür sind das CyclinD1 oder das HER-2/neu-Antigen, eine Rezeptortyrosinkinase, die zu über 30% bei Ovarial- und Mammakarzinomen einen erhöhten Wert aufweist [Van den Eynde & van der Bruggen, 1997; Disis & Cheever, 1998]. Die zweite Gruppe der Tumorantigene beinhaltet Differenzierungsantigene, die nur von Genen bestimmter Gewebetypen exprimiert werden. Eines dieser Antigene ist die von Melanozyten exprimierte Tyrosinase [Van Pel et al., 1995]. Tumorantigene, die eine posttranslationale Modifikation aufweisen, bilden eine weitere Gruppe. Dazu gehört z. B. das MUC-1-Antigen, das in Mamma- und Pankreaskarzinomen vorkommt. Normalerweise weist dieses Antigen viele Glykosylierungen auf, im Tumorgewebe ist es dagegen unterglykosyliert [Van den Eynde & van der Bruggen, 1997]. Zur vierten Gruppe der Tumorantigene gehören die viralen Antigene bzw. viralen Onkogene. So ist beispielsweise das E7-Protein des Humanen Papillomavirus (HPV) ein in Zervixkarzinomen exprimiertes Onkogen [Van den Eynde & van der Bruggen, 1997]. Eine weitere Gruppe sind Antigene, deren Gene normalerweise nur in Keimzellen exprimiert werden und folglich in nicht entartetem, adultem Gewebe nicht vorkommen (mit Ausnahme des Hodens). Zu solchen Genen gehören MAGE-1, MAGE-3 oder BAGE, die in einer Vielzahl von Tumoren, wie Melanomen, Mamma- und Pankreaskarzinomen, aktiviert werden [Chaux et al., 1999; Boon, 1993]. Zur letzten Gruppe der Tumorantigene gehören Antigene, die durch Mutation (häufig Punktmutationen oder Genumlagerungen) entstanden sind. Sie können die Ursache für die maligne Entartung des Gewebes sein. Da sie nur von Tumorzellen exprimiert werden, sind sie tumorspezifisch [Rosenberg, 1999; Lessnick et al., 1995]. Beispiele hierfür finden sich insbesondere bei zahlreichen pädiatrischen Tumoren, so etwa bei Tumoren der Ewing-Tumor-Familie. Da diese Antigene für die Arbeit von Bedeutung sind, sollen sie im Folgenden näher erläutert werden.

Unter den Ewing-Tumoren werden das maligne Ewing-Sarkom des Knochens (der zweithäufigste pädiatrische maligne Knochentumor nach dem Osteosarkom), der

periphere primitive neuroektodermale Tumor (pPNET) sowie der Askin-Tumor zusammengefasst [Lessnick et al., 1995]. Bei der Mehrzahl dieser Tumore ist eine reziproke Translokation $t(11;22)(q24;q12)$ nachgewiesen worden [Mackall et al., 2000; Dockhorn-Dworniczak et al., 1994]. Durch diese Translokation fusioniert die 5'-Region von dem so genannten EWS-Gen auf Chromosom 22 mit der 3'-Region des so genannten FLI-1-Gens auf Chromosom 11. Dabei ist die aminoterminal Domäne von FLI-1 durch einen Teil des EWS-Proteins ersetzt worden. FLI-1 ist ein Bestandteil der Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren. Diese ist durch das Vorhandensein von einer 85 Aminosäuren langen Domäne definiert, genannt ets-Domäne, die eine sequenzspezifische DNA-Bindung vermittelt [May et al., 1993]. EWS kann in zwei funktionale Domänen unterteilt werden. Die A-Domäne (Aminosäuren 1-82) kodiert die Region für höchste Transformationsaktivität, ist aber gleichzeitig ein geringer Transkriptionsaktivator. Im Gegensatz dazu ist die B-Domäne ein starker Transkriptionsaktivator mit reduzierter Transformationsaktivität. Das durch die Translokation hervorgerufene EWS/FLI-1-Fusionsgen kodiert ein tumorspezifisches Protein, welches als aberranter Transkriptionsfaktor agiert und infolgedessen einen transformierenden Charakter aufweist [May et al., 1993].

Ebenfalls eine reziproke Translokation ($t(2;13)(q35;q14)$) weisen ca. 80% der alveolären Rhabdomyosarkome auf und exprimieren damit ein entsprechendes, tumorspezifisches Fusionsprotein (PAX3/FKHR) [Mackall et al., 2000]. Dabei fusioniert PAX3 als DNA-bindendes Protein mit der Transaktivierungsdomäne von FKHR zu einem neuen Transkriptionsfaktor.

1.2.2 Gewebespezifische Antigene

Gewebespezifische Antigene werden auf der Oberfläche von Zellen eines bestimmten Differenzierungszustandes exprimiert. Ein solches Antigen ist z. B. CD79, welches mit seiner α - und β -Kette einen Teil des B-Zell-Rezeptors darstellt und spezifisch für B-Lymphozyten ist [Borst et al., 1996]. Ein anderes gewebespezifisches Antigen ist das CD72, ein Differenzierungsantigen auf der Zelloberfläche von B-Zellen. Dieses Antigen kontrolliert die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen [Van de Velde et al., 1991; Kumanogoh et al., 2000].

Durch die Einführung der DNA-Mikroarray-Analytik ist es inzwischen relativ leicht möglich, das Genexpressionsprofil von Tumorzellen und normalen Vergleichsgeweben zu bestimmen. Durch den Einsatz dieser Technologie liessen sich tumorspezifische Genexpressionsprofile identifizieren, die zeigen, dass Tumore in der Regel das

Genexpressionsmuster ihres histogenetischen Ursprungs teilweise beibehalten [Coulie et al., 1999; Staeger et al., 2004].

1.2.3 Einsatzmöglichkeiten von tumor- und gewebespezifischen Antigenen

Die Möglichkeiten zur Nutzung von Tumorantigenen im Rahmen der Behandlung von Tumorpatienten sind vielfältig. Zum einen finden sie als Tumormarker in der Diagnostik, Verlaufsbeurteilung und Prognose maligner Erkrankungen klinische Anwendung und andererseits eignen sie sich zur Induktion einer adoptiven Immunantwort in der Tumorummunologie [Preuss et al., 2002].

Tumorspezifische Antigene, wie sie bei Tumoren der Ewing-Tumor-Familie und den alveolären Rhabdomyosarkomen vorkommen, entstehen durch eine Translokation an der Fusionsstelle der beiden jeweils beteiligten Proteine. Dadurch werden tumorspezifische Sequenzen gebildet [Mackall et al., 2000]. Der Nachweis der korrespondierenden Onkofusionstranskripte wird für diagnostische Zwecke bereits routinemäßig verwendet. Die durch die Fusion entstehenden tumorspezifischen Peptidsequenzen stellen potentielle Zielstrukturen für die Induktion tumorspezifischer Immunantworten dar. Verwendet werden dabei an MHC-Moleküle suffizient bindende Proteinflragmente bestehend aus acht bis neun Aminosäuren, die eine effektive Immunantwort auslösen können [Lessnick et al., 1995]. Eine tumorspezifische Immunantwort bzw. eine gesteigerte Tumorummunität kann dabei auf zwei verschiedenen Wegen erreicht werden [Rosenberg, 1999]: Zum einen durch eine adoptive T-Zell-Immuntherapie (durch Transfer von *in vitro* generierten tumorspezifischen T-Zellen) und zum anderen durch eine therapeutische Impfung.

Auch gewebespezifische Antigene können aufgrund des histogenetisch typischen Genexpressionsmusters als Marker für versprengte Tumorzellen verwendet werden. Die Tyrosinase wurde als melanozytenspezifisches Antigen, welches auch von Melanomzellen exprimiert wird, bereits erwähnt. Die Unterscheidung von histologisch ähnlichen Tumoren mit Hilfe derartiger gewebespezifischer Marker stellt eine wesentliche Bereicherung der Diagnostik dar. So gehören die beiden oben erwähnten Ewing-Tumore und Rhabdomyosarkome zu der Gruppe der so genannten „klein-rund-blauzelligen Tumore“, zu denen weiterhin Neuroblastome und teilweise (lymphoblastische) Lymphome gerechnet werden. Der Nachweis von gewebespezifischen Antigenen, wie z. B. CD79, kann hierbei für die Abtrennung der letzten Gruppe hilfreich sein.

Gewebespezifische Antigene sind zudem in der immunologischen Tumorbehandlung anwendbar, beispielsweise in der Therapie von B-Zell-Neoplasien. Hier hat die

Verwendung des chimären Antikörpers Rituximab gegen das B-zellspezifische CD20 bereits erfolgreich Einzug in die klinische Praxis gefunden [Bendandi & Longo, 1999]. In der Therapie von Non-Hodgin-Lymphomen werden derzeit auch radiomarkierte monoklonale Antikörper, die das CD20 Antigen auf der Oberfläche von B-Zellen erkennen, getestet [Goldenberg, 2001]. Dem Einsatz dieser Antigene für die Induktion von antigenspezifischen T-Zellen steht entgegen, dass diese Antigene auch auf normalen Zellen zumindest einzelner Differenzierungszustände exprimiert werden, so dass normalerweise Toleranz gegenüber diesen Antigenen besteht. Aktive Impfungen sind daher nur bedingt zur Induktion hochaffiner T-Zellen geeignet. Die Stimulation allogener T-Zellen mit anschließendem adoptivem Transfer könnte dieses Problem jedoch umgehen (siehe unten).

1.2.4 MHC-Klasse-I-Moleküle

T-Zellen erkennen ihr Antigen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) immer in Kombination mit Molekülen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) [Löffler, 1999]. Aufgrund ihrer bevorzugten Existenz auf den Lymphozyten werden diese Moleküle beim Menschen auch als HLA-Moleküle bezeichnet. Ein HLA-Molekül, was bisher zu den am besten Untersuchten gehört und in der mitteleuropäischen Bevölkerung sehr häufig vorkommt, ist das HLA-A2-Molekül [Bell, 1998].

MHC-Moleküle lassen sich entsprechend ihrer Struktur und Funktion in zwei Klassen einteilen: MHC-Klasse-I-Moleküle und MHC-Klasse-II-Moleküle. Während die MHC-Klasse-II-Moleküle ein symmetrisches Heterodimer bestehend aus einer α - und β -Kette bilden und nur auf APCs exprimiert werden, befinden sich MHC-Klasse-I-Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen [Fleuren et al., 1995]. MHC-Klasse-I-Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, bestehend aus dem β 2-Mikroglobulin und einer polymorphen α -Kette [Stern & Wiley, 1994]. Die α -Kette von MHC-Klasse-I-Molekülen lässt sich in drei Domänen unterteilen (α 1, α 2 und α 3). Die α 1- und α 2-Domäne bilden die peptidbindende Struktur, die α 3-Domäne ist in der Membran verankert [Löffler, 1999]. Peptide, die von MHC-Klasse-I präsentiert werden, entstehen durch Proteolyse intrazellulär synthetisierter Proteine im Proteasom, vgl. Abbildung 1. Ein Proteasom ist ein großer zylindrischer Komplex aus ca. 28 Untereinheiten, die in vier Ringen übereinander gestapelt sind. Das Zentrum ist hohl und enthält als wesentlichen Bestandteil eine multikatalytische Protease. Die abzubauenen Proteine werden in das Zentrum geleitet und dort zu Proteinfragmenten verarbeitet. Diese gelangen anschließend durch den TAP-1- und TAP-2-Transportkomplex in das endoplasmatische

Retikulum (ER), wo sie mit dem MHC-Klasse-I-Molekül zusammengesetzt werden [Lankat-Buttgereit & Tampe, 1999; Uebel & Tampe, 1999]. Die Peptidbindung an die MHC-Klasse-I- α -Kette löst eine Konformationsänderung desselben Moleküls aus, die dann eine Bindung mit dem β 2-Mikroglobulin bewirkt, wodurch ein stabiler trimere Komplex entsteht [Germain & Margulies, 1993]. Bevorzugt werden Peptide bestehend aus acht bis zehn Aminosäuren gebunden. Die beladenen MHC-Klasse-I-Moleküle werden durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert [Gemsa et al., 1997], wo das Antigen präsentiert wird.

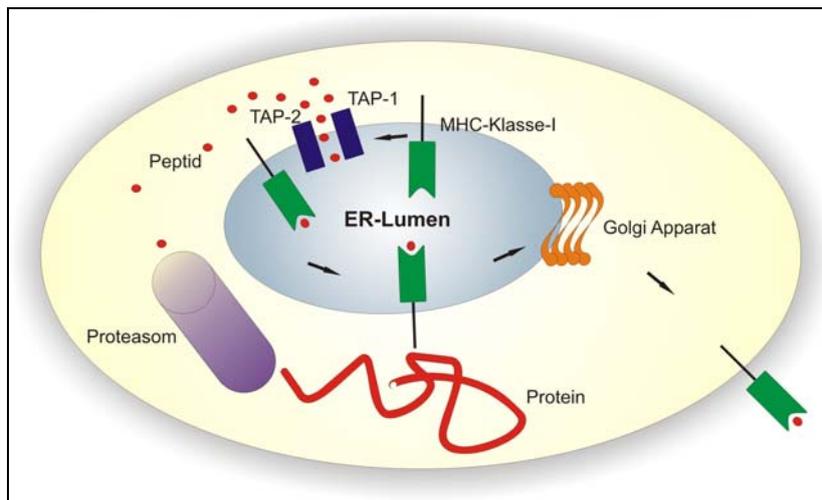


Abbildung 1: Antigenprozessierung bei MHC-Klasse-I in Anlehnung an [Löffler, 1999]

Im Proteasom entstehen aus intrazellulär synthetisierten Proteinen Peptide, welche durch den TAP-Transporter in das ER gelangen. Dort werden sie mit dem MHC-Molekül zusammengesetzt und an die Zelloberfläche transportiert, wodurch eine Antigenpräsentation möglich ist.

1.2.5 Antigenpräsentierende Zellen

APCs sind hoch spezialisierte Zellen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Immunität zwischen Antigen und Effektorzellen. Sie besitzen die Fähigkeit, exogene Proteine aufzunehmen, in Peptide zu zerlegen und diese dann gemeinsam mit MHC-Klasse-II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche darzubieten (exogener Weg der Antigenpräsentation). Effektorzellen können somit aktiviert werden. Zu den so genannten professionellen APCs gehören insbesondere dendritische Zellen, Makrophagen, Langerhans-Zellen der Haut und aktivierte B-Zellen [Gemsa et al., 1997]. Alle kernhaltige Zellen können normalerweise auch Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, indem endogene Peptide über den Klasse-I-Weg der Antigenpräsentation den T-Zellen präsentiert werden. Diese Fähigkeit kann jedoch, wie z. B. in Tumorzellen, verloren gehen. Der humanen HLA-A2 positiven Tumorzelllinie T2 ist es nicht möglich, endogen synthetisierte Peptide auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Die Ursache ist hierfür eine Deletion im MHC-Genbereich, welcher die dort lokalisierten TAP-Transporter

mit betrifft [Heemels & Ploegh, 1995]. Infolgedessen gelangen keine endogenen Peptide in das ER und eine Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle bleibt somit aus. Die daraus resultierenden leeren MHC-Klasse-I-Moleküle werden zwar an die Zelloberfläche transportiert, können aber nicht stabil an der Membran verankert werden und diffundieren in den extrazellulären Raum [Salcedo et al., 1994; Salter et al., 1985]. Die leeren MHC-I-Moleküle sind aber fähig, sich durch externe Zugabe von z. B. synthetisch hergestellten Peptiden bei niedrigen Temperaturen zu stabilisieren, vgl. Abbildung 2. Bei Erreichen einer suffizienten Bindung des Peptids an das MHC-Molekül ist dadurch eine Antigenpräsentation mit einer entsprechenden T-Zell-Stimulation möglich [Jondal et al., 1996; Collins & Frelinger, 1998].

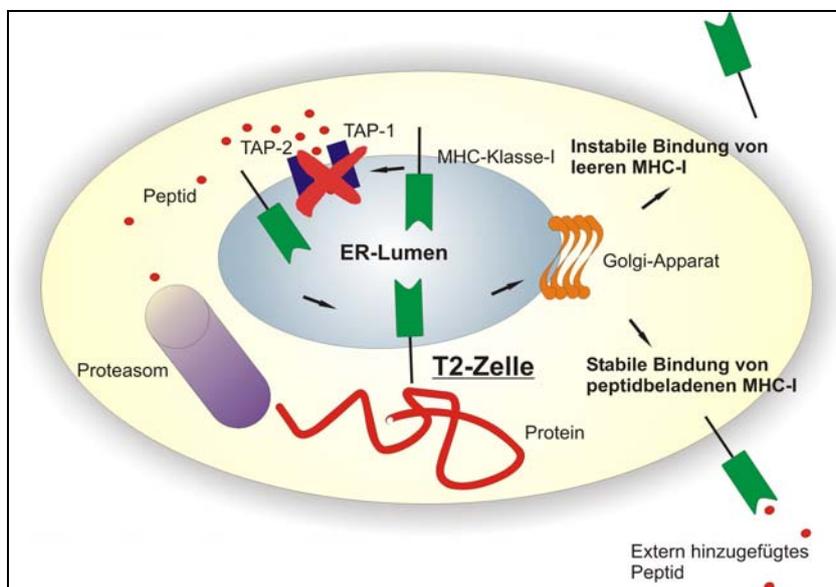


Abbildung 2: T2-Zelle in Anlehnung an [Löffler, 1999]

Aufgrund einer Mutation können keine TAP-Transporter gebildet werden, so dass eine Antigenpräsentation der endogenen Peptide nicht möglich ist. Extern hinzugefügte Peptide sind in der Lage an die leeren MHC-Moleküle zu binden, diese zu stabilisieren und somit eine Antigenpräsentation zu gewährleisten.

1.2.6 Peptidbindungsvermögen

Bei der Analyse von Peptiden, welche natürlicherweise in MHC-Klasse-I-Molekülen gebunden vorliegen, stellte man fest, dass sich diese Peptide eines gegebenen MHC-Moleküls sowohl hinsichtlich der Aminosäurenlänge als auch –sequenz relativ an bestimmten Positionen ähnlich sind [Collins & Frelinger, 1998]. Diese Positionen und die an diesen Positionen vorherrschenden Aminosäuren unterschieden sich von MHC- zu MHC-Molekül. Aufgrund von Strukturuntersuchungen geht man davon aus, dass die an diesen so genannten Ankerpositionen sitzenden Aminosäuren passgenau in Taschen des entsprechenden MHC-Moleküls sitzen. Dadurch wird bedingt, dass einzelne MHC-Haplotypen immer nur ein eingeschränktes Peptidspektrum präsentieren können.

Wie stark die Affinität einzelner Peptide zu den verschiedenen MHC-Molekülen ist, kann inzwischen relativ zuverlässig mit Hilfe von diversen Scores/Algorithmen anhand einer computergestützten Analyse der potentiellen Bindungseigenschaften vorhergesagt werden. Dadurch ist auch eine Voraussage über die Bindung von synthetisch hergestellten Peptiden (z. B. von TAA-Sequenzen) an APCs möglich [Adams & Koziol, 1995; Buus, 1999]. Allerdings muss bedacht werden, dass eine suffiziente Peptidbindung bzw. eine suffiziente Immunwirkung nicht garantiert werden kann [Melief & Kast, 1995; Pelte et al., 2004].

Zwei Datenbanken, die in dieser Arbeit benutzt wurden, sollen nachfolgend näher erläutert werden. Bei beiden handelt es sich um Punktsysteme (Scores), die anhand der Aminosäuresequenz das Bindungsvermögen des Peptides an das MHC-Molekül berechnen können.

I. SYFPEITHI-Score:

In diesem Punktsystem erhält jede schlecht bindende Aminosäure den Wert 1 und jede optimal bindende Aminosäuren den Wert 15. Jeder andere Wert zwischen 1 und 15 ist in Abhängigkeit vom Bindungsvermögen möglich. Aminosäuren, die in einer bestimmten Position unvorteilhaft für die Bindungskapazität des Peptides sind, können auch negative Werte annehmen. Zu beachten ist, dass verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle verschiedene Längen von Aminosäurenketten bevorzugen, z. B. bevorzugt HLA-A2 Nonamere. Der maximale Punktwert variiert zwischen den verschiedenen MHC-Allelen. Für HLA-A2 ist der maximale Punktwert 36 [Rammensee et al., 1999].

II. Bimas-Score:

Bei diesem Punktsystem wird ein initialer Punktwert von 1 gesetzt. Für jede weitere Aminosäure wird dieser Punktwert mit einem Koeffizienten, spezifisch für den Aminosäuretyp, der Position und dem HLA-Molekül, verrechnet. Dabei erhalten mäßig bindende Aminosäuren einen Koeffizienten von weniger als 1, gut bindende einen Koeffizienten von größer als 1. Letztlich werden Nonamere und Dekamere mit 9, Oktamere mit 8 multipliziert. Entsprechend dem HLA-Molekül wird der errechnete Wert mit einer Konstanten multipliziert [Parker et al., 1994].

1.2.7 Apoptose

Der Begriff Apoptose oder auch programmierter Zelltod umfasst ein von der Zelle aktiviertes Selbstzerstörungsprogramm. Dabei schrumpft durch Abbau, Degeneration und anschließende Kondensation der DNS der Zellkern. Morphologisch sind Bläschen

und Ausstülpungen an der Zytoplasmamembran sichtbar. Schließlich schnüren sich membranumschlossene Vesikel von der Zelle ab. *In vivo* eliminieren andere Zellen diese Vesikel durch Phagozytose ohne eine Entzündungsreaktion zu induzieren. *In vitro* erfolgt die Lyse der Apoptosevesikel [Bühling et al., 2000].

Die Apoptose ist ein lebenswichtiger Mechanismus aller Gewebe und auch des Immunsystems, der eine Homöostase zwischen Leben und Tod bzw. Zellteilung und -vernichtung im Organismus aufrechterhält. Alte, verletzte, mutierte oder nutzlose Zellen werden beseitigt bzw. spezifische Abwehrzellen oder neue Zellen werden gebildet. Eine Immunantwort kann so beendet werden oder autoreaktive Zellen können beseitigt werden. Eine Fehlregulation der Apoptose und damit eine Störung des Gleichgewichtes kann zur Entstehung von Autoimmun- oder Tumorerkrankungen führen [Lenardo et al., 1999].

Auslöser für eine Apoptose können viele verschiedene Chemikalien bzw. physikalische Bedingungen sein. Allerdings kann sie auch durch das gleiche Signal verursacht werden, was unter anderen Bedingungen zur Aktivierung und Proliferation führen würde. Dies wird insbesondere beim so genannten aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) deutlich [Vignaux & Golstein, 1994]. Es konnte gezeigt werden, dass aktivierte T-Zellen durch Apoptose zugrunde gehen können, wenn sie nochmals aktiviert werden [Green & Scott, 1994]. Tatsächlich lassen die bisherigen Daten auf eine signifikante (ca. 20 bis 30%) Erhöhung der Apoptoserate von aktivierten Zellen nach Restimulation schließen. Erfolgt dabei die Restimulation mit dem gleichen Signal, kommt es zu einem vermehrten Zellsterben. Neben der Reizart scheint der Zeitraum zwischen der Primär- und Sekundärstimulation eine entscheidende Rolle zu spielen. FACS-Analysen zeigten das Erreichen des Maximum des AICDs nach 12 bis 18 Stunden erfolgter Zweitstimulation [Kabelitz et al., 1993].

Beim Ablauf der Apoptose ist bisher die durch CD95 (auch als APO-1 bzw. Fas-Rezeptor bezeichnet) vermittelte Apoptose am besten charakterisiert und untersucht worden [Krammer, 2000]. Der Fas-Rezeptor, ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert und durch den TNF-ähnlichen Fas-Liganden, einem Membranprotein, aktiviert. Bindet der trimere Fas-Ligand an den Fas-Rezeptor (Monomer), bewirkt er die Bildung von Fas-Trimeren [Ju et al., 1999]. Der Fas-Rezeptor besitzt an seinem zytoplasmatischen Ende eine so genannte Todesdomäne, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt. Ihren Namen verdankt sie ihrer erstmaligen Entdeckung in Apoptose-beteiligten Proteinen. Durch die Konformationsänderung nähern sich mehrere Todesdomänen. Es bildet sich ein Komplex aus mehreren Proteinen, den man auch DISC nennt. Mit diesem Komplex interagiert eine Reihe von

Adapterproteinen, wie z. B. das Protein FADD. Dieses wiederum tritt über eine zweite Todesdomäne (MORT1 oder DED) mit der Procaspase-8, d. h. der inaktiven Form einer Caspase, in Wechselwirkung [Nagata, 1997]. Aggregierte Caspase-8-Moleküle sind in der Lage, sich gegenseitig zu aktivieren. Sie spalten sich autokatalytisch und setzen eine aktive Caspasedomäne frei. Diese kann dann die Caspase 3 aktivieren [Huang & Crispe, 1993]. Die aktivierte Caspase 3 spaltet den Hemmstoff von CAD (I-CAD). Somit wird CAD, eine caspaseaktivierte DNase, aktiviert und kann in den Zellkern eindringen. Dort spaltet sie die DNA in Fragmente und führt zur Apoptose [Baumann et al., 2002].

1.2.8 Stimulation von zytotoxischen T-Zellen

CTLs können nach Aktivierung die Zellen, welche das entsprechende Antigen präsentieren, lysieren [Collins & Frelinger, 1998]. Entsprechend werden in diesem Falle die APCs als Zielzellen bezeichnet. Voraussetzung hierfür ist die spezifische Interaktion zwischen dem Antigen-MHC-Klasse-I-Komplex auf der Oberfläche der APCs mit den Rezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche (MHC-restringierte T-Zell-Antigen-Erkennung). Dabei können zwei Wechselwirkungen unterschieden werden: Die antigenspezifische Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem MHC-Klasse-I-Molekül und die Interaktion zwischen MHC-Klasse-I-Molekül und dem CD8-Dimer, welches als Korezeptor agiert. Beide dieser Interaktionen sind als sehr schwach einzustufen [Jones, 1998].

Für eine optimale T-Zell-Antwort ist eine optimale Signalgebung erforderlich. Diese besteht aus einer maximalen Antigenpräsentation durch eine maximale Expression von MHC-Klasse-I-Moleküle auf den APCs, einem maximalen Bindungsvermögen der Peptide bzw. der Antigene an MHC-Klasse-I, einer maximalen Expression von relevanten Zytokinen und einer maximalen Kostimulation durch akzessorische Moleküle [Collins & Frelinger, 1998]. Durch letzere wird ein zweites antigenunabhängiges Signal hervorgerufen, welches für eine effiziente T-Zell-Aktivierung benötigt wird [Gonzalo et al., 2001; Henry et al., 1999]. Das bisher am besten charakterisierte kostimulierende Molekül ist das homodimere B7.1 (CD80)-Molekül exprimiert auf professionellen APCs [Weng & DeLisi, 1998]. Es gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie. Ebenfalls zu dieser Familie gehört das CD28-Molekül auf der T-Zell-Oberfläche, welches der Rezeptor für das B7.1-Molekül ist.

Neben CD80/CD28 spielen bei der T-Zellaktivierung weitere kostimulatorische Moleküle eine wesentliche Rolle, wie beispielsweise Vertreter aus der Immunglobulin-Superfamilie (ICOS/ICOS-Ligand-System) oder Vertreter aus der so genannten TNF(R)-Superfamilie (CD27/CD70, CD30/CD30-Ligand, CD137/CD137-Ligand).

Empfängt eine T-Zelle nur ein kostimulierendes Signal, so findet in der Regel keine Aktivierung statt [McNally & Welsh, 2002]. In Ausnahmefällen kann in Abhängigkeit vom Signal eine limitierte Zellteilung, das Auslösen von Effektorfunktionen oder Apoptose möglich sein, vgl. Abbildung 3. Demgegenüber führt eine Signalgebung nur durch das Antigen zu einer Inaktivierung der T-Zellen in einen so genannten anergischen Zustand oder sie werden apoptotisch [McNally & Welsh, 2002], wodurch eine T-Zell-Toleranz gegenüber diesem Antigen erreicht wird [Chai et al., 1999; Gonzalo et al., 2001].

Erst das Vorliegen zweier Signale (Antigen und Kostimulation) bewirkt eine effektive klonale Expansion immunreaktiver Zellen durch die gleichzeitige Synthese von IL-2 sowie der α -Kette des IL-2-Rezeptors, vgl. Abbildung 3. Der IL-2-Rezeptor besteht aus drei Ketten, einer α -, einer β - und einer γ -Kette. Nicht aktivierte T-Zellen exprimieren nur die β - und die γ -Kette, wodurch der resultierende Rezeptor eine geringe IL-2-Affinität aufweist [Cerdan et al., 1995]. Erst mit der α -Kette, die im aktivierten Zustand exprimiert wird, kann der Rezeptor IL-2 mit einer viel höheren Affinität binden. Das ermöglicht eine Proliferation der T-Zellen mit dem identischen Antigenrezeptor sowie deren Differenzierung zu bewaffneten Effektorzellen [Minami et al., 1993]. Danach führt jedes Zusammentreffen von T-Zellen mit dem entsprechenden Antigen zu einer Effektorfunktion, d. h. eine Kostimulation ist dann nicht mehr erforderlich. Die Effektorfunktion bewirkt eine Lyse der Zielzellen durch Freisetzung von speziellen kalziumabhängigen lytischen Granula. Eines der ausgeschütteten zytotoxischen Proteine ist das Perforinprotein. Durch Einlagerung der Perforin-Moleküle in der Membran der Zielzelle werden Poren gebildet, die zum Einströmen von Wasser und Salze in Richtung des osmotischen Gefälles in die Zielzelle führen. Ein anderes ausgeschüttetes Protein ist Granzym B, das als Serinprotease bei der Auslösung der Apoptose in der Zielzelle mitwirkt [Gudmundsdottir et al., 1999]. Neben Perforinen und Granzymen setzen CTLs im aktivierten Zustand außerdem noch Zytokine frei. Eines hierbei ist IFN- γ [Stout & Bottomly, 1989]. Dieses verursacht eine Vermehrung der peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Moleküle und damit eine Wahrscheinlichkeitserhöhung der Erkennung von Zielzellen durch CTLs. Zudem ist IFN- γ bei der Aktivierung von Makrophagen von Bedeutung.

