

**Hemmung der Oberflächenexpression
des koinhibitorischen Rezeptors PD-1
auf tumorspezifischen T-Zellen mittels
siRNA als möglicher klinischer
Therapieansatz**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III

-Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg-



vorgelegt von

Dipl. Biochem. Lisa Borkner

aus Ansbach

Amsterdam im Februar 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 18.02.09

Kolloquium stattgefunden am: 06.04.09

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. A. Mackensen und Dr. C. Blank

Prüfungsausschuss: Vorsitz: Prof. Dr. R. Warth

1. Prüfer: Prof. Dr. L. Lehle
2. Prüfer: Prof. Dr. A. Mackensen
3. Prüfer: Prof. Dr. T. Dresselhaus

"I'll be more enthusiastic about encouraging thinking outside the box when there's evidence of any thinking going on inside it."

Terry Pratchett

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Tumorimmunologie.....	1
1.1.1	Die <i>Immune Surveillance</i> - Theorie.....	2
1.1.2	<i>Tumour - Escape</i>	4
1.1.2.1	Verlust oder Reduktion der Expression von MHC-I Molekülen.....	4
1.1.2.2	Verlust von Tumorantigenen.....	5
1.1.2.3	Defekte in der Signaltransduktion apoptotischer Rezeptoren	5
1.1.2.4	T-Zellenergie und -inhibition	6
1.1.2.5	Immunsuppressive Zytokine	6
1.1.2.6	Apoptose aktivierter T-Zellen – <i>Activation induced death</i>	7
1.1.2.7	Suppression tumorspezifischer T-Zellen durch regulatorische T-Zellen (T _{reg})	8
1.1.3	Ansätze zur Tumorimmuntherapie	9
1.1.3.1	Unspezifische Aktivierung des Immunsystems durch inflammatorische Substanzen.....	9
1.1.3.2	Zytokine	9
1.1.3.3	Vakzinierung.....	10
1.1.3.4	Immunmodulation durch blockierende Antikörper	10
1.1.3.5	Adoptive T-Zelltherapie	11
1.2	PD-1	13
1.2.1	Entdeckung des Rezeptors Programmed Death – 1 (PD-1).....	13
1.2.2	Die Struktur des <i>PDCDI</i> -Gens	14
1.2.3	Regulation der Transkription von <i>PDCDI</i>	14
1.2.4	Die Proteinstruktur von PD-1.....	15
1.2.5	Expression von PD-1 und seinen Liganden.....	16
1.2.6	Signaltransduktion mittels PD-1	17
1.2.7	PD-1 und Autoimmunität	19
1.2.8	PD-1 in der Tumorimmunologie	23
1.3	RNAi: Eine Methode um PD-1 ausschließlich auf tumorspezifischen T-Zellen zu unterdrücken	24
1.4	Zielsetzung der Arbeit	28
2	METHODEN	29
2.1	Tumorzelllinien und Mausstämme	29
2.1.1	Verwendete Tumorzelllinien.....	29
2.1.2	Verwendete Mausstämme	31
2.1.3	Das 2C-Tumormodell mit HTR.c (L ^d)	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	<i>In vivo</i> Methoden.....	33
2.2.1.1	Transfer von T-Zellen in Mäuse.....	33
2.2.1.2	Transfer von Tumorzellen in Mäuse	33
2.2.1.3	Kontrolle des Tumorverlaufs.....	33
2.2.1.4	Organentnahme	34
2.2.2	<i>In vitro</i> Methoden.....	34
2.2.2.1	Allgemeine Methoden	34
2.2.2.1.1	Zentrifugation.....	34
2.2.2.1.2	Ermittlung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung.....	34
2.2.2.2	Zellkultur.....	35
2.2.2.2.1	Teilen adhärent und nicht-adhärent wachsender Tumorzelllinien	35
2.2.2.2.2	Mycoplasmentest.....	35
2.2.2.2.3	Auftauen und Einfrieren von Tumorzelllinien.....	35

2.2.2.3	Isolierung muriner T-Zellen	36
2.2.2.3.1	Gewinnung naiver T-Zellen aus der Milz.....	36
2.2.2.3.2	Dynal-Kit (Dynal Mouse CD8 ⁺ Negative Isolation Kit, Invitrogen Dynal): Magnetische Zellseparation	36
2.2.2.3.3	SpinSep-Kit [SpinSep Negative Isolation Kit für CD8 ⁺ T-Zellen (CellSystems)]: Zellseparation über die Dichte	37
2.2.2.3.4	Gewinnung von Splenozyten.....	38
2.2.2.4	<i>In vitro</i> Stimulation naiver 2C TCR tg T-Zellen mit dem Tumor P815.B71 und Restimulation	38
2.2.2.5	Stimulation mit anti-CD3/28 mAb	38
2.2.2.6	Gewinnung humaner PBLs aus einem <i>buffy coat</i>	39
2.2.2.7	Herstellung von <i>feeder mix</i>	39
2.2.2.8	Aktivierung und weitere Kultivierung von humanen PBLs	39
2.2.2.8.1	Aktivierung naiver hPBLs mit PHA und IL-2.....	39
2.2.2.8.2	Kultivierung aktivierter humaner T-Zellen mit PHA und IL-2	40
2.2.2.8.3	Kultivierung aktivierter humaner MART-spezifischer T-Zellen mit MART-Peptid beladenem <i>feeder mix</i>	40
2.2.2.9	Analyse von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	41
2.2.2.9.1	Prinzip des FACS	41
2.2.2.9.2	Antikörperfärbung von Oberflächenmarkern auf murinen und humanen Zellen	41
2.2.2.9.3	<i>Labeling</i> von 1B2	43
2.2.2.9.4	Herstellung MART-spezifischer MHC-Tetramer	43
2.2.2.9.5	Intrazelluläre FACS-Färbung	44
2.2.2.9.6	Lebend-tot-Färbung mit Propidiumjodid (PI)	44
2.2.2.9.7	<i>Sort</i> humaner retroviral transduzierter T-Zellen	44
2.2.2.9.8	Standard-Analysen	45
2.2.2.9.8.1	Analyse der T-Zellaufreinigung	45
2.2.2.9.8.2	Auswertung von intrazellulärem IFN γ - und LAMP-Test.....	46
2.2.2.10	<i>In vitro</i> Assays.....	47
2.2.2.10.1	ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	47
2.2.2.10.2	Proliferationsassay.....	48
2.2.2.10.3	Aktivität humaner spezifischer T-Zellen	48
2.2.2.10.3.1	Voraktivierung der humanen 1D3 TCR tg T-Zellen.....	48
2.2.2.10.3.2	Melanom-Tumorzelllinien.....	49
2.2.2.10.3.3	Bestimmung der Zytokinproduktion spezifischer humaner T-Zellen durch IFN γ - Intrazellulärfärbung	49
2.2.2.10.3.4	Bestimmung der zytotoxischen Aktivität mittels LAMP-Test	50
2.2.3	Transfektion von Tumorzellen und primären Zellen.....	50
2.2.3.1	Transfektion durch Kalziumphosphat-Fällung.....	50
2.2.3.2	Transfektion mit Fugene6 (Lipofektion)	51
2.2.3.3	Elektroporation mit der Amaxa TM -Methode.....	51
2.2.4	Retrovirale Transduktion.....	52
2.2.4.1	Retrovirale Transduktion muriner 2C TCR tg T-Zellen (Regensburg)	53
2.2.4.1.1	Gewinnung des retroviralen Überstands.....	53
2.2.4.1.2	Aktivierung von 2C TCR tg Splenozyten für die Transduktion	54
2.2.4.1.3	<i>Spinfection</i> von 2C TCR tg T-Zellen.....	54
2.2.4.2	Retrovirale Transduktion humaner T-Zellen (NKI)	54
2.2.4.2.1	Gewinnung des retroviralen Überstands.....	54
2.2.4.2.2	Aktivierung humaner PBLs	55
2.2.4.2.3	<i>Spinfection</i> von humanen PBLs.....	55
2.2.5	Genetisch-molekularbiologische Methoden	56
2.2.5.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	56
2.2.5.2	Dauerkulturen.....	56
2.2.5.3	Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i>	56
2.2.5.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	56
2.2.5.5	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	57
2.2.5.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	57
2.2.5.7	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	57
2.2.5.8	Oligo- <i>Annealing</i>	58
2.2.5.9	DNA-Ligation	58

2.2.5.10	Das pSUPER TM -System	58
2.2.5.11	Semi-quantitative RT-PCR	60
2.2.5.11.1	Gewinnung der Gesamt-RNA aus murinen T-Zellen	60
2.2.5.11.2	Reverse Transkription der RNA	60
2.2.5.11.3	Semi-quantitative PCR	61
2.2.6	Statistische Analysen.....	61
3	ERGEBNISSE	62
3.1	Suppression von PD-1 im murinen System.....	62
3.1.1	Transiente Suppression der PD-1 Oberflächenexpression in murinen Zellen	62
3.1.1.1	Analyse der PD-1 Expression verschiedener Tumorzelllinien	62
3.1.1.2	Transiente Transfektion von EL4 mit doppelsträngiger siRNA (Ambion)	63
3.1.1.3	Transiente Transfektion primärer T-Zellen mit siRNA (Ambion)	65
3.1.1.4	Zytokinassays mit transient siRNA transfizierten 2C T-Zellen	65
3.1.2	Etablierung des Systems der retroviralen Transfektion muriner T-Zellen	67
3.1.2.1	Etablierung eines Protokolls zur retroviralen Transduktion muriner T-Zellen	67
3.1.2.1.1	Transduktion verschiedener Zelllinien	67
3.1.2.1.2	Transduktion primärer muriner T-Zellen.....	68
3.1.2.2	Antibiotika Kurven für 2C T-Zellen	71
3.1.2.3	Herstellung der pSUPER-siRNA-Vektoren	71
3.1.2.4	Entwurf weiterer funktioneller siRNA-Sequenzen mittels der sfold-Software	72
3.1.3	Stabiler <i>knock-down</i> der PD-1 Expression in 2C T-Zellen	72
3.1.3.1	Austesten der siRNA-Sequenzen in 2C T-Zellen.....	72
3.1.3.2	Suppression der PD-1 Expression mit pSUPER-siRNA-mu2 und -mu4.....	73
3.1.3.3	RT-PCR für PD-1 in transduzierten T-Zellen	75
3.1.3.4	Oberflächenmarker auf siRNA transduzierte 2C T-Zellen.....	76
3.1.3.5	Funktionelle Tests mit PD-1 supprimierten 2C T-Zellen	77
3.1.3.5.1	Zytokinassays mit stabil siRNA transduzierten 2C T-Zellen	78
3.1.3.5.2	Proliferationsassay mit stabil siRNA transduzierten 2C T-Zellen.....	79
3.1.3.5.3	Zytokinassays in der Gegenwart von blockierendem anti-PD-L1 mAb	80
3.1.3.6	pSUPER-siRNA transduzierte 2C T-Zellen im Maus-Tumormodell.....	82
3.2	Suppression von PD-1 im humanen System.....	85
3.2.1	SiRNA gegen humanes PD-1 und pSUPER-siRNA-hu-GFP	85
3.2.1.1	Transiente Transfektion der humanen B-Zelllinie CIRA2	85
3.2.1.2	Retrovirale siRNA-Vektoren gegen hPD-1 mit GFP-Expression	86
3.2.2	MART spezifischer T-Zellrezeptor und Melanomzelllinien	87
3.2.2.1	Der 1D3 TCR.....	87
3.2.2.2	Melanomzelllinien.....	87
3.2.3	Retrovirale Transduktion humaner T-Zellen.....	89
3.2.3.1	Doppeltransduktion mit 1D3 TCR und pSUPER-siRNA-hu1-GFP.....	89
3.2.3.2	PD-1 Expression bei wiederholter Stimulation humaner T-Zellen	90
3.2.3.3	Suppression der PD-1 Expression mittels pSUPER-siRNA in humanen T-Zellen	93
3.2.4	Funktionelle Assays mit siRNA transduzierten T-Zellen.....	94
3.2.4.1	Zytokinproduktion: Intrazelluläres IFN γ mit und ohne anti-PD-L1	94
3.2.4.1.1	Intrazelluläres IFN γ mit voraktivierten 1D3 TCR tg pSUPER-siRNA-GFP transduzierten T-Zellen	94
3.2.4.1.2	Zytokinproduktion: IFN γ Produktion im ELISA mit 1D3 TCR tg CD8 ⁺ T-Zellen .	97
3.2.4.2	Zytotoxische Aktivität der Zellen über LAMP-Test	98
4	DISKUSSION	101
4.1	Reduktion der PD-1 Expression auf 2C TCR tg murinen T-Zellen.....	102
4.1.1	Transiente Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression auf 2C TCR tg T-Zellen.....	102
4.1.2	Stabile Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression auf 2C TCR tg T-Zellen.....	104
4.2	Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression auf tumorspezifischen humanen T-Zellen	110

4.2.1	Transiente Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression auf der humanen B-Zelllinie CIRA2	110
4.2.2	Stabile Reduktion der PD-1 Expression auf 1D3 TCR transduzierten humanen T-Zellen	111
4.2.3	Funktionelle Assays mit pSUPER-siRNA-GFP transduzierten MART-spezifischen humanen T-Zellen	113
4.2.3.1	Zytokinproduktion PD-1 supprimierter humaner T-Zellen	114
4.2.3.2	Zytotoxizität PD-1 supprimierter humaner T-Zellen.....	116
4.3	Ausblick.....	118
5	ZUSAMMENFASSUNG	120
6	ANHANG	121
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	121
6.2	Plasmide und siRNA-Moleküle	123
6.2.1	Plasmide	123
6.2.2	siRNA-Moleküle	125
6.3	Puffer und Medien	127
6.3.1	Zellkulturmedien	127
6.3.2	Puffer und Lösungen	128
6.4	Verwendete Software und Internetseiten	129
6.5	Verbrauchsmaterial und Geräte.....	129
6.5.1	Verbrauchsmaterial	129
6.5.2	Geräte	130
6.6	Anbieterverzeichnis.....	130
7	LITERATURVERZEICHNIS	132

1 Einleitung

Das adaptive Immunsystem hat sich im Verlauf der Evolution der Vertebraten entwickelt, um den Organismus gegen Pathogene und Schadstoffe, die von außen eindringen können, zu verteidigen. Hauptakteure des adaptiven Immunsystems sind die zytotoxischen T-Zellen, die körperfremde Antigene gezielt erkennen und angreifen. Eine überlebenswichtige Eigenschaft des Immunsystems ist dabei die Fähigkeit, zwischen Selbst- und Fremdantigenen zu unterscheiden.

Im Verlauf der T-Zelldifferenzierung im Thymus werden T-Zellen, deren T-Zellrezeptoren für Selbstantigene spezifisch wären, eliminiert. Das Ziel dieser so genannten Zentralen Toleranz ist es, ein T-Zellrepertoire zu schaffen, das von vornherein selbsttolerant ist. Dieser Prozess ist jedoch nicht zu hundert Prozent verlässlich, so dass immer auch einige selbstspezifische T-Zellen den Thymus verlassen können.

Um einen Angriff selbstspezifischer T-Zellen auf den Organismus zu verhindern, aber auch um eine starke Immunantwort nach einer Infektion zu beenden und somit die Gefahr einer Schädigung des Organismus zu vermeiden, werden Mechanismen benötigt, die die T-Zellaktivität in der Peripherie begrenzen. Man spricht von der so genannten Peripheren Toleranz des Immunsystems (Abbas and Lichtman 2005).

An der negativen Regulation von immunaktiven T-Zellen sind verschiedene koinhibitorische Rezeptoren beteiligt, z.B. die Mitglieder der CD28-Familie CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*) (Waterhouse, Penninger et al. 1995; Leach, Krummel et al. 1996), BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) (Watanabe, Gavrieli et al. 2003) und PD-1 (*programmed death receptor-1*) (Nishimura, Minato et al. 1998; Freeman, Long et al. 2000) und ihre entsprechenden Liganden. Für den Rezeptor PD-1 sind derzeit zwei Liganden bekannt, nämlich PD-L1 (B7-H1) und PD-L2 (B7-DC) (*programmed death receptor-1 ligand 1* und *2*).

1.1 Tumormmunologie

Während eines Menschenlebens werden über 10^{16} Zellen durch Zellteilung gebildet. Bei jeder dieser Zellteilungen besteht die Gefahr, dass bei der Replikation des Genoms Fehler auftreten, die einer Zelle die Fähigkeit verleihen können, unkontrolliert zu

proliferieren. Ein wichtiger zellintrinsischer Mechanismus, um die Proliferation veränderter Zellen zu verhindern, ist die Apoptose, die bei DNA-Schäden und unterschiedlichen Formen physiologischen Stresses (Anoxia, Ungleichgewicht in der Regulation des Zellzyklus, Verlust der Verankerung) eingeleitet wird. Die Zellen sterben, das Überleben veränderter Zellen und damit auch die Entstehung von Krebs wird verhindert (Lowe, Cepero et al. 2004).

1.1.1 Die *Immune Surveillance* - Theorie

Für den Fall, dass diese Mechanismen versagen, wurde schon früh die Bekämpfung entarteter Körperzellen durch das Immunsystem postuliert (Ehrlicher 1909). Mit wachsendem Verständnis im Bereich der Immunologie und Tumorummunbiologie wurde die Hypothese von der Tumorkontrolle durch das Immunsystem von F. Macfarlane Burnet und Lewis Thomas wieder aufgenommen. Aus diesen Ansätzen entwickelte sich die *Immune Surveillance* – Theorie (Immunüberwachung), wonach das Immunsystem den Körper kontinuierlich überwacht und Tumorzellen durch deren Expression tumor-assoziiierter Antigene (TAA) erkennt und beseitigt (Burnet 1970).

Die Expression tumor-assoziiierter Antigene ist auf die genetischen und epigenetischen Veränderungen in Krebszellen zurückzuführen. Es kann sich dabei um Neoantigene handeln, die nur in Tumorzellen vorkommen und nicht in gesunden Zellen exprimiert werden (virale Proteine, Mutationen zelleigener Proteine), oder aber um körpereigene, intakte Proteine, die aus verschiedenen Gründen im Tumorzusammenhang immunogen sein können, z.B. embryonale Proteine, die sonst nicht im adulten Gewebe exprimiert werden oder Proteine, die im Körper normalerweise in so geringen Konzentrationen vorliegen, dass sie vom Immunsystem ignoriert werden (Pardoll 2002).

In Tiermodellen wurde beobachtet, dass einige Tumoren bei Transplantation in syngene Empfängertiere abgestoßen werden (Regressortumoren), während andere auswachsen (Progressortumoren). Aus diesen Beobachtungen leitete man ab, dass Progressortumoren Mechanismen entwickeln einem Angriff durch das Immunsystem zu entgehen (Old, Boyse et al. 1962).

Da passende Modelltiere [z.B. SCID (*severe combined immunodeficiency*) oder RAG^{-/-} (*recombination activation gene*)] fehlten, konnte diese Theorie weder bestätigt noch negiert werden. Indirekt müsste man aber postulieren, dass bei Bestehen von *Immune*

Surveillance immunkompromittierte Individuen eine dramatisch erhöhte Rate an Krebserkrankungen aufweisen würden.

Epidemiologische Studien von Patienten mit erblichen Immundefekten zeigten unterschiedliche Anfälligkeit für verschiedene Krebserkrankungen. Seltene Krebsarten, z.B. Lymphoblastische Lymphome und Kaposisarkome, traten deutlich häufiger auf, während die Rate gewöhnlicher Tumoren des Epithels, wie sie bei zunehmendem Alter auftreten (z.B. Darm-, Lungen-, Prostatakrebs), nicht erhöht war (Penn 1988). Eine nähere Analyse zeigte, dass die Krebsarten, die unter immunkompromittierten Menschen am häufigsten waren, alle mit Tumoviren (z.B. Eppstein-Barr Virus, humanes Herpesvirus - 8, Papillomavirus) assoziiert sind.

Dies legte die Vermutung nahe, dass das Immunsystem durch die Bekämpfung akuter Infektionen sowie durch die Eindämmung chronischer Infektionen, die eventuell zu Krebs führen könnten, gegen gewisse Krebsarten schützt. Die Tatsache, dass nicht virus-assoziierte Krebsarten bei immundefizienten Patienten nicht häufiger auftraten als bei Gesunden, wurde wiederum als starkes Argument gegen die klassische *Immune Surveillance* – Theorie gesehen. Allerdings muss man dabei beachten, dass Patienten mit einem defekten Immunsystem häufig nicht älter als dreißig oder vierzig Jahre werden. Ein möglicher Effekt der Immundefekte auf Krebsarten, die erst im hohen Lebensalter entstehen, kann somit möglicherweise gar nicht beobachtet werden (Pardoll 2003).

Die Entwicklung von Mausmodellen mit Immundefekten ermöglichte eine Neubewertung der Immunüberwachung. Es ergaben sich klare Hinweise darauf, dass verschiedene Komponenten des Immunsystems die Tumorentstehung beeinflussen können. Untersuchungen an RAG *knock-out* Mäusen, die weder T- noch B-Zellen besitzen, zeigten bei einer Beobachtung der Tiere bis ins hohe Alter (18 Monate) eine erhöhte Tumorrates (Shankaran, Ikeda et al. 2001).

Es ist schwierig, einen direkten Nachweis für die *Immune Surveillance* - Theorie im Menschen zu erbringen. Allerdings weisen die Ergebnisse, die sich aus verschiedenen immundefizienten Mausmodellen ergaben, stark auf eine Beteiligung des Immunsystems bei der Unterdrückung der Entstehung von Tumoren hin (Pardoll 2003).

1.1.2 *Tumour - Escape*

Trotz der *Immune Surveillance* durch das Immunsystem und der Tatsache, dass Immunozyten durchaus in der Lage sind Tumorzellen zu erkennen [z.B. TILs (*tumour infiltrating lymphocytes*) in Tumorgewebe] kommt es immer wieder zur Entstehung von Krebs. Dies legt die Vermutung nahe, dass Tumorzellen Wege finden, sich durch so genannten *Tumour - Escape* (Entkommen des Tumors) dem Immunsystem zu entziehen. Eine der Haupteigenschaften von Tumorzellen ist ihre hohe genetische Instabilität und die daraus resultierende genetische Vielfalt. Wird durch das Immunsystem selektiver Druck ausgeübt, so überleben die Varianten, die durch verschiedene Eigenschaften, z.B. Verlust der Antigenpräsentation, einen Überlebensvorteil haben. Es kommt zu einer natürlichen Selektion von Tumorzellen, die einen *Tumour - Escape* Phänotyp besitzen (Khong and Restifo 2002).

1.1.2.1 Verlust oder Reduktion der Expression von MHC-I Molekülen

Damit eine Tumorzelle von zytotoxischen T-Zellen [CTL (*cytotoxic T-lymphocyte*)] erkannt und zerstört werden kann, müssen TAAs auf ihrer Oberfläche in einem MHC (*major histocompatibility complex*)-I-Antigen-Komplex präsentiert werden. Der totale Verlust der MHC-I Expression kommt in manchen Tumorarten, z.B. Melanomen, kolorektalen Karzinomen oder Prostata-Adenokarzinomen, durchaus häufig vor (Algarra, Collado et al. 1997) und wird mit invasivem, metastasierendem Krebs in Verbindung gebracht (Garrido, Ruiz-Cabello et al. 1997). Neben Mutationen der MHC-I Proteine selbst, können Defekte im β_2 -Mikroglobulin Gen (beladene MHC-I Moleküle werden nicht an die Zelloberfläche transportiert) oder in Komponenten der Antigenverarbeitung durch das Proteasom und des intrazellulären Antigentransports [Peptidtransporter TAP-1 und -2 (*Transporter assoziiert mit Antigenpräsentation*)] zu mangelnder Antigenpräsentation auf Tumorzellen führen. Neben dem totalen Verlust der MHC-I Expression ist es auch möglich, dass nur ein Haplotyp selektiv abgeschaltet wird (Pardoll 2003).

Geht man aber auch von MHC-I Verlust als Möglichkeit für *Tumour - Escape* aus, so muss man beachten, dass Zellen mit verringerter MHC-I Expression Angriffsziele für die Lyse durch NK (*natürliche Killer*)-Zellen sind (Porgador, Mandelboim et al. 1997). NK-Zellen exprimieren den Rezeptor KIR (*killer inhibitory receptor*), der bei Bindung an die MHC Komplexe einer Zielzelle die NK-Zelle inhibiert und Zellyse verhindert.

Daneben besitzen NK-Zellen jedoch noch den aktivierenden Rezeptor NKG2D (*natural killer group 2D*), dessen Liganden MICA und MICB (*MHC class I polypeptide-related sequence A* und *B*) durch Zellstress induziert werden. Signale des NKG2D Rezeptors können Inhibition durch KIR aufheben. Dadurch können Zellen, die Zellstress unterworfen sind, eliminiert werden, auch wenn sie eine normale MHC-I Expression aufweisen (Bauer, Groh et al. 1999). NK-Zellen sind am effektivsten bei der Beseitigung von Zellen, wenn sowohl MHC-I Verlust als auch Expression von MICA/B vorliegen. Um einem Angriff durch NK-Zellen zu entkommen, wäre es möglich, dass Tumorzellen die Expression der Stressliganden supprimieren (Garrido and Algarra 2001).

1.1.2.2 Verlust von Tumorantigenen

Unzureichende Antigenpräsentation auf der Tumorzelle kann auch durch den Verlust von Tumorantigenen verursacht werden. Es ist bekannt, dass die Expression von TAAs innerhalb desselben Tumors heterogen ist. Die verminderte Expression von TAAs in Melanomen [gp100 (Glykoprotein 100), MART-1/Melan-A (*Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1*), Tyrosinase] steht in Verbindung mit dem Fortschreiten der Erkrankung (de Vries, Fourkour et al. 1997). In einer Studie zur Peptidvakzinierung mit gp100 konnte eine Reduktion der gp100 Expression beobachtet werden, während der Expressionsgrad von MART-1 unverändert blieb (Riker, Cormier et al. 1999). Der Transfer MART-1-spezifischer zytotoxischer T-Zellen in einer klinischen Studie der Phase I führte wiederum zum Verlust der MART-1 Expression in Tumoren, wohingegen gp100 unverändert hoch exprimiert wurde (Mackensen, Meidenbauer et al. 2006).

Der genaue Mechanismus der Herunterregulierung spezifischer Tumorantigene ist in den meisten Fällen nicht bekannt.

1.1.2.3 Defekte in der Signaltransduktion apoptotischer Rezeptoren

Signaltransduktion durch die so genannten *Death* Rezeptoren [z.B. Fas-Rezeptor, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) – Rezeptoren] löst in einer Zelle Apoptose über die Caspase-Kaskade aus. Eine defekte Signaltransduktion der *Death* Rezeptoren ist daher ein möglicher Mechanismus, der zum Überleben und Proliferation

von Tumorzellen beitragen kann. Dies kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden, z.B. durch Herunterregulierung oder Verlust des Fas-Rezeptors oder der TRAIL-Rezeptoren auf Tumorzellen, durch Mutationen in Genen, die in der Kaskade weiter unten stehen [z.B. Caspase-10, FADD (*Fas-associated protein with Death Domain*)] oder durch die Überexpression von Inhibitoren [z.B. Caspase-8 Inhibitor cFLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*)] (Khong and Restifo 2002).

Tumoren können sich auch der Apoptose, die durch den Perforin/Granzyme B Mechanismus von CTLs vermittelt wird, entziehen, indem sie den Serinprotease-Inhibitor PI-9 (*protease inhibitor – 9*), welcher Granzyme B inaktiviert, überexprimieren (Medema, de Jong et al. 2001).

1.1.2.4 T-Zellenergie und -inhibition

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen benötigen zwei Signale um aktiviert zu werden: Erstens die spezifische Bindung eines Antigen-MHC-I-Komplexes an ihren TCR (*T cell receptor*) und zweitens die Bindung des entsprechenden Liganden an einen kostimulatorischen Rezeptor der T-Zelle. Die fehlende Expression kostimulatorischer Liganden auf Tumorzellen führt bei Bindung des TCRs zu T-Zellenergie (Schwartz 1990). Durch die Transduktion mit den kostimulatorischen Liganden B7.1 oder B7.2 konnte die Immunogenizität von Tumorzellen erhöht werden (Chen, McGowan et al. 1994).

Neben kostimulatorischen Rezeptoren besitzen T-Zellen auch koinhibitorische Rezeptoren, z.B. PD-1, die bei Bindung ihres Liganden die T-Zellaktivierung reduzieren können. Die Expression von PD-L1 ist auf Tumoren weit verbreitet und wird mit einer schlechten Prognose zum Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht (Thompson, Kuntz et al. 2006; Wu, Zhu et al. 2006). Man geht davon aus, dass die PD-1/PD-L1 Interaktion die tumorspezifische Immunantwort der CTLs unterdrückt (Okazaki and Honjo 2006).

1.1.2.5 Immunsuppressive Zytokine

Die Aktivierung oder die Inhibition von T-Zellen hängt auch von der An- oder Abwesenheit verschiedener Zytokine in ihrer unmittelbaren Umgebung ab. Tumorzellen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen [z.B. IL (Interleukin) -10,

TGF- β (*Transforming growth factor- β*), die die Reifung und Funktion von Immunozyten negativ beeinflussen können (Khong and Restifo 2002).

Während IL-10 die Antigenpräsentation behindert, indem es u.a. einen inhibitorischen Effekt auf die Reifung und den funktionellen Status von DCs (*dendritic cells*) ausübt (De Smedt, Van Mechelen et al. 1997; Girolomoni and Ricciardi-Castagnoli 1997), wirkt TGF- β direkt auf die Lymphozyten ein und inhibiert deren Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktionen *in vivo* (Fontana, Frei et al. 1989). In Krebspatienten werden hohe TGF- β Konzentrationen mit einem schnellen Fortschreiten der Krankheit [Brustkrebs (Gorsch, Memoli et al. 1992)] und einer geringen Ansprechrate von Immuntherapien [Darmkrebs (Doran, Stuhlmiller et al. 1997)] in Verbindung gebracht.