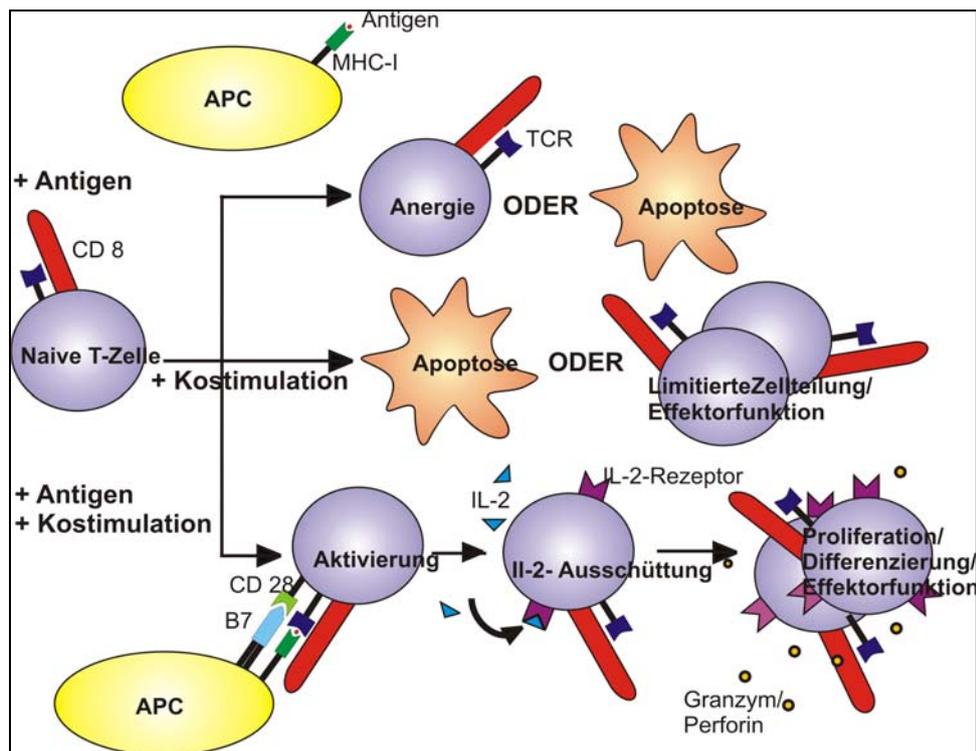


Abbildung 3: T-Zell-Aktivierung in Anlehnung an [McNally & Welsh, 2002]

Eine Stimulation der T-Zelle nur mit dem Antigen führt zur Apoptose oder Anergie. Bei einer Stimulation durch eine alleinige Kostimulation kommt es zur Apoptose oder zu einer limitierten Zellteilung bzw. einer Effektorfunktion. Eine effektive Aktivierung von T-Zellen mit IL-2-Synthese, was zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen mit Aufnahme von Effektorfunktionen führt, ist erst durch eine Stimulation mit einem Antigen und entsprechender Kostimulation möglich.

Wenn T-Zellen aktiviert werden, exprimieren sie das Antigen CD69 auf ihrer Zelloberfläche. Dieses Antigen ist ein Membranprotein, welches zur Familie der C-Typ-Lektinrezeptoren gehört. Es gilt als eines der frühesten Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche dieser Zellen [Koh et al., 1999]. Mit Hilfe von CD69 ist es möglich, die Aktivierung durchflusszytometrisch zu messen. Bei der Aktivierung kommt es innerhalb der ersten 24 Stunden nach Stimulation zu einer verstärkten Expression des TCRs und dem Korezeptor CD8. Danach (bis zu 4 Tagen) folgt eine allmähliche Abnahme dieser Oberflächenmoleküle [Mamalaki et al., 1993]. Im weiteren Verlauf steigt wieder die Anzahl der TCRs und der CD8 positiven Zellen [Huang & Crispe, 1993]. In dieser Phase werden die Gene für IL-2 sowie dessen Rezeptor CD25 induziert und es kommt zur IL-2-abhängigen klonalen Expansion der aktivierten T-Zellen, die bis zu 7 Tage anhalten kann. Das Maximum der Stimulation wird zwischen dem 5. und 6. Tag erreicht. Danach differenzieren sich die aktivierten T-Zellen zu Effektorzellen, wodurch die APCs zerstört werden. Durch den daraus resultierenden Antigenverbrauch bleibt eine weitere Stimulation durch ein Antigen aus und die T-Zellen durchlaufen teilweise den programmierten Zelltod (Apoptose). Ein geringer Anteil der CTLs scheint jedoch der

Apoptose zu entgehen und sich in Gedächtniszellen zu differenzieren [Opfermann et al., 2001].

1.3 Tumorimmunität und Escape Mechanismen

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus sowohl spezifisch als auch unspezifisch insbesondere vor Infektionskrankheiten zu schützen. Hierbei kommt der Unterscheidung zwischen „selbst“ (Selbsttoleranz) und „fremd“ eine besondere Bedeutung zu. Dazu hat das Immunsystem zwei sich ergänzende Strategien entwickelt. Zum einen überprüft es, ob auf der Oberfläche der körpereigenen Zellen eine spezifische Struktur vorhanden ist, die dann zur Inhibition der Immunantwort führt. Fehlt diese Struktur, wird die Zelle als „fremd“ erkannt und eliminiert. Die dabei agierende Effektorzelle ist die natürliche Killerzelle (NK-Zelle) [Kärre, 1985]. Die andere Strategie basiert auf der Erkennung von „fremden“ Antigenen durch antigenspezifische Rezeptoren in Form von Antikörpern oder von T-Zell-Rezeptoren der T-Zellen [Davis & Bjorkman, 1988].

Die Fähigkeit des Immunsystems, körpereigene jedoch entartete Zellen zu zerstören, postulierten MacFarlane Burnet und Lewis Thomas in ihrer Theorie der Immunüberwachung („immune surveillance“) [Burnet, 1991]. Diese Theorie geht davon aus, dass transformierte Zellen genetische Veränderungen aufweisen, die zur Expression von modifizierten Peptiden bzw. Proteinen führen und somit vom Immunsystem als „fremd“ erkannt und zerstört werden. Trotz dieser Eigenschaft scheint das Immunsystem häufig zu versagen. Eine erhöhte Tumorzinzidenz kann auf ein gestörtes Immunsystem, wie z. B. durch eine medikamentös verursachte Immunsuppression, Bestrahlung oder das Immunsystem beeinträchtigende Krankheiten (Virusinfektionen, genetische Defekte), zurückgeführt werden. Die drastisch erhöhte Inzidenz von Tumorerkrankungen, insbesondere von malignen Lymphomen bei HIV-positiven Patienten bzw. iatrogen immunsupprimierter Patienten steht im Einklang mit dieser These.

Allerdings können auch Tumore ohne ersichtliche Ursache entstehen, beispielsweise durch das progressive Wachstum einer einzigen transformierten Zelle, die sich der Kontrolle des Immunsystems durch Unterwanderung der Immunantwort entzieht [Brostoff et al., 1993]. Ein solches Versagen der immunologischen Effektorzellen bei der Unterdrückung des Tumorwachstums ist möglich, wenn die entartete Zelle nur schwach immunogen wirkt. Dieses so genannte „Escape-Phänomen“ kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden:

1. Defekt in der Antigenpräsentation durch Fehlen bzw. einer verringerten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, Defekt der TAP-Proteine, Fehlen von tumorspezifischen Antigenen oder Fehlen von kostimulierenden Molekülen [Rivoltini et al., 2002]
2. Defekt im T-Zell-Repertoire (Fehlen von T-Zellen, die spezifisch gegen Tumorantigene reagieren) [Bodmer et al., 1993]
3. Ungleichgewicht zwischen Tumorwachstum und -zerstörung zugunsten der Tumorzunahme bzw. ein zu rasches Tumorwachstum, so dass der Tumor erst bei einer nicht mehr supprimierbaren Größe vom Immunsystem erkannt wird („sneaking through“) [Brostoff et al., 1993]
4. Aktive Suppression der Immunreaktion durch die Tumorzellen, z. B. durch Sekretion von TGF- β , IL-10, Antikörper- oder Antigenbildung [Heiss et al., 2001]

1.4 Aktuelle immunologische Strategien in der Tumorthherapie

Seit den Anfängen der immunologischen Tumorthherapie sind über 100 Jahre vergangen und die Tumorummunologie hat bemerkenswerte Fortschritte gemacht. Das Ziel der immunologischen Tumorthherapie ist es, Immundefizite in der Antigenpräsentation und in der T-Zell-Funktion zu reparieren, immunsuppressive Faktoren des Tumors zu umgehen und die Immuntherapie im Hinblick auf die klinische Applikation und der Immunantwort zu optimieren, damit krankhaft veränderte Zellen (Tumorzellen) spezifisch zerstört werden können. Zahlreiche Strategien in der experimentellen Immuntherapie wurden in den vergangenen Jahren verfolgt. Vereinfacht kann man zwischen der Zytokinbehandlung und der aktiven sowie passiven Immuntherapie unterscheiden.

1.4.1 Zytokintherapie

Zu den Zytokinen zählt eine Vielzahl von verschiedenen Substanzen, die von vielen Zellarten produziert werden. Biochemisch handelt es sich um Glykoproteine. Sie nehmen als interzelluläre Mediatoren eine wichtige Rolle in der Aktivierung, Wachstum und Differenzierung von Zellen sowie in der Regulation des Ausmasses und der Art einer Immunantwort ein [Abbas et al., 1996]. Diese Funktion nutzt man in der Therapie diverser Tumorerkrankungen aus. Die Gentechnik ermöglicht dabei inzwischen die Herstellung einer ausreichenden Menge von rekombinanten Zytokinen.

Ein sehr häufig verwendetes und bedeutendes Zytokin ist das Interleukin-2 (IL-2). IL-2 wird von aktivierten T-Zellen produziert und fungiert als der wichtigste autokrine Wachstumsfaktor für T-Zellen, wodurch das Ausmass der T-Zell-abhängigen Immunantwort bestimmt wird. Die Anti-Tumorwirkung beruht auf der Stimulation von

NK-Zellen und von CTLs [Dilloo et al., 1994]. Durch Wachstum und durch die Aufnahme von Effektorfunktionen kommt es zur Zytolyse von Tumorzellen. Dabei kann IL-2 allein oder verbunden mit einem adoptiven Zelltransfer in der Behandlung von Tumoren verabreicht werden. Von Nachteil sind die toxischen Nebenwirkungen, da sehr hohe IL-2-Mengen notwendig sind [Abbas et al., 1996].

Ein weiteres Zytokin ist der Tumornekrosefaktor (TNF). Der TNF spielt insbesondere bei der unspezifischen Abwehr gegen gramnegative Bakterien eine Rolle. Hauptsächlich Makrophagen und T-Lymphozyten reagieren auf die Lipopolysaccharide (Endotoxine) in der Zellwand der Bakterien und setzen daraufhin TNF frei. Desweiteren ist eine TNF-Produktion durch die T-Zellen möglich, so dass TNF auch als Mediator der spezifischen Immunität agieren kann. TNF bewirkt eine Entzündungsreaktion, die je nach Dosis lokal oder systemisch bis hin zum septischen Schock verlaufen kann [Abbas et al., 1996]. Die TNF-bedingte Anti-Tumor-Wirkung erkannte William Coley bereits im 19. Jahrhundert (siehe 1.1. Geschichte der Tumorimmunologie). Er nutzte sie unbewusst in seiner Tumorbehandlung. Aufgrund der zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen und der hochtoxischen Wirkung bei Einsatz der erforderlichen TNF-Menge wird diese Art der Tumorthherapie praktisch nicht mehr eingesetzt [Kienle & Kiene, 2003].

Die Interferone (IFN) sind eine weitere Gruppe von Zytokinen. Sie kann man in Typ-I- und Typ-II-IFN einteilen, wobei sich die Typ-I-IFN in zwei serologische Gruppen differenzieren lassen [Abbas et al., 1996]: Das IFN- α besteht aus ca. 20 verschiedenen, strukturell ähnlichen Polypeptiden und wird vor allem von Makrophagen produziert. Das IFN- β ist ein einziges Genprodukt und wird bevorzugt von Fibroblasten produziert. Die IFN-Typ-I werden während einer Immunantwort gegen Antigene, insbesondere bei einer viralen Infektion, produziert. Dabei wirken antigenaktivierte T-Zellen auf die mononukleären Phagozyten, die dann IFN synthetisieren. IFN hemmt die Virusreplikation, indem ein antiviraler Zustand induziert wird (d. h. eine auf IFN reagierende Zelle ist gegen eine Virusinfektion resistent); es hemmt die Zellproliferation, es erhöht die Lysefähigkeit der NK-Zellen sowie der CTLs durch eine erhöhte MHC-Expression, insbesondere von MHC-Molekülen der Klasse-I. Klinische Anwendung in der Tumorthherapie finden diese Interferone beispielsweise bereits bei der Behandlung von Lymphomen [Abbas et al., 1996].

Typ-II-IFN heißt auch IFN- γ und ist ein homodimeres Glykoprotein. Die IFN- γ -Produzenten sind aktivierte NK- und T-Zellen. IL-2, welches ebenfalls bei Aktivierung ausgeschüttet wird, bewirkt eine erhöhte IFN-Ausschüttung. IFN- γ zeigt ähnliche Eigenschaften wie IFN des Typ-I; es induziert einen antiviralen Zustand, wirkt

antiproliferativ und erhöht die Antigenpräsentation durch vermehrte MHC-Expression, allerdings im Gegensatz zum Typ I sowohl der Klasse-I- als auch der Klasse-II-MHC-Moleküle [Abbas et al., 1996]. Daher ist eine zelluläre und humorale Immunantwort verstärkt auslösbar. Außerdem ist IFN- γ ein starker Aktivator für eine Vielzahl von Zellen (mononukleäre Phagozyten, neutrophile Lymphozyten und vaskuläre Endothelzellen). Durch direkte Wirkung auf T- und B-Zellen wird ihre Differenzierung induziert. Insbesondere die verbesserte Antigenpräsentation und damit verbunden das erhöhte Potential der zytotoxischen T-Zelllyse, aber auch die durch Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen ausgelöste verstärkte zytotoxische Aktivität kann zu einer Anti-Tumor-Antwort führen.

Eine weitere wichtige Gruppe von Zytokinen sind die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Dazu gehören der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) und der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF). Beide dienen der Expansion und der Differenzierung von Knochenmarkvorläuferzellen und sind in der Lage, die Tumorimmunität zu steigern [Ragnhammar, 1996; Burdach, 1991]. Zusätzlich werden sie auch bei der Knochenmarktransplantation zur Reifung von Vorläuferzellen und bei einer Chemotherapie verwendet, da sie die neutropenische Phase verkürzen [Abbas et al., 1996; Dranoff, 2002].

1.4.2 Aktive Immuntherapie

Unter einer aktiven Immuntherapie versteht man das aktive Auseinandersetzen des Immunsystems des Patienten gegen seinen eigenen Tumor, was durch Anregung unspezifischer oder spezifischer Immunreaktionen geschieht.

Eine unspezifische Immunstimulation kann man durch den Einsatz von Bakterien oder Bakterienextrakten, wie sie z. B. bei Frühstadien von Harnblasenkarzinomen erfolgreich eingesetzt werden, erzielen. Dabei wird *Mycobacterium bacillus Calmette Guerin* (BCG) in den Tumor oder in unmittelbarer Nähe injiziert, wodurch eine lokale Entzündungsreaktion mit Makrophagenaktivierung induziert wird, die die Tumorzellen abtötet [Abbas et al., 1996].

Die einfachste Variante einer spezifischen Stimulation des Immunsystems ist die Immunisierung mit toten oder attenuierten Tumorzellen [Turk et al., 2002]. Um die Spezifität der Immunantwort zu steigern, kann man auch tumorspezifische Peptide, die entweder an APCs gebunden oder ungebunden sind, injizieren. Nachteilig sind hierbei insbesondere eine nur ineffizient erreichbare Immunogenität und die eingeschränkte

Anwendbarkeit, da diese Art der Immunisierung von dem MHC-Haplotyp abhängig ist, an dem das tumorspezifische Peptid gebunden wird.

Um die Tumorummunogenität zu verstärken kann man den Tumorzellen Adjuvantien aus Bakterien, wie beispielsweise *Corynebacterium parvum*, BCG oder Haptene, wie z. B. DNP, beifügen [Brostoff et al., 1993]. Allerdings sind dahingehende Bestrebungen weitgehend erfolglos geblieben.

Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Hitzeschockproteinen. Diese werden aus Tumorzellen isoliert und fungieren als Chaperone, d. h. als Transportmoleküle für Antigenpeptide [Przepiorka & Srivastava, 1998]. Die APCs besitzen auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren, die spezifische Hitzeschockproteine mit dem Peptid aufnehmen. Somit gelangt das Peptid über Antigenprozessierung an die Oberfläche der APCs und kann eine Tumorummunogenität vermitteln.

Ein in der letzten Zeit an Bedeutung gewinnender Ansatz bedient sich gentherapeutischer Möglichkeiten. Unter Verwendung geeigneter Vektoren werden mittels Transfektion oder Transduktion (z. B. mittels Retroviren oder Adenoviren) bestimmte Gene in Zellen eingeschleust. Zum einen kann dadurch die Immunogenität gegenüber den Tumorzellen erhöht werden, indem Gene von kostimulierenden Molekülen (z. B. das B7-Molekül) oder Zytokinen (z. B. GM-CSF oder IL-2) in das Genom von Tumorzellen integriert werden. So kann der Gentransfer des B7-Moleküls tumorspezifische T-Zellen aktivieren [Li et al., 1996]; die Einbringung des GM-CSF-Gens induziert das Wachstum und die Differenzierung myelomonozytärer Zellen (insbesondere von dendritischen Zellen), die als potente APCs fungieren [Ragnhammar, 1996; Bendandi et al., 1999], und die Einbringung des IL-2-Gens ruft eine gesteigerte Proliferation und Differenzierung der tumorspezifischen T-Zellen und NK-Zellen hervor [Staege et al., 2004]. Andererseits sind so genannte „Suizid-Gene“ oder Tumorsuppressorgene (z. B. p53) in Tumorzellen etablierbar. Dabei hat das „Suizid-Gen“ eine Prodrug-Funktion, d. h. erst durch Zugabe einer zweiten Substanz wird die Tumorerstörung ausgelöst. Beispielsweise kann man die Herpes simplex Virus Typ-I-Thymidinkinase in das Tumorzellgenom integrieren und exprimieren [Heiss et al., 2001; Staege et al., 2003]. Eine Applikation des spezifischen Nucleosid-Analogons Ganzyklovir bewirkt eine Tumorregression.

Wie wirksam und wie sicher die voran beschriebenen Methoden sind, wird derzeit noch in Studien getestet. Eine Immunität gegen Tumorzellen zu erzeugen, ist scheinbar nicht das Problem. Fraglich ist nur, ob eine ausreichende Immunantwort gegen den Tumor induziert werden kann, so dass es zu einer kompletten und lang anhaltenden Regression kommt [Turk et al., 2002]. Kritisch dabei ist die Präsenz der potentesten Antigene nicht

nur auf der Oberfläche der Tumorzellen, sondern auch auf nicht entarteten Zellen. So ist eine verstärkte Tumorimmunität häufig mit einem erhöhten Risiko der Auslösung einer Autoimmunreaktion verbunden, die sich auch gegen gesundes Gewebe richtet [Rosenberg, 1999].

1.4.3 Passive Immuntherapie

Bei der passiven bzw. adoptiven Immuntherapie erfolgt die Tumorerstörung durch eine spezifische Immunzell- (zellulär) oder Antikörpergabe (humoral). Letztere ist mit monoklonalen und bispezifischen Antikörpern (AK) durchführbar.

Die monoklonale AK-therapie gehört zu einem der ersten klinischen Versuche zur immunologischen Tumorbehandlung. Dabei werden AK gegen tumorspezifische Antigene eingesetzt [Houghton & Scheinberg, 2000; Weiner, 1999]. Diese binden an die Tumorzelle und lösen so eine Komplement-vermittelte Lyse (CDC) oder eine AK-abhängige Zytolyse (ADCC) aus. Jedoch bleibt häufig die Vernichtung der Tumorzellen aus [Gemsa et al., 1997].

Für eine effizientere Tumorlyse werden diverse zytotoxische Substanzen, wie beispielsweise Radionuklide, Zytostatika, bakterielle und pflanzliche Toxine (so genannte Immuntoxine), an tumorspezifische AK gekoppelt eingesetzt [Kreitman, 1999; Cragg et al., 1999]. Als Radionuklide kommen β -Strahler mit geringer Reichweite zum Einsatz. Neuere Versuche bevorzugen aufgrund der noch geringeren Reichweite und verstärkten Energieemittierung α -Strahler. Durch Verwendung von Chemotherapeutika an AK gekoppelt reichert sich das Medikament im Tumorgewebe an und entfaltet dort seine Wirkung. Beide Strategien haben zwei wesentliche Vorzüge [Heiss et al., 2001]: Zum einen ist eine Internalisierung nicht nötig und zum anderen werden auch benachbarte Tumorzellen abgetötet, auch wenn sie antigennegativ und damit schwierig immuntherapeutisch behandelbar sind. Ein sehr häufig verwendetes Immuntoxin ist Ricin, ein Phytotoxin des *Ricinus communis* [Lugnier et al., 1980]. Nach AK-Bindung an der Tumoroberfläche gelangt das Konstrukt in die Tumorzelle, lagert sich an Ribosomen an, hemmt die Proteinbiosynthese und zerstört dadurch die Tumorzelle. Trotz der viel versprechenden Ansätze blieben bisher klinische Erfolge sehr begrenzt. Insbesondere die ausgeprägte genetische Instabilität bzw. die Tumorheterogenität, die Produktion von neutralisierenden AK (die meisten AK entstammen Mäusen und induzieren daher nach Applikation in Patienten die Bildung von anti-Maus-AK) und der erschwerte Zugang zu intratumoral gelegenen Tumorzellen sind als problematisch anzusehen [Fleuren et al., 1995].

Eine andere Möglichkeit der AK-Therapie ist die Verwendung bispezifischer AK. Diese bestehen aus zwei Antigen-Bindungsregionen mit unterschiedlichen Spezifitäten, die man je nach Herstellung in Heterokonjugate und in Hybrid-AK unterteilen kann [Renner & Pfreundschuh, 1995]. Heterokonjugate werden durch die chemische Verbindung zweier verschiedener AK mit zwei verschiedenen Spezifitäten erzeugt. Hybrid-AK entstehen durch somatische Fusion. Die bispezifischen AK können mit der einen Antigen-Bindungsstelle an die Tumorzelle und mit der anderen an einer immunologischen Effektorzelle binden. Auf diese Weise können z. B. T-Zellen (mit anti CD3, anti CD28) oder NK-Zellen (mit anti CD16) aktiviert und eine Tumorlyse erreicht werden [Brostoff et al., 1993; Ockert et al., 1999]. Durch die zunehmende Verwendung humanisierter Antikörper verringert sich das Risiko einer Sensibilisierung gegen z. B. Mausantigene. Der Einsatz von bispezifischen AK mit den vielfältigen Möglichkeiten zur Tumorlyse eröffnet ein neues Gebiet der experimentellen Tumorbehandlung. *In vitro* Versuche und Tierversuche konnten eine deutliche Tumorlyse zeigen [Renner & Pfreundschuh, 1995]. Dennoch gibt es einige Schwierigkeiten zu überwinden. Die AK-Produktion muss in Quantität und Qualität ausreichend sein. Ausserdem ist die *in vivo* Instabilität und die Größe der AK, die eine Penetration in das Tumorgewebe erschwert, sehr schwierig. Ein therapeutischer Nutzen kann aufgrund der sehr wenigen Studienergebnisse noch nicht eingeschätzt werden. Ungeachtet der skizzierten Probleme finden inzwischen AK bei der Behandlung ausgewählter Tumorentitäten, teilweise mit ausgesprochen positiven Resultaten, umfangreiche Anwendung. Neben den bereits oben erwähnten AK gegen CD20 (Rituximab) und HER-2/neu (Trastuzumab) sind hier z. B. AK mit Spezifität für CD33 (Gemtuzumab), EGFR (Cetuximab) oder VEGF (Bevacizumab) zu nennen.

Bei der zellulären Immuntherapie werden autologe oder allogene Lymphozyten *in vitro* gegen Tumorzellen stimuliert und expandiert, die dann wiederum dem Patienten reinfundiert werden (adoptiver Transfer), um eine Tumorlyse auszulösen. Dies kann z. B. durch IL-2 Applikation erreicht werden. Dazu werden PBMCs eines Patienten isoliert und 3 bis 5 Tage mit hohen Dosen IL-2 *in vitro* kultiviert [Brostoff et al., 1993]. Die daraus resultierenden so genannten Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen) werden bei gleichzeitiger systemischer Gabe von IL-2 dem Patienten zurück infundiert und bewirken eine erhöhte, gegen den Tumor gerichtete Zytotoxizität. Für diesen Effekt sind vor allem NK-Zellen verantwortlich. Sie unterliegen nicht der MHC-Restriktion und sind dadurch in der Lage, Tumorzellen ohne vorhergehende Sensibilisierung zu lysieren. *In vivo* Ergebnisse waren im Gegensatz zu den *in vitro* Ergebnissen eher enttäuschend. In klinischen Versuchen konnte bewiesen werden, dass aktivierte NK-Zellen im Vergleich

zu den nicht aktivierten Zellen Tumore infiltrieren, aber nur eingeschränkt zirkulieren können. Der entscheidende Punkt dabei scheint demnach die Anzahl der LAK-Zellen zu sein, die den Tumor erreicht. Möglicherweise ist die *in vivo* Wirkung auch von Vermittlung durch T-Zellen abhängig. Hinzu kommt, dass die systemische Gabe von IL-2 zu ernsthaften Nebenwirkungen führen kann [Fleuren et al., 1995].

Tumordinfiltrierende Lymphozyten (so genannte TILs) weisen eine stärkere Zytotoxizität als LAK-Zellen auf. Sie können *ex vivo* durch IL-2-Gabe aus Lymphozyten im Tumorgewebe generiert werden, welche dann wiederum dem Tumorpatienten reinfundiert werden. Experimente belegen, dass so der Tumor zerstört werden kann und immunologische Gedächtniszellen gegen diese Tumorzellen angelegt werden [Fleuren et al., 1995]. Der Einsatz von tumordinfiltrierenden Zellen ist jedoch limitiert, denn die Gewinnung einer ausreichend großen Zellzahl ist durch die lange Antwortdauer sehr schwierig. Außerdem bedingen die benötigten IL-2-Dosen, die das Überleben dieser Zellen ermöglicht, eine erhöhte Toxizität [Heiss et al., 2001].

Ein weiteres Konzept basiert auf der Generierung antigenspezifischer T-Zellen. T-Zellen spielen in der Tumorabwehr eine entscheidende Rolle [Turk et al., 2002]. Durch Erkennen ihres spezifischen Antigens entwickeln sie sich zu Effektorzellen, die antigentragende Zellen (z. B. Tumorzellen) lysieren bzw. Zytokine freisetzen können. In klinischen Experimenten und Forschungsarbeiten zeigte sich, dass T-Zellen auch zur getriggerten anti-Tumor-Antwort nach *in vitro* Generierung von tumorreaktiven T-Zellen fähig sind. Somit eröffnete sich das Konzept, dass eine Veränderung der T-Zell-Antwort durch Stimulierung gegen Tumorantigene ein fortschreitendes Tumorwachstum limitieren und sogar eine Tumorerstörung vermitteln kann [Burdach et al., 2000].

Neben der Generierung tumorreaktiver T-Zellen aus dem T-Zell-Repertoire des Patienten werden aktuell Strategien auf der Basis allogener T-Zellen intensiv verfolgt. Hierbei spielen insbesondere zwei Argumente eine entscheidende Rolle: Zum einen ist das T-Zell-Repertoire des Patienten oft (bedingt durch die unterschiedlich lange Koexistenz mit dem Tumor) nur eingeschränkt in der Lage gegen den autologen Tumor zu reagieren. Zweitens erhofft man sich bei Einsatz allogener Zellen die Nutzung eines so genannten Graft-versus-Tumor (GvT) -Effektes [Maris & Storb, 2005].

Der GvT-Effekt basiert auf den Beobachtungen in der Stammzelltransplantation (SCT). Grundsätzlich ist eine SCT mit autologen und mit allogenen Zellen möglich. Autologe Stammzellen werden vom Patienten selbst, allogene Zellen einem HLA-identischen oder kompatiblen verwandten oder nicht verwandten Spender entnommen. In klinischen Studien an Leukämiepatienten zeigte sich, dass es bei einer autologen SCT zu keiner nennenswerten Morbidität und Letalität gekommen war. Jedoch traten wesentlich mehr

Rezidive auf. Im Gegensatz dazu sank bei der allogenen SCT das Leukämierезидивrisiko erheblich [Talmadge, 2003; Burdach, 1996; Grigg & Ritchie, 2004]. Für diese Tumorremission werden potente Donor-T-Zellen verantwortlich gemacht und wird auch als Graft-versus-Leukemia (GvL) -Effekt bezeichnet. Der genaue Mechanismus bzw. die Zielantigene dieses Phänomens sind bislang noch nicht geklärt.

Neben diesen erwünschten GvL-Effekt steigt das Risiko der Behandlungsmorbidität und -letalität durch die Zerstörung von nicht entarteten Zellen durch die Spenderlymphozyten im Rahmen der so genannten Graft-versus-Host-Disease (GvHD) bei einer allogenen SCT [Stauss, 1999]. Ausschlaggebend dafür ist, dass die Spenderlymphozyten nicht nur das (gewünschte) Tumorantigen, sondern auch andere Determinanten erkennen können, wie z. B. ein „fremdes“ HLA-Molekül. Das GvH-Risiko steigt mit zunehmender Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger, während bei einer syngenen (Spender und Empfänger sind eineiige Zwillinge) oder autologen Transplantation zwar einerseits ein geringes GvH-Risiko besteht, aber andererseits die Häufigkeit eines Rezidivs drastisch zunimmt.

Ähnliches trifft auch für den allogenen bzw. autologen T-Zell-Transfer zu. Nur durch Verwendung von allogenen Zellen als Effektorzellen kann eine ausreichend hohe Anzahl von tumorreaktiven T-Zellen hergestellt werden, was eine vollständige Tumorzerstörung ermöglicht [Melief & Kast, 1995]. Daneben zeigen häufig T-Zellen von Tumorpatienten aufgrund einer T-Zell-Toleranz gegenüber den Tumorantigenen eine eingeschränkte immunologische Reaktionsfähigkeit. Untersuchungen konnten belegen, dass allogene T-Zellen eine Immunantwort gegen Tumorzellen als Resultat einer GvT-Reaktion auslösen können. Problematisch bei der Verwendung von allogenen T-Zellen ist, dass die Spender-Lymphozyten auch nicht entartete Zellen im Sinne einer GvH-Reaktion als Resultat der Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen angreifen und zerstören. Die GvH-Reaktion ist dabei umso stärker ausgeprägt, je geringer die genetische Übereinstimmung bzw. je geringer die HLA-Kompatibilität zwischen Stimulator- und Effektorzellen ist, vgl. Abbildung 4.

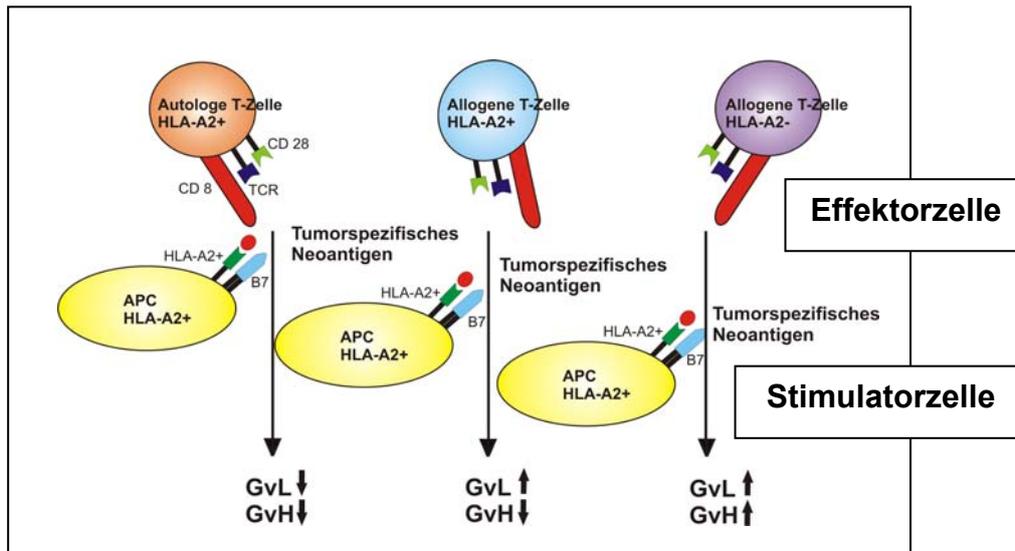


Abbildung 4: Stimulation verschiedener T-Zellen mit einem tumorspezifischen Antigen

Die autologe T-Zelle zeigt eine Toleranz sowohl gegenüber dem Peptid bzw. Antigen als auch dem HLA-A2-Molekül und infolgedessen nur einen geringen GvL- und GvH-Effekt. Die allogene HLA-A2 positive T-Zelle erkennt das Neoantigen (GvL-Effekt) und weist dem HLA-A2-Molekül gegenüber eine Toleranz auf. Die allogene HLA-A2 negative T-Zelle sieht das HLA-A2-Molekül und das Peptid als fremd an, wodurch eine hohe peptidspezifische Aktivierung (GvL-Effekt) bei gleichzeitig hoher Alloreaktivität (GvH-Effekt) erzeugt wird.

Wie oben aufgeführt stellen gewebespezifische Antigene (z. B. CD20) potentielle Zielstrukturen für eine Immuntherapie dar. So könnten beispielsweise T-Zellen mit Spezifität für Antigene, welche nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, im Zuge der Behandlung einer Leukämie die Resthämatopoese (die dann natürlich durch eine allogene Transplantation ersetzt werden muss) des Patienten inklusive aller Tumorzellen eliminieren. Bei erfolgreich allogenen transplantierten Patienten gelang bereits der Nachweis derartiger Zellen [Matsushita et al., 2006]. Bei der Generierung von tumorreaktiven T-Zellen mit Spezifität für gewebespezifische Antigene muss man bedenken, dass solche Antigene auf allen Zellen einer bestimmten „Sorte“ vorkommen, d. h. sowohl bei nicht entarteten Zellen als auch bei entarteten Zellen. Daher ist das autologe, aber auch das allogene HLA-kompatible T-Zell-Repertoire in der Regel nicht in der Lage, diese antigenträgenden Zellen zu erkennen. Sie sind tolerant gegenüber diesen Antigenen und daher unfähig, eine Immunantwort zu induzieren (geringer GvT-Effekt). Nur für allogene T-Zellen, die nicht mit dem HLA-Typ der Stimulatorzellen übereinstimmen, ist das gewebespezifische Antigen „fremd“ und kann somit erkannt werden (hoher GvT-Effekt), vgl. Abbildung 5. Experimente zeigten, dass es möglich ist, mit allogenen, nicht HLA-übereinstimmenden T-Zellen allo-MHC-restringierte CTLs mit Peptidspezifität zu erzeugen [Stauss, 1999].

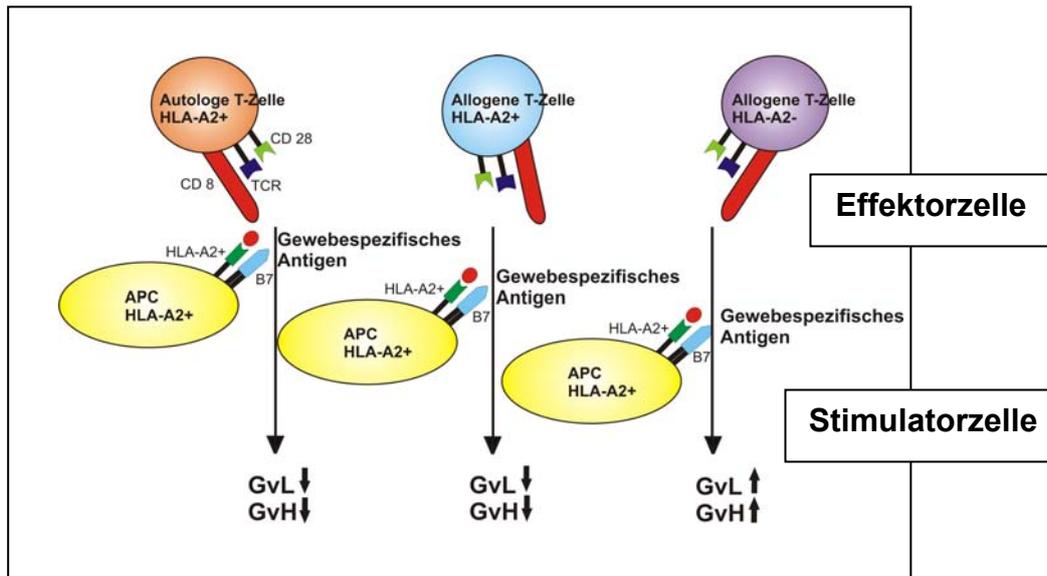


Abbildung 5: Stimulation verschiedener T-Zellen mit einem gewebespezifischen Antigen

Sowohl die autologe als auch die allogene HLA-übereinstimmende (HLA-A2 positive) T-Zelle zeigt aufgrund der Antigentoleranz einen geringen GvL- und GvH-Effekt. Die allogene HLA-A2 negative T-Zelle erkennt das HLA-A2 positive Molekül und das Peptid bzw. Antigen als fremd an (hoher GvL- und GvH-Effekt).

Eine Transplantation von tumorreaktiven T-Zellen, die eine intakte anti-Tumor-Antwort ohne GvH-Reaktivität aufweisen, könnte eine effektive Strategie in der Tumorthherapie sein. Eine Selektion von antigenspezifischen T-Zellen und eine Eliminierung der alloreaktiven T-Zellen einschließlich der NK-Zellen ist durch verschiedene Depletionsverfahren möglich [André-Schmutz et al., 2002; Hartwig, 2002]. Zahlreiche Versuche konnten den Vorzug einer solchen Depletion belegen. Dabei ist es allerdings schwierig, eine ausreichende Selektion von antigen- bzw. peptidspezifischen T-Zellen bei einem für eine effiziente Tumorbehandlung ausreichenden GvT-Effekt zu erreichen [Hummel et al., 2002; Koh et al., 1999].

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Möglichkeiten zur Generierung allogener peptidspezifischer T-Zellen, die als immunologische Effektorzellen potentiell in der Tumorthherapie im Sinne einer subtraktiven *in vitro* Immunisierung eingesetzt werden können, zu untersuchen. Als Stimulatorzellen fungierten hierbei HLA-A2 positive T2-Zellen. Durch externe Zugabe von Peptiden sind sie zu einer Antigenpräsentation fähig. Dabei ist das Mass der Antigenpräsentation von dem Bindungsvermögen der Peptide zu dem HLA-A2-Molekül abhängig. Für die Experimente wurden verschiedene tumorspezifische und gewebespezifische Peptide eingesetzt. Als Effektorzellen wurden allogene T-Zellen verwendet, die *in vitro* mit den verschiedenen peptidgepulsten T2-Zellen aktiviert wurden. Da die Frequenz von alloreaktiven T-Zellen im Vergleich zur Frequenz peptidspezifischer T-Zellen überaus gross ist, wurden Methoden zur Etablierung peptidspezifischer T-Zellen durch Depletion untersucht.

Folgende Aspekte wurden in dieser Arbeit bearbeitet:

1. Anhand von 7 verschiedenen Peptiden, welche man in tumorspezifische und gewebespezifische Peptide unterteilen kann, sollte gezeigt werden, inwieweit diese synthetisch hergestellten Peptide zur Bindung an HLA-A2 positiven T2-Zellen fähig sind. Das Bindungsvermögen wurde durchflusszytometrisch (HLA-A2-Floureszenz) gemessen. Die Ergebnisse wurden mit 2 verschiedenen Algorithmen (SYFPEITHI- und Bimas-Score) verglichen.
2. Allogene T-Zellen wurden mit verschiedenen peptidgepulsten T2-Zellen stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei sollten mögliche peptidspezifische Unterschiede eruiert werden und eine Kinetik zur Optimierung des Zeitpunktes für weitere durchflusszytometrischen Messungen bzw. für eine Depletion dargestellt werden. Desweiteren wurde der Einfluss der HLA-Zugehörigkeit der allogenen T-Zellen für die Aktivierbarkeit der T-Zellen untersucht.
3. Die verschieden stimulierten allogenen T-Zellen wurden depletiert. Anhand von zwei Depletionsmöglichkeiten (IFN- γ -Depletion und Depletion unter Nutzung des AICDs) sollte der Depletionseffekt untersucht werden. Dabei wurde geprüft, ob Depletionsunterschiede hinsichtlich der HLA-Kompatibilität bzw. HLA-Inkompatibilität zwischen T- und T2-Zellen existieren und ob peptidspezifische T-Zellen selektiert werden können. Ferner wurde in einem Versuch die Bedeutung von verschiedenen durchflusszytometrisch-messbaren

Aktivierungsmarkern bzw. die Bedeutung von Primär- und Sekundärstimulation bei der Depletion unter Nutzung des AICDs verifiziert.

4. Zur Überprüfung der peptidspezifischen Aktivierung der durch AICD-Depletion selektierten T-Zellen und damit verbunden zum Nachweis des Depletionseffektes wurden diese auf die Fähigkeit zur peptidinduzierten Freisetzung von Granzym B als Surrogatmarker für Zytotoxizität untersucht. Peptidspezifische Unterschiede wurden geprüft.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Medium und Puffer

Als Zellkulturmedium wurde Iscove's modified Dulbecco's Medium (IMDM) von der Firma Bio Whittaker (Heidelberg) verwendet. Das Medium wurde bei 4°C aufbewahrt.

Vor der Verwendung wurden folgende Komponenten zugesetzt:

- 5% reines humanes AB-Serum (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- 100 U/ml Penicillin (Gibco-BRL, Eggenstein)
- 100 mg/l Streptomycin (Gibco-BRL, Eggenstein).

Als Waschpuffer wurde Dulbecco's Phosphatpuffer (DPBS) ohne Kalzium und Magnesium von der Firma Bio Whittaker (Heidelberg) benutzt.

3.1.2 Zellen

Periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) wurden aus dem Buffy Coat freiwilliger Spender nach erfolgter Einwilligung mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation gewonnen. Die hierzu benötigten Buffy-Coats wurden von der Blutbank der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bereitgestellt.

Desweiteren wurden T2-Zellen verwendet. Diese humane HLA-A2 positive, TAP-defiziente Tumorzelllinie [Salcedo et al., 1994] war eine freundliche Gabe von Dr. rer. nat. Günter Richter aus dem Forschungslabor der Kinderklinik der Universität Halle-Wittenberg.

3.1.3 Peptide

Alle verwendeten Peptide wurden im Institut für Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg dankenswerterweise durch Prof. Dr. rer. nat. Klaus Neubert hergestellt. Dabei wurden die Peptide in je einem Zehntel des Endvolumens in DMSO gelöst und mit autoklaviertem DEPC-Wasser auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl eingestellt. Danach wurde die Lösung durch einen Filter mit der Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert und bei -80°C aufbewahrt. In Tabelle 1 sind die Antigene und die Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Peptide

Peptide	Antigen	Sequenz
Peptid 1	PAX3/FKHR	SPQNSIRHNL
Peptid 2	CD79B	LLLLSAEPV
Peptid 3	CD79B	ATYEDIVTL
Peptid 4	EWS/FLI-1	SYGQQSSLL
Peptid 5	EWS/FLI-1	SSYGQQNPSY
Peptid 6	EWS/FLI-1	QQNPSYDSV
Peptid 7	CD72	CLGVRYLQV

Peptid 1 entspricht der Fusionsregion des PAX3/FKHR-Neoantigens des alveolären Rhabdomyosarkoms. Peptide 4 bis 6 haben eine Aminosäuresequenz, die zu der Fusionsregion des EWS/FLI-1-Neoantigens von Tumoren der Ewing-Tumor-Familie homolog ist. Peptid 2, 3 und 7 sind B-zellspezifische Antigene.

3.1.4 Antikörper

Alle Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2 mit Angabe ihrer Spezifität, des Klones und ihres Fluorochroms aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Spezifität	Klon	Spezies	Isotyp	Flouorchrom	Hersteller
Isotyp-kontrolle	G46-2.6	Maus	IgG1	FITC	PharMingen International
Isotyp-kontrolle	G46-2.6	Maus	IgG1	PE	PharMingen International
CD8	HIT8a	Maus	IgG1,kappa	FITC	Sigma
CD69	L78	Maus	IgG1	PE	Becton Dickinson
CD25	2A3	Maus	IgG1	PE	Becton Dickinson
HLA-DR	L243	Maus	IgG2a	FITC	Becton Dickinson
HLA-A2	#0791HA	Maus	IgG	unmarkiert	One Lambda Inc.

FITC-gekoppelte polyklonale Ziege-anti-Maus-AK wurden ebenfalls von Becton-Dickinson bezogen.

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Einwegmaterialien verwendet:

- Mikrotiterplatten (12-, 24- und 96-well-Rundbodenplatten) TPP AG, Trasadingen, Schweiz
- Zellkulturflaschen (50 und 250 ml) TPP AG, Trasadingen, Schweiz
- Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) Greiner bio-one, Frickenhausen
- Sterile Einmal-Pipettenspitzen (100 und 1000 µl) Eppendorf AG, Hamburg
- Dispenser Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) TPP AG, Trasadingen, Schweiz
- FACS Röhrchen Becton Dickinson, Heidelberg
- Kryoröhrchen Nalgene, Rochester, USA

3.1.6 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

- FACScan Becton Dickinson, Heidelberg
- Neubauer Zählkammer Braun, Melsungen
- Megafuge 1.0 Heraeus, Osterode
- Mikroskop Axiovert 25 Zeiss, Göttingen
- Sterile Werkbank Hera Safe Heraeus, Osterode
- Kühlschrank Liebherr Premium, Deutschland
- Gefriertruhe -80°C Heraeus, Osterode
- Brutschrank BBD 6220 Heraeus, Osterode
- Vortex Genie 2 Roth, Karlsruhe
- Accu jet Brand GmbH & CoKG, Berthelm

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Zellkultur, Zellzahlbestimmung und Kryokonservierung

Alle Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit Kulturmedium bei einem Kohlendioxidgehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95% im Brutschrank bei 37°C kultiviert. T2-Zellen wurden hierbei aller 3 Tage subpassagiert, wobei gleichzeitig eine Versorgung mit frischem Medium erfolgte. Bei länger dauernden Versuchen in Mikrotiterplatten wurden die Zellen bei Bedarf durch Resuspension mit der Mikrotiterpipette aufgewirbelt. Nach

einer Stunde (Zeit zum Absinken der lebenden Zellen) wurde der Überstand vorsichtig mit den darin enthaltenen Zelltrümmern abpipettiert und verworfen. Die Zellen in der Mikrotiterplatte wurden mit frischem Medium suspendiert. Für die Kultur von T-Zellen wurden diese mit h-IL-2-haltigem Medium (10 U/ml) der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) kultiviert und bis zu zweimal wöchentlich mit 50% frischem Medium versorgt. Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der Zählkammer nach Neubauer. Dazu wurde die Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden 16 Quadrate (jeweils 4 Quadrate pro Quadrant) ausgezählt. Da die Kammer eine Tiefe von 0,1 mm besitzt, musste die Summe der ausgezählten Zellen mit 10000 multipliziert werden, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

Die längerfristige Aufbewahrung von Zellen erfolgte durch Einfrieren. Dazu wurden bis zu 10 Millionen Zellen nach Abzentrifugation in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das Einfriermedium bestand aus 90% FCS (Biochrom, Berlin) und 10% DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen). Die kurzfristige Lagerung wurde bei -80°C in der Tiefkühltruhe, die langfristige Lagerung in flüssigem Stickstoff vorgenommen. Aufgetaut wurden die Zellen im Wasserbad. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert.

3.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen

Als Quelle für T-Zellen dienten PBMCs aus dem Rest-Blut („Buffy Coat“) freiwilliger Spender. Zur Gewinnung dieser Zellen wurden diese aus dem Rest-Blut über den Dichtegradienten mittels Ficoll-Paque plus (Amersham) separiert. Die Ausgangszellpräparation wurde hierzu zunächst 1:2 mit DPBS verdünnt und auf die Ficoll'sche Lösung überschichtet (Verhältnis von verdünntem Blut zu Ficoll ca. 3 zu 1). Durch Zentrifugation (35 Minuten bei 1500 Umdrehungen/Minute [460 g] unter Ausschaltung der Rotorbremse) sammelten sich die Lymphozyten und Monozyten in der Interphase, die Erythrozyten und die Granulozyten sedimentieren durch den Gradienten und die Thrombozyten bleiben im Überstand. Die Interphase des Ficollgradienten wurde abpipettiert und erneut zentrifugiert (15 Minuten bei 1000 rpm [205 g]). Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Zellzahl auf etwa 3,5 Millionen/ml eingestellt (Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer).

3.2.3 Pulsen von T2-Zellen mit Peptiden

Die T2-Zellen, welche sich im Kulturmedium befanden, wurden dreimal in 10 ml DPBS gewaschen und zwischendurch jeweils abzentrifugiert (6 min bei 1000 rpm [205 g]).

Danach wurden sie mit Hilfe der Neubauer Zählkammer auf 2 Millionen Zellen/ml Kulturmedium eingestellt. Die Zellen wurden auf eine 24-well-Mikrotiterplatte mit einem Volumen von jeweils 1800 μ l pro well ausgesät. Darauf wurden jeweils 200 μ l der Peptidlösung bzw. der Kontrolle mit 10% DMSO gegeben. Als weitere Kontrolle wurden reine T2-Zellen in Kulturmedium verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden dann ca. 18 Stunden bei Raumtemperatur (ca. 20°C) unter der sterilen Werkbank inkubiert.

3.2.4 Kokultivierung von T2-Zellen mit allogenen T-Zellen

Die mit Peptid gepulsten T2-Zellen bzw. die Kontrollzellen ohne Peptidpuls wurden mit Mitomycin-C behandelt, indem pro well 2 ml Medium 50 μ l einer 1 mg/ml konzentrierten Mitomycin-C-Lösung (Mitomycin-C-Pulver der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, in DPBS aufgelöst) dazugegeben wurden. Mitomycin-C ist ein Zellgift aus *Streptomyces caespitosus*, welches durch Alkylierung der DNA zytotoxisch wirkt [Abraham et al., 2006; Dellas, 2003]. Somit wird eine Proliferation dieser Zellen verhindert und nur eine Antigenpräsentation gewährleistet. Nach Zugabe der Mitomycin-C-Lösung wurden die T2-Zellen bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde dreimal mit DPBS gewaschen, die PBMCs als Quelle für T-Zellen hinzugefügt und bei 37°C inkubiert. Hierbei war das Verhältnis von PBMCs zu T2-Zellen etwa bei 2 bis 3 zu 1. In einem Kontrollansatz wurden keine T2-Zellen zugefügt, d. h. er bestand nur aus den PBMCs.

3.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie misst die Fluoreszenzeigenschaften von Zellen. Ursprünglich stammt diese Methode aus der Immunologie. Sie wird aber heute weit darüber hinaus verwendet, da man jeden zellulären Parameter, der sich in Fluoreszenzintensität ausdrücken lässt, untersuchen kann [Darzynkiewicz et al., 1994]. Grundsätzlich wird die Information pro Einzelzelle erfasst. Die Gesamtpopulation der untersuchten Zellen ist die Summe dieser Einzelzellinformationen.

Das Messgerät besteht aus einem Flüssigkeitssystem, einem Laserlicht-Generator, einem optischen System mit Messstrahl-Aufbereitung, Messkammer und Emissionsstrahl-Bearbeitung. Die Zellen werden über ein Schlauchsystem aufgesaugt und mit Druck in einem so genannten Mantelstrahl („Sheath“) injiziert. Somit werden die Zellen beschleunigt und hintereinander aufgereiht, damit sie einzeln in die Messkammer gelangen [Radbruch, 2000]. Dort wird jede Zelle von dem Laserstrahl getroffen und zelltypspezifisch gestreut. Das gestreute Licht wird bei 180° (FSC) und bei 90° Streulicht

(SSC) gemessen. Anhand der FSC erhält man Informationen über die Zellgröße, die SSC gibt eine Angabe über deren Granularität.

Wenn man die zu untersuchenden Zellen mit einem Antikörper inkubiert, der einerseits spezifisch für ein Oberflächenantigen ist und andererseits mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen ist, sind Marker-positive (fluoreszierende Zellen) von den Marker-negativen (nicht fluoreszierenden Zellen) abgrenzbar. Am häufigsten sind die Antikörper an FITC (Fluoresceinisothiozyanat) oder an PE (Phycoerythrin) gekoppelt.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät konnte die Fluoreszenz in drei Messbereichen, entsprechend der Farben Gelbgrün (FL-1), Orange (FL-2) und Rot (FL-3), gemessen werden. Die Messwerte wurden digitalisiert und einem der Messkanäle zugeordnet. So wurden PE-markierte Zellen im Fluoreszenzkanal 2 erkannt, FITC-markierte Zellen im Kanal 1 [Shapiro, 2003].

Für jede Färbung wurden etwa 1 Million der zu untersuchenden Zellen bereitgestellt und zentrifugiert. Dazu wurden 50 µl eines FITC-markierten AKs sowie bei einer Mehrfachfärbung 50 µl eines PE-markierten AKs mit einer Konzentration von jeweils 20 µg/ml gegeben. Die Zellen inkubierten 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln (Kühlschrank), um eine stabile AK-Bindung zu erreichen. Die nach der Inkubationszeit nicht gebundenen Antikörper wurden durch drei Waschschriffe mit DPBS entfernt. Die Zellen wurden dann in 1 ml DPBS aufgenommen und gemessen. Bei der Verwendung von dem nicht markierten AK Anti-HLA-A2 wurde nach dem Waschen ein sekundärer FITC-markierter AK zugegeben, der gegen den Isotyp des ersten AK gerichtet war. Die zweite Inkubation erfolgte ebenfalls 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Nach dreimaligem Waschen und Auffüllen auf 1 ml DPBS wurden die Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

Da die Fluoreszenzmessung mittels Flowzytometrie eine relative Methode ist und für das Messgerät keine „0-Fluoreszenz“ existiert, wurden Negativkontrollen, so genannte Isotypkontrollen, mitgeführt. Als Isotypkontrollen werden die Proben bezeichnet, die mit einem nicht bindenden Antikörper gleichen Isotyps wie der spezifische Antikörper versetzt wurden [Shapiro, 2003]. Dazu wurden der Maus IgG1-PE-AK sowie der Maus IgG1-FITC-AK verwendet.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit den Computerprogrammen CELLQuest (Becton-Dickinson, Heidelberg) und WinMDI (Verity, Topsham, ME, USA). Anhand der Größe und der Granularität der Zellen lassen sich in einer „Dot Plot“ Grafik Punktwolken für Lymphozyten, T2-Zellen oder andere Zellen abgrenzen. Abbildung 6 zeigt exemplarisch die zellspezifische Lichtstreuung (FSC und SSC) von T2-Zellen.

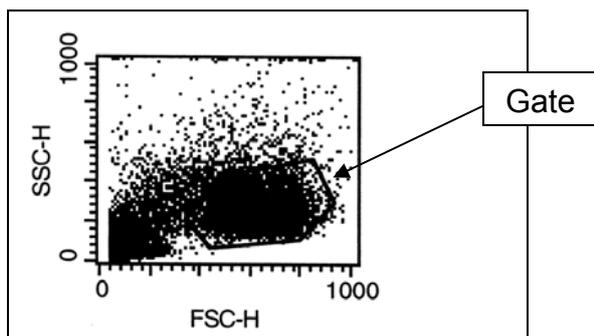


Abbildung 6: FSC-SSC Diagramm von T2-Zellen (Erklärung im Text)

Definierte man nun um die Punktwolke eine Region (wie in Abbildung 6 erkennbar), so konnten die Zellen in dieser Region bzw. dem durch diese Region definierten logischen „Gate“ spezifisch untersucht werden.

Ähnlich zeigten auch PBMCs eine spezifische FSC- und SSC-Lichtstreuung und waren so eindeutig erkennbar und eingrenzbar, vgl. Abbildung 7.

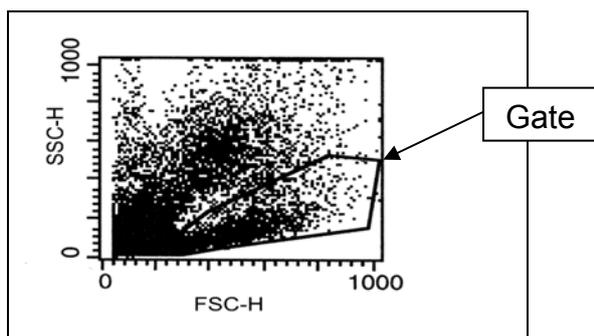


Abbildung 7: FSC-SSC Diagramm der PBMCs (Erklärung im Text)

Die Verteilung der negativen und positiven Zellen (fluoreszierende und nicht fluoreszierende Zellen) wurde ebenso im „Dot Plot“ oder Histogramm ermittelt. Die Expressionsdichte des entsprechenden Antigens wurde hierbei durch die Höhe der Fluoreszenzintensität repräsentiert.

3.2.6 Möglichkeiten der Depletion von Zellpopulationen

Derzeit stehen einige Methoden zur Verfügung, um aktivierte T-Zellen selektiv von anderen Zellen zu trennen. Nachfolgend werden die zwei Methoden vorgestellt, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden.

Zum einen können die Zellen anhand ihrer IFN- γ -Produktion getrennt werden. Aktivierte T-Zellen setzen IFN- γ frei. Durch die Zugabe eines IFN- γ -spezifischen Antikörpers („Catch Reagent“), welcher sich über einen gekoppelten Antikörper gegen ein lymphozytenspezifisch exprimiertes Molekül an der Oberfläche sämtlicher Lymphozyten

anheftet, werden die freigesetzten IFN- γ -Moleküle gebunden und zellnah fixiert. Durch einen PE-konjugierten IFN- γ -spezifischen 2. Antikörper („Detection Antikörper“) lassen sich nun die IFN- γ -produzierenden Zellen nachweisen und mit Hilfe von Anti-PE MicroBeads magnetisch markieren. Gibt man die Zellen dann in ein magnetisches Feld, verbleiben magnetisch markierte Zellen in diesem, unmarkierte Zellen können das Feld passieren. Somit ist eine Depletion der aktivierten IFN- γ -produzierenden T-Zellen von den restlichen nicht IFN- γ -produzierenden Zellen möglich, vgl. Abbildung 8. Für diesen Versuch wurde ein Komplettanalysesystem der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) verwendet und nach Anleitung benutzt.

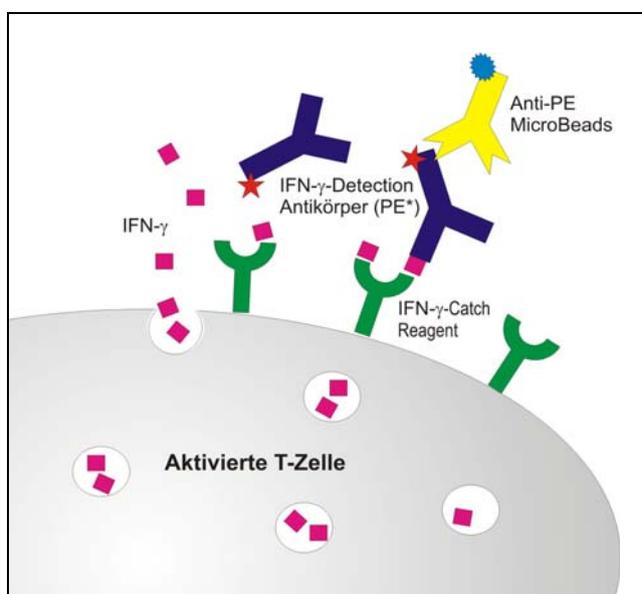


Abbildung 8: IFN- γ -Sekretionsanalyse (Erklärung im Text)

Eine weitere Depletionsmöglichkeit für zytotoxische T-Zellen ist die Eliminierung unerwünschter Zellen durch Nutzung des bereits oben genannten AICDs. Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Zellen, auf die in relativ kurzer Zeit gleiche sich wiederholende Stimuli einwirken, eine hohe AICD-Sensibilität haben. In den reaktivierten Zellen wird der AICD induziert und es kommt zu einer Zerstörung dieser Zellen [Green & Scott, 1994]. Die jeweiligen Einzelheiten der Stimulationsabfolgen sind im Ergebnisteil dargestellt.