1.1.2.6 Apoptose aktivierter T-Zellen – *Activation induced death*

Die Expression des Fas-Liganden (FasL) auf Tumoren und deren Bedeutung im *Tumour - Escape* wird kontrovers diskutiert. Nach anfänglichen Berichten, dass viele Tumoren FasL exprimieren und dass die FasL Expression zu immunologischer Resistenz durch die Einleitung von Apoptose in Fas-Rezeptor exprimierenden T-Zellen führt [Melanom (Hahne, Rimoldi et al. 1996; Andreola, Rivoltini et al. 2002)], wurden diese Ergebnisse durch andere Arbeitsgruppen, die das genaue Gegenteil feststellten (Chappell, Zaks et al. 1999), in Frage gestellt. Die zuerst angenommene Rolle von FasL auf Tumoren im *Tumour - Escape* wurde zunehmend unwahrscheinlicher, als gezeigt werden konnte, dass FasL transduzierte Tumoren *in vivo* besser abgestoßen werden, verbunden mit einer erhöhten Infiltration durch Neutrophile (Arai, Gordon et al. 1997). FasL wirkt bei Bindung von Fas auf Zellen des angeborenen Immunsystems (Neutrophile, Makrophagen, unreife DCs) proinflammatorisch und veranlasst diese Zellen, verschiedene proinflammatorische Zytokine zu produzieren, wodurch wiederum die Abstoßung eines Tumors begünstigt würde (Chen, Sun et al. 1998).

Bedeutender ist die Rolle von Fas/FasL jedoch wahrscheinlich bei der Induktion des *activation induced cell death* (AICD) von tumorspezifischen T-Zellen. T-Zellen regulieren FasL bei Aktivierung ihres T-Zellrezeptors hoch. Über Bindung an den Fas-Rezeptor derselben Zelle („Selbstmord“) oder den Fas-Rezeptor einer anderen T-Zelle („Brudermord“) wird Apoptose eingeleitet und der Angriff auf Tumorzellen unterbunden (Chappell, Zaks et al. 1999; Zaks, Chappell et al. 1999).

1.1.2.7 Suppression tumorspezifischer T-Zellen durch regulatorische T-Zellen (T_{reg})

Regulatorische T-Zellen (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) inhibieren zytotoxische und Helfer-T-Zellen und stellen in Mäusen und Menschen etwa fünf bis zehn Prozent der CD4⁺ T-Zellen (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Des Weiteren finden sich regulatorische T-Zellen in großer Anzahl unter den TILs verschiedener solider Tumore [u.a. Lungenkrebs, Eierstockkrebs (Woo, Chu et al. 2001), Brustkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs (Liyanage, Moore et al. 2002), Melanom (Javia and Rosenberg 2003)]. Generell stellt ein hoher T_{reg}-Anteil in der TIL-Population eine schlechte Prognose für das Langzeitüberleben der Patienten dar (Ichihara, Kono et al. 2003; Curiel, Coukos et al. 2004; Kono, Kawaida et al. 2006).

Die genauen Mechanismen hinter dem Anstieg der T_{reg}-Population im peripheren Blut und der Rekrutierung der T_{reg}-Zellen in den Tumor werden erst langsam entschlüsselt. Bisher wurde gezeigt, dass die erhöhten Mengen an T_{reg}-Zellen durch aktive Proliferation der Zellen und nicht durch Umverteilung aus anderen Kompartimenten (sekundäre Lymphorgane, Knochenmark) erreicht werden (Wolf, Rumpold et al. 2006). Im Fall von Eierstockkrebs führt die Expression des Chemokins CCL22 (*Chemokine (C-C motif) ligand 22*) durch die Tumorzellen zur Rekrutierung der T_{reg}-Zellen über deren Rezeptor CCR4 (*Chemokine (C-C motif) receptor 4*) (Curiel, Coukos et al. 2004).

Durch diese unterschiedlichen Mechanismen wird die Immunogenizität von Tumorzellen verringert, wodurch sie gegen die Entdeckung und den Angriff durch das Immunsystem geschützt werden. Es ist in der Tumorummuntherapie daher nicht ausreichend, das Immunsystem zu aktivieren, sondern es müssen auch Wege gefunden werden, aktivierte Immunozyten gegen die Abwehrstrategien der entarteten Zellen unempfindlich zu machen. Verschiedene Ansätze zur Tumorummuntherapie werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

1.1.3 Ansätze zur Tumormimmuntherapie

1.1.3.1 Unspezifische Aktivierung des Immunsystems durch inflammatorische Substanzen

Einer der ersten Versuche, Krebs durch die Stimulation des Immunsystems zu behandeln, war die Injektion von lebenden *Streptococcus pyogenes* Bakterien oder bakteriellen Extrakten (Coleys Toxine) in Krebspatienten, die Ende des 19. Jahrhunderts von William Coley durchgeführt wurde. Neben einer starken Entzündung konnte in den Patienten eine Tumorregression beobachtet werden (Nauts, Fowler et al. 1953). Auch nach Injektion von inflammatorischen Substanzen [z.B. bakterielle Extrakte, LPS (Lipopolysaccharid)] kommt es zu einer Entzündungsreaktion, in deren Rahmen Makrophagen aktiviert werden, welche eine Vielzahl von Zytokinen freisetzen. Diese wiederum stimulieren zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen (Natürliche Killerzellen), wodurch ein Angriff tumorspezifischer CTLs auf Tumorzellen verstärkt wird. Noch heute findet *Bacillus Calmette-Guérin* bei Blasenkrebs Anwendung, wobei die direkte Injektion in die Blase bei Karzinomen im Frühstadium zu einem hohen Grad an Remissionen führt (Herr 2007).

1.1.3.2 Zytokine

Die Verwendung von Coleys Toxinen war mit starken Nebenwirkungen verbunden, die man in späteren Ansätzen durch den gezielten Einsatz einzelner Zytokine (z.B. Interferone, IL-2) zu vermeiden suchte. Systemische Verabreichung von IFN α führte zu Anti-Tumoreffekten und verlängertem Überleben bei unterschiedlichen hämatologischen Krebsarten [z.B. Chronische Myeloische Leukämie (ohne Autorenangabe) (1997), Haarzelleukämie (Robak 2006)] und einigen soliden Tumoren [z.B. Melanom (Kirkwood, Strawderman et al. 1996), Nierenzellkarzinom (Motzer, Bacik et al. 2002)]. Neben der Aktivierung des Immunsystems führen Interferone auch zu einer verbesserten Antigenpräsentation durch den Tumor. Hohe Dosen von IL-2 aktivieren die Lymphozyten und erreichten bei einigen Patienten mit Nierenzellkarzinom oder Melanom eine Tumorregression (Rosenberg, Lotze et al. 1993; Fyfe, Fisher et al. 1995). Die systemische Anwendung von Zytokinen, vor allem von hoch dosiertem IL-2, führt jedoch auch zu schweren Nebenwirkungen, die denen einer

schweren Infektion ähneln und mit Todesfällen assoziiert sind, so dass deren therapeutischer Nutzen nur gering ist (Dranoff 2004).

1.1.3.3 Vakzinierung

Unter den Begriff Vakzinierung fallen Versuche, das Immunsystem durch Konfrontation mit TAAs zu aktivieren. Dazu gibt es verschiedene Ansätze, die in klinischen Versuchen, vor allem an Melanompatienten, getestet wurden.

Antigene können in Form von abgetöteten Tumorzellen oder Tumorzelllysaten verabreicht werden. Es wurden auch direkt tumorspezifische Antigenpeptide (Coulie, Karanikas et al. 2001; Belli, Testori et al. 2002) eingesetzt. Synthetische Antigenpeptide, die zusätzlich durch gezielte Mutation einzelner Aminosäuren eine erhöhte Immunogenizität aufweisen (Rosenberg, Yang et al. 1998), wurden ebenfalls untersucht.

Eine weitere Möglichkeit, Tumorimmunität in Patienten zu induzieren, ist die Verabreichung von DCs, die *ex vivo* mit dem Antigen beladen (Mackensen, Herbst et al. 2000) oder mit DNA für das entsprechende Antigenpeptid transduziert (Dyall, Latouche et al. 2001) wurden.

Um den Effekt der Vakzinierung zu verstärken, werden zusätzlich Zytokine, z.B. IL-12 in Kombination mit tumorspezifischem Antigen eingesetzt [Antigenpeptid mit IL-12 (Lee, Wang et al. 2001), peptidbeladene PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) mit IL-12 (Gajewski, Fallarino et al. 2001; Peterson, Harlin et al. 2003), autologe Tumorzellen mit IL-12 transfizierten Fibroblasten (Mackensen, Veelken et al. 1997)].

Weiterführende Versuche beinhalten die Transfektion von dendritischen Zellen oder Tumorzellen mit Zytokin-Genen (Dranoff, Jaffee et al. 1993), so dass die antigenpräsentierende Zelle zugleich immunstimulatorische Substanzen freisetzt. Für Tumorzellen wurde auch die Transfektion mit Genen für Liganden kostimulatorischer Rezeptoren eingesetzt, die die angreifenden T-Zellen über Ligand/Rezeptor-Interaktion zusätzlich aktivieren sollen (Townsend and Allison 1993).

1.1.3.4 Immunmodulation durch blockierende Antikörper

Wie im Kapitel 1.1.2.4 beschrieben, können T-Zellen durch die Bindung von koinhibitorischen Rezeptoren an die entsprechenden Liganden negativ beeinflusst

werden. Um die Interaktion von Rezeptor und Ligand zu unterbinden, wurden blockierende Antikörper entwickelt, die spezifisch an den Rezeptor binden und so die Bindung des eigentlichen Liganden verhindern. Am besten untersucht sind blockierende Antikörper gegen den CTLA-4 Rezeptor, die vor allem in klinischen Versuchen mit Melanompatienten getestet wurden. Bei alleiniger Verabreichung von anti-CTLA-4 mAb konnte in Phase I/II Studien in 5 bis 13% der Fälle ein klinisch relevanter Effekt beobachtet werden. In Kombination mit anderen Methoden, wie Vakzinierung, Chemotherapie oder IL-2 lag die Erfolgsrate bei 11 bis 22%. Bei der Behandlung mit anti-CTLA-4 mAb treten Autoimmun-Nebenwirkungen, vor allem in der Haut und im Verdauungstrakt auf, die zum Teil den klinischen Grad III/IV erreichen können. Das Auftreten dieser Nebenwirkungen korreliert dabei in einigen Fällen mit dem Erfolgsgrad der Therapie (Korman, Peggs et al. 2006).

Auch gegen ein weiteres inhibitorisches Molekül (PD-1) wurden Antikörper in klinischen Studien der Phase I getestet. Der Antikörper MDX-1106 wurde an Patienten mit unterschiedlichen Krebserkrankungen (nichtkleinzelliger Lungenkrebs, Nierenzellkarzinom, Darmkrebs, Melanom, Prostatakrebs) auf deren Toxizität getestet. Es traten keine schweren Nebenwirkungen auf, zwei Patienten zeigten jedoch arthritische Symptome, die behandelt werden mussten. In drei von 23 Fällen konnte eine Reduktion von Läsionen beobachtet werden [ASCO-Abstract (Brahmer, Topalian et al. 2008)]. Ein weiterer Antikörper, CT-011, wurde in einer Phase I Studie an Patienten mit hämatologischen Krebserkrankungen getestet. Auch hier traten keine schweren Nebenwirkungen auf und die gewünschte maximale Dosis konnte verabreicht werden. In einem Fall kam es zu einer kompletten Remission, in 4 Fällen zeigten die Patienten eine stabile Erkrankung und in einem Fall trat eine minimale Antwort auf. Insgesamt hatte die Behandlung bei sechs von 18 Patienten einen Effekt, mit einer verlängerten Überlebenszeit von durchschnittlich 60 Wochen (Berger, Rotem-Yehudar et al. 2008).

1.1.3.5 Adoptive T-Zelltherapie

Die bislang angesprochenen Therapien bauen darauf, bereits vorhandene tumorspezifische T-Zellen im Patienten zu aktivieren. Die adoptive T-Zelltherapie hingegen basiert darauf, spezifische T-Zellen *ex vivo* zu gewinnen und zu expandieren. Dazu können PBLs (Periphere Blutlymphozyten) mit antigen-exprimierenden Zellen

kokultiviert werden, um so den Anteil an spezifischen CTLs zu erhöhen. Dies wird z.B. bei Transplantationspatienten mit EBV (Epstein-Barr-Virus) - induzierten Lymphomen angewandt (Rooney, Smith et al. 1998). Einen Schritt weiter geht die Gewinnung von spezifischen T-Zellklonen, z.B. für virale Peptide des CMV (Cytomegalievirus). Diese Zellen werden bei Transplantationspatienten eingesetzt, um akute CMV Infektionen in der Posttransplantationsphase zu vermeiden (Walter, Greenberg et al. 1995).

Bei Tumoren ohne die Expression viraler Antigene gestaltete sich die Gewinnung tumorspezifischer T-Zellen schwieriger. Es wurden daher Lymphozyten durch IL-2 unspezifisch *ex vivo* aktiviert und in Patienten mit Nierenzellkarzinom oder Melanom transferiert. Dies zeigte jedoch keine signifikant höhere Erfolgsrate als die Behandlung mit IL-2 allein (Rosenberg, Lotze et al. 1993).

Um tumorspezifische T-Zellen zu gewinnen, wurden TILs aus Melanomgewebe gewonnen und über mehrere Wochen *ex vivo* expandiert. Diese Zellen wurden dann zusammen mit IL-2 in den Patienten zurücktransferiert. Es zeigte sich bei 34% der Patienten ein klinischer Effekt, allerdings war dieser bei den meisten Patienten nicht lang anhaltend (Rosenberg, Yannelli et al. 1994) und die transferierten T-Zellen stellten bereits nach einer Woche nur noch 0,01% der Gesamt-T-Zellpopulation (Rosenberg, Aebersold et al. 1990). Spätere Versuche beinhalteten daher die Lymphodepletion der Empfänger vor der Verabreichung der expandierten TILs, so dass die tumorspezifischen T-Zellen homöostatisch proliferieren konnten. Bei diesem Versuchsansatz lag die Erfolgsquote bei bis zu 50% mit zum Teil lang anhaltenden Remissionen und Stabilisation der Erkrankung (Dudley, Wunderlich et al. 2005).

Da die Gewinnung von TILs nicht bei allen Patienten möglich ist, wurden TCR gegen weit verbreitete Tumorantigene identifiziert. Diese TCRs können durch retrovirale Transduktion in Lymphozyten eingebracht werden, wodurch gezielt tumorspezifische T-Zellen mit hoher Avidität erzeugt werden können. In einer ersten klinischen Studie mit einem MART-1 spezifischen TCR, zeigten zwei von 16 Melanompatienten Tumorregression (Morgan, Dudley et al. 2006) mit nun seit zwei Jahren anhaltender kompletter Remission (Rosenberg, Restifo et al. 2008).

Trotz der vielen unterschiedlichen Ansätze, das Immunsystem in der Krebsbekämpfung zu aktivieren und zu unterstützen, sind Erfolge der Immuntherapien abgesehen von den hohen Remissionsraten bei kurz expandierten TILs meist auf wenige Patienten beschränkt und oftmals von limitierter Dauer. Dies liegt vor allem daran, dass

Tumorzellen nicht statisch sind und unter selektivem Druck Wege finden, sich dem Immunsystem zu entziehen. Es ist daher notwendig, die Therapieansätze weiter zu optimieren und unterschiedliche Strategien zu kombinieren. Neue Strategien, wie die hier vorgestellte Suppression von koinhibitorischen Rezeptoren wie PD-1 auf tumorspezifischen T-Zellen durch retrovirale Transduktion mit siRNA, erweitern das Repertoire zusätzlich und weisen neue Möglichkeiten auf.

1.2 PD-1

1.2.1 Entdeckung des Rezeptors Programmed Death – 1 (PD-1)

1992 wurde PD-1 als ein Gen identifiziert, das in den murinen Zelllinien 2B4.11 (T-Zell-Hybridom) und LyD9 (hämatopoietische Vorläuferzelle) bei induzierter Apoptose verstärkt exprimiert wird. Zunächst nahm man an, dass das Gen in der Regulation dieses Phänomens involviert war (Ishida, Agata et al. 1992). Spätere Experimente zeigten jedoch, dass die PD-1 Expression nicht für die Apoptose von 2B4.11 Zellen nötig war, und dass eine Überexpression des Proteins nicht zur Induktion von Apoptose führte (Agata, Kawasaki et al. 1996). Aus diesen Anfängen ergab sich auch der fehlleitende Name *programmed death*.

In vivo Aktivierung von T-Zellen in Mäusen durch die Injektion mit anti-CD3 mAb (*monoclonal antibody*) führte zu einer Hochregulation des PD-1 Rezeptors auf der T-Zelloberfläche. Diese Daten konnten *in vitro* durch verschiedene Stimulationsmethoden, die die Aktivierung des T-Zellrezeptors (anti-CD3 mAb, Concanavalin A) oder eine Imitation der physiologischen Prozesse einer solchen Aktivierung (PMA/Ionomycin) beinhalteten, reproduziert werden. Ebenso war es möglich, PD-1 auf B-Zellen durch Zugabe von anti-IgM-Antikörper oder Phorbolmyristatazetat (PMA)/Ionomycin zu induzieren, nicht jedoch durch antigenrezeptor-unabhängige Stimulierung. Die Expression von PD-1 auf der Oberfläche von murinen Lymphozyten ist somit von der Aktivierung des entsprechenden Antigenrezeptors abhängig (Agata, Kawasaki et al. 1996).

Vergleichbare Ergebnisse wurden für *in vitro* Stimulation von humanen T-Lymphozyten mit Phytohämagglutinin (PHA) erreicht (Vibhakar, Juan et al. 1997).

1.2.2 Die Struktur des *PDCDI*-Gens

Das *PDCDI*-Gen findet sich auf Chromosom 1 bei Mäusen und auf Chromosom 2 beim Menschen, mit einer Übereinstimmung von 70% auf Nukleotidebene (Finger, Pu et al. 1997). Es besteht bei beiden Spezies aus 5 Exons. Exon 1 kodiert für ein kurzes Signalpeptid, während Exon 2 den extrazellulären Teil des Proteins mit einer IgV-ähnliche Domäne enthält. Exon 3 kodiert für ein kurzes Verbindungsstück und eine Transmembrandomäne und Exon 4 eine 12 Aminosäuren lange Sequenz, die den Beginn des zytoplasmatischen Teils darstellt. Exon 5 enthält die zytoplasmatische Domäne sowie eine lange 3'UTR (*untranslated region*).

Das Vorkommen verschiedener Spleißvarianten für PD-1 wurde in aktivierten humanen T-Zellen untersucht, und man fand Transkripte welchen Exon 2, Exon 3, Exons 2 und 3 oder Exons 2 bis 4 fehlten. Alle diese Transkripte, bis auf die Variante ohne Exon 3, wurden zusammen mit dem vollständigen PD-1 in gleichen Mengen auch in ruhenden peripheren mononukleären Blutzellen nachgewiesen. Bei Aktivierung der T-Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern wurden alle möglichen Transkripte signifikant hoch reguliert (Nielsen, Ohm-Laursen et al. 2005).

Das Transkript für PD-1 ohne Exon 3 führt zu einer löslichen Form von PD-1, der die Transmembrandomäne fehlt. Im Serum sowie in der Synovia von Patienten mit rheumatischer Arthritis konnte man hohe Konzentrationen des löslichen PD-1 nachweisen. Es wird vermutet, dass das lösliche PD-1 die negative regulatorische Funktion des membrangebundenen PD-1 behindert (Wan, Nie et al. 2006).

1.2.3 Regulation der Transkription von *PDCDI*

Die Regulation der Transkription des *PDCDI* Gens ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Über Computeranalysen identifizierte man zwei hoch konservierte, potenzielle regulatorische Sequenzen in der 5'-Region vor dem Startcodon von PD-1, genannt CR (*conserved region*)-B und CR-C. DNase I – Überempfindlichkeit ist ein Kennzeichen von zugänglichem Chromatin und einer möglichen regulatorischen Funktion von Sequenzabschnitten. Untersuchungen in der murinen T-Zelllymphom Zelllinie EL4, die PD-1 konstitutiv exprimiert, ergaben zwei DNaseI-überempfindliche Stellen in einem Abschnitt von vier Kilobasen vor dem Start von PD-1. Diese beiden Sequenzabschnitte lagen innerhalb der konservierten Regionen CR-B und CR-C. In der murinen B-Zelllymphom Zelllinie A20, die PD-1 nicht exprimiert, fanden sich die

beiden DNaseI-überempfindlichen Stellen nicht. Dies spricht dafür, dass CR-B und CR-C als *cis*-Elemente die PD-1 Expression regulieren.

Chromatin-Modifikationen, die für aktivierte Genabschnitte typisch sind, finden sich in der 5'-Region vor PD-1 in EL4 Zellen, jedoch nicht in A20. Dies legt die Vermutung nahe, dass epigenetische Inaktivierung ebenfalls an der Regulation von PD-1 beteiligt ist. Setzte man CD8⁺ T-Zellen in dieselben Experimente ein, so erhielt man Ergebnisse, die mit denen der EL4 Zellen übereinstimmen (Oestreich, Yoon et al. 2008).

Des Weiteren liegen Daten vor, die eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NFATc1 (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen, zytoplasmatisch, calcineurin-abhängig-1) an der Kontrolle der PD-1 Expression nahe legen. Es ist bekannt, dass Reagenzien, die die T-Zellaktivierung blockieren, z.B. der NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen)-Inhibitor Cyclosporin A, zu einer Reduktion der PD-1 Expression in Mäusen führen. Erschöpfte CD8⁺ T-Zellen, die sich unter anderem durch eine hohe Expression von PD-1 auszeichnen, weisen erhöhte Mengen an NFATc1 Transkripten auf.

Computeranalysen ergaben fünf mögliche Konsensus-Sequenzen für die Bindung von Transkriptionsfaktoren vom Typ NFAT, die teilweise innerhalb der zuvor identifizierten konservierten Regionen CR-B und CR-C liegen. Chromatin-Immunpräzipitation zeigte, dass NFATc1 an die Region CR-C in EL4 Zellen bindet. Mutation einer NFAT-Bindestelle in CR-C innerhalb eines Luciferase-Reporter-Assays mit CD8⁺ T-Zellen, führte zu vollständigem Verlust der Expression.

Diese Daten sprechen dafür, dass NFATc1 ein kritischer Faktor bei der initialen Induktion der PD-1 Expression nach T-Zellaktivierung ist (Oestreich, Yoon et al. 2008).

1.2.4 Die Proteinstruktur von PD-1

Der PD-1 Rezeptor ist ein 288 Aminosäuren langes Transmembranprotein vom Typ I. Die ersten 20 Aminosäuren kodieren für ein kurzes Signalpeptid, das nach Glutamin 20 abgespalten wird, so dass das eigentliche Peptid aus 268 Aminosäuren besteht. PD-1 setzt sich aus einer extrazellulären Domäne von 147 Aminosäuren, einer Transmembrandomäne von 27 und einem zytoplasmatischen Schwanz von 94 Aminosäuren zusammen. Es besteht eine Homologie von ca. 60% auf Aminosäureebene zwischen murinem und humanem PD-1 (Finger, Pu et al. 1997).

Die extrazelluläre Domäne enthält eine IgV-ähnliche Struktur und stimmt zu 21 – 33% mit der anderer Mitglieder der CD28 Familie [CTLA-4, CD28, ICOS (*inducible*

costimulator)] überein. Bei einer errechneten Größe von 29 kDa läuft das Protein im Westernblot unter reduzierenden Bedingungen bei 50 – 55kDa, was darauf schließen lässt, dass die vier möglichen N-Glykosylierungsstellen stark glykosyliert vorliegen. Da sich unter nicht reduzierenden Bedingungen die Größe nicht verändert, geht man davon aus, dass PD-1 als Monomer vorliegt (Agata, Kawasaki et al. 1996). Außerdem fehlt PD-1 der membran nahe Cysteinrest, über den CTLA-4, CD28 und ICOS Disulfidbrücken ausbilden und so Homodimere bilden können (Zhang, Schwartz et al. 2004).

Der zytoplasmatische Schwanz von PD-1 enthält zwei Tyrosinreste, von denen der membran nähere innerhalb eines *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) der andere innerhalb eines *Immunoreceptor tyrosine-based switch motif* (ITSM) liegt (Okazaki and Honjo 2007).

1.2.5 Expression von PD-1 und seinen Liganden

Der Rezeptor PD-1 kann auf T-Zellen, B-Zellen, NKT (natürliche Killer-T)-Zellen, aktivierten Monozyten und DCs exprimiert werden. PD-1 wird nicht auf ruhenden T-Zellen exprimiert, wird aber nach Aktivierung der Zelle induziert. Des Weiteren wird PD-1 während der T-Zellreifung im Thymus auf CD4⁺CD8⁻ doppelt negativen Thymozyten exprimiert, was die Vermutung nahe legt, dass der PD-1/PD-L Signaltransduktionsweg eine Rolle bei der Induktion der Zentralen Toleranz spielt (Nishimura, Agata et al. 1996).

Die beiden Liganden PD-L1 und PD-L2 unterscheiden sich in ihrem Expressionsmuster. PD-L1 wird konstitutiv auf T- und B-Zellen, DCs, Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen und aus dem Knochenmark abgeleiteten Mastzellen exprimiert und wird auf T-Zellen bei Stimulation mit anti-CD3 mAb, auf Makrophagen bei Zugabe von LPS, IFN γ , GM-CSF (*G*ranulocyte *m*acrophage *c*olony-*s*timulating *f*actor) oder IL-4 und auf DCs durch IFN γ , GM-CSF oder IL-4 hoch reguliert. PD-L2 wird auf DCs, Makrophagen und aus dem Knochenmark abgeleiteten Mastzellen exprimiert und kann auf Monozyten und Makrophagen durch GM-CSF, IL-4 und IFN γ induziert werden (Yamazaki, Akiba et al. 2002).

Neben der Expression auf lymphoiden Zellen finden sich die beiden Liganden zusätzlich auf nicht-lymphoiden Geweben im Organismus. Während der Thymozytenreifung ist PD-L1 auf dem thymischen Kortex und den Thymozyten selbst

präsent, PD-L2 findet sich auf der Oberfläche der Medulla (Brown, Dorfman et al. 2003; Liang, Latchman et al. 2003). PD-L1 wird unter anderem auch auf Endothelzellen im Herzen, β -Zellen im Pankreas, Glialzellen im entzündeten Gehirn und Muskelzellen exprimiert (Ansari, Salama et al. 2003; Iwai, Terawaki et al. 2003; Liang, Latchman et al. 2003; Salama, Chitnis et al. 2003; Wiendl, Mitsdoerffer et al. 2003). Die weite Verbreitung von PD-L1 in der Peripherie und zahlreiche Verbindungen zu diversen Autoimmunerkrankungen, wie in Kapitel 1.2.7 näher erörtert, lassen darauf schließen, dass PD-1/PD-L1 Interaktionen T-Zellantworten in der Peripherie regulieren.

Die Liganden des PD-1 Rezeptors werden darüber hinaus in der Plazenta exprimiert, was zu der Annahme führte, dass feto-maternale Toleranz durch PD-1/PD-L-abhängige Inhibition des mütterlichen Immunsystems erreicht wird (Liang, Latchman et al. 2003; Petroff, Chen et al. 2003). In einem Mausmodell für Abortion, führte PD-L1 Blockade bei allogener und damit für Abgänge anfälligerer Paarung zu einer erhöhten Zahl von Abgängen, während dies bei syngener Paarung nicht der Fall war. PD-L2 Blockade hatte keinen Effekt, was vermutlich auf Unterschiede in der Expression der beiden Liganden zurückzuführen ist [PD-L2 auf der Decidua, PD-L1 nur auf der Decidua basalis (Guleria, Khosroshahi et al. 2005)]. Auch wenn sich das Expressionsmuster der PD-1 Liganden in der Plazenta von Mensch und Maus geringfügig unterscheidet (Petroff, Chen et al. 2003; Guleria, Khosroshahi et al. 2005), könnte der PD-1/PD-L Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des immunprivilegierten Status der Plazenta in beiden Spezies spielen.

Neben der normal regulierten Expression finden sich PD-L1 und PD-L2 auf zahlreichen menschlichen Tumoren (siehe Kapitel 1.2.8). Eine hohe Expression der PD-1 Liganden ist dabei häufig mit einer schlechten Prognose verbunden. Es ist daher davon auszugehen, dass die negative Regulation von Effektor-T-Zellen durch PD-1/PD-L1 Interaktion eine bedeutende Rolle in der Tumorummunologie spielt (Okazaki and Honjo 2006).

1.2.6 Signaltransduktion mittels PD-1

Der PD-1 Rezeptor vermittelt ein koinhibitorisches Signal an die Zelle auf der er exprimiert wird, wenn zur gleichen Zeit Bindung eines PD-1-Liganden und Aktivierung des T-Zellrezeptors stattfindet. Es ist dabei notwendig, dass das Signal für den T-

Zellrezeptor und der Ligand für PD-1 auf derselben antigenpräsentierenden Zelle exprimiert werden (Bennett, Luxenberg et al. 2003).

Die Signaltransduktion des PD-1 Rezeptors beginnt mit der Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste im ITIM und im ITSM der zytoplasmatischen Domäne. In B-Zellen wird PD-1 nach B-Zellrezeptoraktivierung durch die Tyrosinkinase Lyn aus der Src Kinase-Familie phosphoryliert (Okazaki, Maeda et al. 2001). In T-Zellen könnte dafür ebenfalls eine Kinase dieser Gruppe verantwortlich sein (Sheppard, Fitz et al. 2004).

Nach der Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste können die beiden SH (*src homology*) 2-Domäne enthaltenden Tyrosinphosphatasen 1 (SHP-1) und 2 (SHP-2) an das ITSM binden. Für das ITIM dagegen wurde nur eine mögliche Bindung von SHP-2 nachgewiesen. Dies wurde mit künstlichen Peptiden gezeigt, die jeweils die ITIM oder ITSM Aminosäuresequenz mit einem Phosphotyrosinrest an der Stelle des Tyrosins enthielten. In lebenden Zellen konnte jedoch ausschließlich die Rekrutierung von SHP-2 an den zytoplasmatischen Schwanz von PD-1 nachgewiesen werden (Okazaki, Maeda et al. 2001; Chemnitz, Parry et al. 2004; Sheppard, Fitz et al. 2004).

In einer murinen B-Zelllinie wurde durch abwechselnde Mutation der beiden Motive gezeigt, dass PD-1 ohne funktionelles ITIM inhibieren kann, jedoch nicht ohne ITSM (Okazaki, Maeda et al. 2001). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Inhibition von B- und T-Zellen bei PD-1 Ligation durch die Rekrutierung der Phosphatase SHP-2 an das phosphorylierte ITSM des Rezeptors vermittelt wird.

Am Übergang von einer naiven zu einer Effektor-T-Zelle nach Bindung des T-Zellrezeptors sind Signalkaskaden und Proteine beteiligt, die über Phosphorylierung von Tyrosinresten aktiviert werden. Die inhibitorischen Effekte des Rezeptors PD-1 werden durch die Aktivität der Phosphatase SHP-2 vermittelt, die Phosphatgruppen von Tyrosinresten abspaltet. Als mögliche Zielproteine von SHP-2 wurden in T-Zellen die Tyrosinkinase ZAP-70 (Zeta-assoziiertes Protein von 70 kDa) und der CD3 ζ -Ketten Komplex identifiziert, die bei Bindung des T-Zellrezeptors phosphoryliert und dadurch aktiviert werden. ZAP-70 steht am Beginn verschiedener Signaltransduktionsketten die in der Expression von Proteinen der aktivierten T-Zelle, z.B. Zytokinen enden. Bei Kolligation von T-Zellrezeptor und PD-1 wird das CD3 ζ -vermittelte Phosphotyrosinsignal zu 70% inhibiert. Die Aktivierung der Proteinkinase C θ (PKC θ), die für die IL-2-Produktion der T-Zelle von Bedeutung ist, wird ebenfalls PD-1 bedingt attenuiert. Die T-Zellrezeptorabhängige ERK (extrazellulär regulierte Kinase)-Signalkaskade wird bei PD-1 Bindung zu 80% unterdrückt (Sheppard, Fitz et al. 2004).

Des Weiteren wirkt PD-1 den Effekten des kostimulatorischen Effektors CD28, die u.a. erhöhte Glukoseaufnahme und Metabolismus der Zelle beinhalten, entgegen. Dies wird durch die Inhibition der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) vermittelt, wodurch wiederum die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt verhindert wird. Akt wird in verschiedenen zellulären Prozessen, wie Zytokinsynthese, Überleben und Glukosestoffwechsel eine wichtige Rolle zugeschrieben. Ein weiterer PI3K-abhängiger Prozess ist die CD28-induzierte Expression des Überlebensfaktors Bcl-xL (*Basal cell lymphoma-extra large*) (Parry, Chemnitz et al. 2005).

Die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-3, Tbet und Eomes, die mit der Effektorfunktion einer T-Zelle in Verbindung stehen, wird ebenfalls durch PD-1 inhibiert (Nurieva, Thomas et al. 2006).

1.2.7 PD-1 und Autoimmunität

Nach der Entdeckung von PD-1 wurden PD-1 defiziente Mäuse hergestellt, um die Bedeutung des koinhibitorischen Rezeptors *in vivo* untersuchen zu können. Die Phänotypen von PD-1 *knock-out* Mäusen auf verschiedenen genetischen Hintergründen weisen alle auf eine Verknüpfung zwischen PD-1 und Autoimmunkrankheiten hin.

Die erste PD-1 *knock-out* Maus entstand auf dem C57BL/6-Hintergrund. Tiere des C57BL/6 *Pdcd1*^{-/-} -Stammes besitzen ein hyperaktiviertes Immunsystem mit Splenomegalie und B-Zellen mit erhöhter Proliferation *in vitro*. Bei einem Alter von 14 Monaten leiden etwa 50% der Mäuse unter Glomerulonephritis, außerdem entwickelt der Großteil der Tiere Arthritis (Nishimura, Nose et al. 1999).

Balb/c-*Pdcd1*^{-/-} Mäuse erkranken an dilatativer Kardiomyopathie, wobei nach 5 Monaten etwa die Hälfte der Tiere an schwerem kongestivem Herzversagen versterben (Nishimura, Okazaki et al. 2001). Das vergrößerte Herz der Mäuse ist dabei unterschiedlich schwer entzündet und im Serum der Tiere finden sich Antikörper gegen körpereigenes kardiales Troponin I, die für die Pathogenese verantwortlich gemacht werden (Okazaki, Tanaka et al. 2003; Okazaki and Honjo 2005).

Fehlende Expression des koinhibitorischen Rezeptors PD-1 war somit in Mausstämmen, die für Autoimmunerkrankungen anfällig sind, für eine beschleunigte und verstärkte Erkrankung der Tiere verantwortlich. Daraus schließt man, dass PD-1 in der Induktion und/oder Aufrechterhaltung von Immuntoleranz involviert ist.

Inhibitorische Signale, die über den PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg vermittelt werden, sind auf verschiedene Art und Weise in der Zentralen und der Peripheren Toleranz eingebunden. So wird PD-1 auf heranreifenden Thymozyten während der Induktion der Zentralen Toleranz exprimiert, während sich PD-L1 auf dem thymischen Kortex und den Thymozyten selbst findet. Die Expression des zweiten Liganden PD-L2 ist auf die Oberfläche der thymischen Medulla beschränkt (Brown, Dorfman et al. 2003; Liang, Latchman et al. 2003). CD4⁺CD8⁻ doppelt negative Thymozyten exprimieren PD-1 sobald sie mit der Rekombination der β -Kette des T-Zellrezeptors beginnen und erstmals funktionelle T-Zellrezeptoren auf der Oberfläche präsentieren (Nishimura, Agata et al. 1996). Während des Übergangs vom doppelt negativen zum doppelt positiven (CD4⁺CD8⁺) Stadium der Thymozytenreifung inhibiert die PD-1/PD-L1 Bindung positive Selektion (Nishimura, Honjo et al. 2000). Dabei beeinflusst PD-1 die Signalschwelle der positiven Selektion, und der Verlust von entweder PD-1 oder PD-L1 erhöht die Zellzahl doppelt positiver Thymozyten (Keir, Latchman et al. 2005). PD-1 kann außerdem zur negativen Selektion beitragen (Blank, Brown et al. 2003) und wurde als mögliches Kandidatengen für gestörte Zentrale Toleranz in NOD (*non-obese diabetic*, nicht-fettleibig diabetische) Mäusen identifiziert (Zucchelli, Holler et al. 2005). All dies weist auf eine Rolle von PD-1 und PD-L1 bei der Induktion der Zentralen Toleranz hin. Selbstreaktive T-Zellen, die der negativen Selektion im Thymus entkommen, werden in der Peripherie durch Mechanismen der Peripheren Toleranz kontrolliert. Erste Kontakte einer T-Zelle mit APCs (*antigen presenting cells*), z.B. DCs, können mögliche selbstreaktive T-Zellantworten modifizieren. Dies geschieht durch die Präsentation von Selbstantigenen auf ruhenden DCs, wobei selbstreaktive T-Zellen durch PD-1 Bindung unterdrückt werden. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass unreife DCs an der Errichtung der T-Zelltoleranz beteiligt sind, wobei Inhibition durch PD-1 eine wichtige Rolle spielt. So wird die Antwort von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen auf Kontakt mit antigenpräsentierenden ruhenden DCs durch den Verlust von PD-1 verstärkt (Probst, McCoy et al. 2005).

Untersuchungen in Mausmodellen zu Autoimmunität und Toleranz haben gezeigt, dass PD-1/PD-L1 Interaktionen nicht nur in der Anfangsphase der Aktivierung und Expansion selbstreaktiver T-Zellen wichtig sind, sondern dass gerade auch die Effektorfunktionen solcher T-Zellen bei erneutem Kontakt mit dem Antigen beeinflusst werden.

Im NOD Mausmodell für autoimmunen T-Zell-vermittelten Diabetes wird PD-L1 im Pankreas auf den Langerhans-Inseln exprimiert (Liang, Latchman et al. 2003). Der Verlust oder die Blockade von PD-1 oder PD-L1 führt schneller zu schwerem Diabetes mit beschleunigter Insulinitis und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch T-Zellen (Ansari, Salama et al. 2003; Wang, Yoshida et al. 2005; Keir, Liang et al. 2006). Ein antigenspezifischer Therapieansatz, bei dem antigenbeladene fixierte APCs Toleranz und Remission des Diabetes in NOD Mäusen vermitteln, ist ebenfalls von der PD-1/PD-L1 Interaktion abhängig (Fife, Guleria et al. 2006).

Um die Bedeutung der PD-L1 Expression auf APCs und auf peripherem Gewebe näher zu untersuchen, wurden Versuche mit Knochenmarkschimären durchgeführt. Dazu wurde das Knochenmark von PD-L1^{-/-}/PD-L2^{-/-} NOD Mäuse durch Bestrahlung zerstört und durch das Knochenmark von WT NOD Mäusen ersetzt. So entstanden Tiere, in denen PD-L1 ausschließlich auf den APCs, die sich aus Knochenmarksvorläuferzellen entwickeln, exprimiert wurde. Transferierte man T-Zellen aus noch nicht diabetischen WT NOD Mäusen in die Knochenmarkschimären, so entwickelten die Tiere Diabetes. Dies zeigte, dass die Expression von PD-L1 und PD-L2 auf den APCs nicht ausreicht, um Diabetes in PD-L1^{-/-}/PD-L2^{-/-} NOD Mäusen zu verhindern. Die PD-L1 Expression auf peripherem Gewebe, das nicht von Knochenmarkszellen abstammt, ist also für die Inhibition von selbstreaktiven T-Zellen erforderlich (Keir, Liang et al. 2006; Grabie, Gotsman et al. 2007; Keir, Freeman et al. 2007).

PD-1/PD-L1 ist somit bei der Entstehung von Diabetes in NOD Mäusen und dem Voranschreiten der Erkrankung beteiligt. Außerdem ist PD-1/PD-L1 Interaktion ein Schlüsselfaktor zur Induktion von Toleranz in Geweben.

Ein Mausmodell zur Erforschung der Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Dabei werden Mäuse mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) immunisiert, worauf die Tiere innerhalb von 10 Tagen Symptome zeigen. PD-1, PD-L1 und PD-L2 werden auf Zellinfiltraten in den Meningen während akuter EAE in C57BL/6 Mäusen exprimiert (Liang, Latchman et al. 2003). PD-L1 findet sich im zentralen Nervensystem (ZNS) auf inflammatorischen Zellen sowie auf Astrozyten und vaskulären Endothelzellen. PD-L1 wird auf CD11b⁺ APCs durch IL-12 (Cheng, Zhao et al. 2007) und auf mikroglialen Zellen durch IFN γ induziert (Magnus, Schreiner et al. 2005). Erste Studien unter Verwendung von PD-1 und PD-L1 blockierenden Antikörpern ergaben Hinweise für eine Rolle der PD-1/PD-L1/2 Interaktionen bei EAE (Salama, Chitnis et al. 2003). Die

Gabe von anti-PD-1 oder anti-PD-L2 mAb während der Induktion von EAE führt zu beschleunigtem Einsetzen und schwererem Verlauf der Krankheit, erhöhten inflammatorischen Infiltraten im ZNS und erhöhter Zahl MOG-reaktiver T-Zellen und Antikörper. Versuche mit anti-PD-L1 oder anti-PD-L1 mAb in verschiedenen Mausstämmen (Zhu, Guleria et al. 2006) oder mit PD1^{-/-}, PD-L1^{-/-} und PD-L2^{-/-} gen-defizienten Tieren (Latchman, Liang et al. 2004; Carter, Leach et al. 2007) ergaben, dass PD-1 und vorwiegend PD-L1, aber nicht PD-L2, für die Beeinflussung der Schwere der EAE in den meisten Mausstämmen verantwortlich sind. Studien mit adoptivem Transfer von MOG-spezifischen T-Zellen in Wildtyp und PD-L1^{-/-} Mäuse unterstreichen die kritische Bedeutung von PD-L1 bei der Einschränkung der myelinreaktiven pathogenen T-Zellen und zeigen, dass PD-L1 sowohl auf den transferierten T-Zellen als auch im Empfängerstamm für die Unterdrückung enzephalitogener T-Zellantworten wichtig ist (Latchman, Liang et al. 2004).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Peripheren Toleranz sind regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die Proliferation und Zytokinproduktion aktivierter T-Zellen unterdrücken können. Sowohl PD-1 als auch PD-L1 sind auf dieser T-Zellpopulation hoch exprimiert und könnten eine Rolle bei der regulatorischen Funktion von T_{reg} spielen (Baecher-Allan, Brown et al. 2003). Einige Studien vermuten, dass PD-L1 für die Induktion regulatorischer T-Zellpopulationen wichtig sein könnte, der Mechanismus ist jedoch noch nicht klar (Krupnick, Gelman et al. 2005). Experimente im Kolitismodell unterstützen das Argument für eine Rolle von PD-1/PD-L1 auf die Subpopulation CD4⁺CD25⁻PD-1⁺ T_{reg}, die die Entwicklung von Kolitis unterdrücken können (Totsuka, Kanai et al. 2005). PD-L1 ist für die *in vitro* Inhibition durch eine weitere supprimierende Population von CD4⁺DX5⁺ T Zellen wichtig (Hornung, Farkas et al. 2006).

Verschiedene Autoimmunkrankheiten beim Menschen werden mit SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) in *PDCDI* in Verbindung gebracht. Ein Zusammenhang wird vermutet für Systemischen Lupus erythematodes (SLE) (Prokunina, Castillejo-Lopez et al. 2002; Wang, Ye et al. 2008), Multiple Sklerose (MS) (Kroner, Mehling et al. 2005), Rheumatische Arthritis (Prokunina, Padyukov et al. 2004), Typ 1 Diabetes (Nielsen, Hansen et al. 2003) und Spondylitis ankylosans (Lee, Lee et al. 2006). Die meisten dieser Polymorphismen finden sich in konservierten Regionen in Introns der Gensequenz. Einer dieser Polymorphismen liegt in einer Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Runx1 (*runt related transcription factor 1*), der eine wichtige

Rolle in der Regulation der Hämatopoese spielt. Dies könnte Einfluss auf die Stabilität der mRNA oder den Expressionsgrad von PD-1 haben und wird mit verminderter PD-1 vermittelter Inhibition von IFN γ Produktion in MS Patienten in Verbindung gebracht (Kroner, Mehling et al. 2005).

Für die Liganden von PD-1 liegen weniger Daten vor, allerdings wird ein Polymorphismus in *PDCD1LG1* mit Morbus Basedow (Hayashi, Kouki et al. 2008) und einer in *PDCD1LG2* mit SLE (Wang, Lin et al. 2007) in Verbindung gebracht.

Des Weiteren wurden Antikörper gegen PD-L1 in Patienten mit rheumatischer Arthritis gefunden, die zu einer Disregulation der T-Zellantwort beitragen könnten (Dong, Strome et al. 2003).

Alle diese Daten geben Hinweise auf eine wichtige Rolle des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges in der Induktion und der Aufrechterhaltung der Peripheren Toleranz von T-Zellen.

1.2.8 PD-1 in der Tumormunologie

Klinische Versuche mit Tumormuntherapien, zeigten, dass tumorspezifische T-Zellen in Patienten in der Lage sind, zum Tumor zu wandern und diesen zu infiltrieren (Kapitel 1.1.3). Dennoch ist der Erfolg dieser Behandlungen häufig gering und kurzlebig, da die Tumorzellen aufgrund ihrer hohen genetischen Instabilität einen *Tumour – Escape* Phänotyp entwickeln können (vgl. Kapitel 1.1.2).

Der Ligand PD-L1 wurde auf einer Vielzahl verschiedener Tumorarten im Menschen gefunden, was zu der Hypothese führte, dass negative Regulation von tumorspezifischen T-Zellen durch den PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg beim *Tumour - Escape* involviert sein könnte. Hinzu kommt, dass tumorinfiltrierende T-Zellen die Expression den Rezeptors PD-1 hoch regulieren (Blank, Brown et al. 2003). Es liegen inzwischen mehrere Studien vor, in denen die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen direkt mit einer unvorteilhaften Prognose verbunden wird (Nieren-, Eierstock-, Blasen-, Brust-, Magen- und Bauchspeicheldrüsenkrebs) (Madrenas, Schwartz et al. 1996; Dong, Strome et al. 2002; Strome, Dong et al. 2003; Konishi, Yamazaki et al. 2004; Thompson, Gillett et al. 2004; Wu, Zhu et al. 2006; Hamanishi, Mandai et al. 2007; Inman, Sebo et al. 2007; Nakanishi, Wada et al. 2007; Nomi, Sho et al. 2007). Diese Studien weisen zudem darauf hin, dass höhere PD-L1 Oberflächenexpression mit einer Progression der malignen Erkrankung assoziiert ist.

Studien mit Tiermodellen zeigten, dass PD-L1 auf Tumoren T-Zellaktivierung inhibieren und die Lyse von Tumorzellen verhindern kann. In einigen Fällen kam es auch zu vermehrter Apoptose tumorspezifischer T-Zellen (Dong, Strome et al. 2002; Hirano, Kaneko et al. 2005). Der Einsatz von blockierenden anti-PD-L1 mAb führte in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen dazu, dass tumorspezifische T-Zellen Tumorzellen besser angreifen konnten, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Dong, Strome et al. 2002; Iwai, Ishida et al. 2002; Strome, Dong et al. 2003; Winterle, Schreiner et al. 2003; Hirano, Kaneko et al. 2005; Blank, Kuball et al. 2006). Injizierte man die PD-L1 exprimierende Myeloma-Zelllinie J558L in PD-1^{-/-} oder PD-1^{+/+} Mäuse, so zeigte sich, dass PD-1 defiziente Tiere in der Lage waren, das Tumorstadium zu unterdrücken, während Tiere, deren T-Zellen PD-1 exprimieren, Tumore entwickelten. Die Gabe von anti-PD-L1 mAb an PD-1^{+/+} Tiere führte zu verlangsamtem Tumorstadium, jedoch nicht zur Abstoßung (Iwai, Ishida et al. 2002). Des Weiteren wird in PD-1 defizienten Tieren die Ausbreitung von schwach immunogenen Melanom- oder Darmkrebszellen im Organismus verhindert (Iwai, Terawaki et al. 2005). Tumorexperimente mit adoptivem T-Zelltransfer zeigten außerdem, dass PD-1^{-/-} tumorspezifische T-Zellen in der Lage sind, Tumore abzustößeln, während PD-1^{+/+} T-Zellen das Tumorstadium nicht kontrollieren können (Iwai, Ishida et al. 2002; Blank, Brown et al. 2004). Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass die Disruption des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges die Effizienz von Immuntherapien gegen Tumore bedeutend verbessern könnten.

1.3 RNAi: Eine Methode um PD-1 ausschließlich auf tumorspezifischen T-Zellen zu unterdrücken

Tumorspezifische T-Zellen können über den PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg bei ihrem Angriff auf Tumorzellen inhibiert werden. Dies wurde im murinen System durch den Einsatz PD-1 gendefizienter Tiere (Blank, Brown et al. 2004) und auch durch blockierenden anti-PD-L1 mAb [z.B. (Dong, Strome et al. 2002)] nachgewiesen. Bei menschlichen Tumorerkrankungen ist eine hohe Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen häufig mit einer schlechten Prognose verbunden [z.B. (Thompson, Gillett et al. 2004)]. Daher stellt der PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg einen möglichen Ansatzpunkt zu einer immunmodulatorischen Tumorthherapie dar. Bislang wurden zwei

blockierende anti-PD-1 mAb in klinischen Studien der Phase I getestet [ASCO-Abstrakt (Brahmer, Topalian et al. 2008), (Berger, Rotem-Yehudar et al. 2008)].

Der PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg ist jedoch auch an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz des Immunsystems beteiligt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass bei einer systemischen Blockade der PD-1/PD-L1 Interaktion über blockierende Antikörper Autoimmun-Nebenwirkungen auftreten, wie dies für blockierende Antikörper gegen den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4 beobachtet wurde [(Korman, Peggs et al. 2006), vgl. auch Kapitel 1.1.3.4].

Autoimmun-Nebenwirkungen, die bei der Brechung der peripheren Toleranz durch blockierende Antikörper gegen inhibitorische Signaltransduktionswege auftreten, können entweder durch selbstspezifische T-Zellen, die der Selektion im Thymus entkommen sind, oder aber durch tumorspezifische T-Zellen, die ein körpereigenes TAA erkennen, verursacht werden. Letzteres lässt sich z.B. in Melanompatienten beobachten, die bei Induktion einer gegen MART-1 gerichteten Tumorantwort auch Vitiligo (Zerstörung der MART-1 exprimierenden Melanozyten in der Haut) oder Uveitis (Angriff auf MART-1 exprimierende Retinazellen) entwickeln (Phan, Yang et al. 2003; Maker, Phan et al. 2005). Selbst wenn man einen Weg findet, die Immuntoleranz während der Behandlung aufrecht zu erhalten, ließen sich die letztgenannten Autoimmuneffekte nicht vermeiden.

Um den PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg bei intakter peripherer Toleranz ausschließlich auf tumorspezifischen T-Zellen zu unterdrücken, wurde die RNA Interferenz (RNAi) als Methode gewählt.

RNA Interferenz wird durch kleine doppelsträngige (ds) RNA Moleküle mit einer Länge von 21 bis 27 Nukleotiden, mit einem 3'-Überhang von zwei Nukleotiden und einem phosphorylierten 5'-Ende, vermittelt. Diese kleinen dsRNA Moleküle können von Vorläufermolekülen durch das Enzym DICER abgespalten werden, sie können aber auch künstlich von außen durch Elektroporation oder Lipofektion in Zellen eingeführt werden. Ein Strang der kleinen interferierenden (*small interfering*) RNA wird dann in den so genannten *RISC (RNA induced silencing complex)* integriert, in dem sich die spezifische mRNA komplementär an den siRNA-Strang anlagert. Vollständige Komplementarität führt zu sequenzspezifischer Spaltung der Ziel-mRNA, während unvollständige Paarung die Proteinsynthese an der mRNA blockiert (Abb. 1). Verschiedene siRNA Sequenzen für das gleiche Gen variieren in ihrer Effektivität zur Herunterregulierung der Proteinexpression (Hannon 2002).

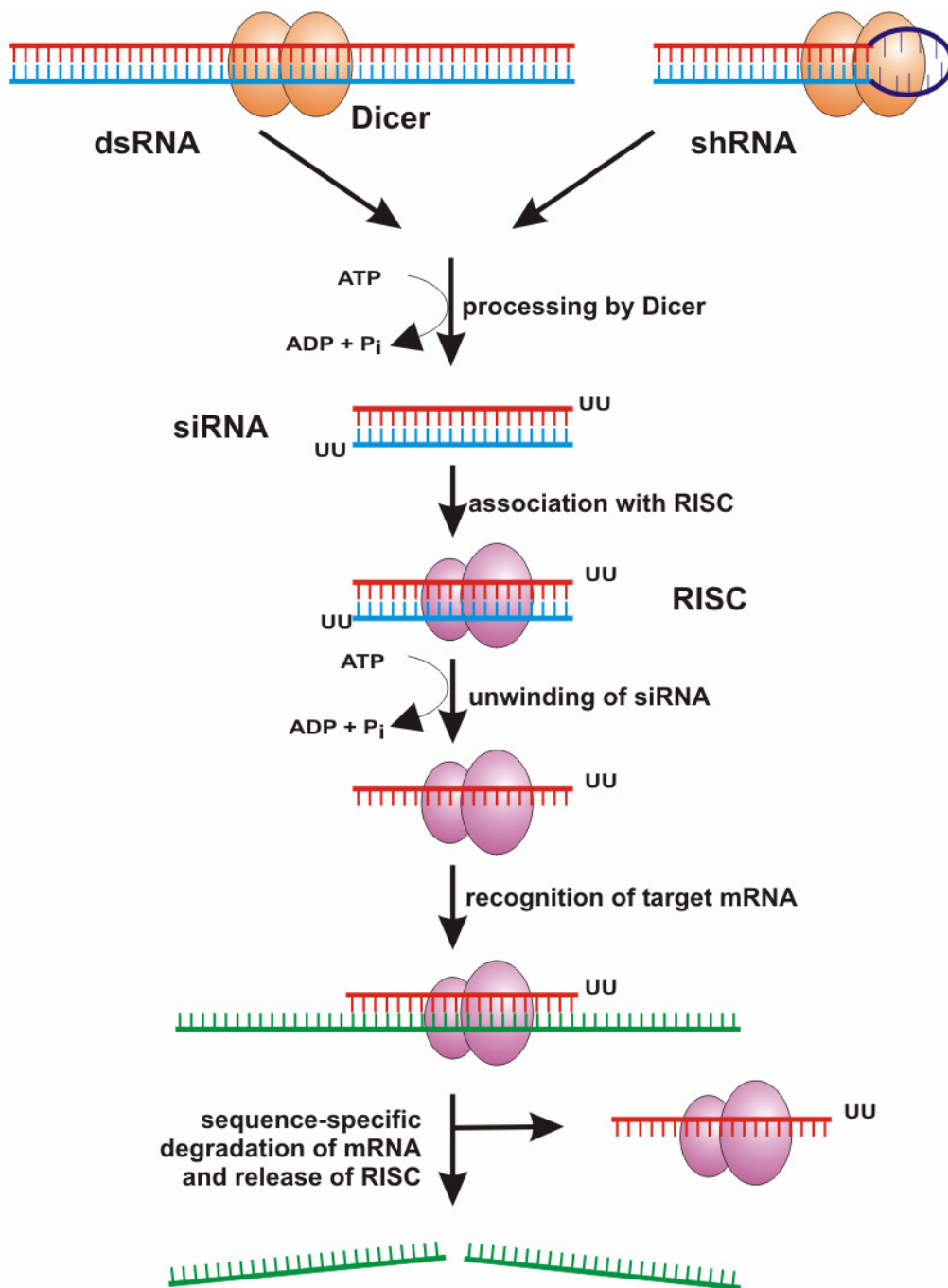


Abbildung 1: RNA Interferenz (RNAi). DsRNA oder *short hairpin* RNA (shRNA) werden durch das Enzym DICER in siRNA umgewandelt. Ein Strang der siRNA wird in den RISC eingelagert. Die komplementäre Ziel-mRNA wird über komplementäre Basenpaarung gebunden, abgebaut und wieder aus dem RISC entlassen [Abbildung aus (Rutz and Scheffold 2004)].

Um siRNA stabil in Zellen einzuführen, verwendet man retrovirale Transfektion mit siRNA-exprimierenden Vektoren. Das pSUPER RNAi SystemTM ist ein Vektorsystem, das speziell dafür entworfen wurde, *short hairpin* (kurze Haarnadel) RNA zu generieren (Brummelkamp, Bernards et al. 2002). Der Vektor kodiert für die siRNA Sequenz, die

durch eine Schlaufe mit der reversen komplementären Sequenz verbunden ist, unter der Kontrolle des H1 Promotors. Retrovirale Transduktion führt zu einer unspezifischen Integration des siRNA Konstruktes in das Genom der Zielzelle. Nach der Transkription lagert sich die RNA zu einem shRNA Vorläufermolekül zusammen, welches ein Substrat für DICER ist und durch dieses Enzym in die funktionelle siRNA gespalten wird (Abb. 2)(Brummelkamp, Bernards et al. 2002).

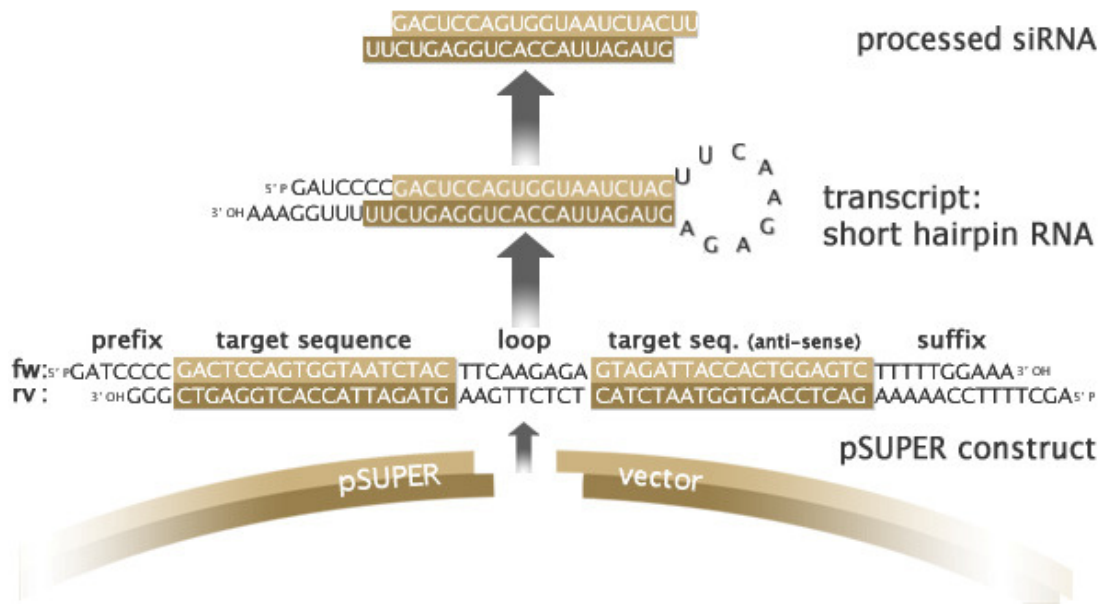


Abbildung 2: Umsetzung von shRNA in siRNA. Das shRNA-Konstrukt im Insert von pSUPER wird in RNA umgeschrieben. Das so entstehende RNA-Molekül bildet über komplementäre Basenpaarung shRNA aus, die dann vom Enzym DICER in funktionelle siRNA umgewandelt wird (Quelle: <http://mekentosj.com/irnai/psuper.html>).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Unterbrechung des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges durch monoklonale Antikörper oder durch *knock-out* des Rezeptors in Mäusen führt zu deutlich verbesserter T-Zellaktivität und Tumorkontrolle. Die Interaktion des PD-1 Rezeptors mit seinem Liganden PD-L1 ist daher ein viel versprechender Angriffspunkt um die Effektivität von Tumorimmuntherapien zu verbessern. Da dieser Signaltransduktionsweg auch in der Induktion und Aufrechterhaltung der Peripheren Toleranz eine wichtige Rolle spielt, ist bei einer systemischen Blockade durch Antikörper gegen PD-L1 oder PD-1 mit Autoimmunkomplikationen zu rechnen. Um dies zu vermeiden, wurde RNA Interferenz als Methode gewählt, PD-1 speziell in den adoptiv transferierten tumorspezifischen T-Zellen herunterzuregulieren.