3.2.7 Nachweis zytotoxischer T-Zellen mittels Granzym B-ELISpot

Zur Quantifizierung der aktivierten Zellen stehen diverse experimentelle Untersuchungen zur Verfügung. Der Granzym B-ELISpot beruht auf der Grundlage des ELISAs und bietet die Möglichkeit, die Immunantwort spezifischer Lymphozyten nach Stimulation auf Einzelzellebene zu quantifizieren. Spezielle Mikrotiterplatten wurden dafür mit einem monoklonalen Antikörper gegen Granzym B beschichtet. Eine Inkubation der zu testenden T-Zellen mit dem Antigen erfolgt direkt auf der Platte. Als Antigen wurden hierbei peptidgeladene T2-Zellen bzw. mitgeführte Kontrollen verwendet. Erkannten die T-Zellen das Antigen, so setzten sie Granzym B frei, das am Entstehungsort an die Antikörperbeschichtung der Platte gebunden wurde. Gebundenes Granzym B wurde dann durch einen Enzym-markierten AK unter Zugabe eines chromogenen Substrates als so genannte „Spots“ sichtbar gemacht. Ein solcher „Spot“ entspricht einer einzelnen reaktiven T-Zelle. Die Zählung und Auswertung der „Spots“ erfolgte computergesteuert mit Hilfe des KS Elispot Systems der Firma Zeiss (Version 4.4.35). Die Anzahl der „Spots“ wurde als Maß für die Reaktivität der T-Zellen auf ein bestimmtes Peptid interpretiert und erlaubte eine standardisierte Beurteilung. Für diesen Versuch wurde das „Human Granzym B-Set“ der Firma BD Bioscience (Heidelberg) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung.

3.2.8 Internet-Programme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Programme verwendet, um HLA-Bindungseigenschaften von Peptiden vorherzusagen:

1. Bimas: dieses Programm stand über das Internet zur Verfügung (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) [Parker et al., 1994].
2. SYFPEITHI: dieses Programm stand ebenfalls über das Internet zur Verfügung (<http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>) [Rammensee et al. 1999].
3. PAProc: dieses Programm wurde zur Vorhersage von Prozessierungswahrscheinlichkeiten von Peptiden verwendet und stand ebenfalls als Internet-Ressource zur Verfügung (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>) [Nussbaum et al., 2001].

4 Ergebnisse

4.1 Bindung von Peptiden an T2-Zellen

4.1.1 Punktwerte der Peptide

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Modellantigene herangezogen, um Peptide aus diesen Antigenen für Bindungsstudien bzw. T-Zellstimulationen zu verwenden. Es wurden hierbei einerseits Antigene verwendet, welche nur in Tumorzellen exprimiert werden (EWS/FLI-1, PAX3/FKHR). Diese Antigene, welche als Folge reziproker Translokation exprimiert werden, sind streng tumorspezifisch. Zusätzlich wurden zwei B-zellspezifisch exprimierte Gene (CD72 und CD79) verwendet. Diese Antigene stellen Modelle für gewebespezifisch exprimierte Antigene dar. Im Gegensatz zu EWS/FLI-1 bzw. PAX3/FKHR finden sich diese Antigene auch bei gesunden Personen, so dass gegen diese Antigene (bzw. Peptide aus diesen Antigenen in Kombination mit autologen HLA-Molekülen) Toleranz erwartet werden kann. Bei bekannter Sequenz kann die Stärke der Bindung eines Peptids an das MHC-Molekül *in silicio* vorhergesagt werden. Um Peptide aus den genannten Molekülen auszuwählen, wurden die Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Programmes Bimas analysiert und Peptide, welche die besten vorhergesagten Bindungswahrscheinlichkeiten an HLA-A2 besitzen, ausgewählt. Mit einem alternativen Programm (SYFPEITHI) wurden die errechneten Bindungswahrscheinlichkeiten überprüft. Zusätzlich wurde mittels des Programmes PAMProc analysiert, ob diese Peptide mit hoher Wahrscheinlichkeit durch das Proteasom generiert werden können. Nur Peptide, bei denen neben einer hohen Bindungswahrscheinlichkeit auch eine hohe Prozessierungswahrscheinlichkeit vorlag, wurden synthetisiert. Hierbei wurde für die genannten Fusionsproteine als weitere Bedingung gestellt, dass die Peptide die Fusionsregion beinhalten sollten. Dabei errechneten sich im SYFPEITHI- und Bimas-Score für die verwendeten Peptide an das HLA-A2-Molekül folgende Punktwerte (zur Bedeutung dieser Punktwerte siehe Erläuterungen unter Material und Methoden):

Tabelle 3: Berechnete Punktwerte der Peptide an HLA-A2 im Bimas- und SYFPEITHI-Score

Peptid	SYFPEITHI-Score	Bimas-Score
Peptid 1	13	0,139
Peptid 2	24	214,366
Peptid 3	27	8,953
Peptid 4	12	0,149
Peptid 5	8	0,004
Peptid 6	15	5,183
Peptid 7	21	140,328

Zur besseren Veranschaulichung sind die im SYFPEITHI- und dem Bimas-Score errechneten Punktwerte der verschiedenen Peptide graphisch in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

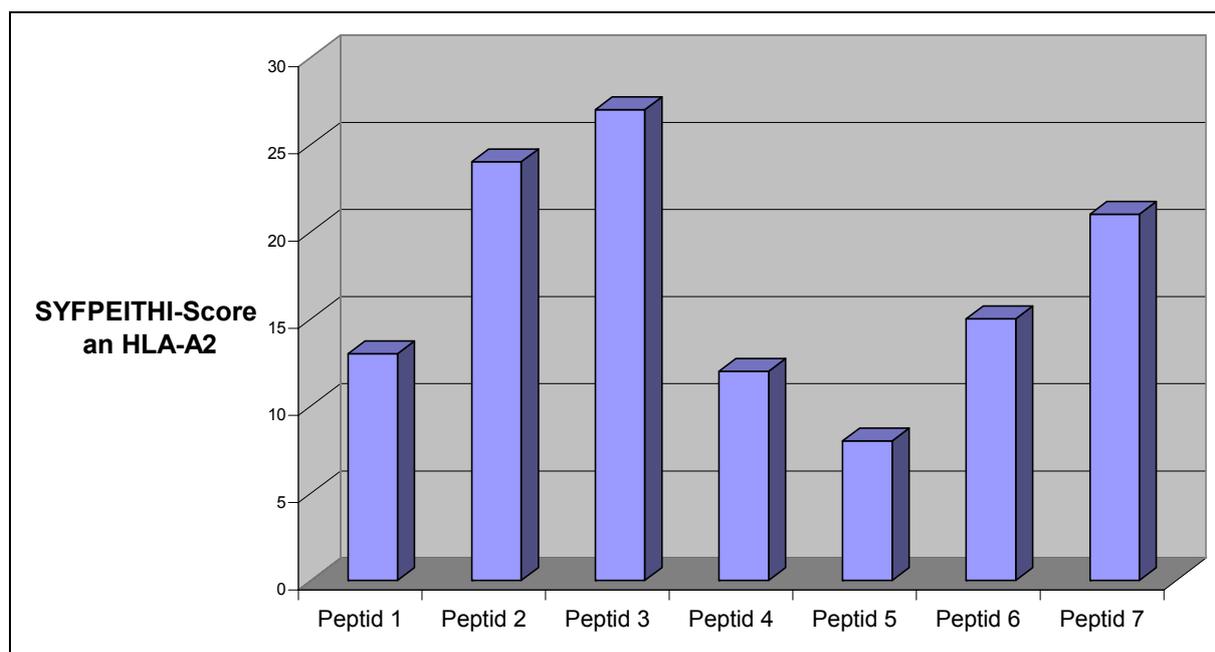


Abbildung 9: Peptidbindungsvermögen nach SYFPEITHI-Score

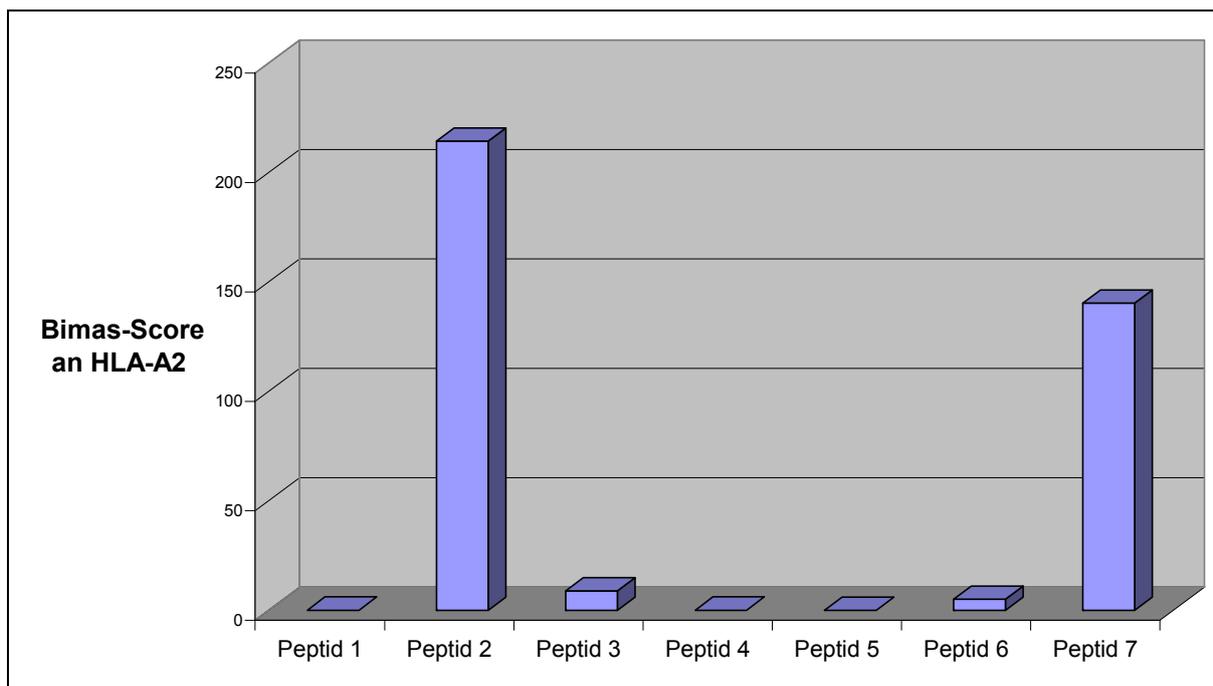


Abbildung 10: Peptidbindungsvermögen nach Bimas-Score

Anhand beider Algorithmen sind Peptid 2, 3 (aus CD79) sowie 7 (aus CD72) als gut an das HLA-A2-Molekül bindend zu charakterisieren. Peptid 6 (aus EWS/FLI-1) weist noch einen mäßig hohen Punktwert auf. Die relativ geringen Punktwerte für die Peptide 1 (aus PAX3/FKHR) und 4 bis 6 (aus EWS/FLI-1) im Vergleich zu den anderen Peptiden erklären sich hierbei aus der Tatsache, dass für diese Peptide die zur Analyse verwendete Aminosäuresequenz die Fusionsregion enthalten musste, so dass insgesamt nur eine sehr geringe Zahl an überhaupt möglichen Peptiden analysiert werden konnte. Es zeigte sich, dass für HLA-A2 diese Fusionsproteine generell nur Peptide mit niedriger Bindungswahrscheinlichkeit enthalten. Im Gegensatz zu EWS/FLI-1, für welches auch bei anderen HLA-Molekülen, sofern analysierbar, nur Peptide mit niedriger Bindungswahrscheinlichkeit vorliegen, finden sich für PAX3/FKHR Peptide sowohl mit hoher Bindungs- als auch Prozessierungswahrscheinlichkeit für andere HLA-Moleküle, insbesondere HLA-B7 (Daten nicht gezeigt) [Van den Broeke et al., 2006].

4.1.2 Messung des Peptidbindungsvermögens

In Abhängigkeit des Bindungsvermögens der Peptide an leere HLA-A2-Moleküle von T2-Zellen werden diese HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche mehr oder weniger gut stabilisiert, wodurch eine entsprechende Antigenpräsentation gewährleistet wird. Ein gut bindendes Peptid stabilisiert so mehr HLA-A2-Moleküle als ein schlecht bindendes. T2-Zellen ohne Peptidzusatz vermögen die leeren HLA-A2-Moleküle nicht an der Zellmembran stabil zu binden, was zum Verlust der HLA-A2-Moleküle auf der

Zelloberfläche führt. Das Mass der auf der Zelloberfläche exprimierten HLA-A2-Moleküle ist durch Messung der HLA-A2-Floureszenz in FACS-Analysen möglich und erlaubt Rückschlüsse auf das Peptidbindungsvermögen. Es wurden daher die synthetisierten Peptide mit T2-Zellen inkubiert und anschließend die HLA-A2-Floureszenz dieser Zellen mittels FACS analysiert. Da FACS-Messungen nur relative Ergebnisse sind, wurden Vergleichsproben zur Verifizierung des Bindungsvermögens mit gemessen. Dazu dienten die ungeladenen bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten T2-Zellen. Die Abbildungen 11 bis 14 zeigen auszugsweise die FACS-Messungen der T2-Zellen mit einem laut Vorhersage gut bindenden Peptid (Peptid 2), einem schlecht bindenden Peptid (Peptid 5), der Kontrolle (10% DMSO) sowie T2-Zellen ohne Zusatz. In der jeweils linken Abbildung ist die HLA-A2-Floureszenzverteilung der verschiedenen geladenen T2-Zellen dargestellt. Jeweils rechts davon ist die dazugehörige Isotypkontrolle gezeigt.

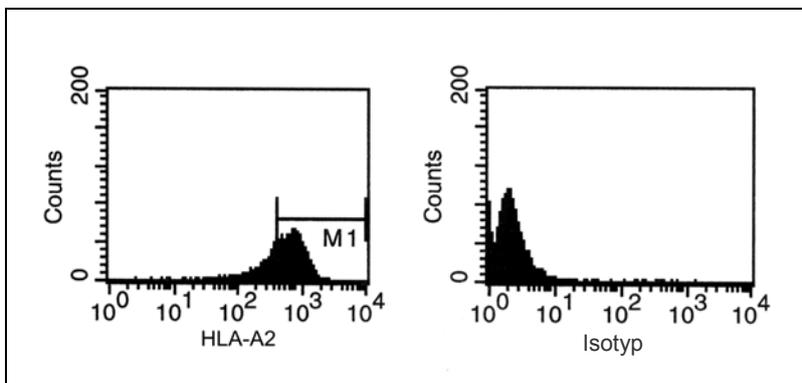


Abbildung 11: HLA-A2-Floureszenz der mit Peptid 2 geladenen T2-Zellen

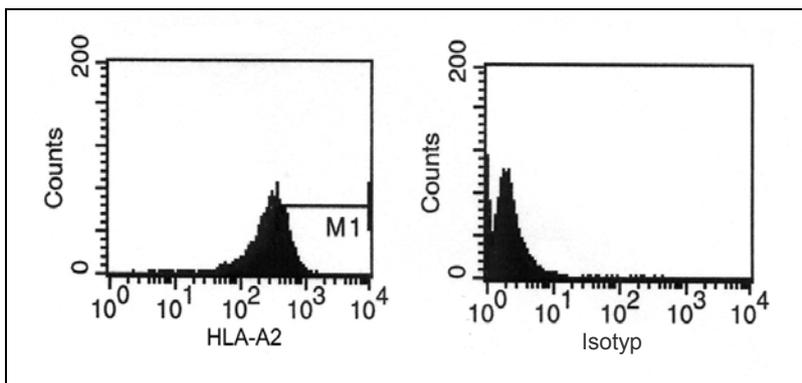


Abbildung 12: HLA-A2-Floureszenz der mit Peptid 5 geladenen T2-Zellen

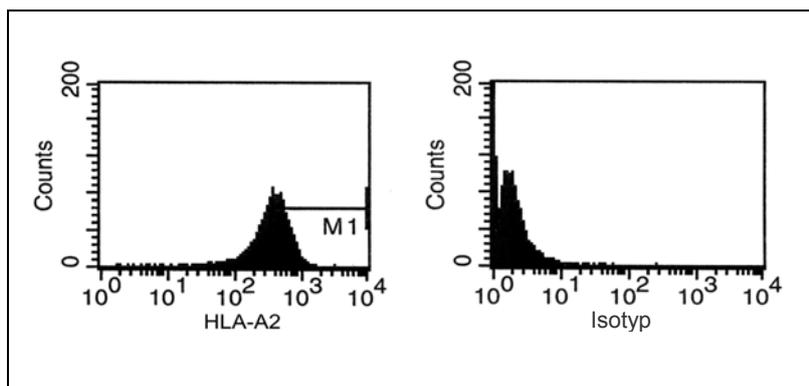


Abbildung 13: HLA-A2-Floureszenz der mit 10% DMSO gepulsten T2-Zellen

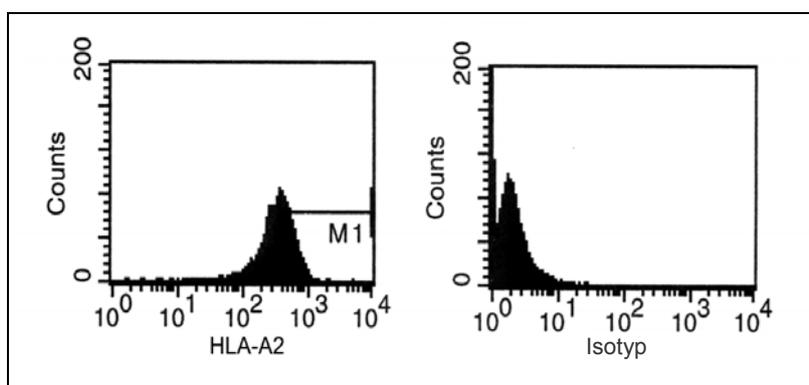


Abbildung 14: HLA-A2-Floureszenz der nicht gepulsten T2-Zellen

Die mittlere Floureszenzintensität („Mean“) der mit floureszenzgekoppelten HLA-A2-bindenden AK markierten T2-Zellen stellt ein Maß für die Bindung der Peptide an das HLA-A2-Molekül dar. Diese ist umso höher, je größer das Bindungsvermögen der Peptide ist. Da man davon ausgehen kann, dass auf ungepulsten T2-Zellen keine Stabilisierung der HLA-A2-Moleküle durch exogene Peptide erfolgt, entspricht deren mittlere Floureszenzintensität der basalen Expression von HLA-A2. Diese wird z. B. durch Signalpeptide, welche nicht mittels TAP-Transportern in das ER transportiert werden müssen, verursacht. Der Quotient aus der mittleren Floureszenzintensität der verschiedenen peptidgepulsten T2-Zellen und der mittleren Floureszenzintensität der T2-Zellen ohne Zusatz (N-facher Mean) ist in Abbildung 15 dargestellt.

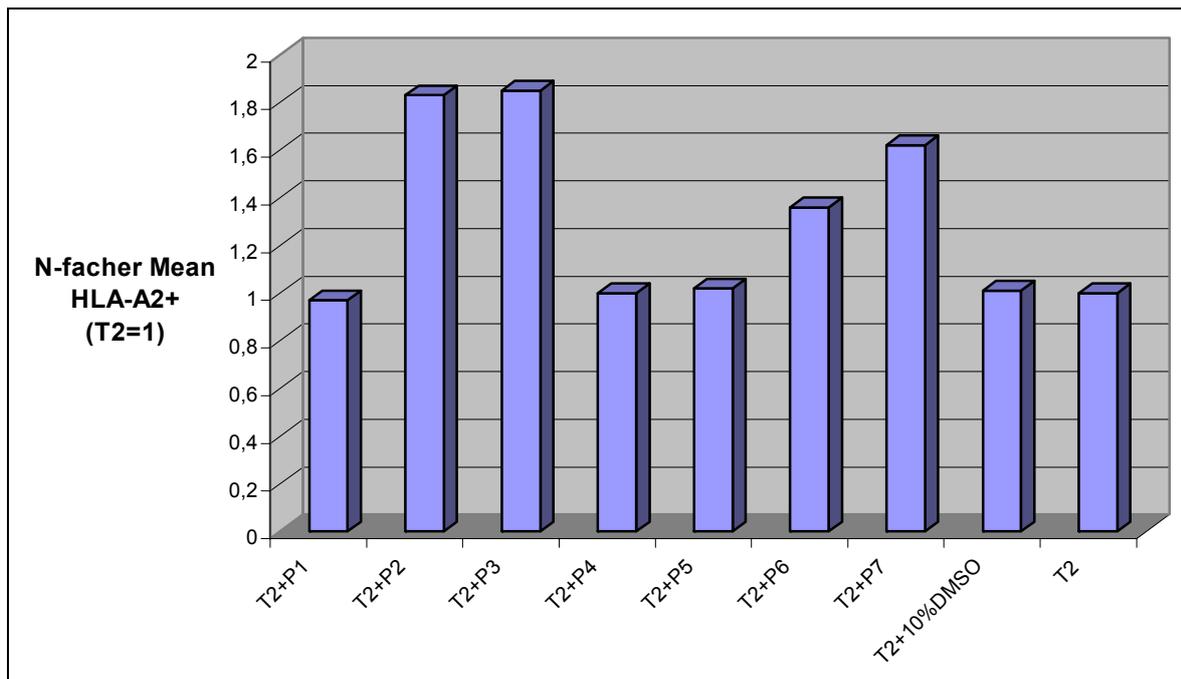


Abbildung 15: N-fache Fluoreszenzintensität verschiedener gepulster T2-Zellen bei T2=1

Für die verschiedenen gepulsten T2-Zellen wurde aus den FACS-Daten die N-fache HLA-Fluoreszenz berechnet, indem die jeweilige Fluoreszenz im Verhältnis zur Fluoreszenz der ungepulsten T2-Zellen gesetzt wurde.

Peptid 2, 3 (nahezu die doppelte Fluoreszenzintensität) und 7 zeigten ein relativ hohes, Peptid 6 mit der ca. 1,3-fachen Fluoreszenzintensität ein mäßiges HLA-A2-Bindungsvermögen. Peptid 1, 4, 5 sowie die Kontrolle mit 10% DMSO verhielten sich ähnlich den T2-Zellen ohne Peptidzusatz.

Ob eine statistische lineare Korrelation zwischen den gemessenen Werten und den beiden Vorhersage-Algorithmen vorliegt, wurde anhand des Korrelationskoeffizienten überprüft. Dabei errechnete sich ein Korrelationskoeffizient für das gemessene Peptidbindungsvermögen mit dem SYFPEITHI-Score von $r=0,97$ bzw. ein Bestimmtheitsmass von $r^2=0,94$ und mit dem Bimas-Score von $r=0,66$ bzw. $r^2=0,43$.

4.2 Stimulation von allogenen T-Zellen mit T2-Zellen

4.2.1 HLA-A2-Zugehörigkeit der T-Zellen

Für die folgenden Versuche wurden PBMCs HLA-A2 positiver und HLA-A2 negativer Spender verwendet. Durch FACS-Messungen unter Verwendung von HLA-A2-bindenden Antikörpern bzw. dazugehörige Isotypkontrollen konnte anhand der HLA-A2-Fluoreszenz die HLA-A2-Zugehörigkeit der Spender bestimmt werden. Abbildung 16 zeigt ein Beispiel eines HLA-A2 negativen T-Zell-Spenders, Abbildung 17 eines HLA-A2 positiven T-Zell-Spenders.

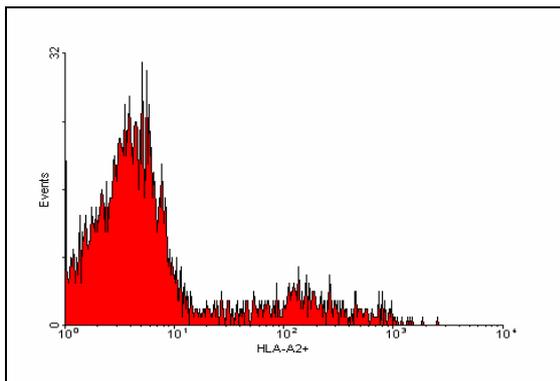


Abbildung 16: FACS-Analyse eines HLA-A2 negativen T-Zell-Spenders

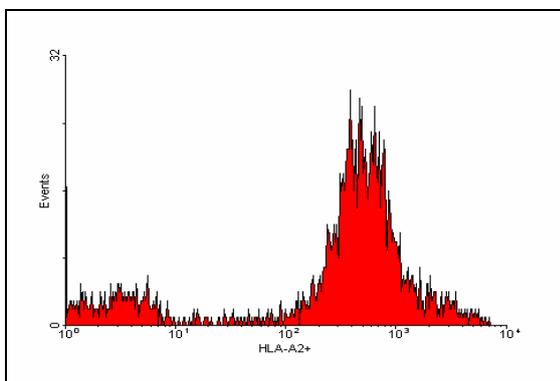


Abbildung 17: FACS-Analyse eines HLA-A2 positiven T-Zell-Spenders

4.2.2 T-Zell-Kinetik

Peptidbeladene T2-Zellen sind in der Lage, als APCs für CTLs (CD8-positive Zellen) zu fungieren. Die T-Zellen erkennen das Antigen, werden aktiviert und exprimieren das Oberflächenantigen CD69, welches durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Anhand der CD69-Floureszenz als Parameter der Aktivierungsrate konnte dadurch der kinetische Verlauf der Stimulation von zytotoxischen T-Zellen verfolgt werden. Abbildung 18 zeigt einen Ausschnitt der FACS-Daten. Dargestellt ist die CD8- und CD69-Floureszenz im Verlauf vom 2. bis zum 9. Tag nach Stimulation von HLA-A2 negativen T-Zellen mit Peptid 6.

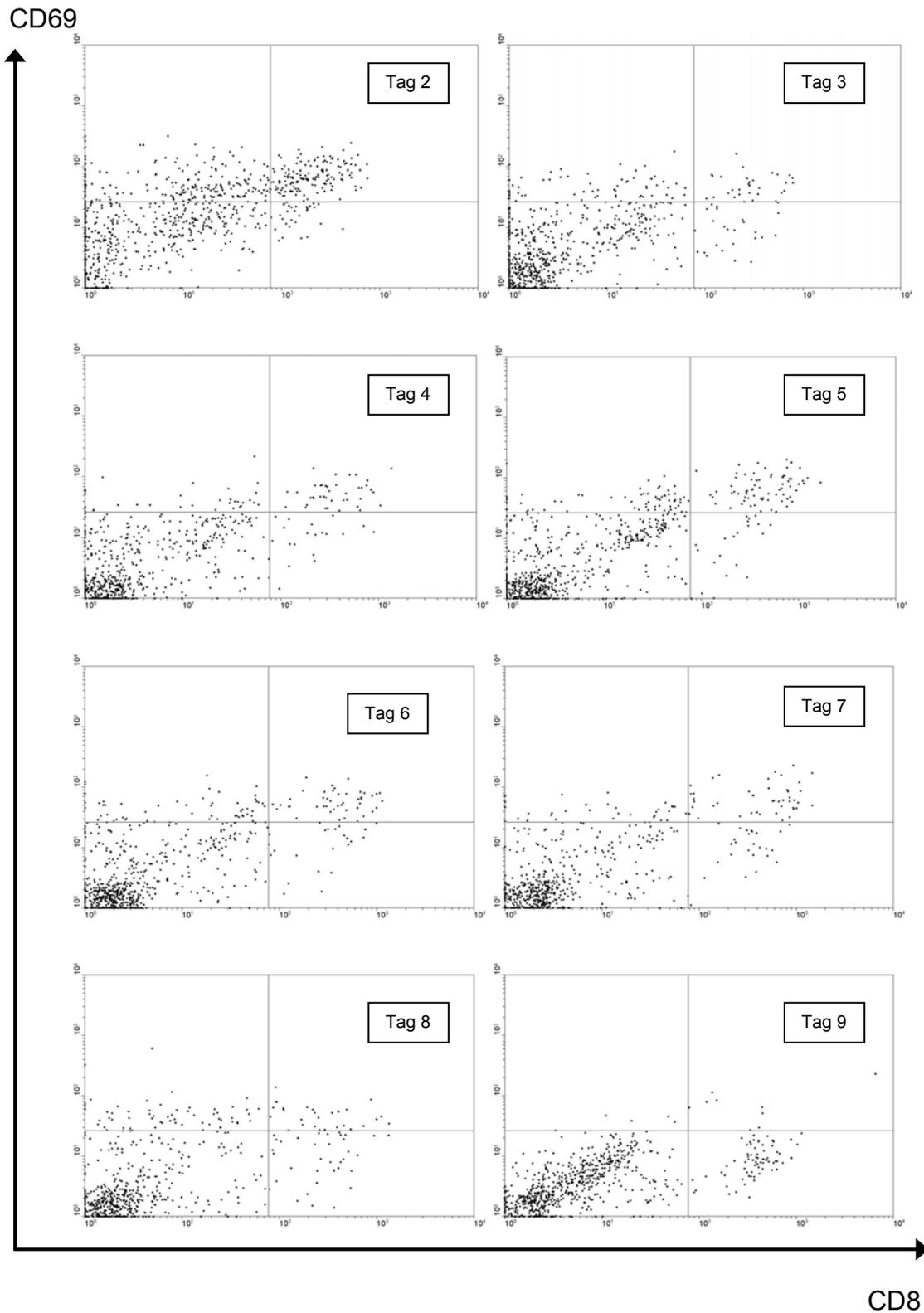


Abbildung 18: T-Zell-Stimulationskinetik am Beispiel von Peptid 6

Am Beispiel der Stimulation von HLA-A2 negativen T-Zellen mit Peptid 6-gepulsten T2-Zellen wurde das Stimulationsverhalten anhand der CD8- und CD69-Floureszenz im zeitlichen Verlauf analysiert. Dazu wurden die mit Peptid 6 beladenen T2-Zellen mit HLA-A2 negativen T-Zellen inkubiert und täglich ihre CD8- und CD69-Floureszenz gemessen.

Um den kinetischen Verlauf der CD69-Expression von HLA-A2 negativen sowie HLA-A2 positiven T-Zellen mit den verschiedenen tumor- und gewebespezifischen Peptiden bzw. den Kontrollen aufzuzeigen, wurde die CD8- und die CD69-Floureszenz und entsprechende Isotypkontrollen aller Proben vom Tag 2 bis Tag 7 täglich gemessen. Zudem wurden die unstimulierten T-Zellen gemessen. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen den zeitlichen Verlauf der Aktivierung der CTLs mit ausgewählten Peptiden und den Kontrollen. In Abbildung 19 ist die Stimulation der HLA-A2 negativen T-Zellen und in Abbildung 20 die Stimulation der HLA-A2 positiven T-Zellen dargestellt. Die unstimulierten T-Zellen sind jeweils mit 0 beschriftet.

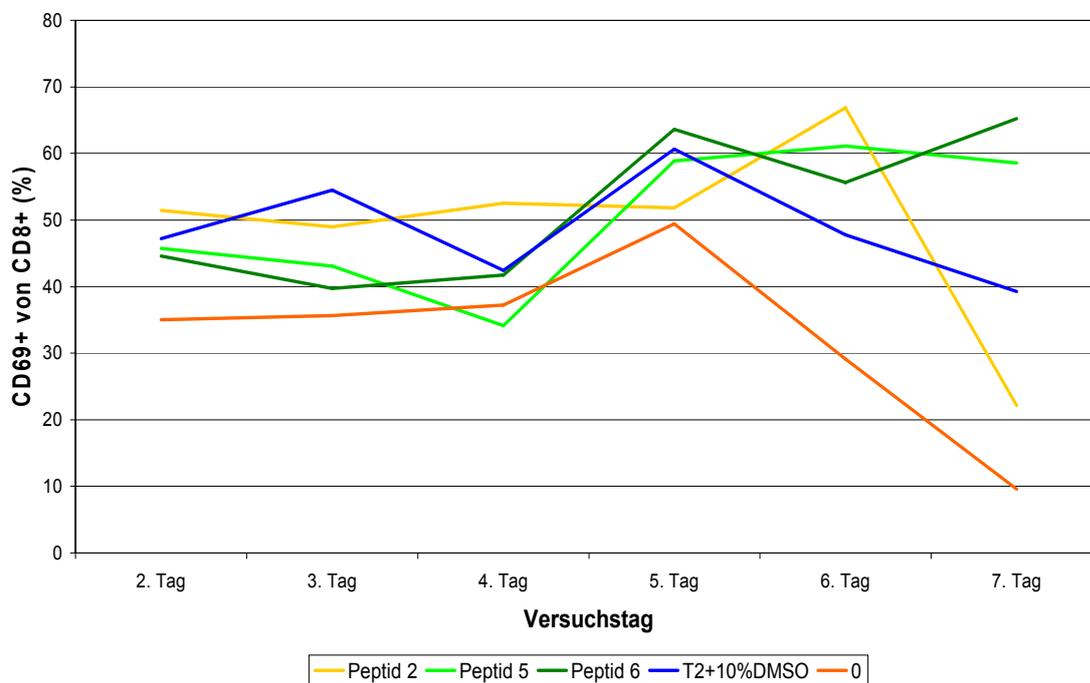


Abbildung 19: Stimulationskinetik von HLA-A2 negativen T-Zellen

In dieser Abbildung ist die Kinetik der Stimulation von HLA-A2 negativen T-Zellen mit ausgewählten Peptiden (Peptid 2, 5 und 6) und der Kontrolle mit 10% DMSO dargestellt. Mit 0 sind die nicht stimulierten T-Zellen gekennzeichnet. Errechnet wurden diese Daten aus den täglich gemessenen CD8- und CD69-Floureszenzen.

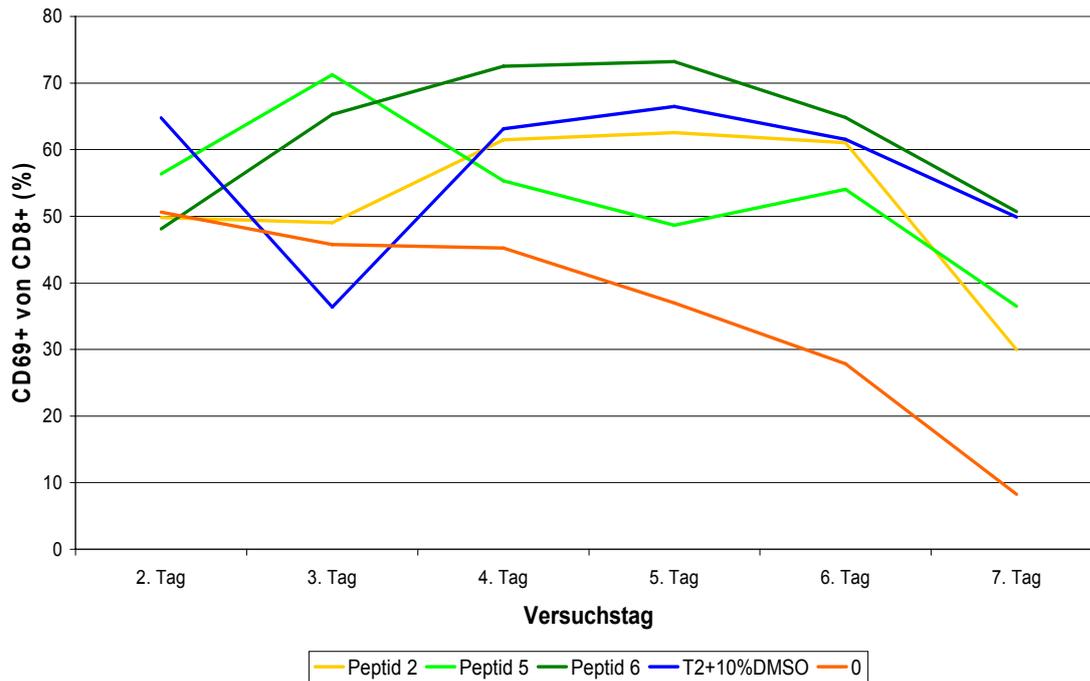


Abbildung 20: Stimulationskinetik von HLA-A2 positiven T-Zellen

Diese Abbildung zeigt die Kinetik der Stimulation von HLA-A2 positiven T-Zellen mit ausgewählten Peptiden und Kontrollen.

In beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass die unstimulierten T-Zellen eine sehr geringe und im Verlauf sinkende CD69-Floureszenz aufwiesen. Eine Stimulation der T-Zellen mit den verschiedenen Peptiden gepulsten T2-Zellen bzw. auch mit den mitgeführten Kontrollen (T2-Zellen gepulst mit 10% DMSO und ungepulste T2-Zellen) führte hingegen zu einem mehr oder weniger starken Anstieg in der CD69-Aktivität. Ein Stimulationsmaximum wurde am 5. bis 6. Tag erreicht. Danach war eine abfallende CD69-Floureszenz messbar.

4.2.3 Peptidspezifische Unterschiede der T-Zell-Aktivierung

Das Mass der Aktivierung der T-Zellen ist von dem Peptid bzw. Antigen sowie von der HLA-A2-Zugehörigkeit der T-Zelle abhängig. Je stärker die Bindung der Peptide an die T2-Zelle ist, desto stärker ist die Antigenpräsentation den T-Zellen gegenüber und umso grösser ist die peptidspezifische Aktivierbarkeit. Neben der Aktivierung von peptidspezifischen T-Zellen kommt es zu einer Aktivierung von peptidunspezifischen T-Zellen, insbesondere im Sinne der Alloreaktivität. Sie wird durch das Erkennen anderer Determinanten, wie z. B. dem „fremden“ HLA-A2-Molekül, hervorgerufen. Da die in den Versuchen mitgeführten Kontrollen keine peptidspezifische Aktivierung erfahren konnten, geben sie über das Mass der Alloreaktivität Aufschluss. Daran anlehnend liess sich für

eine peptidspezifische Stimulation der zytotoxischen T-Zellen mit den vorgestellten Peptiden im Vergleich zu der Alloreaktivität (Stimulation mit T2-Zellen ohne Zusatz) eine N-fache CD69-Aktivität gemessen am Stimulationsoptimum berechnen und darstellen, wodurch Schlussfolgerungen über die Etablierung von peptidspezifischen Zellen möglich wurden, vgl. Abbildung 21.

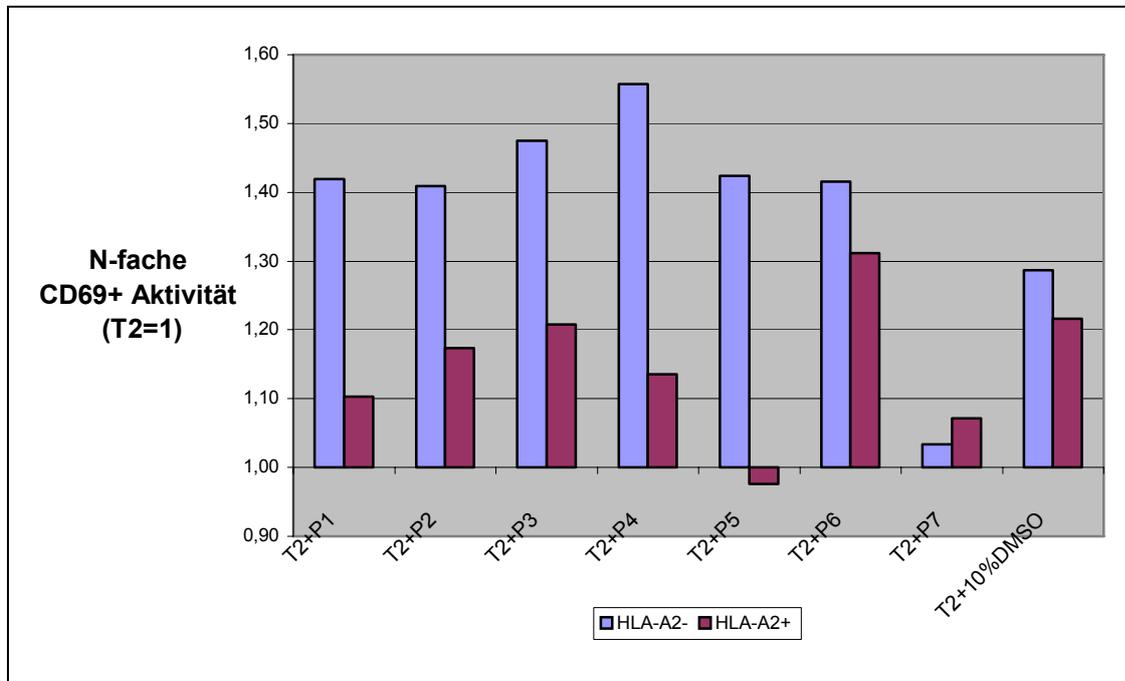


Abbildung 21: Peptidspezifische T-Zell-Aktivierbarkeit

Aus den gemessenen FACS-Werten der CD69 positiven CTLs stimuliert mit verschiedenen Peptiden und Kontrollen wurde der Mittelwert aus den Daten der Stimulation am 5. und am 6. Tag gebildet. Der dabei erhaltene Wert wurde durch den Mittelwert der mit ungepulsten T2-Zellen stimulierten T-Zellen geteilt, um die N-fache CD69-Floureszenz zu erhalten. Jeweils lila sind die verschiedenen stimulierten HLA-A2 negativen T-Zellen gekennzeichnet, dunkelrot die HLA-A2 positiven T-Zellen.

Vergleicht man die N-fache CD69-Floureszenz der HLA-A2 negativen T-Zellen mit der N-fachen CD69-Floureszenz der HLA-A2 positiven T-Zellen, so ist eine stärkere Aktivierbarkeit der HLA-A2 negativen Zellen erkennbar. Die N-fache CD69-Aktivität der verschiedenen stimulierten HLA-A2 negativen T-Zellen unterschied sich demgegenüber nur geringfügig untereinander. Im Vergleich zur Kontrolle (T2-Zellen mit 10% DMSO) zeigten alle Peptide außer Peptid 7 eine höhere Aktivierung. Bei den HLA-A2 positiven T-Zellen war hierbei auffällig, dass Peptid 6 eine deutlich verstärkte N-fache CD69-Floureszenz induzierte. Es war das einzige Peptid, welches eine höhere CD69-Aktivität als die Kontrolle zeigte. Dies ist insofern beachtlich, da dieses Peptid von den echt tumorspezifischen Peptiden die höchste HLA-A2-Bindungskapazität hat.

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen mögliche peptidspezifische Effekte durch eine starke

Alloreaktivität überlagert werden, die, wie erwartet, bei HLA-A2-negativen Spendern deutlich ausgeprägter auftrat. Der Zielsetzung der Arbeit entsprechend wurde daher im Folgenden untersucht, ob durch gezielte Depletion dieser Alloreaktivität die peptidspezifische von der alloreaktiven Antwort trennbar ist.

4.3 Depletion von T-Zellen

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden 2 alternative Depletionsverfahren erprobt.

4.3.1 Depletion mittels IFN- γ -Sekretionsanalyse

HLA-A2 negative und HLA-A2 positive T-Zellen wurden primär mit einem unspezifischen Reiz (T2-Zellen gepulst mit 10% DMSO) stimuliert, wodurch insbesondere alloreaktive T-Zellen aktiviert wurden. Aktivierte T-Zellen produzieren und sezernieren IFN- γ . Es wurde untersucht, ob durch die immunomagnetische Markierung der IFN- γ -sezernierenden T-Zellen mittels MicroBeads diese eliminiert werden können. Die verbliebenen, nicht aktivierten T-Zellen wurden mit T2-Zellen und einem gut HLA-A2-bindenden Peptid (Peptid 2) sowie mit einem schlecht HLA-A2-bindenden Peptid (Peptid 5) bzw. zur Kontrolle mit T2-Zellen mit und ohne 10% DMSO erneut inkubiert, vgl. Versuchsaufbau Abbildung 22.

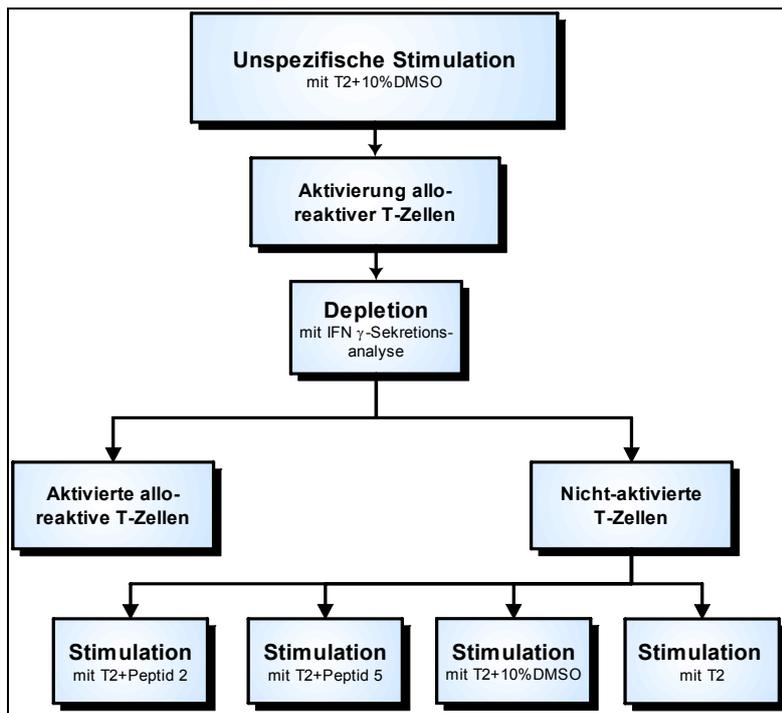


Abbildung 22: Versuchsaufbau zur IFN- γ -Sekretionsanalyse

Für die IFN- γ -Sekretionsanalyse wurden jeweils HLA-A2 negative und HLA-A2 positive T-Zellen unspezifisch mit 10% DMSO gepulsten T2-Zellen stimuliert. Eine solche Stimulation aktiviert besonders alloreaktive T-Zellen. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mittels IFN- γ -Sekretionsanalyse depletiert. Nicht IFN- γ markierte Zellen, d.h. nicht aktivierte Zellen, wurden mit verschiedenen gepulsten T2-Zellen und Kontrollen erneut stimuliert.

FACS-Messungen wurden 5 Tagen nach der 2. Stimulation durchgeführt. In Abbildung 23 ist die Anzahl der CD8 positiven Zellen unter den verschieden sekundär stimulierten HLA-A2 positiven und negativen CTLs dargestellt. Als 0 wurden die unstimulierten T-Zellen bezeichnet.

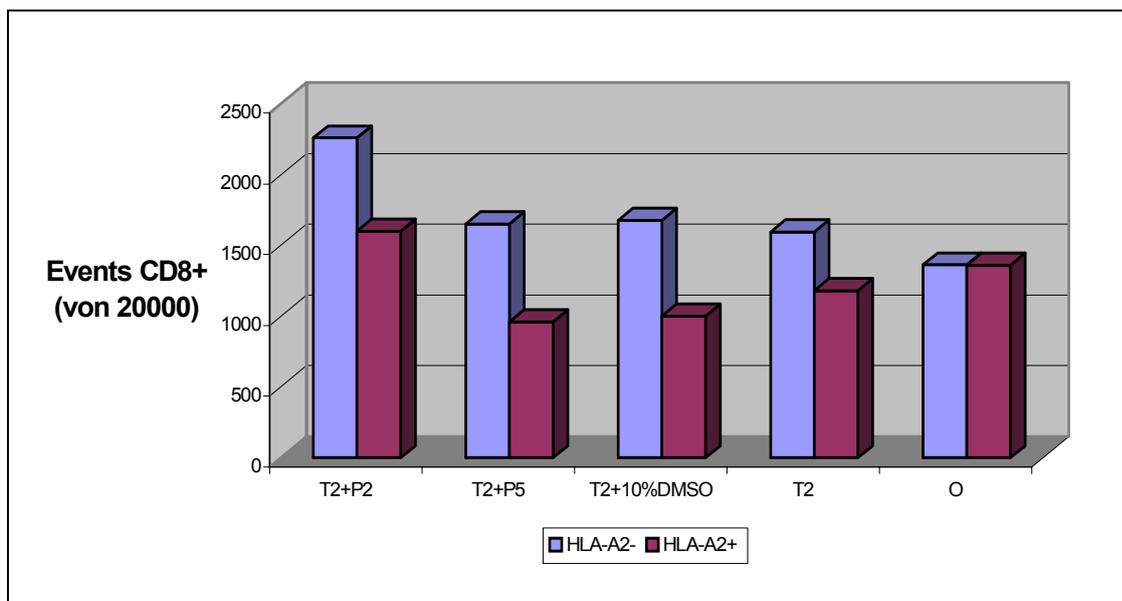


Abbildung 23: Anzahl von CD8 positiven Zellen nach IFN- γ -Depletion

Die Abbildung 23 zeigt die Anzahl der CD8 positiven Zellen der IFN- γ -depletierten und erneut stimulierten HLA-A2 positiven und negativen T-Zellen (siehe Versuchsaufbau Abbildung 22).

Im Vergleich zu den HLA-A2 negativen Zellen waren die HLA-A2 positiven zytotoxischen Zellen nach Depletion und erneuter Stimulation zahlenmäßig weniger. Um Unterschiede innerhalb einer HLA-A2-Zugehörigkeit genauer zu analysieren wurde für jeden Ansatz das N-fache im Vergleich zur CD8-Floureszenz der Zellen, die sekundär mit T2-Zellen stimuliert wurden, errechnet, vgl. Abbildung 24.

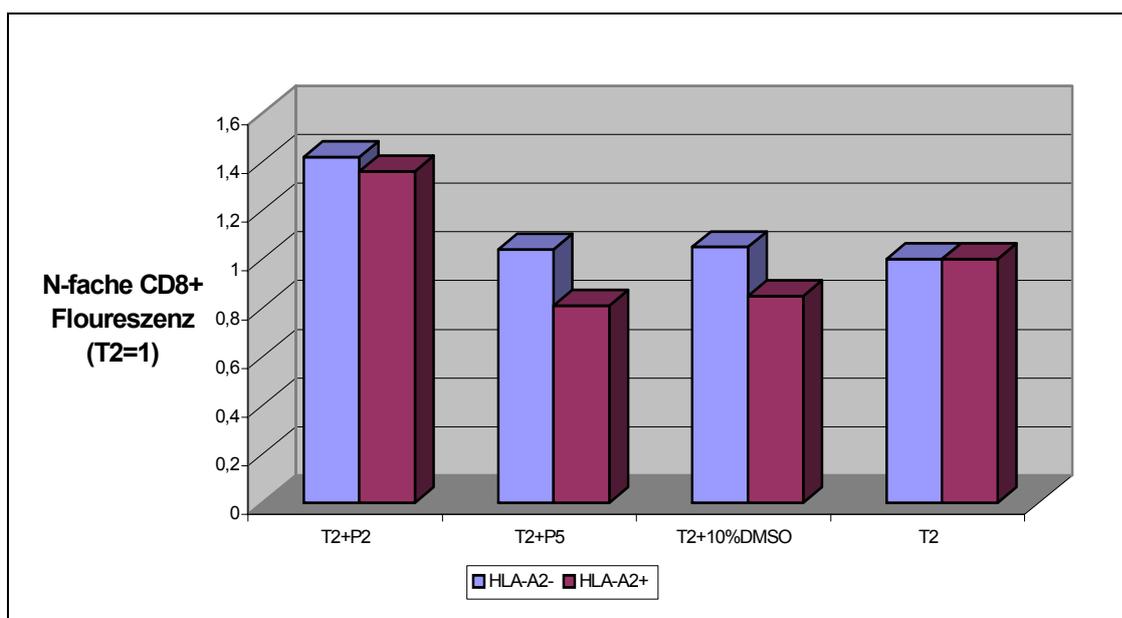


Abbildung 24: N-fache CD8-Floureszenz bei T2=1 nach IFN- γ -Depletion

Die jeweiligen CD8-Floureszenzen wurden durch die CD8-Floureszenz der mit ungepulsten T2-Zellen stimulierten T-Zellen dividiert, um die N-fache CD8-Floureszenz zu erhalten.

Es ist erkennbar, dass die höchste N-fache CD8-Aktivität durch die Stimulation mit Peptid 2, welches nach den vorhergegangenen Untersuchungen gut an HLA-A2 bindet, erreicht wurde. Dabei war diese CD8-Aktivität bei den HLA-A2 negativen T-Zellen im Vergleich zu den HLA-A2 positiven T-Zellen noch stärker ausgeprägt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ein gewisser Depletionseffekt mittels der IFN- γ -Sekretionsanalyse erreicht wird. Zum Vergleich wurde ein zweites Verfahren untersucht, welches nachfolgend erläutert wird.

4.3.2 Depletion durch aufeinanderfolgende Stimulationen (AICD-Depletion)

HLA-A2 negative bzw. HLA-A2 positive T-Zellen wurden mit T2-Zellen mit 10% DMSO stimuliert und somit unspezifisch aktiviert (Alloreaktivität). Am darauffolgenden Tag (< 24 Stunden) erfolgte die erneute Stimulierung durch T2-Zellen mit Peptid 2 (gut bindendes Peptid), mit Peptid 5 (schlecht bindendes Peptid) bzw. durch T2-Zellen mit 10% DMSO und ohne Zusatz (nur T2-Zellen), vgl. Abbildung 25.

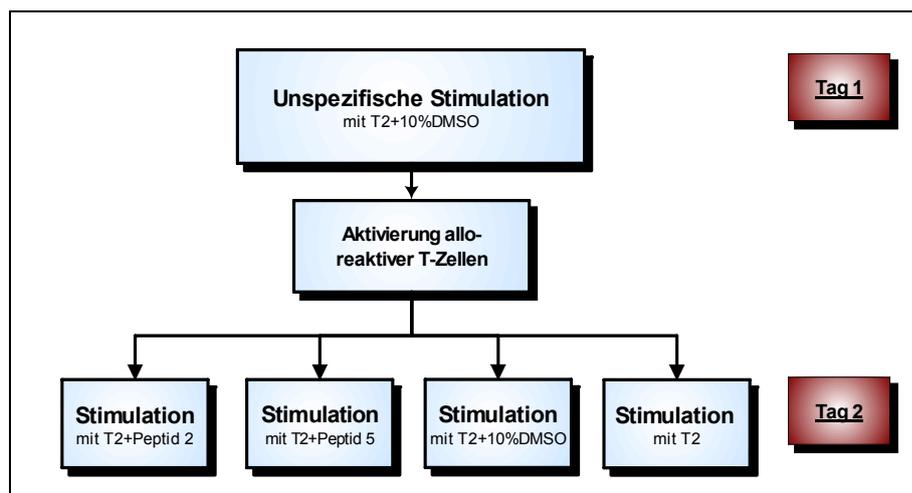


Abbildung 25: Versuchsaufbau 1 zur Depletion unter Nutzung des AICDs

Für die Depletion unter Nutzung des AICDs wurden jeweils HLA-A2 negative und HLA-A2 positive T-Zellen zunächst unspezifisch mit 10% DMSO gepulsten T2-Zellen stimuliert, welche besonders alloreaktive T-Zellen aktivieren. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit verschiedenen gepulsten T2-Zellen (T2-Zellen gepulst mit Peptid 2 und 5) und Kontrollen (T2-Zellen mit und ohne 10% DMSO) restimuliert.

Die FACS-Messungen erfolgten 5 Tage nach der 2. Stimulation. Abbildung 26 zeigt die Anzahl der CD8 positiven T-Zellen von insgesamt 20000 gezählten Zellen in Abhängigkeit von der Sekundärstimulation und der HLA-A2-Zugehörigkeit der Spender.

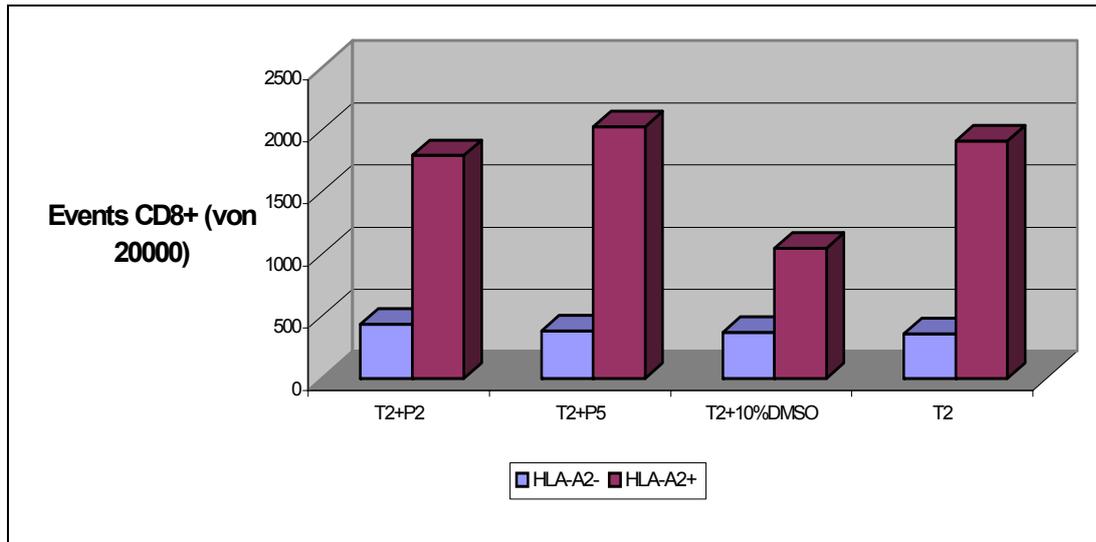


Abbildung 26: Anzahl von CD8 positiven Zellen nach AICD-Depletion

Die depletierten HLA-A2 negativen und positiven T-Zellen wurden mit Peptid 2 und 5 sowie mit 10% DMSO gepulsten T2-Zellen und mit ungepulsten T2-Zellen erneut stimuliert. Abbildung 26 zeigt die Anzahl der CD8 positiven Zellen der jeweiligen Ansätze.

Abbildung 26 verdeutlicht, dass die HLA-A2 negativen CTLs nach Depletion im Vergleich zu HLA-A2 positiven T-Zellen drastisch reduziert wurden.

Um den Depletionseffekt in Abhängigkeit der Zweitstimulation darzustellen, wurde die CD8-Floureszenz des jeweiligen Ansatzes im Verhältnis zu den Zellen, die sekundär mit T2-Zellen ohne Zusatz stimuliert wurden, gesetzt (N-fache CD8-Floureszenz), vgl. Abbildung 27.

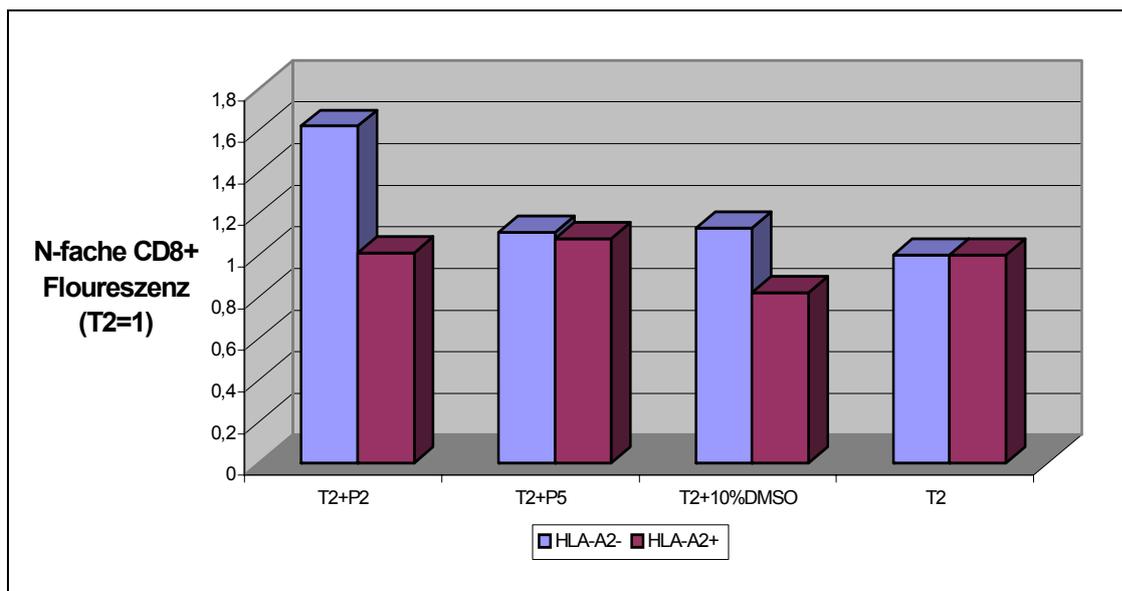


Abbildung 27: N-fache CD8-Floureszenz bei T2=1 nach AICD-Depletion

Die jeweiligen CD8-Floureszenzen wurden durch die CD8-Floureszenz der mit nicht gepulsten T2-Zellen stimulierten T-Zellen dividiert, um die N-fache CD8-Floureszenz zu erhalten.