Die Ziele dieser Doktorarbeit waren daher folgende:

1. Identifizierung von effektiven siRNA-Sequenzen gegen PD-1 im murinen System und retrovirale Transduktion dieser siRNA-Sequenzen in 2C T-Zellen unter Verwendung des pSUPER Systems.
2. Charakterisierung der siRNA transduzierten 2C T-Zellen in Hinsicht auf PD-1 Expression und T-Zellaktivität *in vitro* (Zytokinproduktion, Proliferation) und *in vivo* im Tumormodell.
3. Identifizierung von effektiven siRNA Sequenzen gegen PD-1 im humanen System und retrovirale Kotransduktion der siRNA-Sequenzen im pSUPER-Vektor und des MART-spezifischen T-Zellrezeptor 1D3 in humane T-Zellen.
4. Charakterisierung der siRNA transduzierten 1D3 TCR tg T-Zellen in Hinsicht auf PD-1 Expression und T-Zellaktivität (Zytokinproduktion, Zytotoxizität).

2 Methoden

2.1 Tumorzelllinien und Mausstämme

2.1.1 Verwendete Tumorzelllinien

Zelllinie	Herkunft	Literatur
P815.B71	H-2 ^d DBA/2 Maus, transfiziert	(Gajewski 1996)
HTR.c	H-2 ^d DBA/2 Maus	(Gajewski 1996)
EL4	H-2 ^b C57BL/6N Maus	ATCC
A20	H-2 ^d BALBc/AnN Maus	ATCC
J588	H-2 ^d BALBc Maus	ATCC
Phoenix eco	HEK 293T, transfiziert	http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html (Kinsella and Nolan 1996)
NIH 3T3	H-2 ^q NIH Swiss Maus	ATCC
B16.F10	H-2 ^b C57BL/6J Maus	ATCC
B16.SIY	H-2 ^b C57BL/6J Maus, transfiziert	(Blank, Brown et al. 2004)
B16.SIY E12	H-2 ^b C57BL/6J Maus, transfiziert	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
JY	Human	(Palmer and van Seventer 1997)
FlyRD18	Human, transfiziert	ECACC
Mel MTO Mel ICL Mel AKR Mel GBU	Human	Am NKI aus Tumorgewebe gewonnen

P815.B71/ HTR.c:

Mastozytom Zelllinie (P815), transfiziert mit B71 (P815.B71)

HTR.c: Subklon von P815, der *in vivo* solide Tumoren ausbildet

EL4:

T-Zell Lymphom Zelllinie, chemisch induziert

A20:

Retikulum Zellsarkom Zelllinie, spontan aufgetreten

J588:

Myelom Zelllinie, chemisch induziert

Phoenix eco:

Retrovirale Verpackungszelllinie, die auf der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T basiert. 293T Zellen wurden mit den Transproteinen Gag (Gruppenantigene), Pol (Reverse Transkriptase, RNaseH und Integrase) sowie Env (*envelope*, Hüllprotein) transduziert, die für die Verpackung, weitere Verarbeitung, reverse Transkription und Integration rekombinanter Genome benötigt werden. Gag, Pol und Env basieren dabei auf dem Moloney murinen Leukämievirus. Das Hüllprotein ist ekotropisch, so dass nur Maus- oder Rattenzellen, die sich gerade teilen, infiziert werden können.

NIH 3T3:

Embryonale Fibroblasten Zelllinie

B16.F10/ B16.SIY/ B16.SIY E12:

Melanom Zelllinie (B16.F10), transduziert mit dem Peptid SIYRYYGL-eGFP (B16.SIY) oder dem Peptid SIYRRYGL ohne GFP (B16.SIY E12)

FlyRD18:

Retrovirale Verpackungszelllinie, die auf einer humane Fibrosarkom-Zelllinie basiert und die Transproteine Gag und Pol des Moloney murinen Leukämievirus sowie Env des endogenen felinen Leukämievirus RD114 exprimiert. Die retroviralen Partikel dieser Verpackungszelllinie können sich-teilende humane Zellen infizieren.

JY:

Humane B-Zelllinie

Mel AKR, GBU, ICL, MTO:

Humane Melanomzelllinien

2.1.2 Verwendete Mausstämme

Mausexperimente wurden an der Universität Regensburg und am NKI (*Nederlands Kanker Instituut*) in Amsterdam durchgeführt. Die Tiere wurden in IVC (*individually ventilated cages*) – Käfigen, gemäß den Richtlinien des Deutschen bzw. Niederländischen Tierschutzgesetzes gehalten. In Regensburg wurde dem Trinkwasser standardgemäß konzentrierte HCL (1 ml/l Wasser) zugesetzt. Zur Vermeidung nosokomialer Infektionen wurde zusätzlich Cotrim K (144mg Cotrimoxazol (Kombination aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol)/ 250ml Wasser) zugegeben.

Die Zucht von P14 TCR tg RAG2^{-/-} erfolgte in Regensburg unter SPF (*specific pathogen free*) Bedingungen.

Maus	Haltung	Erstbeschreibung	Herkunft
C57BL/6	Kauf	-	Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich
P14 TCR tg RAG2 ^{-/-}	Zucht, SPF/IVC	-	Taconic, Germantown NY, Eigenzucht
2C TCR tg RAG2 ^{-/-}	Zucht, IVC	(Kranz, Tonegawa et al. 1984; Chen, Eisen et al. 2003)	Zur Verfügung gestellt durch T. Gajewski; Eigenzucht
2C TCR tg RAG2 ^{-/-} PD1 ^{-/-}	Zucht, IVC	(Nishimura, Minato et al. 1998)	Zur Verfügung gestellt durch T. Honjo; Eigenzucht

P14 TCR tg RAG2^{-/-}:

RAG (*recombinase activation gene*) – defiziente Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund, die zusätzlich für den P14 TCR transgen sind.

Die beiden Gene RAG-1 und RAG-2 werden zur Rekombination der T- und B-Zellrezeptoren benötigt. Bei einem Defekt in einem der beiden Gene werden keine funktionellen Rezeptoren gebildet und es entstehen keine reifen T- oder B-Zellen. RAG1^{-/-} und RAG2^{-/-} Mäuse sind daher von Geburt an lymphopen (Mombaerts, Iacomini et al. 1992; Shinkai, Rathbun et al. 1992).

In P14 TCR tg RAG2^{-/-} Mäusen werden während der Thymusreifung ebenfalls alle T- und B-Zellen depletiert, mit Ausnahme der T-Zellen, die den transgenen Rezeptor exprimieren. Da die eingefügte genetische Information für den T-Zellrezeptor CD8-restringiert ist, liegen in der Peripherie daher ausschließlich P14 TCR tg CD8⁺ T-Zellen vor. Regulatorische T-Zellpopulationen, z.B. CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T_{reg} fehlen in diesen Mäusen.

Der P14 TCR ist für das H-2D^b bindende LCMV Glykoprotein (Peptid 33-41) spezifisch (Pircher, Michalopoulos et al. 1987), und kann nicht mit den im 2C Tumormodell eingesetzten Peptiden p2Ca und SIY interagieren (Chen, Eisen et al. 2003).

2C TCR tg RAG2^{-/-}:

Wie die zuvor beschriebenen Mausstämme, besitzen 2C TCR tg RAG2^{-/-} Mäuse ebenfalls nur einen T-Zellklon. Dieser exprimiert den 2C TCR, der sowohl für das artifizielle SIY (SIYRYYGL) Peptid, welches auf syngenen MHC-I Komplex K^b präsentiert wird, als auch das ubiquitär vorkommende p2Ca (LSPFPFDL) Peptid der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase im allogenen MHC-I L^d, spezifisch ist (Kranz, Tonegawa et al. 1984; Sha, Nelson et al. 1988).

2.1.3 Das 2C-Tumormodell mit HTR.c (L^d)

Naive 2C TCR tg T-Zellen interagieren mit dem p2Ca Peptid im MHC-I L^d (H2d). Die Empfängertiere (P14 RAG2^{-/-}) besitzen jedoch einen C57BL/6 Hintergrund (H2b), so dass die DCs der Empfängertiere (H2b) den 2C TCR tg T-Zellen das p2Ca Peptid nicht präsentieren können. Somit können 2C TCR tg T-Zellen den Tumor HTR.c (H2d; Subklon des Mastozytoms P815, welcher solide Tumore formt) nur durch direkte Interaktion des 2C TCR mit dem p2Ca Peptid auf der Tumorzelle erkennen.

In nicht-lymphopenen Empfängertieren (P14 RAG2^{-/-}), in denen keine homöostatische Proliferation stattfinden kann, können naive 2C TCR tg T-Zellen das Tumorstadium nicht kontrollieren, während naive 2C TCR tg PD1^{-/-} T-Zellen den Tumor abstoßen (Abb. 3).

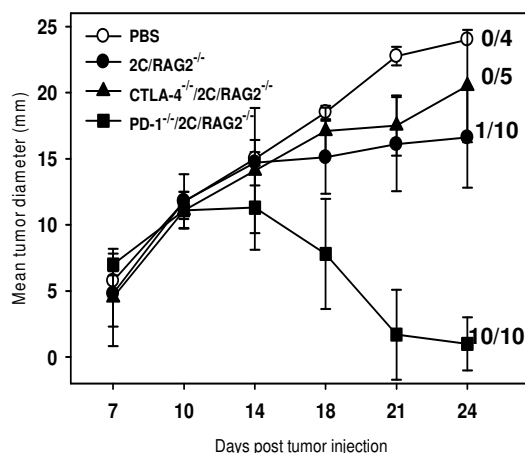


Abbildung 3: Tumorabstoßung (HTR.c) durch PD-1 defiziente 2C TCR tg T-Zellen in P14 TCR tg Empfängertieren. 10⁶ naive T-Zellen (2C TCR tg RAG2^{-/-}, CTLA4^{-/-} 2C TCR tg RAG2^{-/-}, PD1^{-/-} 2C TCR tg RAG2^{-/-}) wurden i.v. in die P14 TCR tg RAG2^{-/-} Empfängertiere injiziert. 24h später wurden 10⁶ HTR.c Zellen s.c. in die Flanke injiziert. Die Zahlen neben den Kurven geben die Anzahl der Tiere an, die den Tumor vollständig abstoßen konnten (aus (Blank, Brown et al. 2004))

2.2 Methoden

2.2.1 *In vivo* Methoden

2.2.1.1 Transfer von T-Zellen in Mäuse

Vor dem Transfer in die Maus wurden T-Zellen dreimal mit sterilem PBS gewaschen, um alle Medienbestandteile zu entfernen. Für den adoptiven T-Zelltransfer wurden die Zellen in PBS resuspendiert, so dass die gewünschte Zellzahl pro Maus in 100µl PBS enthalten war.

An der Universität Regensburg wurde der Transfer an mit Sevofluran (Abbott) anästhesierten Mäusen mittels retrobulbärer Injektion (0,4mm x 19mm, Kanüle, BD MicrolanceTM3) durchgeführt.

Am NKI wurde die Zelllösung ohne Anästhesie mittels einer MyjectorTM Einwegspritze (0,33mm x 12mm, Terumo) in die Schwanzvene injiziert.

2.2.1.2 Transfer von Tumorzellen in Mäuse

Tumorzellen wurden vor der Injektion dreimal mit PBS gewaschen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Tumorzelllinie HTR.c verwendet, die subkutan in die Flanke der Mäuse gespritzt wurde. Jede Maus erhielt dabei $0,5 - 1 \times 10^6$ Tumorzellen in 100µl PBS. Die Injektion erfolgte mit einer 0,9mm x 40mm Kanüle (BD MicrolanceTM3) (Universität Regensburg) oder mit einer 0,33mm x 12mm MyjectorTM (Terumo) Einwegspritze (NKI Amsterdam).

2.2.1.3 Kontrolle des Tumorverlaufs

Die Tumorgröße wurde zwei- bis dreimal pro Woche kontrolliert, wobei jeweils der längste und der dazu im 90° Winkel gelegene Durchmesser bestimmt wurden. Aus den beiden Werten wurde der Durchschnitt gebildet. In den Experimenten wurden zwei bis fünf Mäuse pro Gruppe eingesetzt. Aus allen Werten einer Gruppe wurde der Gesamtdurchschnitt sowie die Standardabweichung mittels der Statistikfunktion eines Taschenrechners ermittelt.

2.2.1.4 Organentnahme

Nachdem die Tiere mittels CO₂-Narkose getötet worden waren, wurden die jeweiligen Organe entnommen. Für die Isolierung bzw. für die FACS-Analyse von T-Zellen aus Milz und/oder Lymphknoten wurden diese Organe bis zur weiteren Verarbeitung in gekühltem Medium aufbewahrt.

2.2.2 *In vitro* Methoden

2.2.2.1 Allgemeine Methoden

Alle Arbeiten mit Tumorzelllinien und Primärkulturen, sowie alle funktionellen Analysen wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt (LaminaAir HB2448, Heraeus).

Die Inkubation von Tumorzelllinien, Primärkulturen und funktionellen Analysen erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus 6000) bei einer Luftfeuchtigkeit von 95%, einem CO₂-Gehalt von 7,5% und einer konstanten Temperatur von 37°C.

2.2.2.1.1 Zentrifugation

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Zentrifugationsschritte sowohl für Tumorzellen als auch für murine und humane Primärzellen bei 4°C für 5 Minuten bei 330 x g durchgeführt.

2.2.2.1.2 Ermittlung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung

Die Zellsuspensionen von Tumorzellen bzw. Immunzellen wurden 1:1 mit einer Trypanblaulösung (Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco, Invitrogen) verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Mikroskops (Leitz DMRB, Leica) ausgezählt. Der Farbstoff wird dabei nur von Zellen mit fehlender Membranintegrität aufgenommen, wodurch tote Zellen blau erscheinen, während lebende Zellen ungefärbt bleiben.

Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahllebender Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,01}{\text{Anzahl der Großquadrate}} = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.2.2 Zellkultur

2.2.2.2.1 Teilen adhärent und nicht-adhärent wachsender Tumorzelllinien

Alle Tumorzelllinien wurden ca. zweimal pro Woche bei einer Konfluenz von etwa 90% abgeerntet. Dazu wurde zunächst das Medium der adhärent wachsenden Kulturen abgenommen und der Zellrasen einmal mit PBS gespült. Das Ablösen der Tumorzellen erfolgte durch eine ca. dreiminütige Inkubation bei RT mit 3 ml 1 x Trypsin/EDTA (10fach, PAN Biotech) in PBS. Die Suspension aus abgelösten Zellen wurde mit 10 ml Medium verdünnt und abzentrifugiert. Eine neue Zellkulturflasche wurde schließlich – je nach Bedarf und Zelllinie – mit 1/5 bis 1/20 der abgeernteten Zellen angeimpft.

Nicht-adhärent wachsende Kulturen wurden zweimal pro Woche abzentrifugiert und mit Medium gewaschen. Die neue Kultur wurde ebenfalls – je nach Bedarf und Zelllinie – mit 1/5 bis 1/20 der abgeernteten Zellen angeimpft.

2.2.2.2.2 Mycoplasmentest

In Regensburg erfolgte in regelmäßigen Abständen die Überprüfung der verwendeten Tumorzelllinien auf Mycoplasmen mit Hilfe des VenorGEM-Tests (Minerva Biolabs).

In Amsterdam wurden die Zellkulturen mittels des Mycoplasma Tissue Culture NI (MTC-NI) Schnellnachweissystems (Gen-Probe) getestet.

2.2.2.2.3 Auftauen und Einfrieren von Tumorzelllinien

Zellaliquots ($1 - 5 \times 10^6$), die in flüssigem Stickstoff eingefroren waren, wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und in 10 ml Medium überführt. Nach Zentrifugation und einem Waschschrift mit Medium wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche mit Medium überführt.

Aliquots neu aufgetauter Tumorzellen wurden nach zwei bis drei Passagen erneut eingefroren. Dazu wurden nach dem Abernten Zellaliquots mit $1 - 5 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium zunächst bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen zur längeren Lagerung in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.2.2.3 Isolierung muriner T-Zellen

2.2.2.3.1 Gewinnung naiver T-Zellen aus der Milz

Für die Aufreinigung von T-Zellen aus der Milz wurde das entnommene Organ zunächst steril über ein Zellsieb (Cell Strainer 100µm, BD Falcon) in einer Petrischale (Easy Grip Petri Dish, Falcon) zerrieben, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Alternativ wurde das Zellsieb direkt auf ein 50 ml Röhrchen (BD Falcon) aufgesetzt, so dass die Zellsuspension direkt in das Behältnis tropfte. Die Suspension wurde erneut über ein Zellsieb pipettiert, um Gewebeteile zu entfernen. Nach einem Waschschrift wurden die Splenozyten in dem jeweils benötigten Puffer zur Zellaufreinigung oder Stimulation aufgenommen. Sowohl naive polyklonale als auch monoklonale T-Zellen wurden mit Hilfe der negativen Zellseparation isoliert. Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Separationssysteme zur negativen Zellisolierung zum Einsatz, das Dynal-System und das SpinSep-System.

2.2.2.3.2 Dynal-Kit (Dynal Mouse CD8⁺ Negative Isolation Kit, Invitrogen Dynal): Magnetische Zellseparation

Die Separationsmethode von Dynal beruht auf der Bindung von magnetischen Polystyrol Beads, die mit polyklonalen sheep-anti-rat IgG Antikörpern beschichtet sind, an Zellen, die zuvor mit einem Cocktail verschiedener Ratte-Antikörper markiert wurden. Diese Antikörper binden alle Zellpopulationen, die entfernt werden sollen, und nur die zu isolierende Zellfraktion bleibt unmarkiert (= Prinzip der negativen Zellisolierung).

Zunächst wurden die Splenozyten abzentrifugiert und in 1 ml PBS + 10% BSA (Albumin Fraktion V, Roth) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit dem Cocktail von Ratte-Antikörpern (150µl/Milz) sowie 200µl FCS/Milz zum Abblocken unspezifischer Bindungen versetzt und bei 4°C inkubiert. Nach 20 Minuten wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen der Zellsuspension mit PBS + 0,1% BSA entfernt, und das Pellet wurde in 5ml PBS + 0,1% BSA/Milz resuspendiert. Die magnetischen Beads wurden zweimal mit PBS + 0,1% BSA gewaschen und anschließend zur Zellsuspension gegeben (1,5ml beads/Milz). Nach einer Inkubation von 15 Minuten auf dem Überkoprotator (MACSmix, Miltenyi Biotec) wurde die Suspension in einen Handmagneten überführt. Durch das magnetische Feld werden

Zellen, die an die magnetischen Beads gebunden sind, an der Röhrenwand festgehalten, so dass sich nur noch die unmarkierten, erwünschten Zellen in Suspension befinden. Diese Suspension wurde in ein neues Röhrchen überführt und erneut für 2 Minuten im Magneten inkubiert, um auch noch letzte markierte Zellen zu entfernen. Schließlich wurden die isolierten T-Zellen zentrifugiert, in Medium resuspendiert, ausgezählt und für die FACS-Analyse der Aufreinigung vorbereitet.

2.2.2.3.3 SpinSep-Kit [SpinSep Negative Isolation Kit für CD8⁺ T-Zellen (CellSystems)]: Zellseparation über die Dichte

Das System zur Zellseparation von SpinSep (CellSystems) trennt markierte und nicht markierte T-Zellen aufgrund der unterschiedlichen Dichte dieser Populationen. Um diese unterschiedlichen Dichten zu erreichen, wurden auch in diesem System zunächst alle unerwünschten Zellen mit einem Antikörpercocktail (15µl/Milz, resuspendiert in 2ml SpinSep Puffer/Milz) markiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C und dem Entfernen überschüssiger Antikörper durch Waschen mit dem SpinSep Puffer erfolgte die Zugabe der so genannten SpinSep Dense Particles (500µl/Milz, resuspendiert in 2ml SpinSep Puffer/Milz). Diese sind mit Antikörpern gegen den Fc-Teil des Antikörpercocktails beschichtet und binden daher an alle zu depletierenden Zellen. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Auftrennung der markierten („schweren“) und der nicht-markierten („leichten“) Zellen in einem speziellen Dichtegradienten. Dazu wurden 5 ml des so genannten SpinSep Density Mediums in einem 15 ml Röhrchen (Corning Costar) vorgelegt und mit der Suspension aus Zellen und Partikeln vorsichtig überschichtet, so dass zwei getrennte Phasen entstanden. Alle „schweren“ Zellen finden sich nach Zentrifugation (10 min, 770 x g, ohne Bremse) im Pellet wieder, während sich die unmarkierten Zellen in der Interphase zwischen Density Medium und überschichtetem Zellkulturmedium ansammeln. Diese Phase wurde abgezogen und mit SpinSep Puffer gewaschen, um das restliche Density Medium zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen, ausgezählt und für die FACS-Analyse der Aufreinigung vorbereitet.

2.2.2.3.4 Gewinnung von Splenozyten

Zur Gewinnung von Splenozyten ohne weitere Aufreinigung der T-Zellfraktion wurde die Einzelzellsuspension nach Zerreiben der Milz abzentrifugiert, in 5 ml ACK Lysepuffer resuspendiert und für 3 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5 ml Medium zugegeben und die Zellsuspension wurde abzentrifugiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit Medium. Danach wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen, ausgezählt und für die FACS-Analyse vorbereitet.

2.2.2.4 *In vitro* Stimulation naiver 2C TCR tg T-Zellen mit dem Tumor P815.B71 und Restimulation

2C TCR tg (2C PD1^{-/-}) T-Zellen können *in vitro* mit P815.B71 stimuliert werden. In einer 24-well Platte (Tissue Culture Treated, Polystyrene, Corning Costar) wurden dazu 10⁵ 2C T-Zellen mit 5 x 10⁵ Tumorzellen in 2,5 ml Medium koinkubiert. Um zu verhindern, dass die Tumorzellen die T-Zellen überwachsen, wurden jeweils 3 x 10⁷ P815.B71 Tumorzellen in 10 ml Medium mit Mitomycin C (2mg/ml Medium, Medac) für 90 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen insgesamt dreimal mit Medium gewaschen, wobei die Zellen nach dem zweiten Waschschrift für 10 Minuten im Medium ruhten, damit überschüssiges Mitomycin C ausgeschieden werden konnte.

Nach vier Tagen wurden die Zellen abgeerntet, zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf Ficoll (Pancoll human, PAN Biotec) geschichtet, so dass zwei getrennte Phasen entstanden. Nach einer entsprechenden Zentrifugation (20 min bei RT, 525 x g, ohne Bremse) befinden sich lebende T-Zellen in der Interphase, während sich tote Zellen und Tumorzellen im Pellet absetzen.

Auch die Restimulation wurde im Verhältnis 1:5 T-Zellen zu Tumorzellen angesetzt.

2.2.2.5 Stimulation mit anti-CD3/28 mAb

3x 10⁶ Splenozyten wurden mit jeweils 1µg/ml anti-CD3 mAb und anti-CD28 mAb in Gegenwart von 10U/ml IL-2 stimuliert.

2.2.2.6 Gewinnung humaner PBLs aus einem *buffy coat*

Ein *buffy coat* ist der zelluläre Anteil von 500 ml Spenderblut, der zu einem Gesamtvolumen von 50 ml aufkonzentriert ist. *Buffy coats* wurden von der Blutbank Sanquin (Amsterdam) bezogen.

50 ml *buffy coat* wurden auf acht 50 ml Rörchen verteilt und mit RPMI-Medium ohne Zusätze auf 20 ml aufgefüllt. Dies entspricht einer vierfachen Verdünnung. Die Zellsuspension wurde vorsichtig mit Ficoll unterschichtet und 16 Minuten bei RT mit 1250 x g ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphase abgenommen, auf zwei 50 ml Rörchen verteilt und zweimal mit RPMI + 2% FCS gewaschen (Zentrifugation bei 650 x g). Der Überstand und die obere weiße Schicht, die die Thrombozyten enthält, wird jeweils abgeschüttet. Um die restlichen Thrombozyten zu entfernen, erfolgten drei weitere Waschschriffe in 40 ml RPMI + 2% FCS (Zentrifugation bei 200 x g). Sollten die Zellen als *feeder mix* Zellen eingesetzt werden, wurde ein zusätzlicher Waschschriff durchgeführt.

Anschließend wurden die Zellen vereinigt, in 20 ml Medium aufgenommen und ausgezählt.

2.2.2.7 Herstellung von *feeder mix*

Frisch gewonnene oder aufgetaute hPBLs wurden in 10 ml Ijssels Medium aufgenommen und mit 40 Gy bestrahlt. JY Tumorzellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und mit 80 Gy bestrahlt. Anschließend wurden alle Zellen einmal gewaschen und ausgezählt. Für den *feeder mix* wurden die zwei Zellsorten mit einer Endkonzentration von 2×10^6 hPBLs und 2×10^5 JY Tumorzellen in Ijssels Medium vereinigt. Der so gewonnene *feeder mix* ist zweifach konzentriert und wird durch die Zugabe der zu stimulierenden Zellen auf die Endkonzentration (10^6 hPBLs mit 10^5 JY) verdünnt.

2.2.2.8 Aktivierung und weitere Kultivierung von humanen PBLs

2.2.2.8.1 Aktivierung naiver hPBLs mit PHA und IL-2

Zur Aktivierung der naiven humanen PBLs vor der retroviralen Transduktion wurden die Zellen mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in Ijssels Medium aufgenommen

und mit 2µg/ml PHA (Biochrome AG) und 20 U/ml IL-2 versetzt. Die Zellsuspension wurde mit jeweils 1 ml/well in eine 24-well Platte pipettiert.

2.2.2.8.2 Kultivierung aktivierter humaner T-Zellen mit PHA und IL-2

Nach der ersten Aktivierung (und retroviraler Transduktion) wurden die humanen T-Zellen einmal pro Woche restimuliert. Die T-Zellen wurden abgeerntet, einmal mit Ijssels Medium gewaschen, mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in Ijssels Medium resuspendiert und mit 200ng/ml PHA und 40U/ml IL-2 versetzt. Anschließend wurden 500µl der T-Zellsuspension mit 500µl *feeder mix* (2x) pro well in 24-well Platten pipettiert. Am dritten Tag nach Restimulation wurde 1 ml Ijssels Medium mit 40U/ml IL-2 pro well zugegeben.

2.2.2.8.3 Kultivierung aktivierter humaner MART-spezifischer T-Zellen mit MART-Peptid beladenem *feeder mix*

Zur Stimulation von humanen MART-spezifischen T-Zellen wurden die Zellen des *feeder mix* mit dem ELAGIGILTV-Peptid beladen (am NKI hergestellt). Es handelt sich dabei um eine mutierte Form des MART-Peptids Melan-A₂₆₋₃₅, bei der die zweite Aminosäure der Sequenz (Alanin) durch Leucin ersetzt wird. Durch diesen Aminosäurenaustausch wird die Immunogenizität des Peptids erhöht (Valmori, Fonteneau et al. 1998).

Zur Beladung wurden 50ml *feeder mix* (2x) abzentrifugiert und in 10 ml Ijssels Medium aufgenommen. Anschließend wurde das Peptid hinzugegeben (Endkonzentration 1µg/ml) und die Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend wieder in 50ml Ijssels Medium aufgenommen.

Die T-Zellen wurden abgeerntet, einmal mit Ijssels Medium gewaschen, mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in Ijssels Medium aufgenommen und mit 40U/ml IL-2 versehen.

Anschließend wurden 500µl der T-Zellsuspension und 500µl des Peptid beladenen *feeder mix* pro well in eine 24 well Platte pipettiert. Am Tag drei nach der Stimulation wurde 1 ml Ijssels Medium mit 40U/ml IL-2 zugegeben.

2.2.2.9 Analyse von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

2.2.2.9.1 Prinzip des FACS

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem FACS-Calibur (BD) mit dem Cellquest-Programm durchgeführt. Die Auswertung der aufgezeichneten FACS-Daten erfolgte mit Hilfe des Flowjo-Programms (Treestar, San Carlos, CA).

Die Messeinstellungen wurden vor jeder Messung mit ungefärbten Proben, Einzelfärbungen bzw. Isotypkontrollen überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Im FACS (*fluorescence-activated cell sorter*) können Zellen charakterisiert werden. Das Vorwärtsstreulicht (*forward-scatter*, FSC) liefert Informationen über die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (*side-scatter*, SSC) dagegen gibt Auskunft über die Granularität der Zelle. Im FACS Calibur können zusätzlich zu diesen beiden Eigenschaften über fluoreszenzmarkierte Antikörper noch vier weitere Parameter untersucht werden. Dazu verfügt das FACS Calibur über zwei Laser (Argon- und UV-Laser), welche die Fluoreszenzfarbstoffe anregen können. Die Emission der Farbstoffe kann in vier Kanälen gemessen werden. Als Farbstoffkonjugate wurden FITC (Fluoroisothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PercP (Peridin-Chlorophyll-Protein), APC (Allophycocyanin) und Alexa FluorTM 647 eingesetzt.

2.2.2.9.2 Antikörperfärbung von Oberflächenmarkern auf murinen und humanen Zellen

Für die FACS-Färbungen wurden 96-well Spitzbodenplatten (Mikrotiterplatten, V-Bottom, Greiner) verwendet. Je 5×10^5 bis 10^6 Zellen wurden pro well für eine Färbung eingesetzt.

Bevor die gegen Oberflächenmoleküle gerichteten Antikörper zugegeben wurden, wurden die Zellen zunächst einmal mit FACS-Puffer gewaschen.

Im Fall von murinen Zellen wurden zunächst 15 μ l 2.4G2 (anti-Fc-Rezeptor Antikörper) zugegeben, wodurch unspezifische Bindungen durch den Fc Teil der Antikörper verhindert werden. Anschließend wurden 10 μ l eines direkt konjugierten Antikörpers zupipettiert (Verdünnungen in FACS-Puffer). Die Inkubation erfolgte bei 4°C im Dunklen für 15 Minuten.

Bei der Färbung humaner Zellen wurden die Antikörper oder Tetramere direkt zu den Zellen pipettiert. Anschließend wurden 20µl FACS-Puffer zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei RT im Dunklen für 15 Minuten.

Anschließend wurden überschüssige Antikörper mittels eines Waschschrittes mit FACS-Puffer entfernt. Die gefärbten Proben wurden schließlich für die Messung am FACS in kleine Röhrchen (1,2 ml Polypropylene Cluster Tubes, Costar Corning) überführt. Die gefärbten Proben sollten innerhalb von zwei Stunden gemessen werden, sonst empfiehlt es sich, die Färbung mit 1%igem Formaldehyd in PBS zu fixieren. Dies verhindert ein Ablösen der gebundenen Antikörper. Die Fixierung ermöglicht eine Messung innerhalb von 48 Stunden.