Bezüglich der Bedeutung der Zweitstimulation zeigen die HLA-A2 negativen Zellen im Vergleich zu den HLA-A2 positiven Zellen hiernach deutliche Unterschiede auf. Die N-fache CD8-Floureszenz der HLA-A2 negativen Zellen, die sekundär mit Peptid 2 stimuliert wurden, ist deutlich höher als in den anderen Ansätzen. Diese Beobachtung ist vereinbar mit der durch die Stabilisierung von HLA-A2-Molekülen mittels Peptid Erhöhung antigener Determinanten, die in HLA-A2 negativen T-Zellen aufgrund fehlender Toleranz zur Aktivierung der Zellen führen kann. Zusätzlich zur Zahl CD8 positiver Zellen wurde die CD69-Floureszenz gemessen. Die mittlere Floureszenzintensität der CD8 und CD69 positiven Zellen wurde in Abbildung 28 dargestellt.

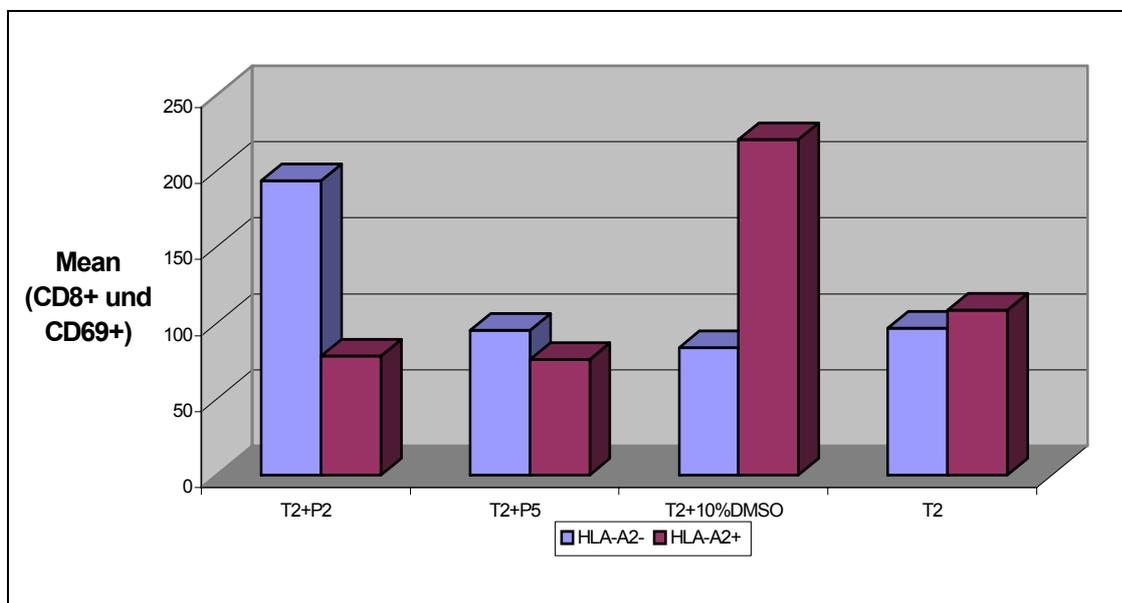


Abbildung 28: Mittlere Floureszenzintensität der CD69 positiven CTLs nach AICD-Depletion

In dieser Abbildung sind für die jeweiligen Ansätze die mittlere Floureszenzintensität der CD69 positiven CTLs (CD8 positiv) berechnet worden.

Auffällig ist hier, dass die mit Peptid 2 sekundär stimulierten HLA-A2 negativen Zellen eine deutlich höhere mittlere Floureszenzintensität im Vergleich zu den anderen Ansätzen aufwiesen. Eine ebenfalls hohe mittlere Floureszenzintensität zeigten die HLA-A2 positiven Zellen auf, die sekundär mit T2 mit 10% DMSO stimuliert wurden.

In einem weiterführenden Experiment sollten diese Ergebnisse in Abhängigkeit der Bedeutung von Primär- und Sekundärstimulation näher untersucht werden. Dazu wurden T-Zellen HLA-A2 negativer Spender primär mit T2-Zellen mit Peptid 2, Peptid 5, Peptid 6 und mit 10% DMSO stimuliert. Innerhalb von 24 Stunden erfolgte die Zweitstimulation, indem pro Ansatz mit T2-Zellen mit Peptid 2, Peptid 5, Peptid 6 sowie mit 10% DMSO sekundär stimuliert wurde, vgl. Versuchsaufbau Abbildung 29.

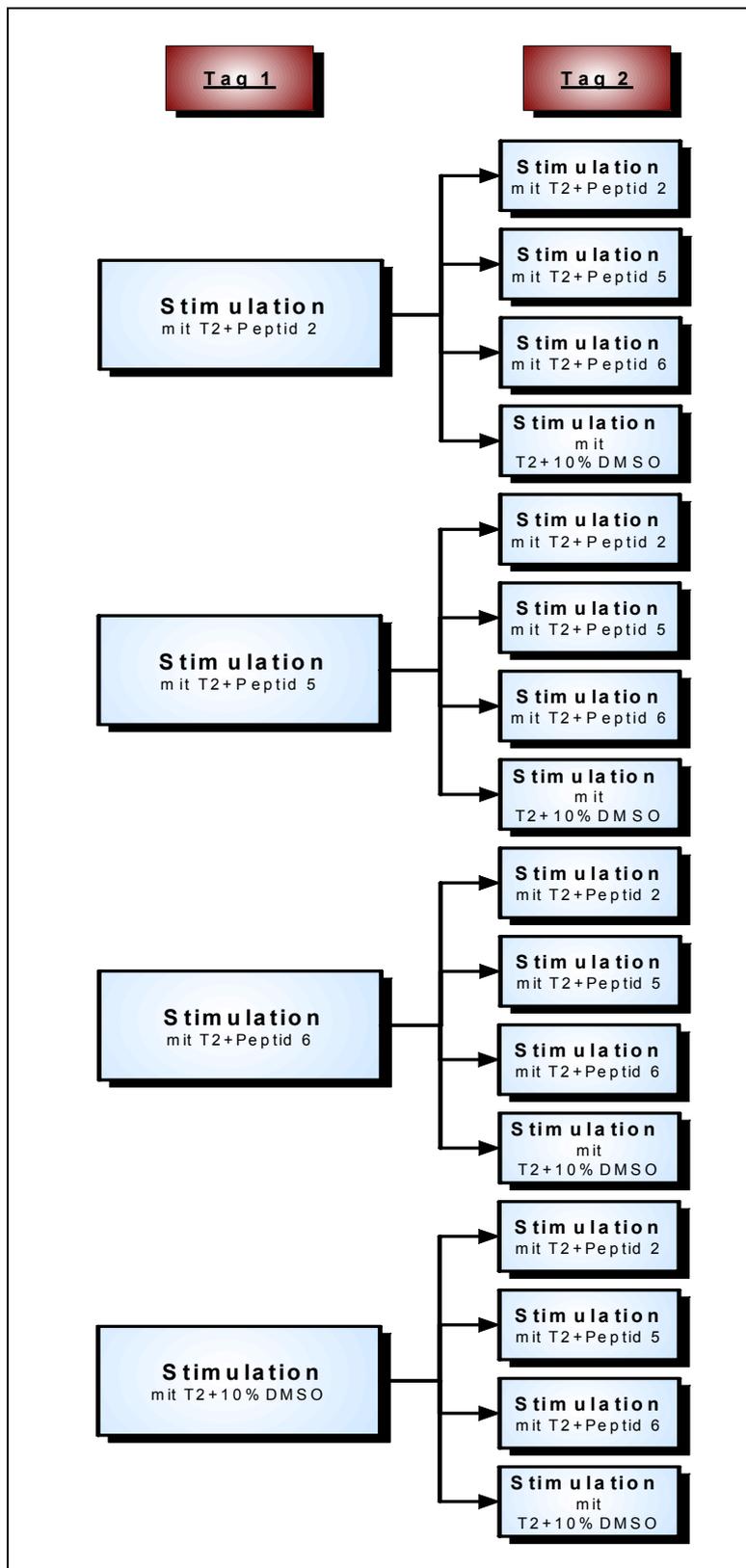


Abbildung 29: Versuchsaufbau 2 zur Depletion unter Nutzung des AICDs

Versuchsaufbau 2 zeigt ein weiterführendes Experiment zur Depletion unter Nutzung des AICDs. Dabei wurden HLA-A2 negative T-Zellen am ersten Tag verschieden stimuliert (mit Peptid 2, 5, 6 sowie mit 10% DMSO gepulsten T2-Zellen). Am nächsten Tag wurden die verschiedenen Ansätze jeweils erneut mit Peptid 2, 5, 6 und 10% DMSO gepulsten T2-Zellen restimuliert.

Die CD8-, die CD69-, die HLA-DR-, die CD25-Floureszenz sowie die entsprechenden Isotypkontrollen wurden 5 Tage nach der Sekundärstimulation gemessen. Abbildung 30 zeigt 4 Diagramme mit einer jeweils sich unterscheidenden Primärstimulation. In jedem Diagramm ist anhand der Abszissenbeschriftung die Sekundärstimulation ablesbar. Jeweils auf der Ordinate ist das N-fache der CD8 positiven Zellen dargestellt, wenn die entsprechende Floureszenz im Verhältnis zu den sekundär mit den T2-Zellen mit 10% DMSO stimulierten Zellen gesetzt wird.

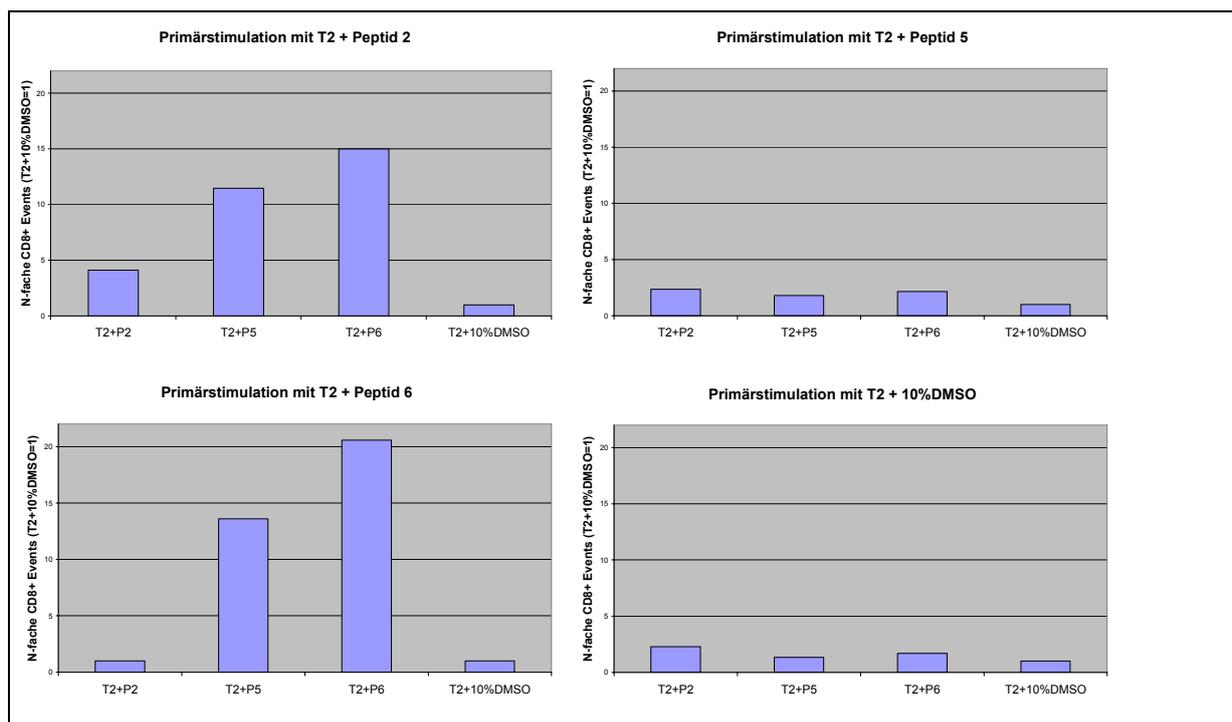


Abbildung 30: N-fache CD8+ Events (T2+10%DMSO=1) nach AICD-Depletion

Um die N-fache CD8-Floureszenz zu erhalten wurden für alle Proben die jeweiligen CD8-Floureszenzen durch die CD8-Floureszenz der mit 10% DMSO gepulsten T2-Zellen stimulierten T-Zellen dividiert. Die Ergebnisse wurden in vier Diagrammen dargestellt. In jedem Diagramm ist die Primärstimulation anhand der Überschrift erkennbar, die Sekundärstimulation anhand der jeweiligen Abszissenbeschriftung.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung der Primärstimulation nicht mit der Wirkung der Sekundärstimulation übereinstimmt. So wurde der größte Depletionseffekt bei einer unspezifischen Primärstimulation, d. h. mit Peptid 5 und mit 10% DMSO gepulsten T2-Zellen, unabhängig von der Sekundärstimulation erreicht. Bei genauerer Betrachtung fällt bei beiden unspezifischen Primärstimulationen auf, dass eine Sekundärstimulation mit Peptid 2 bzw. 6 die höchste N-fache CD8-Aktivität bewirkte. Demgegenüber wurde ein geringerer Depletionseffekt durch eine spezifische Primärstimulation (Stimulation mit Peptid 2 und 6) unabhängig von der Sekundärstimulation (mit Ausnahme der sekundären Stimulation mit 10% DMSO gepulsten T2-Zellen) erzielt.

Als Maß der Aktivierung existieren verschiedene durchflusszytometrisch messbare Aktivierungsmarker, wie beispielsweise CD69, HLA-DR oder CD25. Um die einzelnen Marker miteinander zu vergleichen, wurden bei allen Proben gleichzeitig die CD69-, CD25- sowie HLA-DR-Floureszenz gemessen. Abbildung 31, 32 und 33 zeigen die N-fachen mittleren Floureszenzintensitäten jeder Probe im Verhältnis zur jeweiligen Probe, die sekundär mit T2-Zellen mit 10% DMSO stimuliert wurde.

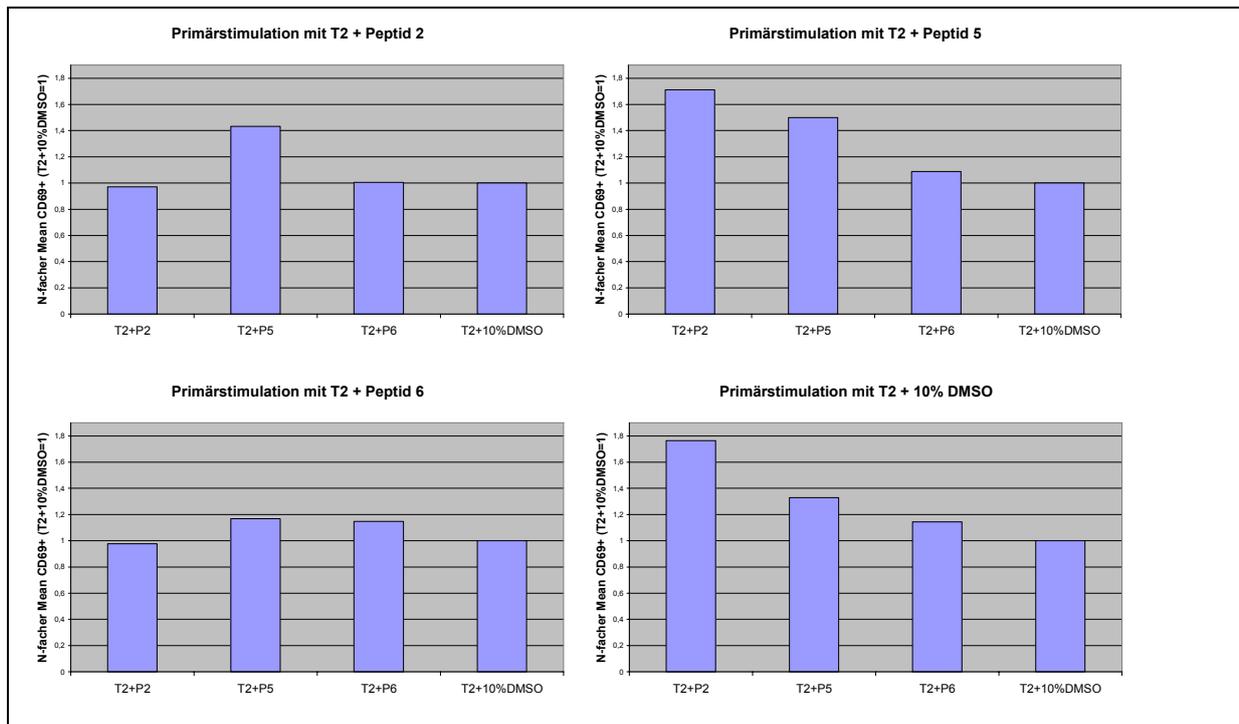


Abbildung 31: N-fache mittlere Floureszenzintensität der CD69+ Zellen (T2+10%DMSO=1) nach AICD-Depletion

Für alle Ansätze ist die N-fache mittlere Floureszenzintensität der CD69 positiven Zellen berechnet worden. Dazu wurde die jeweilige mittlere CD69-Floureszenzintensität durch die jeweilige mittlere Floureszenzintensität der sekundär mit T2-Zellen gepulst mit 10% DMSO stimulierten T-Zellen dividiert.

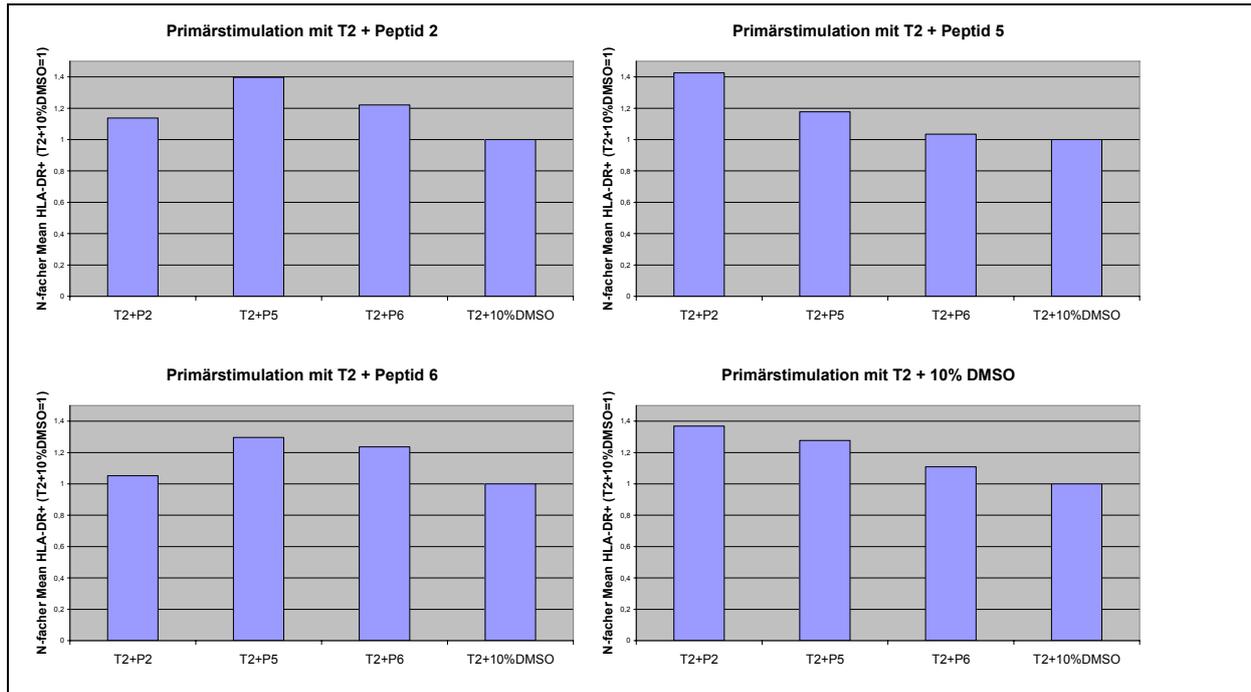


Abbildung 32: N-fache mittlere Fluoreszenzintensität der HLA-DR+ Zellen (T2+10%DMSO =1) nach AICD-Depletion

Hier wurde anstelle von CD69 HLA-DR als Aktivierungsmarker eingesetzt und die N-fache Fluoreszenzintensität berechnet.

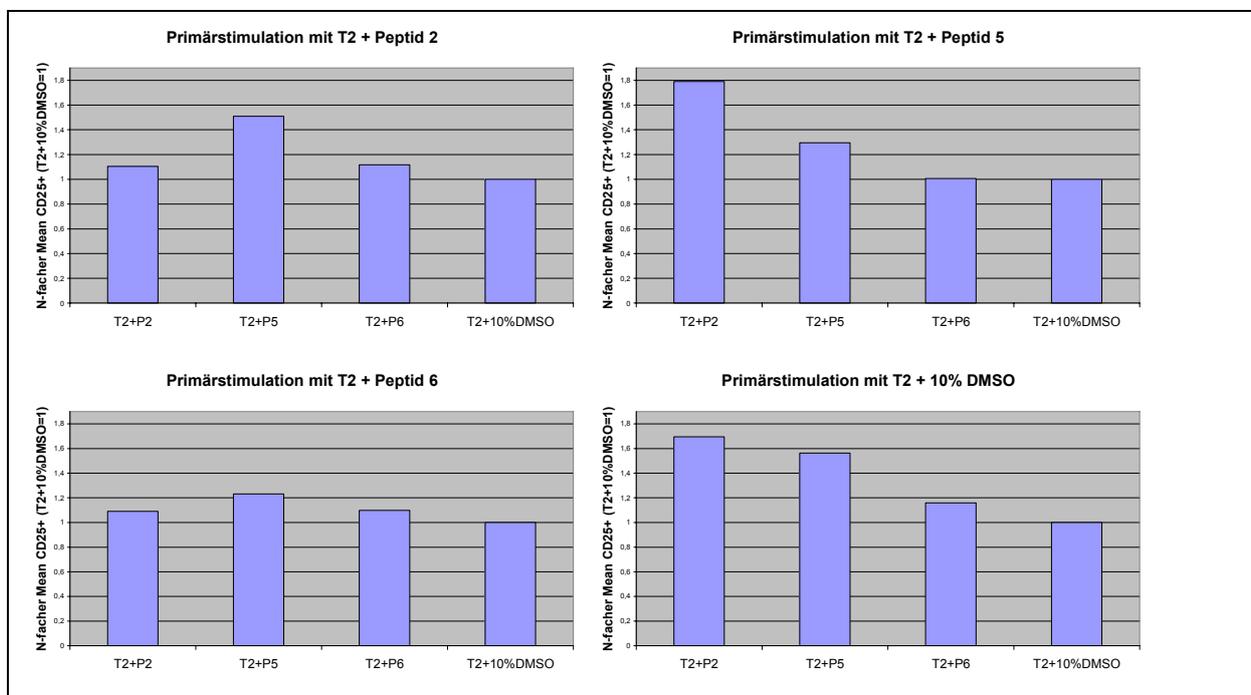


Abbildung 33: N-fache mittlere Fluoreszenzintensität der CD25+ Zellen (T2+10%DMSO=1) nach AICD-Depletion

Anstelle von CD69 und HLA-DR ist auch CD25 als Aktivierungsmarker einsetzbar. Die N-fache Fluoreszenzintensität wurde wie in Abbildung 31 dargestellt berechnet.

Die CD69-, HLA-DR- und die CD25-Floureszenz wiesen ein nahezu identisches Verhalten in gleichen Ansätzen auf.

Eine unspezifische Primärstimulation, d. h. eine Stimulation mit T2-Zellen mit 10% DMSO sowie mit dem schlecht bindenden Peptid 5, und eine Sekundärstimulation mit Peptid 2 erreichte einen mehr oder weniger signifikanten Unterschied. Eine Sekundärstimulation mit Peptid 6 bewirkte hingegen kaum einen Unterschied im Vergleich zu einer unspezifischen Sekundärstimulation. Stimulierte man nun primär mit einem gut bindenden Peptid, wie Peptid 2 oder 6, wick die mittlere Floureszenzintensität aller Aktivierungsmarkern zwischen den einzelnen Proben nur geringfügig ab. Einzig die Sekundärstimulation mit Peptid 5 wies eine erhöhte Floureszenz aller Aktivierungsmarker auf.

4.4 Zytotoxizitätsnachweis mittels Granzym B-ELISpot

Mittels ELISpot wurde die Freisetzung von Granzym B der unterschiedlich gepulsten und durch frühzeitige Restimulation depletierten T-Zellen ermittelt. Als Antigen dienten dabei die mit den entsprechenden Peptiden (Peptid 2, 5, 6 und 10% DMSO) gepulsten T2-Zellen. Die wie aus Versuchsaufbau Abbildung 29 ersichtlich gewonnenen Zellen sowie unstimulierte T-Zellen wurden am Tag 7 nach Zweitstimulation jeweils mit den verschiedenen Antigenen (Peptid 2, 5 und 6 gepulste T2-Zellen) und Kontrollen (T2-Zellen gepulst mit 10% DMSO bzw. nur Medium) inkubiert und die Freisetzung von Granzym B gemessen. Zudem wurde als eine weitere Kontrolle die Granzym B-Freisetzung durch verschieden gepulste T2-Zellen ohne T-Zellen gemessen. Bei allen Ansätzen erfolgte eine Dreifachbestimmung.

Abbildung 34 zeigt die gemessenen Werte. In jedem Diagramm ist auf der Abszisse das Antigen, d. h. mit Peptid 2, 5 und 6 gepulste T2-Zellen bzw. als Kontrolle kein Antigen (Medium) und mit 10% DMSO gepulste T2-Zellen aufgetragen. Die Beschriftung jeweils oben links gibt die verwendeten unterschiedlich stimulierten Effektor-T-Zellen (d.h. deren Primär- und Sekundärstimulation) an. Als K ist die Stimulation mit T2 mit 10% DMSO benannt. Die nicht stimulierten T-Zellen wurden im Diagramm mit 0 gekennzeichnet.

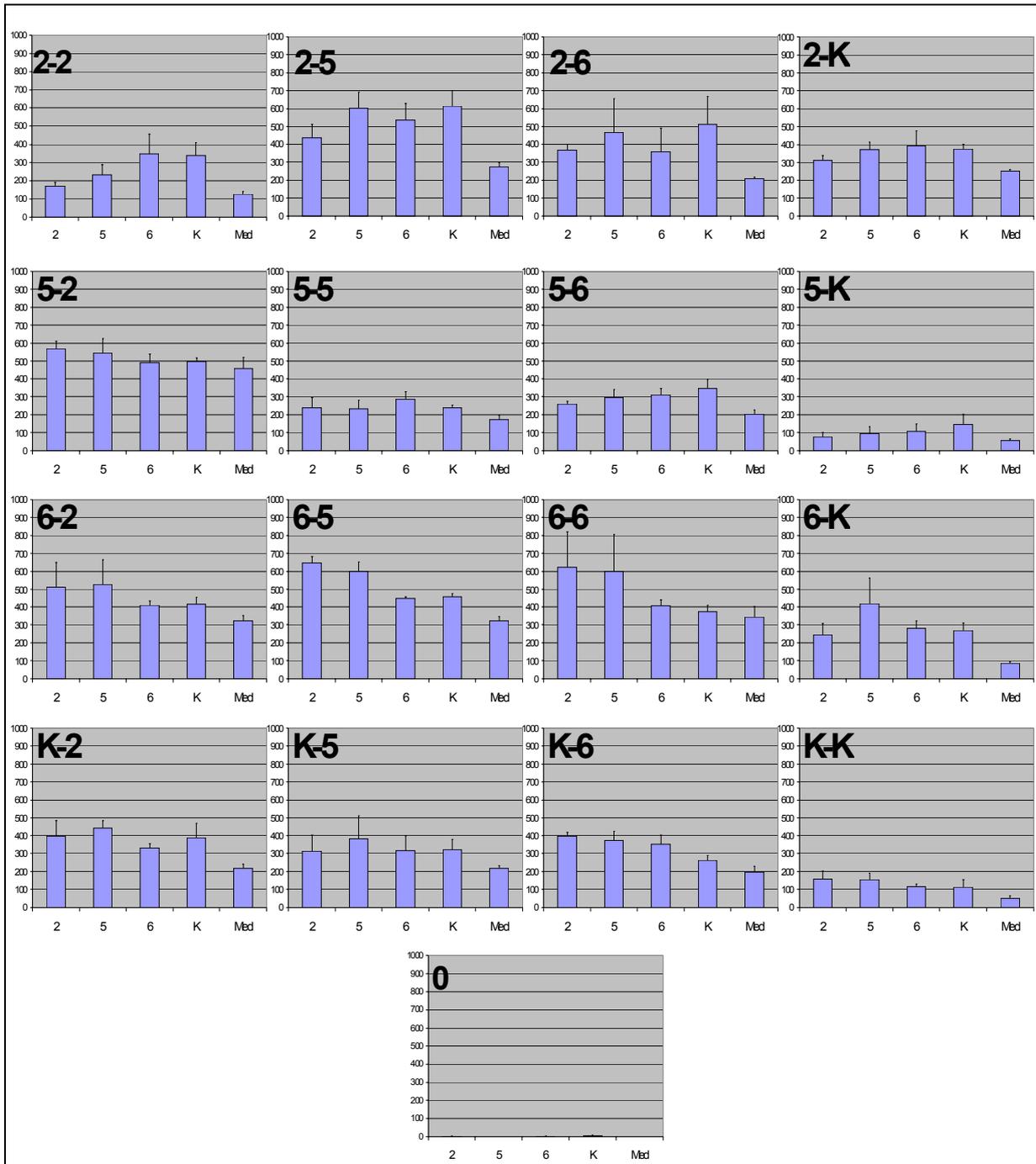


Abbildung 34: Zytotoxizitätsnachweis

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse des Zytotoxizitätsnachweises. Jeweils oben links ist die Abfolge der Stimulationen angegeben (erste Nummer oder Buchstabe gibt die Primärstimulation an, zweite die Sekundärstimulation). Als K ist die Stimulation mit 10% DMSO gepulsten T2-Zellen gekennzeichnet, mit 0 die unstimulierten T-Zellen. Die Abszissenbeschriftung gibt jeweils das Antigen an.