Es sollten nicht mehr als zwei verschiedene Antikörper pro Färbung eingesetzt werden. Nach einem Waschschritt kann eine Probe allerdings erneut mit bis zu zwei zusätzlichen Antikörpern markiert werden, so dass alle vier Farbkanäle besetzt sind.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Anti-Maus Antikörper

	Isotyp	Klon	Herkunft	Fluorochrom	Hersteller	Verdünnung
anti-CD4	rIgG _{2a} , κ	RM4-5	Ratte	F, PE, APC	BD Pharmingen	1:80
anti-CD8	rIgG _{2a} , κ	53-6.7	Ratte	F, PE, PercP, APC	BD Pharmingen	1:80
anti-CD25	rIgG ₁ , λ	PC61	Ratte	PE	BD Pharmingen	1:50
anti-CD28	hIgG	37.51	Hamster	PE	ebioscience	1:80
anti-CD44	rIgG _{2a} , κ	IM7	Ratte	PE	BD Pharmingen	1:80
anti-CD62L	rIgG _{2a} , κ	Mel-14	Ratte	PE	BD Pharmingen	1:80
anti-CTLA4	hIgG ₁ , κ	UC10-4F10-11	Hamster	PE	BD Pharmingen	1:50
anti-PD1	hIgG	J43	Hamster	PE	ebioscience	1:50
anti-PD-L1	rIgG _{2a} , κ	MIH5	Ratte	PE; functional grade	ebioscience	1:80; 10µg/ml
Isotyp	rIgG _{2a} , κ		Ratte	functional grade	Ebioscience	10µg/ml
Isotyp	rIgG _{2a} , κ	R35-95	Ratte	F, PE, APC	BD Pharmingen	
anti-1B2	-	-	Mouse	F, AF647	(Kranz, Tonegawa et al. 1984)	1:50
anti-CD3	hIgG ₁ *κ,	145-2C11	Hamster	Functional grade	Ebioscience	-
anti-CD28	hIgG	37.51	Hamster	Functional grade	ebioscience	-
2.4G2	-	-	-	-	ATCC	-

Anti-human Antikörper und Tetramere

	Isotyp	Klon	Herkunft	Fluorochrom	Hersteller	Verdünnung
anti-CD4	mIgG ₁	SK3	Maus	FITC, PE	BD Biosciences	1µl in 20µl
anti-CD8	mIgG ₁ , κ	SK1	Maus	FITC, PE, PercP-Cy5.5	BD Biosciences	1µl in 20µl
anti-CD8	mIgG ₁ , κ	RPA-T8	Maus	APC	BD Pharmingen	1µl in 20µl
anti-CD107a (LAMP-1)	mIgG ₁ , κ	H4A3	Maus	PE	BD Pharmingen	1,5µl in 200µl (LAMP-Test)
anti-HLA-A2	mIgG _{2b} , κ	BB7.2	Maus	FITC	BD Pharmingen	1µl in 20µl
anti-IFNγ	mIgG _{2b} , κ	25723.11	Maus	PE	BD Biosciences	1,5µl in 20µl
anti-PD1	mIgG ₁ , κ	MIH4	Maus	Alexa Fluor TM 647	ebioscience	3µl in 20µl
anti-PD-L1	mIgG ₁	MIH1	Maus	PE	ebioscience	1µl in 20µl
anti-PD-L1		5-496		Functional grade	Von O.Madijc zur Verfügung gestellt	10µg/ml
Sandoglobulin	hIG			Functional grade	Novartis	10µg/ml
Isotype	mIgG ₁ , κ	P3	Maus	AF TM 647, PE	ebioscience	
MART-Tetramer	-	-	-	APC, PE	-	2µl in 20µl

2.2.2.9.3 Labeling von 1B2

Ein spezifischer Antikörper gegen den 2C TCR ist nicht käuflich zu erwerben. Dieser Antikörper wurde in unserem Labor aus dem Überstand des Hybridoms 1B2 mit Hilfe des ImmunoPure (G) Kit (Pierce) aufgereinigt.

Obwohl eine indirekte Färbung zwar schwache Signale durch den nachfolgenden Sekundärantikörper verstärken kann, ist doch stets die Gefahr einer unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers gegeben. Deshalb wurde der Antikörper gegen den 2C TCR unter Verwendung des Alexa Fluor 647 Monoclonal Labeling Kits (Invitrogen, nach Angaben des Herstellers) direkt markiert.

2.2.2.9.4 Herstellung MART-spezifischer MHC-Tetramer

Die MART-spezifischen MHC-Tetramere, die mit PE oder APC gekoppelt sind, wurden am NKI durch UV-Peptid-Austausch hergestellt (Rodenko, Toebe et al. 2006; Toebe, Coccoris et al. 2006).

2.2.2.9.5 Intrazelluläre FACS-Färbung

Handelt es sich bei den zu färbenden Molekülen nicht um Oberflächenmarker, so ist eine Intrazellulärfärbung nötig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Färbart für das Molekül CTLA-4 auf murinen Zellen durchgeführt. Nach der Färbung der Oberflächenmarker erfolgte nach einem weiteren Waschschrift die Fixierung der Färbung für 10 Minuten bei RT in 0,25% Formaldehyd in PBS. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen zweimal mit Saponin-Puffer gewaschen, um die Zellen zu permeabilisieren. Die Zugabe der Antikörper für die Intrazellulärfärbung erfolgte ebenfalls in Saponin-Puffer. Nach 20minütiger Inkubation bei RT im Dunkeln wurde erneut zweimal mit Saponin- und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Die Färbung wurde mit 2% Formaldehyd in PBS fixiert.

Für die Intrazellulärfärbung von IFN γ im Rahmen der funktionellen Assays der humanen T-Zellen wurde der Cytotfix/Cytoperm Kit mit Golgi PlugTM (BD) gemäß der Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.9.6 Lebend-tot-Färbung mit Propidiumjodid (PI)

Propidiumjodid (Sigma-Aldrich) ist ein Farbstoff der die DNA einer Zelle markiert und dadurch tote Zellen kennzeichnet. PI gelangt nur dann ins Zellinnere und interkaliert in die DNA, wenn die Zellmembran zerstört ist. Dieser Farbstoff kann im gleichen Kanal wie PercP detektiert werden und wird häufig benutzt, um in einem ersten Schritt tote von lebenden Zellen zu unterscheiden. PI wird erst kurz vor der FACS-Analyse zugesetzt (1 μ l/100 μ l Zellsuspension), eine Inkubation ist nicht erforderlich.

Eine Lebend-tot-Färbung mittels Propidiumjodid kann nach einer Fixierung der Proben mit Formaldehyd nicht mehr vorgenommen werden, denn die Fixierung macht die Zellmembran durchlässig für den Farbstoff.

2.2.2.9.7 Sort humaner retroviral transduzierter T-Zellen

Um humane T-Zellen nach retroviraler Transduktion mit 1D3 TCR und pSUPER-siRNA-GFP in den Kulturen anzureichern und nach CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen aufzutrennen wurde ein *Sort* mittels eines FACSSORT (BD) durchgeführt. Die T-Zellen wurden abgeerntet und in 1 ml Ijssels Medium resuspendiert. 20 x 10⁶ T-Zellen wurden dabei mit 10 μ l anti-CD8-PE und 25 μ l MARTtet-APC versetzt (doppelte Menge bei

höherer T-Zellzahl) und für 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 1 ml Ijssels aufgenommen und durch den Filterdeckel eines 5 ml Röhrchens getropft.

Im SORT wurden die Zellen in folgende Populationen aufgetrennt: $1D3^+ GFP^+ CD8^+$, $1D3^+ GFP^+ CD8^- (CD4^+)$, $1D3^+ GFP^- CD8^+$ und $1D3^+ GFP^- CD8^- (CD4^+)$. Die Zellen wurden in 500µl vorgelegtes humanes Serum gesortet und im Anschluss mit PHA und IL-2 restimuliert.

2.2.2.9.8 Standard-Analysen

2.2.2.9.8.1 Analyse der T-Zellaufreinigung

Jeder Aufreinigung von T-Zellen und jeder Gewinnung von Splenozyten folgte eine abschließende FACS-Kontrolle. Analysiert wurde dabei die Menge $CD8^+$ Zellen und deren Aktivierungsstatus.

Abbildung 4 zeigt eine Standard-FACS-Analyse für naive 2C TCR tg T-Zellen. Dabei wurde zunächst ein *Gate* um die Lymphozytenpopulation gesetzt, um tote Zellen auszuschließen. Im nächsten Schritt erfolgte die Identifizierung der doppelt positiven anti-1B2-FITC und anti-CD8-APC positiven Zellen, um die Reinheit der aufgereinigten Zellen bzw. den Anteil dieser Population in der Gesamt-Splenozytenpopulation zu bestimmen (Abb. 4 A).

Zudem wurden die 2C T-Zellen, bevor sie in ein Experiment eingesetzt wurden, routinemäßig auf ihren jeweiligen Aktivierungsstatus untersucht. Naive T-Zellen zeigen dabei eine niedrige CD44- und eine hohe CD62L-Expression (Abb. 4 B).

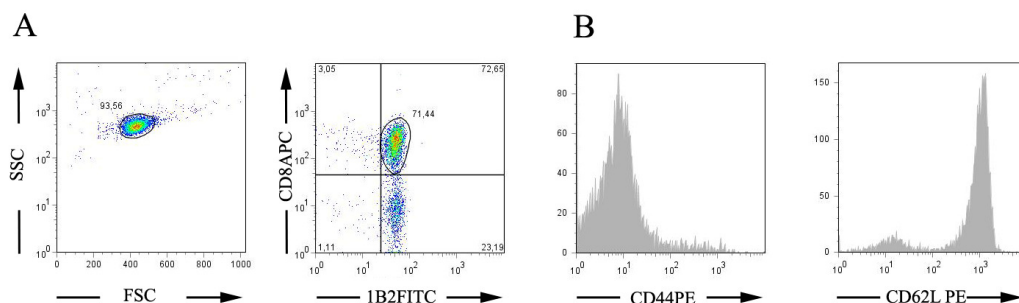


Abbildung 4: Standard-FACS-Analyse von aufgereinigten, naiven 2C TCR tg T-Zellen

- A) Bestimmung der Reinheit für anti-1B2-FITC and anti-CD8-APC doppelt-positive 2C T-Zellen
- B) Analyse des Aktivierungszustandes der naiven 2C T-Zellen über CD44 und CD62L

2.2.2.9.8.2 Auswertung von intrazellulärem IFN γ - und LAMP-Test

Bei der Analyse von intrazellulärem IFN γ bzw. der LAMP-Expression auf T-Zellen wurden die zu untersuchenden Moleküle (IFN γ ; LAMP) jeweils mit einem PE-markierten Antikörper gefärbt. Zusätzlich wurden die Zellen mit anti-CD8-PerCP-Cy5.5 und MARTtet-APC gefärbt. Retroviral transduzierte T-Zellen exprimierten zudem GFP als Marker für Transduktion mit pSUPER-siRNA-GFP.

Die *Gates* wurden dabei wie folgt gesetzt: Zuerst wurde ein *Size-Gate* im FSC-H/SSC-H Diagramm um die Population der aktivierte Lymphozyten gesetzt. In diesem *Gate* wurde nun jeweils ein *Gate* auf MARTtet-APC und anti-CD8-PerCP-Cy5.5 doppelt-positive Zellen (1D3 CD8) bzw. auf MARTtet-APC positive und anti-CD8-PerCP-Cy5.5 negative Zellen (1D3 CD4) gesetzt. In diesen *Gates* wurde ein weiteres *Gate* um die GFP-positiven Zellen gelegt. Dieser Schritt entfiel für die Zellen, die nicht mit pSUPER-GFP transduziert waren. In dieser Population wurde nun zwischen anti-IFN γ -PE/CD107a(LAMP)-PE positiven und negativen Zellen unterschieden. In nicht pSUPER-GFP transduzierten Zellen wurde die PE-Expression auf 1D3 CD8⁺ und 1D3 CD4⁺ Zellen direkt untersucht (Abbildung 5 am Beispiel von IFN γ).

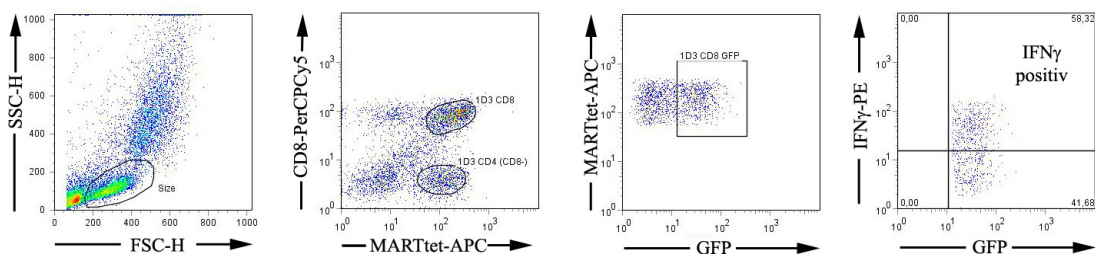


Abbildung 5: Gating Pfad für intrazelluläre IFN γ Färbung. Die Ansätze waren mit anti-CD8-PerCP-Cy5.5, MARTtet-APC und anti-IFN γ -PE gefärbt worden. T-Zellen, die mit pSUPER-shuffle-GFP, bzw. pSUPER-siRNA-hu1-GFP transduziert worden waren, waren zusätzlich GFP positiv. Zunächst wird ein *Size-Gate* auf die Population aktivierter Lymphozyten gesetzt. Anschließend wird auf MARTtet+ CD8+ (1D3 CD8) bzw. MARTtet+ CD8- (1D3 CD4) gegatet. Innerhalb dieser Populationen wird nun ein *Gate* auf die GFP-positiven Zellen gesetzt (hier für 1D3 CD8 GFP gezeigt). Zuletzt wird nun in dieser Population auf IFN γ + Zellen gegatet. Die Auswertung für CD8⁺ und CD4⁺ Zellen folgt demselben Muster. Bei Zellen, die nicht mit pSUPER-GFP transduziert waren, entfiel das GFP-*Gate*.

2.2.2.10 *In vitro* Assays

2.2.2.10.1 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Der ELISA wurde eingesetzt, um die Zytokinproduktion von T-Zellen zu analysieren. Es wurde zum einen die IL-2 oder IFN γ Produktion muriner T-Zellen, zum anderen die IFN γ Produktion humaner T-Zellen untersucht. Es wurden dementsprechend unterschiedliche Antikörper-Paare in den Test eingesetzt.

Antikörper-Paare für ELISA

	Antikörper	Herkunft	Klon	Konzentration
<i>Maus IL2 ELISA (BD Pharmingen)</i>				
<i>Capture</i>	anti-Maus IL2	Ratte	JES6-1A12	1 μ g/ml
Detektion	anti-Maus IL2-bio	Ratte	JES6-5H4	0,1 μ g/ml
<i>Maus IFNγ ELISA (BD Pharmingen)</i>				
<i>Capture</i>	anti-Maus IFN γ	Ratte	R4-6A2	1 μ g/ml
Detektion	anti-Maus IFN γ -bio	Ratte	XMG1.2	0,1 μ g/ml
<i>Human IFNγ ELISA (R&D Systems)</i>				
<i>Capture</i>	anti-human IFN γ	Maus	K3.53	1 μ g/ml
Detektion	anti-human IFN γ -bio	Ziege	ZX12	0,1 μ g/ml

Zur Bestimmung der von T-Zellen produzierten Zytokinmenge wurde zunächst eine 96-well Platte (Flat Bottom, Greiner) über Nacht bei 4°C mit dem *capture*-Antikörper in *Coating*-Puffer beschichtet (50 μ /well). Am nächsten Tag wurde die Platte zweimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und für zwei Stunden mit PBS + 10% FCS abgesättigt. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die Proben in der jeweils benötigten Verdünnung sowie der Standard mit der jeweiligen Startkonzentration aufgetragen.

Zytokin-Standards für ELISA

<i>ELISA</i>	<i>Zytokin</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Startkonzentration</i>
IL2 murin	rMu IL2	BD Pharmingen	20ng/ml
IFNγ murin	rMu IFN γ	BD Pharmingen	100ng/ml
IFNγ human	rHu IFN γ	PromoKine	100ng/ml

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Platten viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Danach wurden zunächst der biotinylierte Detektor-Antikörper aufgetragen, nach einstündiger Inkubation und fünf weiteren Waschschritten dann die Streptavidin-Peroxidase (1:3000 verdünnt, Dianova). Nach 30 Minuten Inkubation bei RT wurde die Platte erneut fünfmal gewaschen. Zur Entwicklung wurden pro well 100µl TMB-Substratlösung aufgetragen. Sobald sich eine Blaufärbung zeigte, wurde die Reaktion mit 2N Schwefelsäure (Merck) abgestoppt. Die Extinktion wurde anschließend im ELISA-Reader (precision microplate reader, MWG Biotech) bei 450nm gegen 650nm mit dem SOFTmax Programm gemessen und ausgewertet.

2.2.2.10.2 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der proliferativen Kapazität von 2C TCR tg T-Zellen wurde ein ³H-Thymidin Proliferationsassay durchgeführt. Dazu wurden 10⁵ 2C T-Zellen mit 10⁵ B16.SIY E12 Zellen, die zuvor 48 Stunden mit IFN γ (rMU IFN γ , 20ng/ml Medium) behandelt worden waren, in 200µl Medium für 18h koinkubiert. Anschließend wurde ³H-Thymidin (1µCi/well, Hartmann Analytic) zu den Ansätzen gegeben, das von proliferierenden Zellen in die DNA eingebaut wird. Die Inkorporation des radioaktiven Materials wurde nach sechs Stunden gestoppt, indem die Zellen mit destilliertem Wasser lysiert wurden. Die dabei freigesetzte DNA wurde auf Uni-Filter-Platten (1,2 µm Porengröße, Perkin Elmer Life Sciences) aufgefangen. Die getrocknete Filterplatte wurde mit 50µl Szintillationsflüssigkeit pro well versetzt und in einem Szintillationszähler (Perkin Elmer Life Sciences) gemessen.

2.2.2.10.3 Aktivität humaner spezifischer T-Zellen

2.2.2.10.3.1 Voraktivierung der humanen 1D3 TCR tg T-Zellen

Um die Expression von PD-1 auf den zu untersuchenden T-Zellen sicherzustellen, wurden diese vor Verwendung in Aktivitätstests voraktiviert.

Die T-Zellen wurden an Tag 7 nach der letzten Stimulation geerntet und mit einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml in Ijssels Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 mit *feeder mix* gemischt und es wurden 2µg/ml PHA zugegeben. Die Zellsuspension wurde mit 1 ml/well in eine 24-well Platte

pipettiert und zwei Tage bei 37°C inkubiert. Nach der Voraktivierung wurden die Zellen geerntet und ausgezählt. Der Anteil 1D3⁺GFP⁺CD8⁺ und 1D3⁺GFP⁺CD4⁺ wurde mittels FACS-Analyse ermittelt.

2.2.2.10.3.2 Melanom-Tumorzelllinien

Um die Aktivität MART-spezifischer 1D3 TCR tg transduzierter T-Zellen mit und ohne Suppression der PD-1 Expression zu analysieren, wurden zwei verschiedene Tumorzelllinien, nämlich Mel GBU und Mel MTO eingesetzt. Mel MTO wurde dabei mit 200ng/ml hIFN γ für 48h vor Durchführung der Versuche inkubiert, um die Expression von PD-L1 zu induzieren.

Bezeichnung	Vorbehandlung	MHC	MART	PD-L1	
Mel MTO	-	HLA-A2	+	-	Positivkontrolle
Mel MTO IFNγ	48h mit 200ng/ml huIFN γ	HLA-A2	+	+	PD-1/PD-L1 Interaktion
Mel GBU	-	HLA-A2	-	-	Negativkontrolle

2.2.2.10.3.3 Bestimmung der Zytokinproduktion spezifischer humaner T-Zellen durch IFN γ -Intrazellulärfärbung

Voraktivierte 1D3 TCR tg T-Zellen wurden geerntet und nach FACS-Analyse in Ijssels Medium aufgenommen und eingestellt ($10^4 - 2 \times 10^5$ Zellen/100 μ l), wobei nur die 1D3⁺ Zellen einer Population beachtet wurden. Anschließend wurden 2 μ l Golgi PlugTM (BD) zu den T-Zellen gegeben. Die Tumorzellen (Mel MTO, Mel MTO + IFN γ Vorbehandlung, Mel GBU) wurden auf dieselbe Konzentration eingestellt. Jeweils 100 μ l T-Zellen und 100 μ l Tumorzellen wurden in 96-well Rundbodenplatten pipettiert (Tripletts) und mit 60 x g für 1 Minute zentrifugiert. Je nach Versuchsansatz wurde zudem 10 μ g/ml blockierender anti-PD-L1 mAb oder Sandoglobulin als Isotyp-Kontrolle zugegeben. Danach wurden die Kokulturen für 4 h bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit anti-CD8-PerCP-Cy5.5 und MARTtet-APC extrazellulär gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung des Cytofix/Cytoperm Kit mit Golgi PlugTM (BD) gemäß Anleitung mit anti-IFN γ -PE intrazellulär gefärbt. Die Proben wurden sofort im Anschluss im FACS-Gerät analysiert.

2.2.2.10.3.4 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität mittels LAMP-Test

Wie für die IFN γ -Intrazellulärfärbung wurden voraktivierte 1D3 TCR tg T-Zellen und Tumorzellen im Verhältnis 1:1 in 200 μ l Ijssels Medium in 96-well Platten pipettiert. Anschließend wurden 2 μ l/well anti-CD107a(LAMP)-PE zugegeben und die Platten wurden nach Zentrifugation (60 x g, 1 min) für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze zusätzlich mit anti-CD8-PerCP-Cy5.5 und MARTtet-APC gefärbt. Die Proben wurden sofort im Anschluss durch FACS-Analyse untersucht.

2.2.3 Transfektion von Tumorzellen und primären Zellen

Unter Transfektion versteht man die Einbringung fremder DNA in eine Zelle mit nicht-viralen Methoden. Transfektion ist in der Regel transient, der Effekt des eingebrachten genetischen Materials ist daher zeitlich begrenzt. Einige wenige der transfizierten Zellen bauen transfizierte DNA jedoch durch spontane Rekombination ungerichtet in ihr Genom ein. Wird DNA eingebracht, die ein Antibiotikumsresistenzgen beinhaltet, so können diese Zellen durch Kultivierung in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums selektiert werden und man erhält stabile Transfektanten, die das transfizierte Gen kontinuierlich exprimieren.

2.2.3.1 Transfektion durch Kalziumphosphat-Fällung

Das Prinzip der Kalziumphosphat-Fällung besteht darin, dass aus negativ geladenen Phosphationen und positiv geladenen Kalziumionen ein feines Präzipitat aus Partikeln entsteht, die die ebenfalls anwesende DNA auf ihrer Oberfläche binden. Diese Partikel werden auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, die die DNA durch einen nicht näher verstandenen Mechanismus in ihr Inneres aufnehmen.

Zur Herstellung des Transfektionscocktails wurden 10 μ g DNA in 438 μ l H₂O aufgenommen und in ein 15ml Rundbodenröhrchen überführt. Anschließend wurden 62 μ l 2M CaCl₂ (Sigma-Aldrich) zugegeben und die Lösung wurde durch Anschnipsen des Röhrchens gemischt. Danach wurden schnell 500 μ l HBS (2x, ph 7,0) zugegeben und durch Blasen mittels einer 5 ml Pipette 15s lang gemischt. Der Transfektionscocktail wurde tropfenweise über die zu transfizierenden Zellen, die am Tag zuvor in 4 ml Medium in einer Zellkulturschale (Durchmesser 6 cm) angeimpft

worden waren, verteilt. Unter dem Mikroskop lässt sich das Präzipitat als kleine schwarze Partikel erkennen.

2.2.3.2 Transfektion mit Fugene6 (Lipofektion)

Bei der Lipofektion wird die zu transfizierende DNA von einem Liposom umschlossen, das die DNA durch Fusion mit der Zellmembran in die Zelle einbringt. Um Zellen durch Lipofektion zu transfizieren, verwendeten wir das Reagenz Fugene6 (Roche Applied Science).

Für die Herstellung des Transfektionscocktails wurden zunächst 200µl (800µl) serumfreies Medium (OptiMEM oder RPMI, Gibco) in ein 1,5ml Eppendorfröhrchen vorgelegt. Danach wurden 12,5µl (25µl) Fugene6 zugegeben, wobei darauf zu achten ist, dass das Reagenz direkt in das vorgelegte Medium pipettiert wird und nicht die Plastikwand des Reaktionsgefäßes berührt. Es erfolgte eine Inkubation von 5 Minuten bei RT. Anschließend wurde die DNA (5-10µg) zugegeben und die Lösung durch Anschnipsen gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT wurde der Transfektionscocktail über die zu transfizierenden Zellen getropft.

2.2.3.3 Elektroporation mit der AmaxaTM-Methode

Bei der Elektroporation werden die zu transfizierenden Zellen in ein elektromagnetisches Feld eingebracht, wodurch sich Poren in der Zellmembran bilden, die sich nach dem Bruchteil einer Sekunde wieder schließen. Befindet sich in der Zellsuspension freie DNA, so kann diese durch diese Poren in die Zelle aufgenommen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Elektroporation mit dem AmaxaTM-System verwendet, um siRNA-Moleküle in Zellen einzubringen. Die Transfektion erfolgte gemäß dem Protokoll der entsprechenden Kits, wobei jeweils 2×10^6 Zellen und 3µg/ml siRNA pro Transfektion eingesetzt wurden.

Zellart	Amaxa TM Kit	Transfektionsprogramm
EL4	Mouse T cell Kit (VPA-1006)	X-01; Q-01
Frisch isolierte naive Maus T-Zellen	Mouse T cell Kit (VPA-1006)	X-01
CIRA2	Human T cell Kit (VPA-1002)	U-15

Die transfizierten Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten auf den Effekt der siRNA auf die PD-1 Expression durch FACS-Analyse untersucht. Sollten transfizierte 2C T-Zellen in einem funktionellen Test eingesetzt werden, so wurden sie zunächst 4h bei 37°C inkubiert, damit sich die Zellen erholen konnten.

2.2.4 Retrovirale Transduktion

Die retrovirale Transduktion ermöglicht es, genetische Information in sich-teilende Zellen einzubringen und ungerichtet in das Genom der Zielzellen zu integrieren. Nach einer erfolgreichen retroviralen Transduktion ist die neue genetische Information fest in das Genom eingefügt und geht nicht wieder verloren. Transduzierte Zellen können je nach Transduktionsvektor entweder durch Selektion über eine miteingebrachte Antibiotikumsresistenz oder über die Expression von GFP in transduzierten Zellen erkannt werden.

Das zu transduzierende Plasmid wird zunächst über transiente Transfektion in die Verpackungszelllinie Phoenix eco oder FlyRD18 eingebracht. Phoenix eco exprimiert die Proteine Gag (Gruppenantigene; virale Kernproteine, z.B. RNA-Bindungsprotein), Pol (Reverse Transkriptase, RNaseH und Integrase) und Env (*envelope*) des Moloney murinen Leukämievirus (MMuLV), FlyRD18 unterscheidet sich nur im *envelope* und exprimiert Env des felines Leukämievirus RD114. Nach der Transfektion von pSUPER-Plasmiden in die Verpackungszellen, wird dort die Sequenz zwischen den LTRs einschließlich der LTRs in RNA transkribiert. Dieses RNA-Molekül enthält das virale Verpackungssignal. Aus den in der Verpackungszelle vorliegenden viralen Proteinen und der RNA werden virale Partikel gebildet, die in das Medium abgegeben werden. Mit diesem viralen Überstand wiederum können Maus- oder Rattenzellen, infiziert werden. Durch die virale reverse Transkriptase wird der Bereich des Vektors, der sich zwischen den LTRs befindet, wieder in DNA umgeschrieben und schließlich ungerichtet in das Genom der Zielzelle integriert. Nun kann die siRNA-Sequenz in der Zelle abgelesen werden und so ihr Zielprotein unterdrücken (Abb. 6).

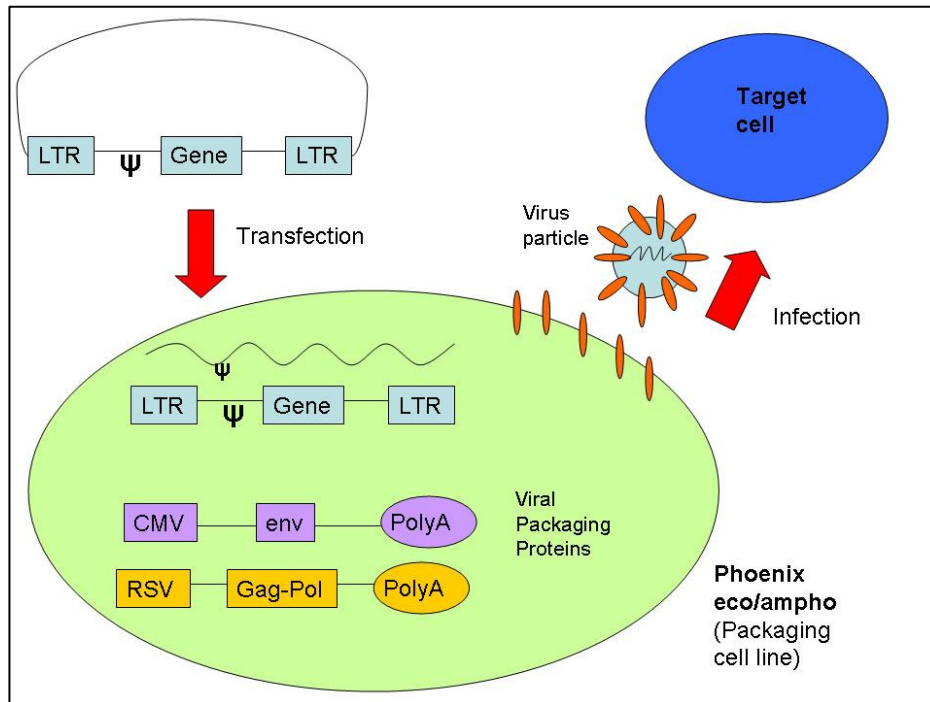


Abbildung 6: Retrovirale Transduktion einer Zelle. Das Plasmid mit der genetischen Information, die stabil in die Zielzelle integriert werden soll, wird in die Verpackungszelllinie Phoenix eco transfiziert. Dort wird die DNA in RNA transkribiert und in virale Partikel verpackt. Diese Partikel infizieren die Zielzelle. Die RNA wird wieder in DNA umgeschrieben, die daraufhin ungerichtet in das Genom der Zielzelle integriert werden kann (nach der Homepage des Nolan Labs, http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Protokolle zur retroviralen Transduktion verwendet. Das Protokoll, das zur Transduktion muriner T-Zellen verwendet wurde, wurde in Regensburg im Rahmen dieser Arbeit etabliert, zur Transduktion humaner T-Zellen wurde ein Protokoll eingesetzt, das am NKI in Amsterdam Standard ist.