Die T-Zellen, die nicht stimuliert wurden, zeigten nach Inkubation mit den verschiedenen Zielzellen nur eine sehr geringe Freisetzung von Granzym B. Die verschieden gepulsten T2-Zellen ohne Zugabe von Effektorzellen setzten kein nachweisbares Granzym B frei (nicht dargestellt). Dagegen steigerte eine Kokultivierung der allogenen T-Zellen mit den

verschieden gepulsten T2-Zellen die Granzym B-Freisetzung nach Inkubation mit allen Zielzellen.

In allen Ansätzen zeigten die verschieden stimulierten Effektorzellen gegenüber dem Medium (kein Antigen) die geringste Aktivität. Bei Anwesenheit eines Antigens (peptidgepulste und DMSO-gepulste T2-Zellen) stieg hingegen in allen Proben die Granzym B-Aktivität. Dies spricht für das Vorhandensein alloreaktiver Zellen trotz Depletion. Vergleicht man die Zytotoxizitäten miteinander, so konnte keine überzeugende Korrelation mit der Primär- bzw. Sekundärstimulation bzw. eine Peptidspezifität festgestellt werden. Zwar war nach zweimaliger Stimulation mit T2-Zellen, welche entweder mit 10% DMSO oder mit einem schlecht bindenden Peptid (Peptid 5) primär gepulst und sekundär mit 10% DMSO gepulst worden waren (Ansätze „K-K“ bzw. „5-K“), kaum noch Aktivität nachweisbar und nach zweimaliger Stimulation mit dem gleichen Peptid (Ansätze „2-2“, „5-5“ und „6-6“) war die Aktivität gegenüber diesem Peptid geringer im Vergleich zu den anderen Peptiden (am ausgeprägtesten bei Peptid 6). Jedoch zeigte beispielsweise der Ansatz „2-K“ keine Spezifität für Peptid 2, wie dies bei Depletion alloreaktiver Zellen zu erwarten wäre. Vergleicht man die Werte der Ansätze, in welchen bei der 2. Stimulation mit DMSO-gepulsten Zellen stimuliert wurde miteinander (Ansätze „2-K“, „5-K“, „6-K“ und „K-K“), so fällt auf, dass jeweils in den Ansätzen, bei welchen gut bindende Peptide (Peptide 2 oder 6) zur Primärstimulation verwendet wurden, die Aktivität höher war. Gleiches gilt auch für die Ansätze, bei welchen die 2. Stimulation mit dem schlecht bindenden Peptid 5 durchgeführt worden war (Ansätze „2-5“ bis „K-5“). Somit scheint hier eine Korrelation zwischen Bindungs- und Stimulationsfähigkeit in der Primärstimulation bei geringer Peptidspezifität der stimulierten T-Zellen vorzuliegen.

5 Diskussion

Mit zunehmender Kenntnis über die molekularbiologischen Grundlagen der Immunabwehr und den sich daraus ergebenden Möglichkeiten, diese zu beeinflussen, eröffneten sich in den letzten Jahrzehnten verschiedene immuntherapeutische Strategien zur Tumorbekämpfung. Voraussetzung dieser Immuntherapieansätze ist die Antigenität des Tumors, die auf vielfältige Weise durch Manipulation der Tumorzellen oder des Immunsystems gesteigert werden kann. Insbesondere hat hierbei der Einsatz von zytotoxischen T-Zellen einen besonderen Stellenwert. Durch Stimulation der T-Zellen mit Tumorantigenen soll eine gezielte Abwehrreaktion gegen Tumorantigene ausgelöst werden. Dabei ist der Einsatz von allogenen T-Zellen für den adoptiven T-Zell-Transfer ein vielversprechender Ansatz. Die entscheidenden Vorteile sind dabei, dass eine mögliche eingeschränkte Reaktionsfähigkeit der T-Zellen, über die die Tumorpatienten häufig verfügen, umgangen wird und dass eine ausreichende Zellzahl von tumorreaktiven T-Zellen erreicht werden kann. In vielen Experimenten konnte eine spezifische Immunantwort gegen diverse Tumorzellen, z. B. bei Melanomen, induziert werden [Scheibenbogen et al., 2002]. Obwohl mehrfach eine Anti-Tumor-Aktivität der T-Zellen *in vitro* bewiesen wurde, waren bisher die *in vivo* Versuche ohne durchschlagende Erfolge.

Um eine effektive Tumorthherapie durch allogenen T-Zell-Transfer überhaupt zu erreichen, müssen bestimmte Kriterien erfüllt werden:

1. Die Antigene bzw. die Peptide, die zur Stimulation von allogenen T-Zellen verwendet werden, müssen auch von dem Tumor des Patienten präsentiert werden.
2. Die Antigene müssen suffizient von APCs präsentiert werden.
3. Es muss eine suffiziente immunologische Reaktionsfähigkeit der T-Zellen gegen das Antigen gewährleistet sein.
4. Eine GvH-Reaktion muss verhindert werden.

Als Antigene wurden in der vorliegenden Arbeit 7 verschiedene Peptide, die man prinzipiell in tumorspezifisch und gewebespezifisch einteilen kann, verwendet und untersucht. Als APCs bzw. Stimulatorzellen dienten HLA-A2 positive T2-Zellen [Heemels & Ploegh, 1995]. Dies sind Zellen mit einem defekten TAP-Gen, wodurch sie zu einer Präsentation endogener Peptide nicht fähig sind. Die auf der Zelloberfläche leeren und instabilen MHC-Moleküle können allerdings durch externe Zugabe von Peptiden stabilisiert werden und folglich zu einer peptidspezifischen Antigenpräsentation führen. Das Ausmaß der Antigenpräsentation ist dabei von dem Bindungsvermögen der Peptide an das HLA-A2-Molekül der T2-Zellen abhängig. In durchflusszytometrischen

Untersuchungen wurde die HLA-A2-Expression auf der Oberfläche von T2-Zellen nach Peptidinkubation gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Peptide eine Erhöhung der HLA-A2-Expression auf der Oberfläche von T2-Zellen und demnach eine suffiziente Peptidbindung bewirken können. Die Peptide 2 und 3 (aus dem gewebespezifischem Antigen CD79B) wiesen hierbei eine ca. doppelt so hohe HLA-A2-Floureszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle auf. Auch bei Peptid 7 (aus CD72) konnte eine signifikante Floureszenzerhöhung (1,6-fache HLA-A2-Floureszenz) gemessen werden, vgl. Abbildung 15. Von den aus Onkofusionsproteinen abgeleiteten Peptiden, die insgesamt betrachtet alle eine nur geringe Floureszenzerhöhung zeigten, wies das Peptid 6 (aus EWS/FLI-1) mit der 1,3 fachen HLA-A2-Floureszenzintensität im Vergleich zu der Kontrolle das höchste HLA-A2-Bindungsvermögen auf. Die übrigen Peptide wiesen eine Floureszenz ähnlich der Kontrolle auf und können somit als schlecht bindend betrachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen in etwa mit der *in silicio*-Vorhersage (entsprechend dem SEIFPEITHI- und dem Bimas-Score) überein. Anhand des errechneten Korrelationskoeffizienten $r=0,97$ bzw. des Bestimmtheitsmasses $r^2=0,94$ liegt ein statistischer linearer Zusammenhang zwischen den gemessenen HLA-A2-Floureszenzen und dem SYFPEITHI-Score vor. Bei der Überprüfung des Zusammenhangs zwischen den gemessenen Werten und dem Bimas-Score ergibt sich ein Korrelationskoeffizienten von $r=0,66$ bzw. ein Bestimmtheitsmass von $r^2=0,43$. Zusammengefasst zeigen somit die gemessenen Werte eine sehr gute Korrelation mit dem SEIFPEITHI-Score und eine geringere Korrelation mit dem Bimas-Score an.

Aufgrund der geringen Zahl an verwendeten Peptiden kann aus diesen Daten nicht auf die Qualität der Vorhersage-Algorithmen geschlossen werden. Daten aus der Literatur zeigen, dass verschiedene Algorithmen zu unterschiedlichen Vorhersagen über Bindungswahrscheinlichkeiten gelangen [Hassainya et al., 2005; Larsen et al., 2005]. Von Peptiden mit vorhergesagter guter Bindungseigenschaft binden hierbei in der Regel nicht alle. So konnten Elkington et al. von mittels BIMAS und SYFPEITHI vorhergesagten 149 Peptiden nur für 94 Peptide im HLA-Stabilisierungs-Test wirklich Bindung nachweisen, also in einer ähnlichen Größenordnung wie in der vorliegenden Arbeit [Elkington et al., 2003].

Ob T2-Zellen als suffiziente spezialisierte APCs agieren und so eine effiziente T-Zell-Stimulierung bewirken können, wurde durch die Stimulierung von T-Zellen mit den verschieden peptidgepulsten T2-Zellen näher untersucht. Als T-Zell-Spender eignet sich hierbei zunächst unabhängig vom HLA-Haplotyp jeder beliebige Spender. Allerdings muss man bei der Generierung von tumorspezifischen T-Zellen bedenken, dass HLA-A2

positive Spender prinzipiell den HLA-A2 negativen überlegen sind, da sie das HLA-A2-Molekül nicht als „fremd“, d. h. als Alloantigen, erkennen und damit eine geringere Alloreaktivität vorliegt. Demgegenüber ist bei der Gewinnung von gewebespezifischen T-Zellen der T-Zell-Spender überlegen, der nicht mit dem HLA-Haplotyp der Stimulatorzellen übereinstimmt. Denn bei gleichen HLA-Haplotyp liegt eine Toleranz dem gewebespezifischen Antigen gegenüber vor, was daher nicht mit hoher Avidität von den T-Zellen erkannt werden kann.

Nach Bestimmung der HLA-A2-Zugehörigkeit der T-Zellen in FACS-Analysen wurden die verschiedenen gepulsten T2-Zellen zum einen mit HLA-A2 positiven T-Zellen und zum anderen mit HLA-A2 negativen T-Zellen inkubiert. Täglich wurden die CD8- und die CD69-Floureszenz sowie die entsprechenden Isotypkontrollen gemessen. Anhand dieser Messungen konnte der kinetische Verlauf bzw. die gegebenenfalls vorliegenden peptidspezifischen Unterschiede dargestellt werden. Bei fast allen Proben zeigte es sich, dass die aktivierten zytotoxischen T-Zellen nach anfänglicher Abnahme allmählich zunahmten bis sie ein Maximum am 5. bis 6. Tag erreicht hatten. Danach sank die CD69-Floureszenz aufgrund des Antigenverbrauches und der damit verbundenen fehlenden Stimulation. Ein solcher kinetischer Verlauf wurde bereits in anderen Studien bzw. Veröffentlichungen in ähnlicher Form beschrieben [Mamalaki et al., 1993]. Die gemessene Kinetik zeigte hierbei weder in Abhängigkeit vom HLA-Haplotyp der T-Zellen noch in Abhängigkeit vom eingesetzten Peptid signifikante Unterschiede.

Um peptidspezifische Unterschiede aufzuzeigen, wurde das N-fache der CD69-Floureszenz von jeder Probe zur CD69-Floureszenz der T-Zellen, die mit ungepulsten T2-Zellen stimuliert worden waren (als Maß der Alloreaktivität), berechnet, vgl. Abbildung 21. Aus dieser Abbildung werden deutliche Unterschiede in der CD69-Aktivität in Abhängigkeit vom HLA-Haplotyp erkennbar: HLA-A2 negative T-Zellen sind stärker aktivierbar als HLA-A2 positive T-Zell-Spender. Dies war zu erwarten, da HLA-A2 negative T-Zellen neben dem Peptid auch das HLA-A2-Molekül der T2-Zellen als „fremd“ erkennen und infolgedessen aktiviert werden. Die daraus resultierende höhere Alloreaktivität bei vergleichsweise geringer Peptidspezifität äußert sich in den hohen CD69-Floureszenzen, aber geringen peptidspezifischen Unterschieden. Die Ergebnisse der Messungen zeigen, dass T-Zellen, die mit verschiedenen peptidgepulsten T2-Zellen inkubiert worden waren, eine höhere Aktivität als die Kontrolle aufwiesen. Eine Ausnahme hierbei nahmen die mit Peptid 7 (aus CD72) gepulsten T-Zellen ein. Die CD69-Floureszenzen korrelieren allerdings nicht mit dem Bindungsvermögen der einzelnen Peptide an die T2-Zellen, so dass dieser Effekt nicht auf eine Peptidspezifität zurückgeführt werden kann. Demgegenüber sollten die HLA-A2

positiven T-Zellen aufgrund der Toleranz für das HLA-A2-Molekül eine geringere Alloreaktivität und damit verbunden eine größere Peptidspezifität aufweisen. In Abbildung 21 zeigt das Peptid 6 (aus dem tumorspezifischem Antigen EWS/FLI-1) als einzigstes Peptid eine höhere CD69-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle mit 10% DMSO. Nach der Peptidbindungsstudie und in Anbetracht der Tatsache, dass die Peptide 2, 3 und 7 als gewebespezifisch anzusehen sind und daher die T-Zellen diesen Peptiden gegenüber tolerant sind und eine peptidspezifische Aktivierung nur geringfügig bzw. gar nicht möglich ist, waren diese Ergebnisse auch erwartet worden. Ob das Peptid 6 auch *in vivo* von Ewing-Tumorzellen präsentiert und möglicherweise als Zielantigen für zytotoxische T-Zellen dienlich ist, ist zur Zeit ungeklärt.

Die Ergebnisse belegen, dass die Generierung von peptidspezifischen T-Zellen nicht das vorrangige Problem ist, sondern vielmehr die Etablierung einer ausreichenden Zahl von peptidspezifischen Zellen vor dem Hintergrund der hohen Alloreaktivität bei der Verwendung von allogenen T-Zellen. Gerade bei der Zielsetzung derartige Zellen zum adoptiven Transfer in Patienten zu verwenden kommt der Depletion von diesen alloreaktiven T-Zellen die wichtige Aufgabe zu, eine GvH-Reaktion zu verhindern bzw. zu minimieren. Allerdings steigt mit der Depletion auch das Risiko einer Infektion oder eines Tumorrezidivs [Hartwig et al., 2002]. Eine effiziente Immuntherapie ist nur durch eine selektive Eliminierung aller empfängerreaktiven T-Zellen unter Beibehalt aller anderen T-Zellen, die Infektionserreger, Tumorantigene oder die bestimmte Tumor-Histokompatibilitätsantigene erkennen können, möglich. Um das zu erreichen, sind verschiedene Ansätze denkbar bzw. schon in ihrer experimentellen Erprobung, wie z. B. Antikörper gekoppelt mit einem Immuntoxin, der Gentransfer von Suizidgenen in Spender T-Zellen, das Blockieren von kostimulierenden Signalen, das Einsetzen von Zytokinen, Markieren und Eliminieren von alloreaktiven T-Zellen mit MicroBeads oder eine frühe T-Zell-Reaktivierung. Die letzten beiden Möglichkeiten wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Bei der Depletion mittels der immunomagnetischen IFN- γ -Markierung zeigte sich, dass nach unspezifischer Stimulation und Eliminierung von IFN- γ -produzierenden (alloreaktiven) und nachfolgender Stimulation mit dem gut bindenden Peptid 2 und dem schlecht bindenden Peptid 5 bzw. mit den Kontrollen sowohl HLA-Typ-abhängige als auch peptidabhängige Unterschiede beobachtet wurden. HLA-A2 negative Zellen zeigten im Vergleich zu den HLA-A2 positiven Zellen einen geringeren Depletionseffekt (vgl. Abbildung 23), was aufgrund der fehlenden HLA-Übereinstimmung zwischen den HLA-A2 negativen T-Zellen und HLA-A2 positiven T2-Zellen nicht erwartet wurde. Gründe dafür könnten in der nicht ausreichenden Depletion der alloreaktiven Zellen

durch z. B. eine zu geringe IFN- γ -Produktion der alloreaktiven Zellen oder die nach der zweiten Stimulation einsetzende hohe Aktivierung und damit eine hohe Wachstumsrate sein. Desweiteren könnten auch andere nicht untersuchte spenderspezifische Eigenschaften dafür verantwortlich sein. Sowohl bei den HLA-A2 positiven als auch bei den HLA-A2 negativen T-Zellen wurde die höchste N-fache CD8-Floureszenz durch Stimulation mit Peptid 2, was als gut bindendes gewebespezifisches Peptid ermittelt wurde, erzielt. Vergleicht man die beiden N-fachen Floureszenzen in Abbildung 24 miteinander, so stellt man fest, dass die Floureszenz bei den HLA-A2 negativen T-Zellen höher ist. Dies ist mit der geringeren Toleranz der HLA-A2 negativen T-Zellen gegenüber an den HLA-A2 positiven T2-Zellen gebundenem Peptid 2 zu erklären und könnte einen Hinweis auf die Generierung und das Wachstum peptidspezifischer T-Zellen geben.

Analog zum IFN γ -Versuchsaufbau erfolgte auch die Depletion unter Nutzung des AICDs durch kurz aufeinanderfolgende Stimulationen. Es zeigte sich, dass - im Gegensatz zum IFN- γ -Sekretionsanalyse - bei den HLA-A2 negativen T-Zellen nach Zweitstimulation ein deutlich höherer Depletionseffekt erzielt wurde als bei den HLA-A2 positiven Zellen, vgl. Abbildung 26. Die Inkompatibilität der HLA-A2 negativen T-Zellen zu den HLA-A2 positiven T2-Zellen induziert eine ausgeprägte Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen. Dies verursachte vermutlich die erheblich höhere Depletionsrate. Wenn man sich die Abbildung 27 betrachtet, fällt die signifikant erhöhte N-fache CD8-Floureszenz der HLA-A2 negativen T-Zellen, die in der Zweitstimulation mit Peptid 2 aktiviert wurden, auf. Das spricht für die Generierung von peptidspezifischen Zellen. Im Gegensatz dazu hatte die Zweitstimulation bei den HLA-A2 positiven T-Zellen keinen Einfluss auf diesen Parameter. Die in Abbildung 28 deutlich erhöhte mittlere Floureszenzintensität der aktivierten, HLA-A2 negativen CTLs, welche sekundär mit dem Peptid 2 stimuliert wurden, könnte ebenfalls durch die Generierung von peptidspezifischen T-Zellen hervorgerufen sein. Für die gleichfalls hohe mittlere Floureszenzintensität der HLA-A2 positiven T-Zellen, die sekundär mit T2-Zellen mit 10% DMSO stimuliert wurden, liegen möglicherweise spenderspezifische Eigenschaften zugrunde.

Um diese Ergebnisse weiterführend zu untersuchen, wurden HLA-A2 negative T-Zellen primär mit den Peptiden 2, 5, 6 bzw. mit der Kontrolle stimuliert. Jede Probe wurde daraufhin sekundär ebenfalls mit den Peptiden 2, 5, 6 und der Kontrolle restimuliert, vgl. Versuchsaufbau Abbildung 29. Neben den in den vorhergehenden Experimenten eingesetzten Peptiden 2 und 5 wurde hierbei das Peptid 6 verwendet. Peptid 6 ist ein tumorspezifisches und mittelmäßig bindendes Peptid. Der Depletionseffekt wurde anhand der CD8-, CD69-, HLA-DR- und der CD25-Floureszenz durchflusszytometrisch gemessen, vgl. Abbildung 30 bis 33. CD69, HLA-DR und CD25 sind Marker für den

Aktivierungszustand von Zellen. Keiner der drei verwendeten Aktivierungsmarker wies nennenswerte Unterschiede im Fluoreszenzverhalten in gleichen Proben auf. Folglich kann für eine Stimulationsmessung bzw. zur Depletionseffektverifizierung anstelle der Verwendung der CD69-Fluoreszenz ebenso die HLA-DR- oder CD25-Fluoreszenz angewendet werden.

In Abbildung 30 ist dargestellt, dass die Wirkung der Primärstimulation nicht mit der Wirkung der Sekundärstimulation übereinstimmt. Der grösste Depletionseffekt wurde mit einer unspezifischen Primärstimulation unabhängig von der Sekundärstimulation (mit Ausnahme der spezifischen Primärstimulation und der Sekundärstimulation mit 10% DMSO gepulsten T2-Zellen) erreicht. Die Effekte der Primärstimulation waren dabei durchaus verschieden. Mit einer unspezifischen Primärstimulation konnten mehr alloreaktive Zellen aktiviert und (unabhängig von der Sekundärstimulation) depletiert werden als mit einer spezifischen Primärstimulation. Die effizientere Eliminierung der alloreaktiven Zellen verdeutlicht sich auch in den erkennbaren Unterschieden der verschiedenen Peptide. Die Anzahl der CD8 positiven Zellen, die sekundär mit Peptid 2 und 6 stimuliert waren, war grösser als in Proben, die eine unspezifische Sekundärstimulation erfahren hatten. Bei der Auswertung der zugehörigen Aktivierungsmarker CD69, HLA-DR und CD25 fällt auf, dass bei einer unspezifischen Primärstimulation nur nach Sekundärstimulation mit Peptid 2 signifikante Unterschiede erreicht wurden. Dies bestätigt die Behauptung, peptidspezifische T-Zellen generiert zu haben. Die Sekundärstimulation mit Peptid 6 hingegen bewirkte keine Unterschiede. Vermutlich reichte das nur mäßige Bindungsvermögen nicht aus, um eine suffiziente Antigenpräsentation und damit Aktivierung peptidspezifischer T-Zellen zu erreichen. Ging nun der zweiten Stimulation eine spezifische Primärstimulation voraus, zeigte die Fluoreszenz der Aktivierungsmarker mit Ausnahme des Peptides 5 keine erheblichen Unterschiede auf. D. h. T-Zellen scheinen bei Verwendung von Peptid 5 im Vergleich zur Kontrolle noch zusätzlich Faktoren erkennen und dadurch aktiviert werden zu können.

Ob die depletierten und stimulierten T-Zellen auch funktionell aktiv waren, wurde mittels Granzym B-ELISpot überprüft. Dieser Test zeigte zwar eine Granzym B-Freisetzung der T-Zellen, diese war aber antigen- bzw. peptidunspezifisch, vgl. Abbildung 34. Ein Grund dafür könnte sein, dass eine unzureichende Depletion der alloreaktiven Zellen erfolgte. Da dieser Versuch mit allogenen und nicht mit dem HLA-Typ der T2-Zellen übereinstimmenden T-Zellen durchgeführt wurde, ist das Verhältnis der Frequenz der alloreaktiven Zellen zur Frequenz der peptidspezifischen überaus hoch und die Etablierung von einer Peptidspezifität bzw. peptidspezifischen Zellyse trotz Depletion schwierig. Zugleich könnten auch T-Zellen generiert worden sein, die zwar

peptidspezifisch sind, aber keine effiziente Granzym B-Freisetzung auslösen können. Dafür könnten TCRs mit einer zu geringen Affinität zum Tumorantigen verantwortlich sein. Zudem ist es durchaus vorstellbar, dass die Peptide auch an andere in dieser Arbeit nicht berücksichtigte HLA-Moleküle der T2-Zellen binden und demzufolge die Spender T-Zellen aktivieren. Beispielsweise zeigt das an dem schlecht HLA-A2-Molekül bindende Peptid 5 ein hohes Bindungsvermögen zu anderen HLA-Molekülen, beispielsweise zum HLA-A1-Molekül (SYFPEITHI-Score: 23; Bimas-Score: 1,5). Andererseits sind die mHA nicht zu vernachlässigen [Goker et al., 2001]. Diese Antigene sind polymorphe endogene Peptide, die von Zellproteinen abstammen. Sie werden im Zytosol der Zelle prozessiert, in das ER transportiert und an die HLA-Moleküle gebunden [Townsend & Bodmer, 1989]. Ob mHAs überhaupt eine GvH-Reaktion induzieren können, ist noch nicht vollständig geklärt [Koh et al., 1999]. Anscheinend sind Lymphozyten in der Lage, diese feinen Unterschiede in der Antigenpräsentation zu erkennen. Dahingehende Experimente konnten zeigen, dass HLA-identische Unterschiede existieren. Zusätzlich sind auch die NK-Zellen von erheblicher Relevanz und von noch unbestimmtem Einfluss. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass auch sie zur Zellyse fähig sind und somit sowohl einen GvH- als auch einen GvT-Effekt hervorrufen können, vgl. [Hummel et al., 2002].

Zusammengefasst zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Versuchsergebnisse, dass weder mittels IFN- γ -Depletion noch mit AICD-Depletion eine ausreichend effiziente Trennung von alloreaktiven und peptidspezifischen allogenen T-Zellen erreicht werden konnte. Zwar sprechen die Ergebnisse dafür, dass neben alloreaktiven auch solche T-Zellen generiert wurden, die gegen die eingesetzten Peptide reagierten, jedoch wurde diese Aktivität auch nach Depletion von Alloreaktivität überlagert.

Zu den vorgestellten Schwierigkeiten für einen erfolgreichen adoptiven T-Zell-Transfer *in vitro* kommen die Probleme, die *in vivo* auftreten. In klinischen Versuchen konnte in Tumorpatienten eine Immunantwort gegen Tumorantigene nachgewiesen werden [Jager et al., 2002]. Allerdings belegen viele Studien, dass der Tumor im Verlauf der Erkrankung die Expression von MHC-Klasse-I-Antigenen reduziert bzw. sogar vollständig einstellt oder suppressive Faktoren ausschüttet, um der Erkennung und damit der Zerstörung durch tumorspezifische T-Zellen zu entgehen [Jager et al., 1996]. Eine effektive Tumorlyse kann aber auch durch die genetische Instabilität bzw. die Tumorerheterogenität erschwert werden [Fleuren et al., 1995]. In operativ entfernten Tumoren liessen sich multiple Antigene unterschiedlicher Spezifität und Genese simultan nachweisen [Coulie et al., 1999]. Man geht davon aus, dass sich die Antigenität von Tumoren im Verlauf der Erkrankung ändert. Für eine erfolgreiche Tumorregression ist es

daher erforderlich, simultan mit allen relevanten Tumorantigenen zu immunisieren. Dabei muss jedoch die erhöhte Induktion einer möglichen Autoimmunität, die durch die gleichzeitige Präsenz der Tumorantigene auf transformierten und auf nicht entarteten Zellen hervorgerufen wird, als kritisch bewertet werden [Ludewig et al., 2000]. Zudem ist die Tumorgröße als problematisch anzusehen, wodurch es trotz ausreichender Anzahl von tumorspezifischen T-Zellen oftmals bei einem grossen Tumor durch die erschwerte Penetration keine ausreichende Reduktion der Tumorzellen bewirkt werden kann.

Ein Einsatz von allogenen depletierten T-Zellen für eine mögliche *in vivo* Immuntherapie im Sinne eines adoptiven T-Zell-Transfers erscheint daher fraglich. Dennoch bleibt der Ansatz hoch attraktiv. Wie kürzlich gezeigt wurde [Matsushita et al., 2006] lassen sich aus dem Blut erfolgreich allogene transplantierte Leukämiepatienten T-Zellen isolieren, welche Alloantigene des Empfängers erkennen und denen eine mögliche Rolle im Rahmen einer GvL-Reaktion zugesprochen wird. Neben gewebespezifischen Antigenen werden von solchen T-Zellen auch allogene HLA-Determinanten (in der zitierten Arbeit Klasse-II-MHC-Moleküle) erkannt, welche aufgrund der Restriktion der Expression dieser Antigene auf hämatopoietische Zellen als quasi-gewebespezifisch anzusprechen sind. Dies zeigt, dass ein „intelligenter HLA-Mismatch“ zwischen Spender und Empfänger auch ohne *in vitro*-Vorbehandlung der Zellen durchaus therapeutisch ausnutzbar sein könnte. Die Optimierung der *in vitro*-Depletion alloreaktiver Zellen mit GvHD-Potenz könnte diesen Ansatz jedoch wesentlich bereichern, insbesondere um die Gefahr einer schweren GvHD zu minimieren.

Da die komplette Depletion alloreaktiver Zellen nach den in dieser Arbeit vorgelegten Befunden zumindest mit den hier eingesetzten Methoden nicht die nötige Effizienz aufweist, sind hierzu alternative Methoden zu entwickeln. Bei Kenntnis der relevanten Antigene wäre eine gezielte Stimulation mit diesen Antigenen möglich, um anschließend die gewonnenen T-Zellen (als Mischung aus alloreaktiven und den gewünschten T-Zellen) entweder mittels Grenzverdünnungsverfahren oder durch Klonierung der entsprechenden T-Zell-Rezeptoren und Transfer dieser Rezeptoren in T-Zellen des Empfängers die gewünschten Spezifitäten von ungewünschten Alloreaktivitäten zu isolieren [Staege & Burdach, 2003]. Aufgrund des erheblichen experimentellen und des damit verbundenen hohen zeitlichen Aufwandes bleibt es jedoch fraglich, ob diese Strategie zur Behandlung eines größeren Patientenkollektives geeignet sein wird.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die körpereigene Abwehr zur Bekämpfung des Tumors zu nutzen ist schon lange ein faszinierender Traum. Die entscheidenden Vorteile der immunologischen Tumorthapie im Vergleich zu den „konventionellen“ Methoden liegen in der erhofften höheren Tumorspezifität bei geringeren Nebenwirkungen sowie in dem breiteren Einsatzspektrum.