2.2.4.1 Retrovirale Transduktion muriner 2C TCR tg T-Zellen (Regensburg)

2.2.4.1.1 Gewinnung des retroviralen Überstands

Am ersten Tag der retroviralen Transduktion wurden 5×10^5 Phoenix eco Zellen in 4 ml Medium in Zellkulturschalen (Durchmesser 6 cm) ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion dieser Zellen mittels Fugene 6-Lipofektion (12,5 µl Fugene 6) mit 5 µg des Zielplasmids und 3,75 µg pCL-eco. Eine Tag später wurde das Medium durch 5 ml frisches Medium ersetzt. Einen weiteren Tag später, am Tag der ersten Transduktion, wurde der Zellüberstand abgeerntet und mit 600 x g für 5 Minuten bei RT abzentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Um die Anlagerung der viralen Partikel an

die Zielzellen zu erleichtern wurde das kationische Reagenz Polybrene (Sigma) zugegeben (Endkonzentration $8\mu\text{g/ml}$ Überstand). Bis zur Transduktion wurde der Überstand auf Eis aufbewahrt. Um weiteren Überstand für die Transduktion am nächsten Tag zu erhalten wurden 5 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben.

2.2.4.1.2 Aktivierung von 2C TCR tg Splenozyten für die Transduktion

Das hier verwendete Phoenix eco System macht es erforderlich, dass sich die zu transduzierenden Zellen gerade aktiv teilen und keine intakte Kernhülle besitzen, damit die genetische Information in den Zellkern eindringen kann.

Um dies zu erreichen wurden Splenozyten aus den Milzen von 2C TCR tg Mäusen gewonnen und im FACS auf ihren Anteil 2C CD8⁺ überprüft. Zur Aktivierung der Zellen wurden Splenozyten mit einem Anteil von 10^5 2C CD8⁺ T-Zellen mit 5×10^5 P.815.B71 Tumorzellen in 24-well Zellkulturplatten stimuliert, wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben.

2.2.4.1.3 Spinfection von 2C TCR tg T-Zellen

An Tag 4 der retroviralen Transduktion wurde 1 ml Medium/well von den aktivierten Splenozyten abgenommen und durch 1 ml viralen Überstands ersetzt. Die so vorbereiteten Platten wurden dann für 90 Minuten mit $900 \times g$ bei RT zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die Zellen samt retroviralen Überstandes bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die *Spinfection* der Zellen mit neuem retroviralen Überstand wiederholt. Die Zellen wurden danach für 2h bei 37°C inkubiert, dann wurde 1 ml Überstand abgenommen und durch frisches Medium mit Puromycin (Endkonzentration im well $2,5 \mu\text{g/ml}$; Sigma) ersetzt. Die erste Restimulation der Zellen erfolgte an Tag 8 der Transfektion. Danach wurden die Zellen im Abstand von vier bis fünf Tagen mit P815.B71 in Gegenwart von Puromycin ($2,5\mu\text{g/ml}$) restimuliert.

2.2.4.2 Retrovirale Transduktion humaner T-Zellen (NKI)

2.2.4.2.1 Gewinnung des retroviralen Überstands

Am ersten Tag der retroviralen Transduktion wurden $1,2 \times 10^6$ FlyRD18 Zellen in 8 ml Medium in Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) ausplattiert. Am nächsten Tag

erfolgte die Transfektion dieser Zellen mittels Fugene 6 –Lipofektion (25µl Fugene 6) mit 10µg des Zielplasmids. Eine Tag später wurde das Medium durch 8 ml frisches Medium ersetzt. Einen weiteren Tag später, am Tag der Transduktion, wurde der Zellüberstand abgeerntet und mit 600 x g für 5 Minuten bei RT abzentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Bis zur Transduktion wurde der Überstand auf Eis aufbewahrt. Retroviraler Überstand von FlyRD18 Zellen kann bei -80°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt verwendet werden.

2.2.4.2.2 Aktivierung humaner PBLs

An Tag 2 der retroviralen Transduktion wurden humane PBLs aus einem *buffy coat* isoliert und mit PHA und IL-2 wie in Kapitel 2.2.4.2.2 beschrieben aktiviert. Vor der Aktivierung wurden die T-Zellen durch FACS-Analyse auf ihre PD-1 Expression hin untersucht.

2.2.4.2.3 Spinfection von humanen PBLs

An Tag 4 der retroviralen Transduktion wurden *non tissue culture treated* 24-well Platten für 2h bei RT (alternativ ÜN bei 4°C) mit 500 µl RetroNectinTM (5 µg/ml in PBS; TaKaRa) beschichtet. Anschließend wird die RetroNectinTM-Lösung, die bis zu fünfmal wieder verwendet werden kann, abgenommen und durch 500µl 2% BSA in PBS ersetzt. Die Platten werden nun weitere 30 Minuten bei RT inkubiert und im Anschluss mit 1 ml PBS gewaschen. RetroNectinTM ist ein rekombinantes humanes Fibronektin-Fragment, das mit den Zielzellen und den viralen Partikeln interagiert und diese dadurch in direkte Nachbarschaft bringt. Auf diese Weise wird die Effektivität der retroviralen Transduktion erhöht.

Während der Vorbereitung der Platten werden die aktivierten Zellen geerntet, ausgezählt und auf 10⁶ Zellen/ml Medium eingestellt und die retroviralen Überstände vorbereitet.

Es werden nun zuerst 500µl des retroviralen Überstands (bei Doppeltransduktionen jeweils 250µl eines jeden Überstandes) in die RetroNectinTM beschichteten Platten pipettiert, gefolgt von 500µl der Zellsuspension. Die so vorbereiteten Platten wurden dann für 90 Minuten mit 900 x g bei RT zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die Zellen samt retroviralem Überstandes bei 37°C inkubiert. Am

darauf folgenden Tag wird 1 ml Medium/well abgenommen und durch 1 ml frisches Medium mit 40U/ml IL-2 ersetzt.

Die Transduktionseffizienz wurde an Tag 8 oder 9 durch FACS-Analyse überprüft (tetMART, GFP-Expression). An Tag 9 wurden die Zellen abgeerntet und mit PHA/IL-2 gemäß Kapitel 2.2.2.8.2 restimuliert.

2.2.5 Genetisch-molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht der Bakterien (Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells, Invitrogen) erfolgte über Nacht bei 37°C im Umluftschüttler in LB_{Amp}-Medium (100µg/ml Ampicillin) zur Selektionierung auf Zellen mit Plasmid. Transformierte *E.coli* wurden über Nacht auf LB_{Amp}-Platten im 37°C Brutschrank inkubiert.

2.2.5.2 Dauerkulturen

Die *E.coli* Bakterien wurden bis zum Erreichen der stationären Phase in LB_{Amp}-Medium angezogen, abzentrifugiert und in LB-Medium mit 43,5% Glycerin (Sigma) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Kulturen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5.3 Plasmidisolierung aus *E.coli*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden verschiedenen Kits angewendet. Plasmid-DNA aus 2ml Übernachtskulturen wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder dem JETQUICK Plasmid Spin Kit (Genomed) isoliert. Für große Ansätze (100 – 500 ml Übernachtskulturen) wurde der Endofree Plasmid Maxi Kit (Quiagen) oder der Jetstar Plasmid 2.0 Maxi Kit (Genomed) verwendet.

2.2.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA und RNA-Konzentrationen wurden spektrometrisch über die Absorption bei 260nm im NanoDrop (Thermo scientific) ermittelt.

2.2.5.5 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von Nucleinsäuren mit Restriktionsenzymen wurde nach Sambrook durchgeführt (Sambrook, Fritsch et al. 1989). Ein Restriktionsverdau besteht dabei gewöhnlich aus der DNA in der gewünschten Konzentration, einem oder mehreren Restriktionsenzymen, dem zugehörigen Puffer und BSA, wobei die Angaben des Enzymhersteller (Promega) berücksichtigt werden.

2.2.5.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren

DNA-Fragmente wurden, entsprechend Sambrook (Sambrook, Fritsch et al. 1989), durch horizontale Gelelektrophorese in TAE-Agarosegelen aufgetrennt. Als Standard wurde die 1kb-Leiter und der 100bp Standard (Promega) verwendet.

Zunächst wurde das Agarosegel gegossen. Dazu wurde Agarose mit einer Konzentration von 1 bis 2% (je nach erwarteter Fragmentgröße) in TAE-Puffer (100-150ml je nach Kammergröße) durch Erhitzen in einer Mikrowelle aufgelöst. Nachdem die Lösung auf 60°C abgekühlt war, wurde der in DNA interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid (5µl/100ml Gel, 10mg/ml) zugegeben. Die Lösung wurde in die Gelkammer des Gelelektrophoresegeräts gegossen und ein Kamm zur Bildung von Geltaschen wurde eingesetzt. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. 10µl der zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 1µl 10x *loading dye* versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Danach wurde ein Spannung von 100V angelegt, bis die blaue Markierung des *loading dyes* (Bromphenolblau) die Mitte des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde daraufhin im UV-Licht analysiert und photographiert.

2.2.5.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung im TAE-Gel wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.5.8 Oligo-Annealing

DNA-Oligonukleotide (TIBmolbiol) wurden mit einer Konzentration von 50 μ M in H₂O aufgenommen. Ein *Annealing*-Ansatz bestand aus jeweils 30 μ l der beiden komplementären Oligonukleotide (50 μ M) und 15 μ l *Annealing*-Puffer (5x). Zunächst erfolgte eine Inkubation von 1 Minute im 90°C Wasserbad, woraufhin die Ansätze für 1h bei 37°C und danach für 1h bei RT inkubiert wurden. Nach dem *Annealing* können die Ansätze bei -20°C gelagert werden.

2.2.5.9 DNA-Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach dem Protokoll von Sambrook (Sambrook, Fritsch et al. 1989) mit T4-DNA-Ligase (Promega) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. 10 μ l Ansätze, bestehend aus den DNA-Fragmenten, T4-DNA Ligase und Ligase-Puffer, wurden entweder 3h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.5.10 Das pSUPERTM-System

Auf dem pSUPER-Plasmid umschließen die 3' und die 5'-LTR (*long terminal repeat*) Regionen des MSCV (*murine stem cell virus*) ein shRNA-Konstrukt unter Kontrolle des Polymerase III H1 RNA Promotors, eine Puromycin oder Neomycin Kasette und das virale Verpackungssignal Ψ (Abb. 7, aus Brummelkamp 2002).

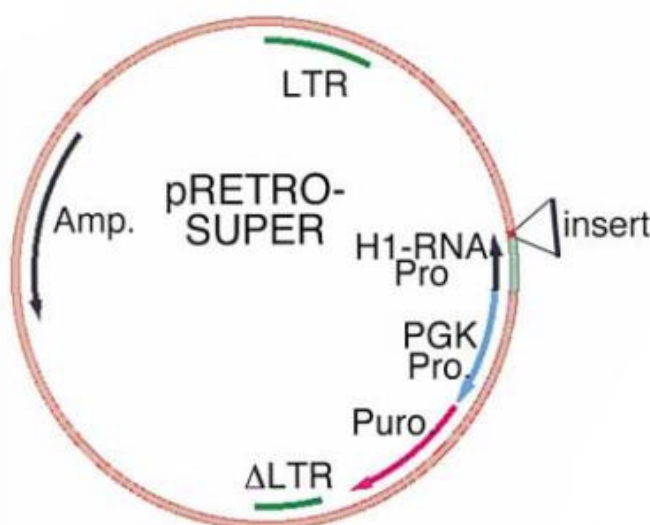


Abbildung 7: Schematische Darstellung des pSUPER. retro. puro Plasmids: Die LTR-Regionen des MSCV umschließen das siRNA-Konstrukt (Insert) unter dem H1-RNA-Promotor sowie die Puromycin-Kassette unter Kontrolle des PGK-Promotors. (Abbildung aus Brummelkamp, Bernards et al. 2002)

Die Verwendung des H1 RNA Promotors führt zur Synthese kurzer RNA-Transkripte ohne Polyadenosinschwanz, mit einem eindeutigen Transkriptionsstart und einem Terminationssignal von fünf Thyminresten. Das RNA-Produkt wird dabei nach dem zweiten Uridinrest abgespalten, wodurch sich für das shRNA-Konstrukt ein 3'-Überhang von zwei Uridin- oder Thyminresten ergibt, wie er auch bei synthetischer siRNA angefügt wird. Das shRNA-Insert besteht aus einer 19 Nukleotide langen genspezifischen Sequenz, die durch ein kurzes Verbindungssequenz mit der *anti-sense* Sequenz verbunden ist. Das daraus entstehende RNA-Transkript bildet durch komplementäre Basenpaarung eine Haarnadelstruktur aus (Abb. 8) (Brummelkamp, Bernards et al. 2002). Dieses Konstrukt ist Substrat für das Enzym DICER, das die shRNA in funktionelle siRNA umwandelt. Diese kann dann in den RISC eingebaut werden und so die Expression des Zielgens unterdrücken (Hannon 2002).

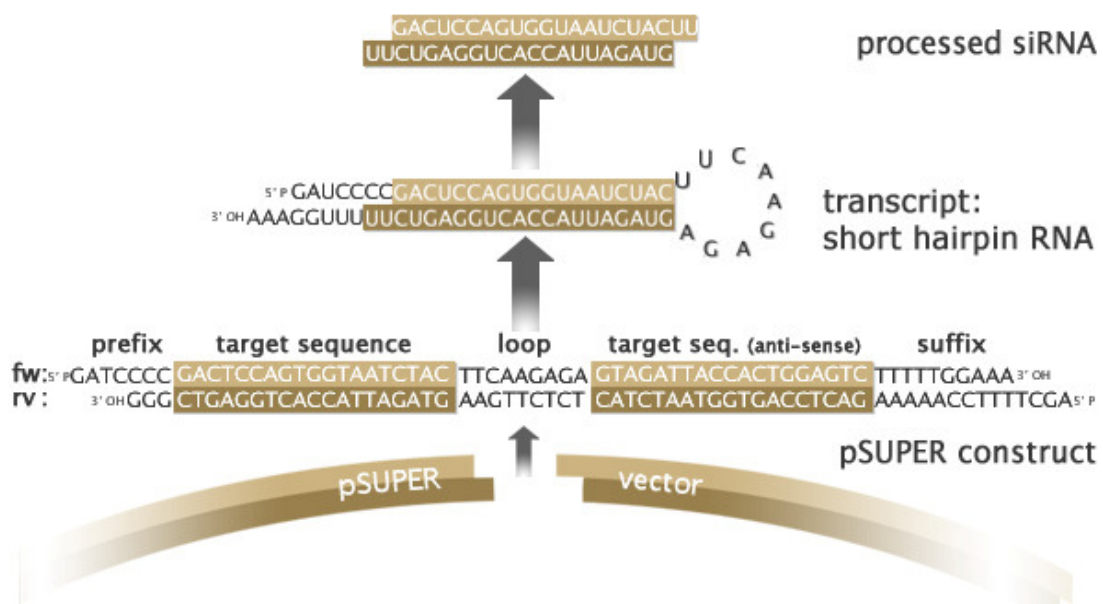


Abbildung 10: Umsetzung von shRNA in siRNA. Das shRNA-Konstrukt im Insert von pSUPER wird in RNA umgeschrieben. Das so entstehende RNA-Molekül bildet über komplementäre Basenpaarung shRNA aus, die dann vom Enzym DICER in funktionelle siRNA umgewandelt wird (Quelle: <http://mekentosj.com/irnai/psuper.html>).

Für die Klonierung in den pSUPER-Vektor wurden DNA-Oligonukleotidpaare mit folgendem Aufbau verwendet:

5' - GAT CCC C – Sequenz A - TTC AAG AGA - Sequenz A' - TTT TTG GAA A-3'
 3' - GGG – Sequenz A' AAG TTC TCT – Sequenz A – AAA AAC CTT TTCGA-5'

Sequenz A' bezeichnet hierbei die *anti-sense* Sequenz zu Sequenz A. Über die Überhänge wird am 5'-Ende eine BglII- Schnittstelle und am 3'-Ende eine HindIII- Schnittstelle eingefügt. Eine Liste mit den *sense* und *anti-sense* Sequenzen der verwendeten siRNA findet sich im Anhang 6.2.2.

Zur Klonierung wurden die pSUPER-Plasmide (pSUPER.retro.puro, pSUPER.retro.neo.GFP) zunächst mit HindIII und BglII verdaut. Dadurch werden die Plasmide linearisiert und Überhänge für die Ligation mit den *annealed* Oligonukleotiden, die für die shRNA-Struktur kodieren, geschaffen. Anschließend wurden die linearisierten Plasmide mit den *annealed* Oligonukleotiden ligiert. Nach der Ligation erfolgte ein Verdau mit BglII. Durch die Ligation des BamHI Überhanges des Oligonukleotides mit dem BglII Überhang des linearisierten Plasmids wird die BglII Schnittstelle zerstört. Durch den erneuten Verdau der ligierten Plasmide mit BglII werden Konstrukte, die kein Insert enthalten verdaut, wohingegen die gewünschten Plasmide unbeeinträchtigt bleiben.

Im Anschluss wurde der Ligationsansatz in E.coli transformiert. Verschiedene Klone wurden als 2ml Übernachtskulturen angezogen und durch Verdau mit EcoRI und HindIII kontrolliert. Bei korrekter Einfügung des Oligonukleotids ist neben einem Fragment mit ca. 6kb ein Fragment von 281bp zu erwarten, bei einem negativen Klon ohne Insert beträgt die Fragmentgröße 1kb.

2.2.5.11 Semi-quantitative RT-PCR

2.2.5.11.1 Gewinnung der Gesamt-RNA aus murinen T-Zellen

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurden der RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Es wurden jeweils 10^6 der zu untersuchenden T-Zellen eingesetzt und die RNA wurde gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert. Anschließend wurde die Konzentration der RNA mit dem NanoDrop bestimmt.

2.2.5.11.2 Reverse Transkription der RNA

Zur reversen Transkription der RNA wurden die SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen) in Verbindung mit Random Primern (Invitrogen) eingesetzt. Die reverse Transkription wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5.11.3 Semi-quantitative PCR

Die semi-quantitative PCR wurde an cDNA, die durch reverse Transkription aus der Gesamt-RNA einer bestimmten Anzahl Zellen gewonnen wurde, durchgeführt. Der Anteil einer bestimmten mRNA wurde dabei durch Messung der Intensität der Bande nach PCR auf einem TAE-Agarosegel, im Vergleich zum Signal des Haushaltgens β -Aktin bestimmt. Die densitometrische Auswertung wurde mit der Total Lab TL100-Software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) durchgeführt.

Ein PCR-Ansatz bestand aus 2 μ l cDNA, 12,5 μ l Hot Star Taq Plus Master Mix (Qiagen), 1 μ l Primer A (10 μ M), 1 μ l Primer B (10 μ M) und 10,5 μ l H₂O.

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

15'	95°C	1 Zyklus
30''	94°C	30 Zyklen
30''	55°C	
45''	72°C	
10'	72°C	1 Zyklus
ÜN	4°C	

2.2.6 Statistische Analysen

Die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurden mit einem statistischen Taschenrechner durchgeführt. Die Daten verschiedener Gruppen wurden mit Hilfe des Student t-Test miteinander verglichen. Werte von $p < 0,05$ wurden dabei als statistisch signifikant betrachtet und in den Abbildungen mit * gekennzeichnet. Bei $p < 0,01$ sprach man von hoher Signifikanz, und die Daten wurden mit ** gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Suppression von PD-1 im murinen System

Der Vergleich von PD-1 exprimierenden und PD-1 defizienten tumorspezifischen murinen T-Zellen zeigte, dass die PD-1 defizienten T-Zellen bei Zytokinproduktion, Proliferation und Tumorabstoßung *in vivo* deutlich im Vorteil waren (Blank, Brown et al. 2004). Da es nicht möglich ist, humane PD-1 *knock-out* T-Zellen aus einem transgene Organismus zu erhalten, wurde das System der RNAi vermittelten Suppression gewählt. Zuerst sollte das System im murinen System etabliert und getestet werden.

In den folgenden Versuchen wurde daher die PD-1 Expression auf murinen 2C TCR tg T-Zellen durch RNA Interferenz reduziert. Derartig veränderte T-Zellen wurden *in vitro* auf ihre Zytokinproduktion und Proliferation hin untersucht und später *in vivo* im Tumorexperiment eingesetzt.

3.1.1 Transiente Suppression der PD-1 Oberflächenexpression in murinen Zellen

3.1.1.1 Analyse der PD-1 Expression verschiedener Tumorzelllinien

Die PD-1 Expression ändert sich auf T-Zellen mit dem Aktivierungsstatus (Blank, Brown et al. 2004). Um die Effizienz eines *knock-downs* der Oberflächenexpression besser beurteilen zu können, sollten verschiedene siRNA-Sequenzen zunächst in einer Tumorzelllinie getestet werden, die PD-1 konstitutiv exprimierte. Dazu wurden die murinen Tumorzelllinien EL4, J588 und A20 auf ihre PD-1 Oberflächenexpression hin mittels FACS-Analyse untersucht. Für EL4 konnte eine hohe konstitutive PD-1 Expression nachgewiesen werden (Abb.9). Die folgenden Experimente wurde daher mit dieser Tumorzelllinie durchgeführt.

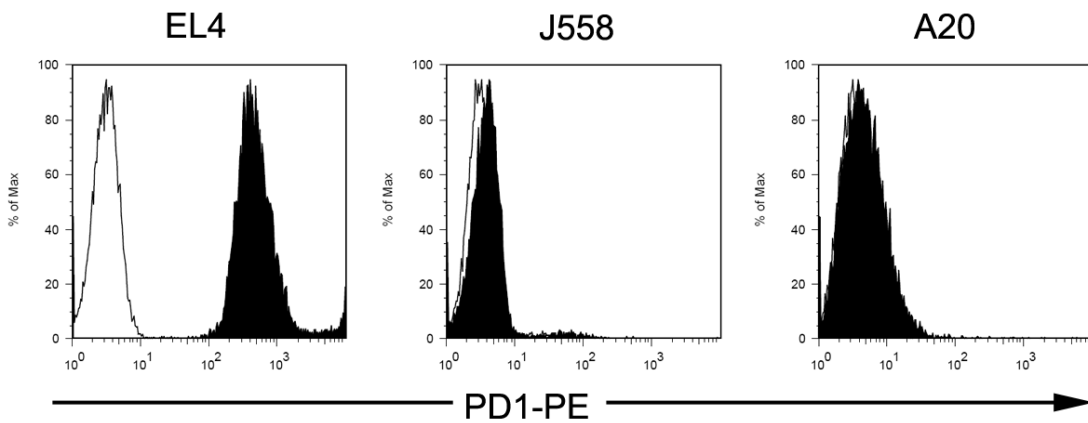


Abbildung 9: PD-1 Oberflächenexpression auf EL4, J558 und A20 Zellen. $5 \times 10^5 - 10^6$ Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden mit anti-PD1-PE (gefüllt) und hIgG-PE (leer) gefärbt. EL4 zeigt eine hohe PD-1 Expression, während J558 und A20 für PD-1 negativ sind.

3.1.1.2 Transiente Transfektion von EL4 mit doppelsträngiger siRNA (Ambion)

Zunächst wurden drei für PD-1 *knock-down* entworfene doppelsträngige siRNA-Moleküle der Firma Ambion (*Silencer® predesigned siRNA*), auf ihre Effizienz bei der Suppression von PD-1 getestet. Doppelsträngige siRNA kann direkt in den RISC-Komplex integriert werden und so ihr Zielprotein supprimieren (Hannon 2002).

Zunächst wurde die Transfektionseffizienz der Amaxa Methode mit EL4-Zellen ermittelt. Es konnte dabei eine Transfektionseffizienz von 90% für doppelsträngige FAM (*fluorescein acetoxymethyl*)-markierte siRNA (siRNA-negativ-FAM, *Silencer® FAM™ labeled Negative Control #1 siRNA*) erreicht werden. Als weitere Transfektionskontrolle wurde das pmaxGFP-Plasmid eingesetzt, dass als Positivkontrolle mit dem Amaxa-System geliefert wird. Für das Plasmid lag die Transfektionseffizienz zwischen 70 und 90% (Abb. 10).

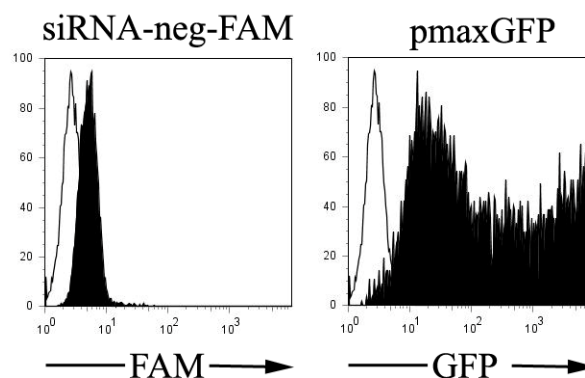


Abbildung 10: Transfektionseffizienz für EL4 mit dem Amaxa-System. 2×10^6 EL4 Zellen wurden mit der FAM-markierten siRNA-negativ-FAM oder mit dem Plasmid pmaxGFP transfiziert und 24h nach Transfektion durch FACS-Analyse untersucht. (leer: untransfizierte EL4, gefüllt: transfizierte EL4)

EL4 Zellen wurden mit 0,5 oder 3,0 μ g/ml siRNA-mu1, -mu2 oder -mu3 sowie der Negativkontrolle siRNA-negativ-FAM durch Elektroporation im Amaxa-System transfiziert und 24, 48, 72 und 96h nach der Transfektion im FACS-Gerät analysiert. Es stellte sich heraus, dass die siRNA-mu1 und -mu2 in der Lage sind, die PD-1 Expression der EL4 Zellen zu unterdrücken. 48h nach der Transfektion zeigten Zellen, die mit siRNA-mu1 transfiziert worden waren eine Reduktion der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) auf 370, verglichen mit der MFI von 684 der Zellen, die die negative Kontroll-siRNA erhalten hatten. SiRNA-mu2 konnte die MFI noch weiter auf 225 reduzieren, während siRNA-mu3 keinen Effekt hatte (MFI 744). SiRNA-mu2 ist also am effektivsten und konnte noch 72h nach der Transfektion die PD-1 Expression supprimieren (Abb. 11). Die höhere Menge an siRNA zeigte nur geringfügig besseren *knock-down* (nicht gezeigt). Es ist also möglich PD-1 Expression auf murinen Zellen durch transiente Transfektion mit siRNA zu unterdrücken.

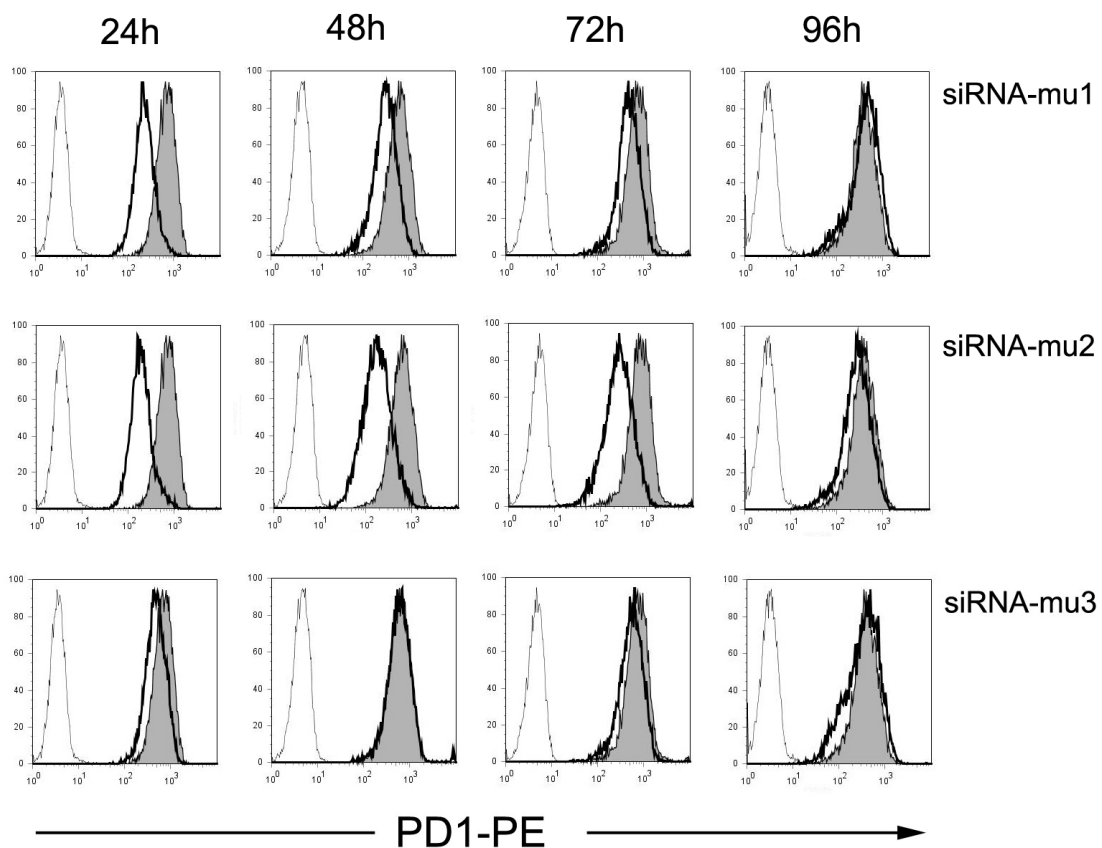


Abbildung 11: Transiente Transfektion von EL4 mit siRNA. EL4 Zellen wurden mit 3,0 μ g/ml siRNA-mu1, -mu2, -mu3 oder siRNA-negativ-FAM transfiziert und über einen Zeitraum von 96h auf PD-1 Oberflächenexpression hin untersucht. Gefüllt: siRNA-negativ-FAM transfizierte Zellen, fein: siRNA-negativ-FAM transfizierte Zellen (Isotyp-PE), fett: siRNA-mu1-3 transfizierte Zellen.

3.1.1.3 Transiente Transfektion primärer T-Zellen mit siRNA (Ambion)

Nachdem die Funktionalität der verschiedenen siRNA Sequenzen in EL4 gezeigt werden konnte, wurde nun untersucht, ob man durch transiente Transfektion mit siRNA auch auf primären T-Zellen die PD-1 Expression herunterregulieren kann. Dazu wurden aufgereinigte CD8⁺ 2C T-Zellen zunächst mindestens einmal durch spezifische Stimulation mit P815.B71 aktiviert, um die PD-1 Expression auf der Zelloberfläche zu induzieren. An Tag 4 der Stimulation wurden die T-Zellen geerntet und mittels Amaxa-Elektroporation mit den siRNAs-mu1, -mu2, und -mu3 transfiziert. Parallel dazu wurden CD8⁺ 2C und 2C PD1^{-/-} T-Zellen ohne siRNA *mock* transfiziert. Nach einer Ruhephase von 4h im 37°C Inkubator wurden die Zellen mit B16.SIY IFN γ spezifisch stimuliert. 48h nach der Transfektion und 44h nach Beginn der Stimulation ließ sich eine Reduktion der PD-1 Expression feststellen, die dem Muster von EL4 entsprach. Die MFI der *mock* transfizierten 2C T-Zellen betrug 647 und konnte durch siRNA-mu1 auf 443, durch siRNA-mu2 auf 206 und durch siRNA-mu3 auf 590 reduziert werden. Bei einem Teil der siRNA-mu2 transfizierten 2C T-Zellen konnte die PD-1 Expression auf den Grad von 2C PD1^{-/-} T-Zellen reduziert werden (Abb. 12).

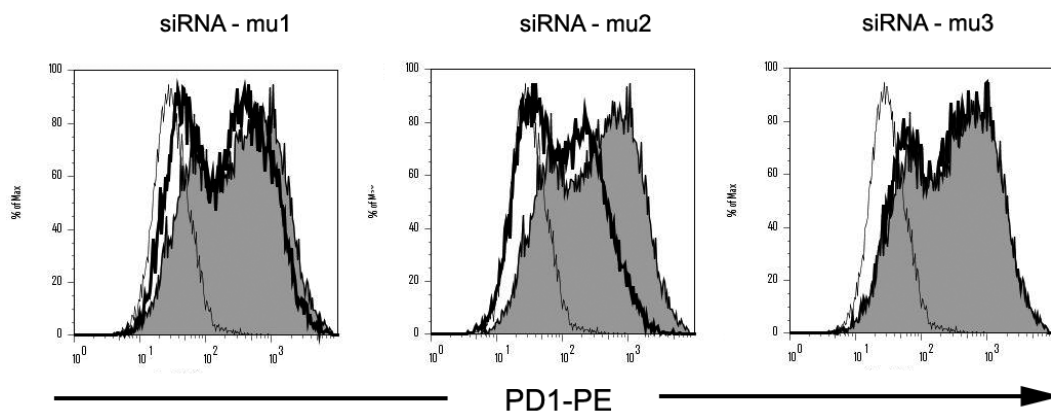


Abbildung 12: Transienter *knock-down* von PD-1 auf 2C T-Zellen. 2C T-Zellen wurden mit 3,0 μ g/ml siRNA-mu1,-mu2 oder -mu3 transfiziert und nach 48h auf PD-1 Oberflächenexpression hin untersucht. Gefüllt: mock transduzierte 2C Zellen, dünn: mock transduzierte 2C PD1^{-/-} T-Zellen, dick: siRNA-mu1 bis -mu3 transduzierte 2C T-Zellen.

3.1.1.4 Zytokinassays mit transient siRNA transfizierten 2C T-Zellen

Es stellte sich nun die Frage, ob transienter *knock-down* der PD-1 Oberflächenexpression bereits einen positiven Einfluss auf die Zytokinproduktion der transfizierten 2C T-Zellen hat. Dazu wurden 2C T-Zellen mit siRNA-mu1, -mu2 und -mu3 transfiziert und für 18h mit B16.SIY E12 IFN γ stimuliert. Die B16.SIY E12

Tumorzellen waren zuvor 48h mit $\text{IFN}\gamma$ inkubiert worden (B16.SIY E12 $\text{IFN}\gamma$), wodurch die Expression des MHC (H2Kofb) und des Liganden PD-L1 induziert wurde (Abb. 13).

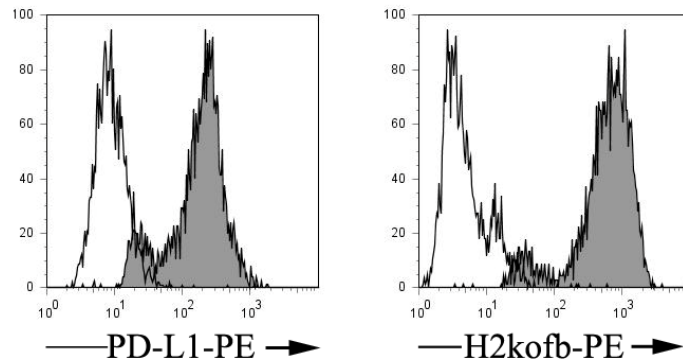


Abbildung 13: Induktion von B16.SIY E12 Tumorzellen mit $\text{IFN}\gamma$: B16.SIY E12 Tumorzellen wurden für 48h in Gegenwart von 20ng/ml $\text{IFN}\gamma$ kultiviert. Leer: B16.SIY E12 ohne $\text{IFN}\gamma$ Induktion, Gefüllt: B16.SIY E12 $\text{IFN}\gamma$

Danach wurden die Überstände mittels ELISA auf die Produktion von IL-2 und $\text{IFN}\gamma$ hin untersucht. SiRNA-mu2 transfizierte 2C T-Zellen zeigten dabei einen signifikanten Anstieg um ein Drittel (34 %) für die IL-2 Produktion und um nahezu drei Viertel (75 %) für die $\text{IFN}\gamma$ Produktion verglichen mit *mock* transfizierten 2C T-Zellen. SiRNA-mu1 bewirkte einen signifikanten Anstieg um fast zwei Drittel (60 %) in der $\text{IFN}\gamma$ Produktion (Abb. 14).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der *knock-down* der PD-1 Oberflächenexpression auf 2C T-Zellen durch transiente Transfektion mit siRNA die Zytokinproduktion bei Stimulation in Gegenwart von PD-L1 erhöht.

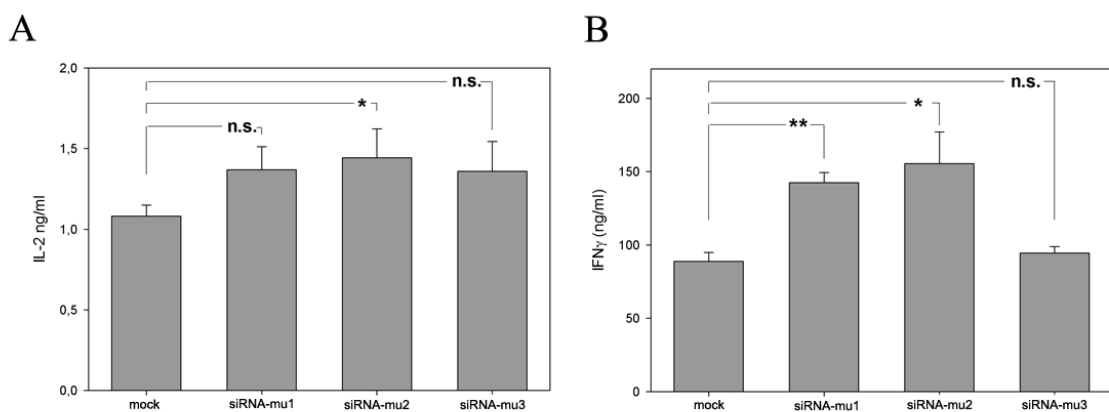


Abbildung 14: IL-2 und $\text{IFN}\gamma$ Produktion transient siRNA transfizierter 2C T-Zellen. 5×10^4 2C T-Zellen wurden 4h nach Transfektion mit siRNA-mu1, -mu2 oder -mu3 mit B16.SIY E12 $\text{IFN}\gamma$ (E:T = 1) stimuliert. Nach 18h wurden die IL-2 (A) und die $\text{IFN}\gamma$ (B) Mengen im Überstand mittels ELISA bestimmt.

3.1.2 Etablierung des Systems der retroviralen Transfektion muriner T-Zellen

Der Effekt transienter Transfektion mit siRNA ist nicht lang anhaltend, da die siRNA in den Zellen mit jeder Teilung verdünnt wird. Nach spätestens 96h sind die Zellen wieder in der Lage, PD-1 normal zu exprimieren (Abb. 11). Um PD-1 anhaltend zu supprimieren wählten wir das pSUPERTM-Vektor-System (Methoden Kapitel 2.2.5.10), um siRNA-Sequenzen durch retrovirale Transduktion permanent in das Genom der Zielzellen zu integrieren (Brummelkamp, Bernards et al. 2002).

3.1.2.1 Etablierung eines Protokolls zur retroviralen Transduktion muriner T-Zellen

3.1.2.1.1 Transduktion verschiedener Zelllinien

Zur Etablierung der retroviralen Transduktion verwendeten wir wieder zuerst Tumorzelllinien. Zunächst wurde versucht, die Zelllinien EL4 und NIH3T3 mit einem retroviralen GFP-Kontrollplasmid (pLeGFP-N1) zu transduzieren. Es lag ein Protokoll vor, das bereits verwendet worden war, um die Zelllinie B16.F10 unter Einsatz der Verpackungszelllinie Phoenix amphi zu transduzieren. Nach diesem Protokoll wurden zunächst Phoenix eco Zellen mittels Kalziumphosphat-Fällung mit dem Kontrollplasmid transfiziert. 48h nach der Transfektion wurde der virale Überstand gewonnen und zusammen mit dem kationischen Polymer Polybrene zu den Zielzellen gegeben. Polybrene neutralisiert dabei die unterschiedlichen Ladungen von Zellmembran und Viruspartikel und erleichtert so die Infektion der Zelle (Davis, Rosinski et al. 2004). Am darauf folgenden Tag wurde der virale Überstand durch frisches Medium ersetzt.

Nachdem mehrere Versuche gescheitert waren, auf diesem Wege die Zellen zu transduzieren, wurde die so genannte *Spininfection* versucht. Dabei werden die Zellen nach Zugabe des viralen Überstandes für eineinhalb Stunden zentrifugiert. Durch diese Methode waren wir in der Lage EL4 und NIH3T3 retroviral zu transduzieren, wobei die Transduktionseffizienz jedoch gering war (EL4: 0,7%, NIH3T3: 2,5% GFP-positive Zellen).

3.1.2.1.2 Transduktion primärer muriner T-Zellen

Als nächstes wurden primäre murine T-Zellen in den Transduktionsversuchen eingesetzt. Da sich nur teilende Zellen retroviral transduzieren lassen, mussten die T-Zellen zunächst stimuliert werden. In ersten Versuchen wurden 2C T-Zellen, die nach der 1. Stimulation bei -80°C eingefroren worden waren, mit anti CD3/28 mAB und IL-2 oder mit P815.B71 stimuliert. Dabei konnte keine Transduktion der Zellen erreicht werden. Dies ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass stimulierte murine Splenozyten *envelope* Proteine endogener Retroviren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, wodurch eine weitere Infektion durch ecotrope virale Partikel erheblich erschwert wird. Auch die murinen Zelllinien EL4 und B16 exprimieren derartige Proteine, wodurch sich die geringe Transduktionseffizienz der EL4 Zellen bei Einsatz der Phoenix eco – Verpackungszelllinie erklären lässt. Für die früheren erfolgreichen Transduktionen von B16.F10 waren Phoenix amphi Verpackungszellen verwendet worden, die amphitrophe virale Partikel produziert. Diese Partikel können fast alle Säugerzellen, u.a. auch humane Zellen, infizieren. Eine mögliche Transduktion von EL4 Zellen mit Phoenix amphi wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht verfolgt.

Auf naiven T-Zellen liegen die endogenen retroviralen Proteine noch nicht vor. Eine erfolgreiche Transduktion muriner T-Zellen kann daher nur in dem engen Fenster zwischen erster Aktivierung und Expression dieser Proteine auf der Zelloberfläche stattfinden (Zhang, Tsang et al. 2003).

In den darauf folgenden Experimenten konnten unter Einsatz der Phoenix eco Verpackungszelllinie erste Erfolge für C57BL/6 Splenozyten erzielt werden, die 24h nach Aktivierung mit anti CD3/28 mAB und IL-2 mit einem GFP-Reporterplasmid transduziert worden waren (Transfektionseffizienz bis zu 27%). Die Transfektionseffizienz für Splenozyten aus 2C TCR tg RAG2^{-/-} Mäusen, die ausschließlich CD8⁺ 2C TCR tg T-Zellen enthalten, hingegen war sehr gering (0,3%). Dies korreliert mit Beobachtungen, dass sich CD8⁺ T-Zellen in Gegenwart von CD4⁺ T-Zellen besser transduzieren lassen (Kessels, Wolkers et al. 2005).

Im nächsten Experiment wurden Splenozyten aus einer 2C RAG2^{+/-} Maus verwendet, die neben CD8⁺ 2C TCR tg T-Zellen auch CD4⁺ 2C TCR tg T-Zellen besaß. Als Stimulationsmethode wurde neben anti CD3/28 mAbs mit IL-2 auch Stimulation mit P815.B71 eingesetzt. Mit beiden Stimulationsmethoden konnten sowohl für CD8⁺ als auch für CD4⁺ 2C T-Zellen gute Transfektionseffizienzen erreicht werden (anti CD3/28, IL-2: CD4⁺ 14%, CD8⁺ 10%; P815.B71: CD4⁺ 23%, CD8⁺ 14%) (Abb. 15). Die bessere Transfektionseffizienz für CD4⁺ T-Zellen wurde ebenfalls schon von anderen Gruppen beobachtet (Kessels, Wolkers et al. 2005).

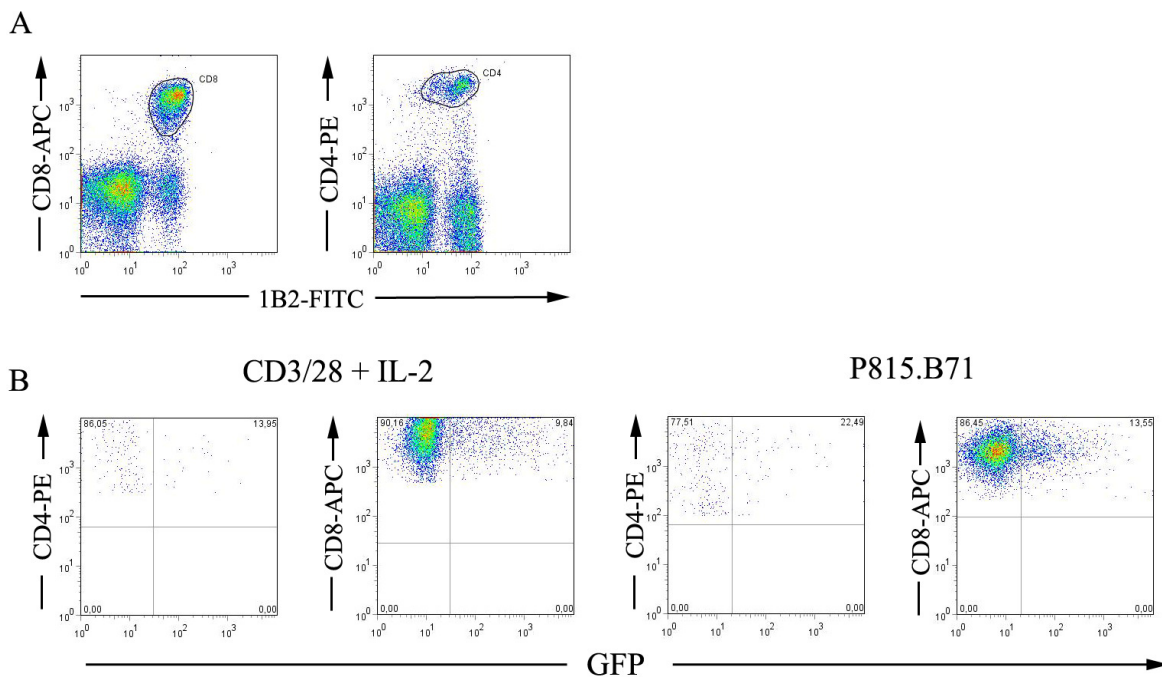


Abbildung 15: Transduktionseffizienz für 2C TCR tg T-Zellen unter verschiedenen Bedingungen. A) Splenozyten aus einer 2C TCR tg RAG1^{+/-} Maus enthalten einen gewissen Anteil CD4⁺ 2C TCR tg T-Zellen. B) Transduktionseffizienz für 2C TCR tg T-Zellen bei Stimulation mit CD3/28 mAb + IL-2 oder mit P815.B71. Die Zellen wurden an Tag 3 nach Transduktion ohne vorherige Puromycin-Selektion mittels FACS-Analyse untersucht.

Kessels et al. empfehlen außerdem den Einsatz des Plasmids pCL-Eco (Naviaux, Costanzi et al. 1996). Dieses Plasmid enthält zusätzlich noch einmal die Sequenzen für Gag, Pol und Env des MMuLV und wird mit dem pSUPER-Plasmid zusammen in Phoenix eco kotransfiziert. Dadurch wird der Titer der viralen Partikel im Überstand erhöht.

Mit diesen Erkenntnissen wurden verschiedene Transduktionsbedingungen ausgetestet. Als Zielzellen wurden 2C Splenozyten, die mit P815.B71 stimuliert wurden. Variiert

wurde dabei die Zahl der ausplattierten Phoenix eco vor der Transfektion (5×10^5 bzw. 10^6) sowie der Zeitpunkt der Transduktion (Tag 1, Tag 2 oder Tag 1 und 2 nach Aktivierung). Es stellte sich heraus, dass sich die Phoenix eco Zellen besser transfizieren ließen, wenn sie dünner angeimpft wurden, mit einer Transfektionseffizienz von 56% für die mit 5×10^5 Zellen und 40% für die mit 10^6 Zellen angeimpften Kulturen. Ein höherer Transfektionsgrad der Phoenix eco Zellen führte zugleich auch zu einer besseren Transduktionsrate der Zielzellen. Splenozyten ließen sich am besten an Tag 1 nach Stimulation transduzieren. Die höchste Anzahl transduzierter $CD8^+$ Zellen ließ sich bei zweimaliger Transduktion an Tag 1 und 2 beobachten (Tabelle 1).

Transfektion, Ausgangszahl Phoenix eco	Transfektions- effizienz Phoenix eco	Transduktionseffizienz 2C $CD8^+$ T-Zellen aus Splenozytenkultur		
		Tag 1	Tag 2	Tag 1 und 2
5×10^5	56%	12%	4%	36%
10^6	40%	8%	3%	28%

Tabelle 1: Austesten verschiedener Transduktionsbedingungen für die retrovirale Transduktion primärer 2C T-Zellen. Splenozyten einer 2C TCR tg Maus wurden mit P815.B71 Tumorzellen stimuliert. Zur Gewinnung viralen Überstandes wurden 5×10^5 bzw. 10^6 Phoenix eco Zellen ausplattiert und mit pLeGFP-N1 und pCL-Eco kotransfiziert. Nachdem die Überstände für die *Spininfection* der Zielzellen an Tag 1 abgenommen worden waren, wurde frisches Medium auf die transfizierten Zellen gegeben um so viralen Überstand für die Transduktion an Tag 2 zu gewinnen. Transfektions- und Transduktionseffizienzen wurden durch FACS-Analyse der GFP-Expression durch den Kontrollvektor pLeGFP-N1 bestimmt.

Für alle weiteren retroviralen Transduktionen von 2C T-Zellen wurde folgendes Protokoll verwendet: 5×10^5 Phoenix eco Zellen wurden ausplattiert und am folgenden Tag mit dem gewünschten pSUPER-Plasmid sowie pCL-Eco mittels Fugene6 Lipofektion transfiziert. Am nächsten Tag wurde das Medium auf den Phoenix eco Zellen erneuert und 2C Splenozyten gewonnen und mit P815.B71 stimuliert. An den beiden darauf folgenden Tagen erfolgte *Spininfection* der Zielzellen mit dem viralen Überstand unter Zugabe von Polybrene.

Mit diesem Protokoll lagen die Transduktionseffizienzen gewöhnlich zwischen 20 und 50%. Die maximale Transduktionseffizienz, die je erreicht wurde, betrug 68%.

3.1.2.2 Antibiotika Kurven für 2C T-Zellen

Nach der erfolgreichen Transduktion mit den pSUPER-siRNA Vektoren sollten die transduzierten 2C T-Zellen durch Antibiotika-Selektion angereichert werden. Neben der shRNA-Sequenz unter dem H1 Promotor befindet sich eine Puromycin-Kassette zwischen den LTR-Sequenzen. Zellen, die durch retrovirale Transduktion das shRNA-Konstrukt in ihr Genom integriert haben, weisen sich daher durch Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin aus. Um die Konzentration zu bestimmen, bei der alle 2C T-Zellen einer Kultur sterben, wurde eine Konzentrationskurve erstellt. Dazu wurden 2C TCR tg RAG2^{-/-} T-Zellen durch P815.B71 spezifisch stimuliert. Es stellte sich heraus, dass bei einer Konzentration von 2 µg/ml Puromycin im Medium an Tag 6 mehr als 99% der T-Zellen abgestorben waren (Abb. 16). 2C TCR tg und 2C TCR tg PD1^{-/-} T-Zellen verhielten sich vergleichbar (nicht gezeigt). Anhand dieser Kurven wurde eine Konzentration von 2,5 µg/ml Puromycin für die Selektion pSUPER.retro.puro transduzierter 2C TCR tg T-Zellen festgelegt.

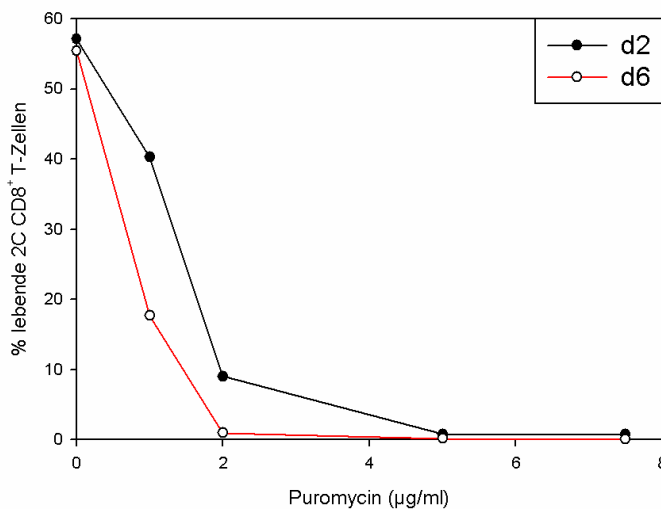


Abbildung 16: Titrierung der Puromycin-Konzentration zur Selektion pSUPER.retro.puro transduzierter 2C T-Zellen. 10⁵ 2C T-Zellen wurden in Gegenwart von 0, 1, 2, 5, 7,5 und 10 µg/ml Puromycin spezifisch mit 5x10⁵ P815.B71 stimuliert. Das Medium wurde an Tag 3 durch Medium mit frischem Antibiotikum ersetzt.

3.1.2.3 Herstellung der pSUPER-siRNA-Vektoren

Als Ausgangsvektor für die Herstellung der pSUPER-siRNA-Vektoren diente das Plasmid pSUPER.retro.puro. Die verschiedenen siRNA Sequenzen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben in das Plasmid kloniert (Methoden Kapitel 2.2.5.10).

3.1.2.4 Entwurf weiterer funktioneller siRNA-Sequenzen mittels der sfold-Software

Um weitere funktionelle Sequenzen zu entwerfen, wurde die sfold-Software (<http://sfold.wadsworth.org>; siRNA) eingesetzt. Dabei werden verschiedene Parameter (z.B. GC-Gehalt, Antisense-siRNA-Bindungsenergie, differenzielle Stabilität der Duplexenden) berücksichtigt und in ein Punktesystem umgesetzt, das die voraussichtliche Wirksamkeit einer siRNA beurteilt. Es wurden sieben weitere, gegen murines PD-1 gerichtete Sequenzen ausgesucht, die so gut wie möglich folgenden Kriterien entsprachen: GC-Gehalt von möglichst 40%, Antisense-siRNA-Bindungsenergie von mindestens -15 bis -20 kcal/mol, Gesamtpunktzahl von mindestens 12. Diese Sequenzen und siRNA-mu2 wurden in pSUPER.retro.puro eingefügt.

3.1.3 Stabiler *knock-down* der PD-1 Expression in 2C T-Zellen

3.1.3.1 Austesten der siRNA-Sequenzen in 2C T-Zellen

Nachdem die siRNA-Sequenzen in das pSUPER.retro.puro Plasmid eingefügt worden waren, sollten diese auf ihre Effektivität getestet werden. Dazu wurden 2C T-Zellen retroviral transduziert und mit Puromycin über mehrere Stimulationen selektioniert. Die überlebenden Zellen wurden durch FACS-Analyse auf ihre PD-1 Expression untersucht. Als Negativkontrolle diente pSUPER.retro.puro ohne Insert (Abb. 17).

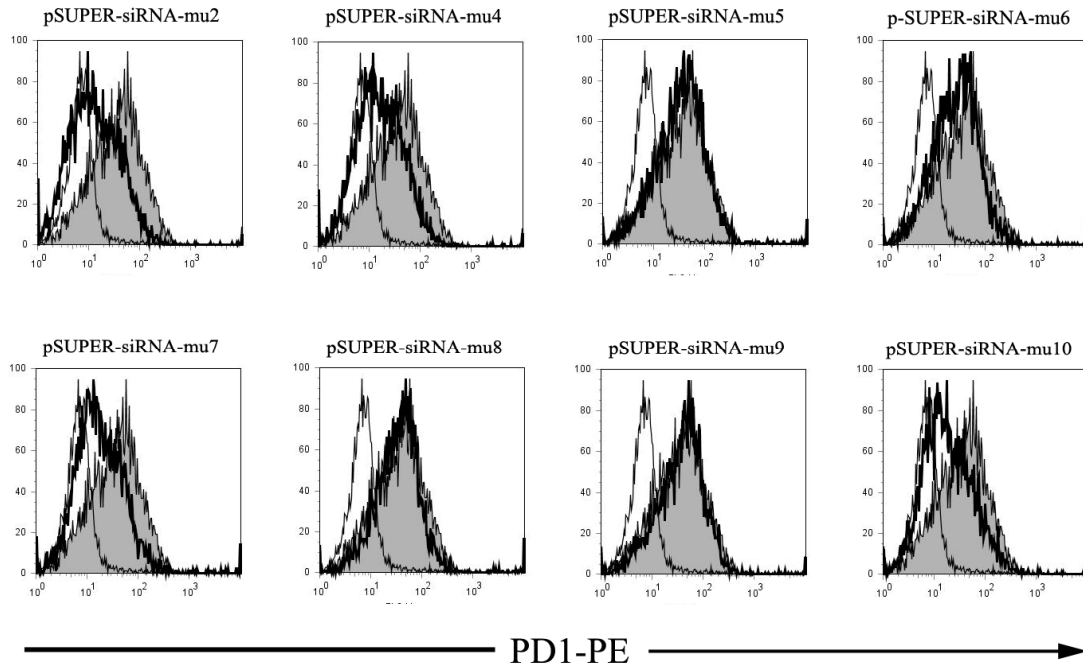


Abbildung 17: Effektivität verschiedener siRNA-Sequenzen in 2C T-Zellen. 2C T-Zellen wurden retroviral mit den siRNA-Vektoren pSUPER-siRNA-mu2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 transduziert und über mehrere Runden selektiert. Als Negativkontrolle diente der Vektor pSUPER.retro.puro ohne Insert. Gefüllt: 2C pSUPER.retro.puro, fein: 2C PD1^{-/-}, fett: 2C pSUPER-siRNA.

MFI:

2C pSUPER.retro.puro	82	2C pSUPER-siRNA-mu6	75
2C PD1 ^{-/-}	17	2C pSUPER-siRNA-mu7	78
2C pSUPER-siRNA-mu2	37	2C pSUPER-siRNA-mu8	110
2C pSUPER-siRNA-mu4	48	2C pSUPER-siRNA-mu9	85
2C pSUPER-siRNA-mu5	92	2C pSUPER-siRNA-mu10	53

Neben der Sequenz siRNA-mu2, die bereits durch transiente Transfektion in EL4 und 2C T-Zellen getestet worden war, erwiesen sich die Sequenzen siRNA-mu4, -mu7 und -mu10 als wirksam darin, PD-1 zu supprimieren. Für die weiteren Experimente wurden die Plasmide pSUPER-siRNA-mu2 (beste siRNA) und pSUPER-siRNA-mu4 (Zwischenstufe) ausgewählt und weiter getestet.

3.1.3.2 Suppression der PD-1 Expression mit pSUPER-siRNA-mu2 und -mu4

Zur anhaltenden Suppression der PD-1 Expression wurden 2C T-Zellen gemäß des etablierten Protokolls mit pSUPER-siRNA-mu2 und pSUPER-siRNA-mu4 transduziert und mit Puromycin selektiert. Als Negativkontrolle diente die Transduktion mit pSUPER.retro.puro ohne Insert oder mit dem unspezifischen siRNA-Vektor pSUPER-shuffle, der die Sequenz der siRNA-mu2 in verdrehter Form enthält. Nach mehreren

Stimulationssrunden mit P815.B71 unter selektiven Bedingungen ließ sich durch FACS Analyse die konstante Reduktion der PD-1 Expression, die bereits beim Austesten der Sequenzen beobachtet werden konnte, in siRNA-mu2 (MFI 73) und zu einem geringeren Maß in siRNA-mu4 transduzierten T-Zellen (MFI 168) verglichen mit pSUPER.retro.puro transduzierten T-Zellen (MFI 170) feststellen (Abb. 18 B). Der Effekt der Supprimierung von PD-1 war an d2 der Restimulationen am deutlichsten zu sehen, da zu diesem Zeitpunkt einer Stimulation die PD-1 Expression auf T-Zellen am höchsten ist (Blank, Brown et al. 2004). pSUPER.retro.puro und pSUPER-shuffle haben keinen oder nur einen geringen Effekt auf die PD-1 Oberflächenexpression verglichen mit untransduzierten T-Zellen (Abb. 18 A).