In dieser Arbeit wurde der immuntherapeutische Ansatz für die Behandlung von Tumoren mittels allogenen T-Zell-Transfer vorgestellt und näher untersucht. Als Stimulatorzellen wurden T2-Zellen eingesetzt, die mit verschiedenen tumor- und gewebespezifischen Antigenen gepulst wurden. In durchflusszytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Intensität der HLA-A2-Floureszenz und damit dem Bindungsvermögen der Peptide mit dem SYFPEITHI-Score sehr gut korreliert und mit dem Bimas-Score geringer korreliert.

Die gepulsten T2-Zellen wurden danach mit allogenen HLA-A2 positiven und HLA-A2 negativen T-Zellen inkubiert, um diese zu aktivieren. Anhand der CD8- und CD69-Floureszenz ließ sich eine Kinetik aufnehmen, die weder eine Antigen-spezifität noch eine HLA-Haplotyp-Spezifität erkennen liess. Das Stimulationsmaximum war nach 5 bis 6 Tagen erreicht. Auffällig war, dass bei den HLA-A2 negativen Zellen kaum peptidspezifische Unterschiede bestanden, während Peptid 6 (aus EWS/FLI-1) bei den HLA-A2 positiven Zellen eine signifikante Erhöhung in der Expression von CD69 bewirkte. Da dieses Peptid aus der Fusionsregion des Ewing-Tumor-spezifischen EWS/FLI-1-Onkogens stammt, könnte dies für die Entwicklung einer Ewing-Tumor-spezifischen Immuntherapie durchaus interessant sein. Ob dieses Peptid hierzu geeignet ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

In weiteren Experimenten wurde die Depletierbarkeit mittels IFN- γ -Sekretionsanalyse und durch aufeinanderfolgende Stimulationen unter Nutzung des AICDs analysiert. Es zeigte sich, dass ein grösserer Depletionseffekt durch kurz aufeinanderfolgende Stimulationen erzielt wurde. Das laut Bindungsstudie gut bindende Peptid 2 (aus dem gewebespezifischem Antigen CD79B) erlangte besondere Bedeutung, da sowohl durch IFN- γ -Depletion als auch durch AICD-Depletion eine signifikant erhöhte CD8- und CD69-Floureszenz erreicht wurde, was für die Generierung und Selektion von peptidspezifischen T-Zellen spricht. Der Depletionseffekt durch AICD-Depletion wurde weiter untersucht, in dem HLA-A2 negative Zellen verschieden primär und sekundär stimuliert wurden. Dabei war festzustellen, dass die Wirkung der Primärstimulation nicht mit der Wirkung der Sekundärstimulation übereinstimmte. Offensichtlich kann eine

unspezifische Primärstimulation einen höheren Depletionseffekt bei einer höheren Peptidspezifität erreichen. Dies wurde besonders bei Peptid 2 deutlich. Bei Peptid 6 war vermutlich das nur mäßige Peptidbindungsvermögen für eine Peptidspezifität nicht ausreichend. Hingegen löst eine spezifische Primärstimulation mit nachfolgender unspezifischen Sekundärstimulation keine Peptidspezifität aus, allerdings scheint Peptid 5 (aus EWS/FLI-1) als Sekundärstimulation mit den hohen Fluoreszenzwerten eine Ausnahme zu bilden. Ob dies auf die Erkennung des Peptides oder auf Erkennung anderer Determinanten beruht, kann nicht gesagt werden.

Um die Funktionalität dieser allogenen und depletierten T-Zellen zu überprüfen, wurde die Freisetzung von Granzym B durch diese Zellen ermittelt. Im Granzym B-ELISpot konnte keine signifikante Peptidspezifität zwischen den verschiedenen Ansätzen festgestellt werden.

Zusammenfassend konnten von den in dieser Arbeit untersuchten Peptiden für das tumorspezifische Peptid 6 (aus EWS/FLI-1) und das gewebespezifische Peptid 2 (aus CD79B) Hinweise auf eine mögliche Immunstimulation durch diese Peptide gewonnen werden. Ob diese Peptide auch endogen von Tumorzellen prozessiert und in Kombination mit HLA-A2 präsentiert werden, bedarf weiterer Untersuchungen. Die Generierung peptidspezifischer Zellen zur Induktion einer gezielten Tumorabwehr wäre möglicherweise eine immuntherapeutisch hochinteressante Alternative. So könnte eine Immunisierung mit den Peptiden für HLA-A2-positive Patienten mit Ewing-Tumoren (Peptid 6) oder für Patienten mit Leukämien der B-Zellreihe nach allogener Transplantation (Peptid 2) eine interessante Behandlungsstrategie darstellen und für die Zukunft sicherlich eine Bereicherung zum bisher bestehenden Behandlungsspektrum sein.

Die Problematik hinsichtlich der Generierung von peptidspezifischen T-Zellen und deren Induktion einer peptidspezifischen Zellyse verdeutlicht die vielen offenen Fragen bzw. die noch zahlreichen Hindernisse, die beantwortet bzw. überwunden werden müssen, bis eine spezifische effiziente Immuntherapie durchgeführt werden kann. Schon 1929 schrieb W. H. Woglom: „Eine Immunisierung gegen einen Tumor zu erreichen dürfte so schwierig sein, wie das rechte Ohr abzustossen und dabei das linke nicht zu beschädigen.“ zitiert nach [Rosenberg, 1999]. Seit dieser Zeit sind zwar viele Fortschritte und neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Tumormunologie erzielt worden, doch das Immunsystem ist in seiner Komplexität und möglichen Beeinflussbarkeit noch nicht hinreichend erforscht. Es stehen noch zahlreiche Versuche aus, um eine effektive und nebenwirkungsfreie klinische Einsatzfähigkeit garantieren zu können.

7 Literaturverzeichnis

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.: Immunologie. 2. Auflage. Verlag Hans Huber, Bern, 1996

Abraham L.M., Selva D., Casson R., Leibovitch I.: Mitomycin: clinical applications in ophthalmic practice 66 (2006) 321-340

Adams H.P., Koziol J.A.: Prediction of binding to MHC class I molecules. J Immunol Methods 185 (1995) 181-190

André-Schmutz I., Le Deist F., Hacein-Bey-Abina S., Vitetta E., Schindler J., Chedeville G., Vilmer E., Fischer A., Cavazzana-Calvo M.: Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. Lancet 360 (2002) 130-137

Baumann S., Krueger A., Kirchhoff S., Krammer P.H.: Regulation of T cell apoptosis during the immune response. Curr Mol Med 2 (2002) 257-272

Bell J.I.: Molecular anatomy of the immune response. Immunol Rev 163 (1998) 5-10

Bendandi M., Gocke C.D., Kobrin C.B., Benko F.A., Sternas L.A., Pennington R., Watson T.M., Reynolds C.W., Gause B.L., Duffey P.L., Jaffe E.S., Creekmore S.P., Longo D.L., Kwak L.W.: Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against lymphoma. Nat Med 5 (1999) 1171-1177

Bendandi M., Longo D.L.: Biologic therapy for lymphoma. Curr Opin Oncol 11 (1999) 343-350

Bodmer W.F., Browning M.J., Krausa P., Rowan A., Bicknell D.C., Bodmer J.G.: Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. Ann NY Acad Sci 690 (1993) 42-49

Boon T., Van der Bruggen P.: Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. J Exp Med 183 (1996) 725-729

Boon, T.: Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes: present perspectives for specific immunotherapy. Int J Cancer 54 (1993) 177-180

Borst J., Jacobs H., Brouns G.: Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes. Curr Opin Immunol 8 (1996) 181-190

Brostoff S., Scadding G.K., Male D., Roitt I.M.: Klinische Immunologie. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, 1993

Bühling K.J., Lepenies J., Witt K.: Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. 2. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2000

Burdach S., Nürnberger W., Göbel U.: Hematopoietic stem cell transplantation: Principles and practice. Schweiz Rundsch Med Prax 85 (1996) 741-748

Burdach S., van Kaick B., Laws H.J., Ahrens S., Haase R., Korholz D., Pape H., Dunst J., Kahn T., Willers R., Engel B., Dirksen U., Kramm C., Nürnberg W., Heyll A.,

Ladenstein R., Gadner H., Jurgens H., Goel U.: Allogeneic and autologous stem-cell transplantation in advanced Ewing tumors. An update after long-term follow-up from two centers of the European Intergroup study EICESS. Stem-Cell Transplant Programs at Düsseldorf University Medical Center, Germany and St. Anna Kinderspital, Vienna, Austria. *Ann Oncol.* 11 (2000) 1451-1462

Burdach S.: Th granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF): basic science and clinical application. *Klin Padiatr* 203 (1991) 302-310

Burnet F.M.: The nobel lectures in immunology. The nobel prize for physiology or medicine, 1960. Immunologic recognition of self. *Scand J Immunol* 33 (1991) 3-13

Buus S: Description and prediction of peptide-MHC binding: the `human MHC project`. *Curr Opin Immunol* (1999) 11209-11213

Cerdan C., Martin Y., Courcoul M., Mawas C., Birg F., Olive D.: CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2-receptor. *Res Immunol* 146 (1995) 164-168

Chai J.G., Vendetti S., Bartok I., Schoendorf D., Takacs K., Elliot J., Lechler R., Dyson J.: Critical role of costimulation in the activation of naive antigen-specific TCR transgenic CD8+ T cells in vitro. *J Immunol* 163 (1999) 1298-1305

Chaux P., Vantomme V., Stroobant V., Thielemans K., Corthals J., Luiten R., Eggermont A.M., Boon T., van der Bruggen P.: Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes. *J Exp Med* 189 (1999) 767-778

Coley W.B.: Contribution to the knowledge of sarcoma. *Annals of surgery* 14 (1891) 199-220

Coley W.B.: The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sciences* 105 (1893) 487-511

Coley W.B: Late results of the treatment in inoperable sarcoma by the mixed toxins of erysipelas and bacillus prodigiosus. *Am J Med Sciences* 131 (1906) 375-430

Collins E.J., Frelinger J.A.: Altered peptide ligand design: altering immune responses to class I MHC/peptid complexes. *Immunol Rev* 163 (1998) 151-160

Coulie P.G., Ikeda H., Baurain J.F., Chiari R.: Antitumor immunity at work in a melanoma patient. *Adv Cancer Res* 76 (1999) 213-242

Cragg M.S., French R.R., Glennie M.J.: Signaling antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11 (1999) 541-547

Darzynkiewicz Z., Robinson J.P., Crissman H.A.: Flow Cytometry. Academic Press, San Diego. 1994.

Davis M.M., Bjorkman P.J.: T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334 (1988) 395-402.

Dellas C.: Crashkurs Pharmakologie. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2003

- Dilloo D., Laws H.J., Hanenberg H., Körholz D., Nürnberger W., Burdach S.E.: Induction of two distinct natural killer-cell populations, activated T cells and antineoplastic cytokines, by interleukin-2 therapy in children with solid tumors. *Ecp Hematol* 22 (1994) 1081-1088
- Disis M.L., Cheever M.A.: HER-2/neu oncogenic protein: issues in vaccine development. *Crit Rev Immunol* 18 (1998) 37-45
- Dockhorn-Dworniczak B., Schafer K.L., Dantcheva R., Blasius S., van Valen F., Burdach S., Winkelmann W., Jurgens J., Bocker W.: Detection of EWS-/FLI-1 gene fusion transcripts by RT-PCR as a tool in the diagnosis of tumors of the Ewing sarcoma group. *Verh Dtsch Ges Pathol* 78 (1994) 214-219
- Dranoff G.: GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol Rev* 188 (2002) 147-154
- Elkington, R., Walker S., Crough T., Menzies M., Tellam J., Bharadwaj M., Khanna R.: Ex vivo profiling of CD8⁺-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J. Virol.* 77 (2003) 5226
- Fleuren G.J., Gorter A., Kuppen P.J.K., Litvinov S., Warnaar S.O.: Tumor heterogeneity and immunotherapy of cancer. *Immunol Rev* 145 (1995) 91-113
- Gemsa D., Kalden J.R., Resch K.: *Immunologie*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997
- Germain R.N., Margulies D.H.: The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 11 (1993) 403-450
- Goker H., Haznedaroglu I.C., Chao N.J.: Acute graft-vs-host disease: Pathobiology and management. *Exp Hematol* 29 (2001) 259-277
- Goldenberg D.M.: The role of radiolabeled antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: the coming of age of radioimmunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 39 (2001) 195-201
- Gonzalo J.A., Delaney T., Corcoran J., Goodearl A., Gutierrez-Ramos J.C., Coyle A.J.: Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 166 (2001) 1-5
- Green D.R., Scott D.W.: Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 6 (1994) 476-487
- Grigg A., Ritchie D.: Graft-versus-lymphoma effects: clinical review, policy proposals, and immunobiology. *Biol Blood Marrow Transplant* 9 (2004) 579-90
- Gudmundsdottir H., Wells A.D., Turka L.A.: Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* 162 (1999) 5212-5223
- Hartwig U.F., Robbers M., Wickenhauser C., Huber C.: Murine acute graft-versus-host disease can be prevented by depletion of alloreactive T lymphocytes using activation-induced cell death. *Blood* 8 (2002) 3041-49

- Hassainya Y., Garcia-Pons F., Kratzer R., Lindo V., Greer F., Lemonnier F.A., Niedermann G., van Endert P.M.: Identification of naturally processed HLA-A2-restricted proinsulin epitopes by reverse immunology. *Diabetes* 54 (2005) 2053-2059
- Heemels M.-T., Ploegh H.L.: Generation, translocation and presentation of MHC class-I restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 64 (1995) 463-491
- Heiss M.M., Lamerz R., Lersch C., Schlimok G., Weber B.: Tumorummunologie und Tumorendokrinologie. *Manual Gastrointestinale Tumoren* (2001) 58-63
- Henry J., Miller M.M., Pontarotti P.: Structure and evolution of the extended B7 family. *Immunol Today* 20 (1999) 285-288
- Houghton A.N., Scheinberg D.A.: Monoclonal antibody therapies-a «constant» threat to cancer. *Nat Med* 6 (2000) 373-374
- Huang L., Crispe I.N.: Superantigen-driven deletion of T cells. *J Immunol* 151 (1993) 1844-1851
- Hummel S., Wilms D., Vitacolonna M., Zöller M.: Donor T cell and host NK depletion improve the therapeutic efficacy of allogeneic bone marrow cell reconstitution in the nonmyeloablatively conditioned tumor-bearing host. *J Leukoc Biol* 72 (2002) 898-912
- Jager E., Jager D., Knuth A.: Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol* 14 (2002) 178-182
- Jager E., Ringhoffer M., Karbach J., Arand M., Oesch F., Knuth A.: Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T cell responses : evidence for immunoselection of antigen-loss variants *in vivo*. *Int J Cancer* 66 (1996) 470-476
- Jondal M., Schirmbeck R., Reimann J.: MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 5 (1996) 295-302
- Jones E.Y., Tormo J., Reid S.W., Stuart D.I.: Recognition surfaces of MHC class I. *Immunol Rev* 163 (1998) 121-128
- Ju S.T., Matsui K., Ozdemirli M.: Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction. *Int Rev Immunol* 18 (1999) 485-513
- Kabelitz D., Pohl T., Pechhold K.: Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol Today* 14 (1993) 338-340
- Kärre K.: Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis. In *Mechanisms of NK mediated cytotoxicity*. Academic Press. San Diego. 1985
- Kienle G.S., Kiene H.: Die Coley'sche Fiebertherapie der Krebserkrankung - historischer Markstein oder heute noch Vorbild? *Merkurstab* 6 (2003) 355-364
- Koh M.B.C., Prentice H.G., Lowdell M.W.: Selective removal of alloreactive cells from haematopoietic stem cell graft: graft engineering for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant* 23 (1999) 1071-1079

- Krammer P.H.: CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407 (2000) 789-795
- Kreitman R.J.: Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11 (1999) 570-578
- Kumanogoh A., Watanabe C., Lee I., Wang X., Shi W., Araki H., Hirata H., Iwahori K., Uchida J., Yasui T., Matsumoto M., Yoshida K., Yakura H., Pan C., Parnes J.R., Kikutani H.: Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* 13 (2000) 621-631
- Lankat-Buttgereit B., Tampe R.: The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. *FEBS Lett* 464 (1999) 108-112
- Larsen M.V., Lundegaard C., Lamberth K., Buus S., Brunak S., Lund O., Nielsen M.: An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. *Eur J Immunol* 35 (2005) 2295-2303
- Lenardo M., Cham K.M., Hornung F., McFarland H., Siegel R., Wang J., Zheng L.: Mature T lymphocyte apoptosis - immune regulation is a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17 (1999) 221-253
- Lessnick S.L., Braun B.S., Denny C.T., May W.A.: Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene* 10 (1995) 423-431
- Li Y., Hellstrom K.E., Nevby S.A., Chen L.: Costimulation by CD48 and B7-1 induces immunity against poorly immunogenic tumors. *J Exp Med* 183 (1996) 639-644
- Linehan D.C., Bown W.B., Leis J.J.: Immunotherapeutic approach to sarcoma. *Semin Surg Oncol* 17 (1999) 72-77
- Löffler G.: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 3. Auflage. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg, 1999
- Ludewig B., Ochsenbein A.F., Odermatt B., Paulin D., Hengartner H., Zingernagel R.M.: Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J Exp Med* 191 (2000) 795-804
- Lugnier A.A., Creppy E.E., Dirheimer G.: Ricin, the toxic protein of the castor-oil plant (*Ricinus communis* L). Structure and properties (author's transl) 28 (1980) 127-139
- Mackall C., Berzofsky J., Helman L.J.: Targeting tumor specific translocations in sarcomas in pediatric patients for immunotherapy. *Clin Orthop Relat Res* 373 (2000) 25-31
- Mamalaki C., Tanaka Y., Corbella P., Chandler P., Simpson E., Kioussis D.: T cell deletion follows chronic antigen specific T cell activation in vivo. *Int Immunol* 5 (1993) 1285-1292
- Maris M.B., Storb R.: Allogeneic hematopoietic cell transplantation as consolidation immunotherapy of cancer after autologous transplantation. *Acta Haematol* 114 (2005) 221-229

- Matsushita M., Yamazaki R., Ikeda H., Mori T., Sumimoto H., Fujita T., Okamoto S., Ikeda Y., Kawakami Y.: Possible involvement of allogeneic antigens recognised by donor-derived CD4 cytotoxic T cells in selective GVL effects after stem cell transplantation of patients with haematological malignancy. *Br J Haematol* 132 (2006) 56-65
- May W.A., Gishizky M.L., Lessnick S.L., Lunsford L.B., Lewis B.C., Delattre O., Zucman J., Thomas G., Denny C.T.: Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 5752-5756
- May W.A., Lessnick S.L., Braun B.S., Klemsz M., Lewis B.C., Lunsford L.B., Hromas R., Denny C.T.: The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 12 (1993) 7393-7398
- McNally J.M., Welsh R.M.: Bystander T cell activation and attrition. *Curr Top Microbiol Immunol* 263 (2002) 29-41
- Melief C.J.M., Kast W.M.: T-cell immunotherapy of tumors by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes and by vaccination with minimal essential epitopes. *Immunol Rev* 146 (1995) 167-177
- Minami Y., Kono T., Miyazaki T., Taniguchi T.: The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* 11 (1993) 245-267
- Nagata S.: Apoptosis by death factor. *Cell* 88 (1997) 355-365
- Nussbaum A.K., Kuttler C., Haderer K.P., Rammensee H.-G., Schild H.: PAPProC: A Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages available on the WWW, *Immunogenetics* 53 (2001), 87-94
- Ockert D., Schmitz M., Hampl M., Rieber E.P.: Advances in cancer immunotherapy. *Immunol Today* 2 (1999) 63-65
- Opfermann J.T., Ober B.T., Narayanan R., Ashton-Rickhardt P.G.: Suicide induced by cytolytic activity controls the differentiation of memory CD8(+) T lymphocytes. *Int Immunol* 13 (2001) 411-419
- Pardoll D.M.: Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 13 (1995) 399-415
- Parker K.C., Bednarek M.A., Coligan J.E.: Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 152 (1994) 163-175
- Pelte C., Cherepnev G., Wang Y., Schoenemann C., Volk H.-D., Kern F.: Random screening of proteins for HLA-A*0201-binding nine-amino acid peptides is not sufficient for identifying CD8 T cell epitopes recognized in the context of HLA-A*0201. *J Immunol* 172 (2004) 6783-6789
- Preuss K.-D., Zwick C., Bormann C., Neumann F., Pfreundschuh M.: Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasm. *Immunol Rev* 188 (2002) 43-50

Przepiorka D., Srivastava P.K.: Heat shock protein-peptid complexes as immunotherapy for human cancer. *Mol Med Today* 4 (1998) 478-484

Radbruch A.: *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer Verlag, Heidelberg, 2000

Ragnhammar P.: Anti-tumoral effect of GM-CSF with or without cytokines and monoclonal antibodies in solid tumors. *Med Oncol* 13 (1996) 167-176

Rammensee H.G., Bachmann J., Emmerich N.P., Bachor O.A., Stevanovic S.: SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50 (1999) 213-219

Renner C., Pfreundschuh M.: Tumor therapy by immune recruitment with bispecific antibodies. *Immunol Rev* 145 (1995) 179-201

Rivoltini L., Carrabba M., Huber V., Castelli C., Novellino L., Dalerba P., Mortarini R., Arancia G., Anichini A., Fais S., Parmiani G.: Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 188 (2002) 97-113

Rosenberg S.A.: A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10 (1999) 281-287

Salcedo M., Momburg F., Hämmerling G.J., Ljunggren H.G.: Resistance to natural killer cell lysis conferred by TAP1/2 genes in human antigen-processing mutant cells. *J Immunol* 152 (1994) 1702

Salter R.D., Howell D.N., Cresswell P.: Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 21 (1985) 235

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

Shapiro H.M.: *Practical Flow Cytometry*. Wiley-Liss, New York, 2003

Staege M.S., Burdach S.: Gegenwart und Zukunft der molekularen Therapie. Vom Genom zum Antigenom. *Kinder- und Jugendmedizin* 3 (2003) 216-220

Staege M.S., Gorelov V., Bulankin A., Fischer U., Dumon K., Hohndorf L., Hattenhorst U., Kramm C., Burdach S.: Stable transgenic expression of IL-2 and HSV-tk by single and fusion tumor cell lines bearing EWS/FLI-1 chimeric genes. *Pediatr Hematol Oncol* 20 (2003) 119-140

Staege M.S., Hutter C., Neumann I., Foja S., Hattenhorst U.E., Hansen G., Afar D., Burdach S.E.: DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 64 (2004) 8213-8221

Statistisches Bundesamt, Todesursachenstatistik, Wiesbaden 2004

Stauss H.J.: Immunotherapy with CTLs restricted by nonself MHC. *Immunol Today* 20 (1999) 180-183

Stern L.J., Wiley D.C.: Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 2 (1994) 245-251

Stout R., Bottomly K.: Antigen-specific activation of effector macrophages by interferon- γ producing (TH1) T cell clones failure of IL-4 producing (TH2) T-cell clones to activate effector functions in macrophages. *J Immunol* 142 (1989) 760

Talmadge J.E.: Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy. *Int Immunopharmacol* 3 (2003) 1121-1143

Townsend A., Bodmer H. : Antigen recognition by class I-restricted T-lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 7 (1989) 601-624

Turk M.J., Wolchok J.D., Guevara-Patino J.A., Goldberg S.M., Houghton A.N.: Multiple pathways to tumor immunity and concomitant autoimmunity. *Immunol Rev* 188 (2002) 122-135

Uebel S., Tampe R.: Specificity of the proteasom and the TAP transporter. *Curr Opin Immunol* 11 (1999) 203-208

Van den Broeke L.T., Pendleton C.T., Mackall C., Helman L.J., Berzofsky J.A.: Identification and epitope enhancement of a PAX-FKHR fusion protein breakpoint epitope in alveolar rhabdomyosarcoma cells created by a tumorigenic chromosomal translocation inducing CTL capable of lysing human tumors. *Cancer Res* 66 (2006) 1818-1823

Van den Eynde B., van der Bruggen P.: T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9 (1997) 684-693

Van de Velde H., von Hoegen I., Luo W., Parnes J.R., Thielemans K.: The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature* 351 (1991) 603-604

Van Pel A., van der Bruggen P., Coulie P.G., Brichard V.G., Lethé B., Van den Eynde B., Uyttenhove C., Renauld J.-C., Boon T.: Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunol Rev* 145 (1995) 229-250

Vignaux F., Golstein P.: Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway? *Eur J Immunol* 24 (1994) 923-927

Weiner L.M.: Monoclonal antibody therapy of cancer. *Senin Oncol* 26 (1999) 43-51

Weng Z., DeLisi C.: Towards a predictive understanding of molecular recognition. *Immunol Rev* 163 (1998) 251-266

York I.A., Goldberg A.L., Mo X.Y., Rock K.L.: Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev* 172 (1999) 49-66

8 Thesen

1. Der adoptive T-Zell-Transfer von *in vitro* generierten allogenen antigenspezifischen CTLs ist eine vielversprechende Möglichkeit der Immuntherapie.
2. T2-Zellen sind durch externe Zugabe von Peptiden zu deren Präsentation auf der Zelloberfläche fähig.
3. Anhand der Stabilisierung von HLA-A2-Molekülen auf der Oberfläche von T2-Zellen kann das Bindungsvermögen von Peptiden an das HLA-A2-Molekül nachgemessen werden.
4. Die mittels Immunfluoreszenz gemessene Stabilisierung des HLA-A2-Moleküls auf der Oberfläche von T2-Zellen zeigt bei Verwendung von 7 verschiedenen Peptiden eine relativ gute Übereinstimmung mit *in silicio* vorhergesagten Bindungswahrscheinlichkeiten.
5. Die Stimulationskinetik von HLA-A2 positiven und HLA-A2 negativen T-Zellen nach Aktivierung durch mit verschiedenen Peptiden gepulsten T2-Zellen zeigt weder signifikante HLA-Haplotypspezifische noch peptidspezifische Unterschiede auf.
6. Das Stimulationsmaximum ist hierbei 5 bis 6 Tage nach Antigenkontakt erreicht.
7. HLA-A2 negative T-Zellen sind aufgrund der höheren Alloreaktivität in der Gesamtheit stärker als HLA-A2 positive T-Zellen unter diesen Versuchsbedingungen aktivierbar.
8. Bei HLA-A2 positiven T-Zellen zeigt ein tumorspezifisches Peptid aus der Fusionsregion des Onkofusionsproteins EWS/FLI-1 (Peptid 6), welches auch nach den Bindungsstudien am besten von den verwendeten tumorspezifischen Peptiden an HLA-A2 bindet, eine deutliche Erhöhung der Aktivierung, was als Hinweis auf die Generierung peptidspezifischer T-Zellen gewertet werden kann.
9. Eine Eliminierung alloreaktiver T-Zellen von den peptidspezifischen Zellen ist durch Depletion möglich.

-
10. Im Vergleich der IFN- γ -Sekretionsanalyse mit der Depletion durch aufeinander folgende Stimulationen unter Nutzung des AICDs erzielt die AICD-Depletion einen größeren Depletionseffekt.
 11. Bei beiden Depletionsverfahren bewirkt ein gewebespezifisches Peptid aus dem CD79B-Antigen (Peptid 2) mit dem höchsten HLA-A2-Bindungsvermögen von den verwendeten Peptiden auch eine deutlich erhöhte T-Zell-Aktivierung.
 12. CD69, HLA-DR und CD25, als Marker für den Aktivierungszustand der stimulierten T-Zellen, weisen ein nahezu identisches Verhalten in der Durchflusszytometrie bei Messung gleicher Proben auf.
 13. Mittels GranzymB-ELISpot konnte vor dem Hintergrund einer Alloreaktivität keine peptidspezifische Aktivierung der AICD-depletierten T-Zellen nachgewiesen werden.
 14. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verfahren zeigen nicht die für den therapeutischen Einsatz erforderliche Effizienz zur Trennung alloreaktiver und peptidspezifischer T-Zellen.
 15. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Peptide mit Stimulationsaktivität für HLA-A2 positive (Peptid 6 aus EWS-FLI1) und negative (Peptid 2 aus CD79B) T-Zellen könnten interessante Peptide für die Immunisierung von Patienten mit Ewing-Tumoren (Peptid 6) oder Leukämien nach allogener Transplantation (Peptid 2) darstellen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kerstin Reinhardt, geb. Kunze
Geboren am: 01.11.1979 in Greifswald
Familienstand: verheiratet
Wohnhaft: Robert-Koch-Str.18, 08280 Aue

Ausbildung

1986-1991 Erich-Weinert-Schule in Gatersleben
1991-1996 Hans-Stubbe-Gymnasium in Gatersleben
1996-1998 Stephaneum in Aschersleben mit Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
1998-2004 Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität in Halle (Saale)

Beruflicher Werdegang

Seit 2005 Assistenzärztin für Unfallchirurgie und Orthopädie am HELIOS
Klinikum in Aue

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäss § 16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Aue, den 06. Juni 2007

Danksagung

Der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin unter ihrem damaligen kommissarischen Direktor, Herrn Professor Dr. med. S. Burdach, danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Labor der Kinderklinik. PD Dr. med. C. Kramm möchte ich für das gezeigte Interesse und der Bereitschaft der Betreuung dieser Arbeit danken.

Bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Kinderklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich mich für die grosse Hilfsbereitschaft und die technische Unterstützung sowie für die stets freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. M. S. Staeger für die Betreuung im Labor, für die fachliche Beratung und unermüdliche Hilfe sowie seine stete Bereitschaft, die Ergebnisse kritisch zu diskutieren.

Bei Dr. rer. nat. G. Richter aus dem Forschungslabor der Kinderklinik der Universität Halle-Wittenberg möchte ich für die Überlassung der T2-Zellen danken.

Bei Prof. Dr. rer. nat. K. Neubert im Institut für Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bedanke ich mich für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Peptide.

Frau Dr. med. H. Peschke und ihren Mitarbeitern in der Blutbank der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Bereitstellung der Buffy-Coats.

Mein ausdrücklicher Dank gebührt darüber hinaus Sebastian Reinhardt, der mir über die Jahre liebevoll zur Seite stand und mich mit Rat und Tat unterstützt hat.

Schließlich danke ich an dieser Stelle meiner Familie für die gewährte Unterstützung meiner gesamten Ausbildung.