Wir waren also in der Lage, die PD-1 Oberflächenexpression auf 2C T-Zellen stabil und reproduzierbar zu supprimieren. Für die weiteren Experimente wählten wir pSUPER-siRNA-mu2 als das Plasmid mit der stärksten PD-1 Suppression, pSUPER-siRNA-mu4 als eine Zwischenstufe mit geringerer PD-1 Suppression, sowie pSUPER-siRNA-shuffle als Negativkontrolle.

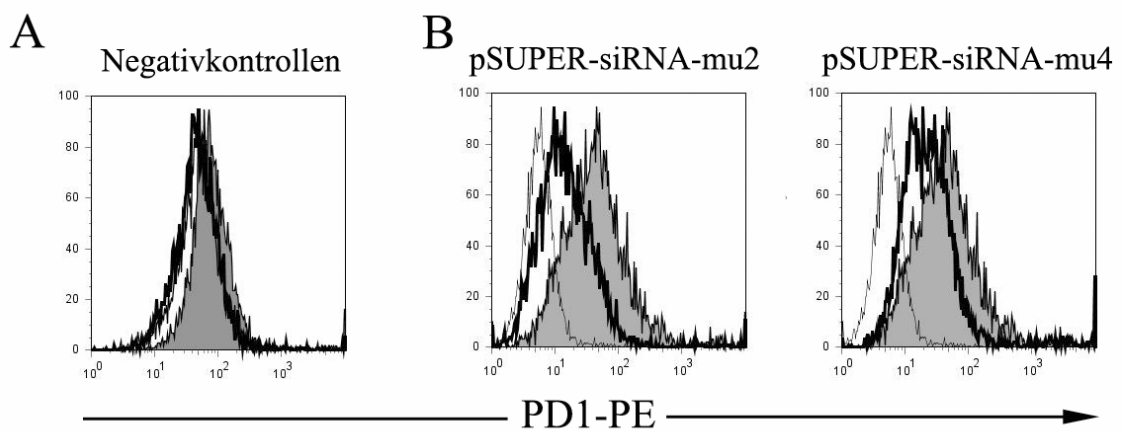
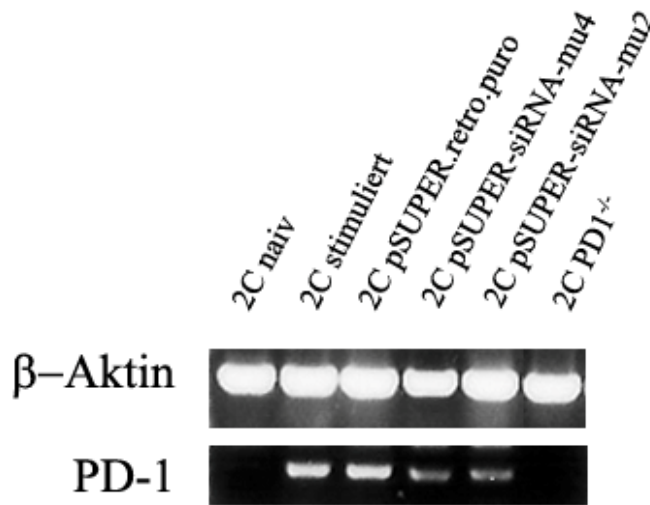


Abbildung 18: Stabiler knock-down der PD-1 Expression auf pSUPER-siRNA transduzierten 2C T-Zellen. A) 2C TCR tg T-Zellen wurden mit pSUPER.retro.puro oder pSUPER-siRNA-shuffle transduziert und über mehrere Runden unter Puromycin Selektion restimuliert. Gefüllt: untransduziert, fett: pSUPER.retro.puro, fein: pSUPER-siRNA-shuffle B) 2C T-Zellen wurden gemäß Protokoll mit pSUPER-siRNA-mu2, -mu4 und pSUPER.retro.puro transduziert und mindestens 3 Runden unter Puromycinselektion restimuliert. Grau gefüllt: pSUPER.retro.puro, fett: pSUPER-siRNA-mu2/4, fein: 2C PD1^{-/-}.

3.1.3.3 RT-PCR für PD-1 in transduzierten T-Zellen

Die Wirkungsweise der RNA Interferenz beruht zum Großteil auf dem Abbau der spezifischen mRNA. Um den Effekt der siRNA auf mRNA-Ebene zu überprüfen, wurde aus naiven, stimulierten und retroviral transduzierten 2C T-Zellen (pSUPER.retro.puro, pSUPER-siRNA-mu2 und pSUPER-siRNA-mu4) sowie aus stimulierten 2C PD1^{-/-} T-Zellen die Gesamt-RNA gewonnen. Diese wurde durch reverse Transkription in cDNA übersetzt, die daraufhin in einer PCR mit PD-1 spezifischen Primern analysiert wurde. Als Positiv- und Beladungskontrolle diente eine β -Aktin spezifische PCR, die unter denselben Bedingungen durchgeführt wurde. Die PCR wurde densitometrisch ausgewertet und die Signalstärke der Banden wurde gegen β -Aktin normalisiert, wobei das stärkste β -Aktinsignal gleich 100 gesetzt wurde. Es stellte sich heraus, dass siRNA transduzierte Zellen um den Faktor 4,4 (siRNA-mu2) bzw. 2,7 (siRNA-mu4) weniger PD-1 mRNA enthielten als Zellen, die nur mit pSUPER.retro.puro ohne Insert transduziert worden waren. Naive 2C T-Zellen, die kein PD-1 exprimieren und 2C PD1^{-/-} T-Zellen enthielten erwartungsgemäß keine mRNA für PD-1 (Abb. 19). Zu den 2C PD1^{-/-} T-Zellen bleibt anzumerken, dass diesen *knock-out* Zellen lediglich der Transmembranteil des PD-1 Rezeptors fehlt. Einer der verwendeten Primer bindet in der Sequenz des Transmembranteils. Die 2C PD1^{-/-} T-Zellen enthalten somit keine WT mRNA für PD-1. Bei einer Intrazellulärfärbung für PD-1 lässt sich aber dennoch die mutierte Form von PD-1 nachweisen (Daten nicht gezeigt).

A



B

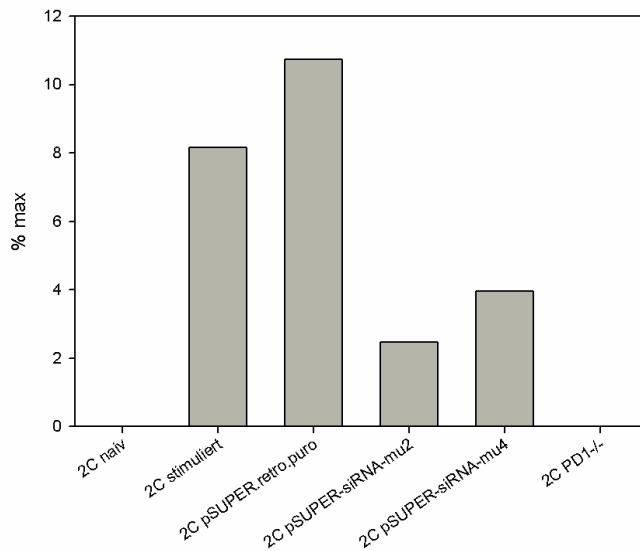


Abbildung 19: Analyse der PD-1 mRNA in pSUPER-siRNA transduzierten 2C T-Zellen mittels RT-PCR. (A) Aus der Gesamt-RNA von 10^6 naiven, stimulierten oder transduzierten 2C T-Zellen oder stimulierten 2C PD1^{-/-} T-Zellen wurde cDNA gewonnen und in einer PCR analysiert. (B) Die Signalstärke wurde gegen β -Aktin normalisiert. Zellen, die mit pSUPER-siRNA-mu2 oder -mu4 transduziert worden waren, besaßen deutlich weniger PD-1 mRNA als Zellen, die nicht oder mit pSUPER.retro.puro transduziert worden waren. Naive 2C T-Zellen und 2C PD1^{-/-} T-Zellen enthielten keine PD-1 mRNA.

3.1.3.4 Oberflächenmarker auf siRNA transduzierte 2C T-Zellen

Neben PD-1 sind verschiedene andere Moleküle der CD28-Familie beschrieben, die einen kostimulatorischen oder koinhibitorischen Einfluss auf die T-Zellaktivität haben können (Greenwald, Freeman et al. 2005). Um sicherzustellen, dass mögliche Effekte in Experimenten zur T-Zellaktivität auf die PD-1 Reduktion und nicht auf andere Veränderungen der transduzierten T-Zellen zurückzuführen waren, wurden untransduzierte, mit pSUPER.retro.puro und mit pSUPER-siRNA-mu2 transduzierte Zellen nach mehreren Runden Stimulation unter selektiven Bedingungen auf die

Expression verschiedener Oberflächenmarker untersucht. Die transduzierten Zellen unterschieden sich dabei, abgesehen von der PD-1 Expression, nicht von den untransduzierten Zellen (Abb. 20).

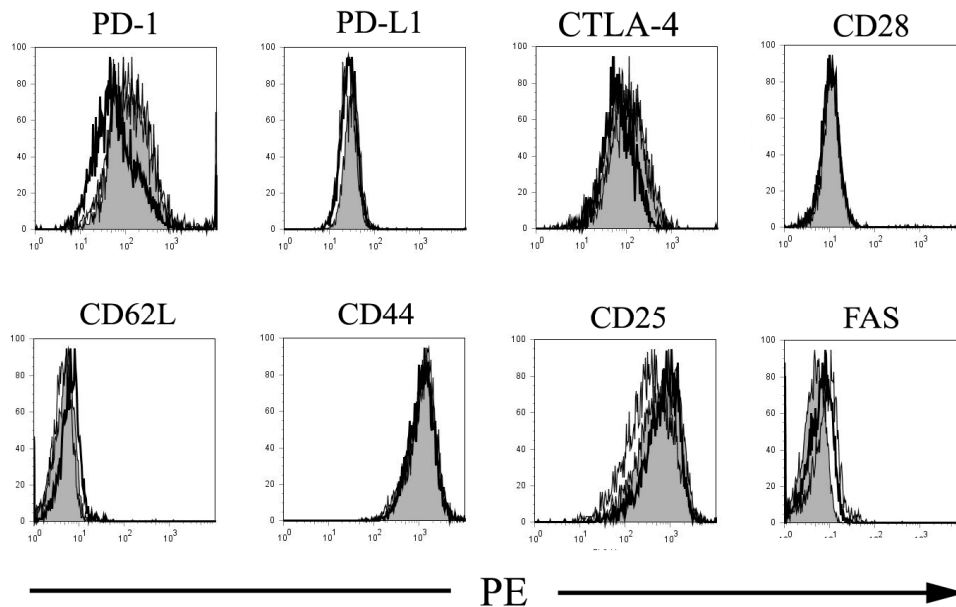


Abbildung 20: Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmarker. Untransduzierte, pSUPER.retro.puro und pSUPER-siRNA-mu2 transduzierte 2C T-Zellen wurden nach der 7. Stimulationsrunde durch FACS-Analyse auf verschiedene Oberflächenmarker hin untersucht. Gefüllt: untransduziert, fett: pSUPER-siRNA-mu2, fein: pSUPER.retro.puro

3.1.3.5 Funktionelle Tests mit PD-1 supprimierten 2C T-Zellen

Nachdem wir den PD-1 *knock-down* in pSUPER-siRNA transduzierten 2C T-Zellen sowohl durch FACS Analyse auf der Zelloberfläche als auch durch RT-PCR auf mRNA Ebene nachweisen konnten, stellte sich nun die Frage nach der funktionellen Bedeutung der stabilen PD-1 Reduktion. Wie wir bereits in den Zytokinassays mit transient siRNA transfizierten 2C T-Zellen sehen konnten, hat die PD-1 Reduktion einen positiven Einfluss auf die IL-2 und IFN γ Produktion der spezifischen T-Zellen. Um zu prüfen, ob der stabile *knock-down* von PD-1 auf der Oberfläche von 2C T-Zellen einen stärkeren Effekt auf die Funktionalität der Zellen hatte, wurden Zytokinassays und ein Proliferationsassay durchgeführt.

3.1.3.5.1 Zytokinassays mit stabil siRNA transduzierten 2C T-Zellen

Zur Analyse der Zytokinproduktion wurden 2C T-Zellen retroviral mit pSUPER-shuffle, -siRNA-mu2 und -siRNA-mu4 transduziert und über mehrere Runden unter selektiven Bedingungen restimuliert. 2C PD1^{-/-} T-Zellen wurden parallel dazu restimuliert. Am Tag fünf der letzten Restimulation wurden die T-Zellen mit B16.SIY E12 IFN γ kokultiviert und die Überstände nach 18h abgenommen und mittels ELISA auf die Bildung von IL-2 und IFN γ hin untersucht.

Da die Zellen bereits mehrere Runden restimuliert worden waren, konnte keine Produktion des für naive und *early effector* T-Zellen typischen Zytokins IL-2 mehr festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). 2C T-Zellen, die mit pSUPER-siRNA-mu2 (440 ± 42 ng/ml) transduziert worden waren, zeigten einen hoch signifikanten Anstieg der IFN γ Produktion um mehr als das 1,5 fache verglichen mit Zellen, die mit pSUPER-shuffle (165 ± 10 ng/ml) behandelt worden waren. 2C T-Zellen welche pSUPER-siRNA-mu4 (142 ± 6 ng/ml) oder -shuffle erhalten hatten, zeigten zudem eine höhere IFN γ Produktion als untransduzierte 2C T-Zellen (76 ± 18 ng/ml), mit einem Anstieg um nahezu das 1,2 fache für pSUPER-shuffle und einem Anstieg um über vier Fünftel für pSUPER-siRNA-mu4 (Abb. 21). Dies könnte durch so genannte *off target* Effekte von unspezifischer siRNA in den 2C T-Zellen erklärt werden, wohingegen die mehr als doppelt so hohe IFN γ Produktion der pSUPER-siRNA-mu2 transduzierten T-Zellen verglichen mit pSUPER-shuffle den spezifischen Effekt von siRNA-mu2 belegt.

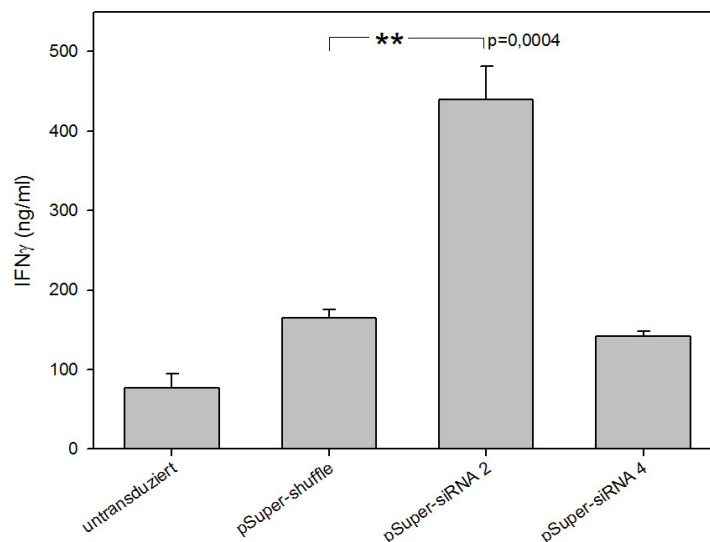


Abbildung 21: IFN γ Produktion stabil transduzierter 2C T-Zellen. 2C T-Zellen wurden mit pSUPER-shuffle, -siRNA-mu2 oder -siRNA-mu4 transduziert und über mehrere Runden selektiert. Danach wurden sie für 18h mit B16.SIY.E12 IFN γ kokultiviert (E:T = 1). Die Überstände wurden durch ELISA für IFN γ analysiert.

3.1.3.5.2 Proliferationsassay mit stabil siRNA transduzierten 2C T-Zellen

Nachdem ein deutlicher positiver Effekt des PD-1 *knock-downs* auf die Zytokinproduktion von T-Zellen nachgewiesen werden konnten, wurde als nächstes überprüft, ob auch die Proliferation der Zellen verbessert wird. Dazu wurde die Aufnahme von ^3H -Thymidin in die wachsenden Zellen untersucht. 2C T-Zellen, die mit pSUPER-shuffle, -siRNA-mu2 und -siRNA-mu4 transduziert und mit Puromycin selektioniert worden waren, wurden 24h mit B16.SIY.E12 $\text{IFN}\gamma$ stimuliert, die letzten 6h davon in der Gegenwart von ^3H -Thymidin. Nach einer Inkubation von 6h wurden die Zellen auf eine Filterplatte übertragen und gewaschen, und die aufgenommene Radioaktivität wurde im Szintillationsgerät gemessen. pSUPER-siRNA-mu2 transduzierte 2C T-Zellen integrierten die 2,6fache Menge Radioaktivität, die von pSUPER-shuffle transduzierten Zellen aufgenommen worden war, pSUPER-siRNA-mu4 transduzierte 2C T-Zellen integrierten die 1,5fache Menge. In beiden Fällen waren die Unterschiede hoch signifikant (Abb. 22).

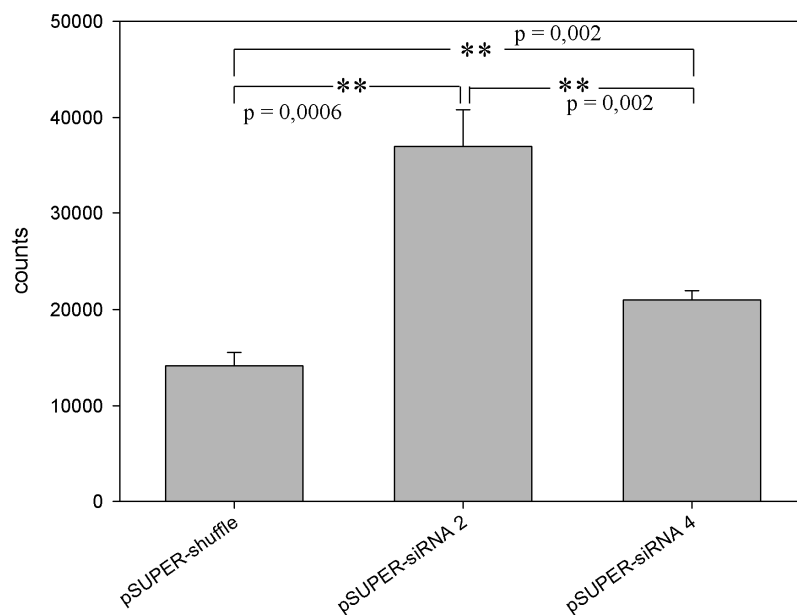


Abbildung 22: Proliferation stabil transduzierter 2C T-Zellen. 2C T-Zellen wurden mit pSUPER-shuffle, -siRNA-mu2 oder -siRNA-mu4 transduziert und 6h mit B16.SIY.E12 $\text{IFN}\gamma$ (E:T = 1) in der Gegenwart von ^3H -Thymidin kokultiviert. Im Anschluss wurde die aufgenommene Radioaktivität gemessen.

3.1.3.5.3 Zytokinassays in der Gegenwart von blockierendem anti-PD-L1 mAb

Die FACS Daten der pSUPER-siRNA-mu2 transduzierten 2C T-Zellen zeigen zwar eine reduzierte Expression von PD-1 auf der Zelloberfläche, es konnte jedoch kein kompletter Verlust der Expression erreicht werden (Abb. 18). Daraus ergab sich die Frage, ob der *knock-down* der PD-1 Expression ausreichend war, um jegliche Signaltransduktion durch den PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg zu unterbinden, oder ob eine Restaktivität übrig blieb. Um dies zu beantworten, wiederholten wir den IFN γ Zytokinassay mit pSUPER-siRNA-mu2 und -mu4 transduzierten 2C T-Zellen in der Gegenwart von blockierendem anti-PD-L1 mAb und Isotyp-IgG als Kontrolle. Auf diesem Weg wird der PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg zusätzlich auf der Seite des Liganden unterbrochen, wodurch, im Falle einer unvollständigen Blockade durch siRNA vermittelten PD-1 *knock-down*, ein weiterer Anstieg in der IFN γ Produktion zu beobachten sein sollte. Wie erwartet, zeigten siRNA-mu2 transduzierte 2C T-Zellen eine höhere IFN γ Produktion als siRNA-mu4 transduzierte 2C T-Zellen, wenn kein Antikörper oder nur das Kontroll-IgG zugegeben wurde. Wurde jedoch anti-PD-L1 hinzugefügt, kam es sowohl bei siRNA-mu2 als auch bei siRNA-mu4 transduzierten 2C T-Zellen zu einem Anstieg der IFN γ Produktion. Unter diesen Bedingungen erreichten siRNA-mu2 und siRNA-mu4 nahezu gleiche IFN γ Mengen (Abb. 23), wodurch deutlich wird, dass der PD-1 *knock-down* zwar die PD-1/PD-L1 Signaltransduktion hemmt, jedoch nicht vollständig unterdrückt.

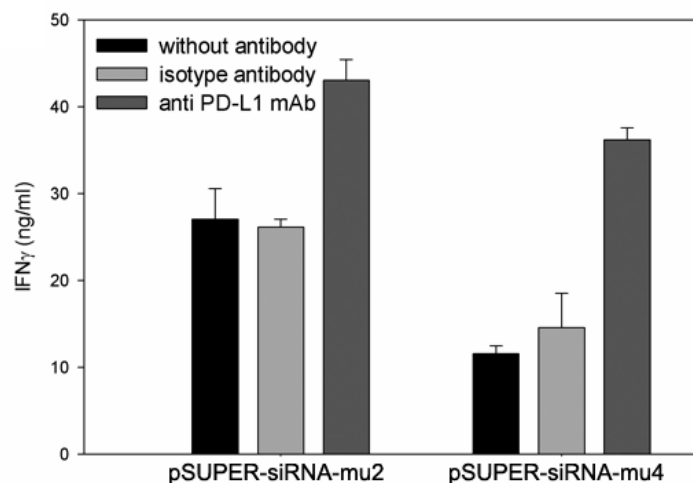


Abbildung 23: IFN γ Produktion stabil transduzierter 2C T-Zellen in der Gegenwart von blockierendem anti-PD-L1 mAb. pSUPER-siRNA-mu2 und -mu4 transduzierte 2C T-Zellen wurden in der Gegenwart von keinem Antikörper, anti-PD-L1 mAb oder Kontroll-IgG mit B16.SIY.E12 IFN γ kokultiviert (E:T = 1). Nach 16h wurde der Überstand durch ELISA auf IFN γ untersucht.

Nachdem ein weiterer Anstieg der IFN γ Produktion der siRNA transduzierten 2C T-Zellen bei der Zugabe von anti-PD-L1 mAb beobachtet wurde, stellte sich die Frage, ob die Kombination aus blockierendem Antikörper und siRNA ausreichend war, um die Zytokinmengen von 2C PD1^{-/-} T-Zellen zu erreichen. Um die Wirksamkeit des PD-1 *knock-downs* im Vergleich zum vollständigen *knock-out* des Rezeptors zu überprüfen, wurden pSUPER-siRNA-mu2 transduzierte 2C T-Zellen mit und ohne anti-PD-L1 und 2C PD1^{-/-} T-Zellen verglichen. 2C PD1^{-/-} T-Zellen, ohne jegliche PD-1 Expression auf der Zelloberfläche, besaßen eine deutlich höhere IFN γ Produktion als pSUPER-siRNA-mu2 transduzierte 2C T-Zellen in Kombination mit anti-PD-L1 mAb. Dies beweist, dass die Unterbrechung des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges mit anti-PD-L1 mAb nicht so effektiv ist, wie ein kompletter *knock-out* des Rezeptors auf der T-Zelle (Abb. 24).

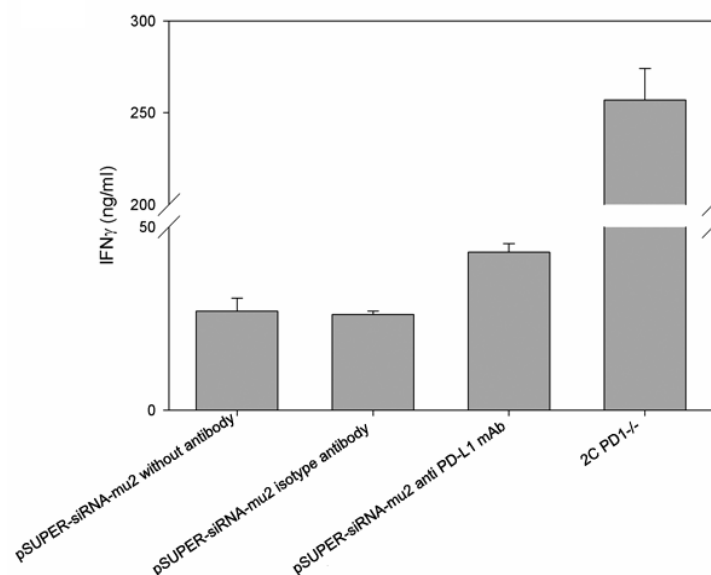


Abbildung 24: IFN γ Produktion stabil transduzierter 2C T-Zellen in der Gegenwart von anti-PD-L1 mAb verglichen mit 2C PD1^{-/-} T-Zellen. pSUPER-siRNA-mu2 transduzierte 2C T-Zellen wurden in der Gegenwart von keinem Antikörper, anti-PD-L1 mAb oder Kontroll-IgG mit B16.SIY.E12 IFN γ kokultiviert (E:T = 1). Parallel dazu wurden 2C PD1^{-/-} T-Zellen unter gleichen Bedingungen behandelt. Nach 16h wurde der Überstand durch ELISA auf IFN γ untersucht.

3.1.3.6 pSUPER-siRNA transduzierte 2C T-Zellen im Maus-Tumormodell

Nachdem der Effekt der Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression auf 2C T-Zellen *in vitro* untersucht worden war, sollten als nächstes überprüft werden, ob pSUPER-siRNA-mu2 transduzierte 2C T-Zellen auch *in vivo* einen Vorteil gegenüber untransduzierten oder mit unspezifischer siRNA transduzierten 2C T-Zellen hatten.

Dazu wurde das etablierte 2C/HTR.c Tumormodells, wie es unter 2.1.3 beschrieben ist, verwendet. In einem Vorexperiment wurde überprüft, ob naive 2C PD1^{-/-} T-Zellen auch in der Lage waren den HTR.c Tumor abzustößen, wenn die T-Zellen erst zwei Tage *nach* der Injektion der Tumorzellen injiziert wurden und nicht davor, wie es in früheren Experimenten gehandhabt wurde (Blank, Brown et al. 2004). Naive 2C PD1^{-/-} T-Zellen waren in der Lage, den HTR.c Tumor in P14RAG2^{-/-} Mäusen abzustößen, auch wenn sie erst nach dem Tumor injiziert wurden. Naive 2C T-Zellen konnten das Tumorstadium leicht verlangsamen verglichen mit der Negativkontrolle. Sie waren jedoch nicht in der Lage den Tumor abzustößen (Abb. 25). Dasselbe Experiment wurde noch mit der T-Zellinjektion an Tag 6 nach Tumordinjektion durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Auch in diesem Fall waren die 2C PD1^{-/-} T-Zellen in der Lage den Tumor abzustößen und die 2C T-Zellen nicht.

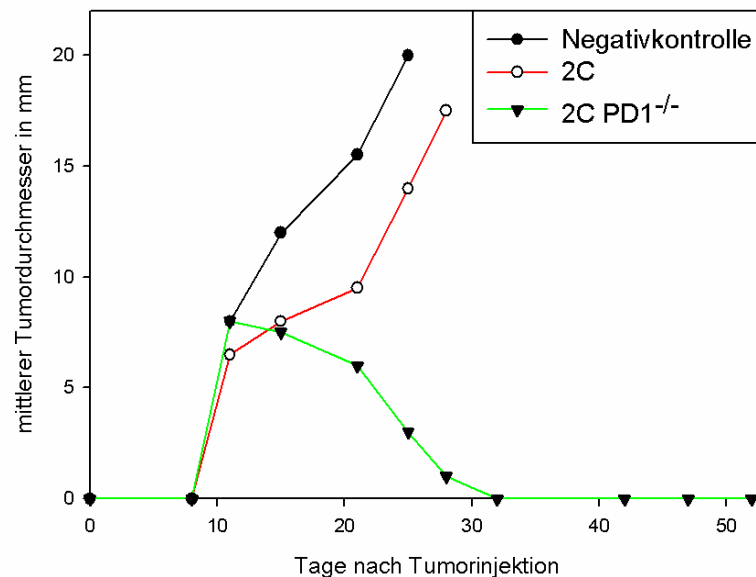


Abbildung 25: Abstoßung von HTR.c in P14 RAG2^{-/-} durch naive 2C PD1^{-/-} T-Zellen. 10⁶ HTR.c Zellen wurden subkutan in die Flanke von 3 P14 RAG2^{-/-} Mäusen gespritzt. An Tag 2 nach der Injektion erfolgte die Gabe von 10⁶ naiven aufgereinigten CD8⁺ 2C oder 2C PD1^{-/-} T-Zellen. Die Negativkontrolle erhielt keine T-Zellen.

Um transduzierte 2C T-Zellen im Tumorexperiment zu testen, wurden Zellen verwendet, die mit pSUPER.retro.puro, pSUPER-siRNA-mu2 und -mu4 transduziert und über sechs Restimulationen selektioniert worden waren. Parallel dazu wurden 2C T-Zellen stimuliert und 2C PD1^{-/-} T-Zellen, die nach der ersten Stimulation eingefroren und für die Restimulationen wieder aufgetaut worden waren. In der letzten Stimulation wuchsen die pSUPER-siRNA-mu4 und die 2C PD1^{-/-} nicht mehr und es konnte nur ein Zehntel der Zellen wieder gewonnen werden, die ursprünglich in die Restimulation eingesetzt worden waren.

Es wurden 5×10^5 2C T-Zellen in P14RAG2^{-/-} Mäuse, die drei Tage zuvor 10^6 HTR.c Zellen in die Flanke erhalten hatten, injiziert. Jeweils zwei Mäuse erhielten keine, untransduzierte, pSUPER-siRNA-mu4 transduzierte 2C T-Zellen oder 2C PD1^{-/-} T-Zellen, jeweils drei Mäuse erhielten pSUPER.retro.puro bzw. pSUPER-siRNA-mu2 transduzierte 2C T-Zellen. Zuerst schien es, als ob siRNA-mu2 transduzierten 2C T-Zellen das Tumorstadium geringfügig verlangsamen würden, letztendlich wuchsen jedoch alle Tumore aus (Abb. 26).

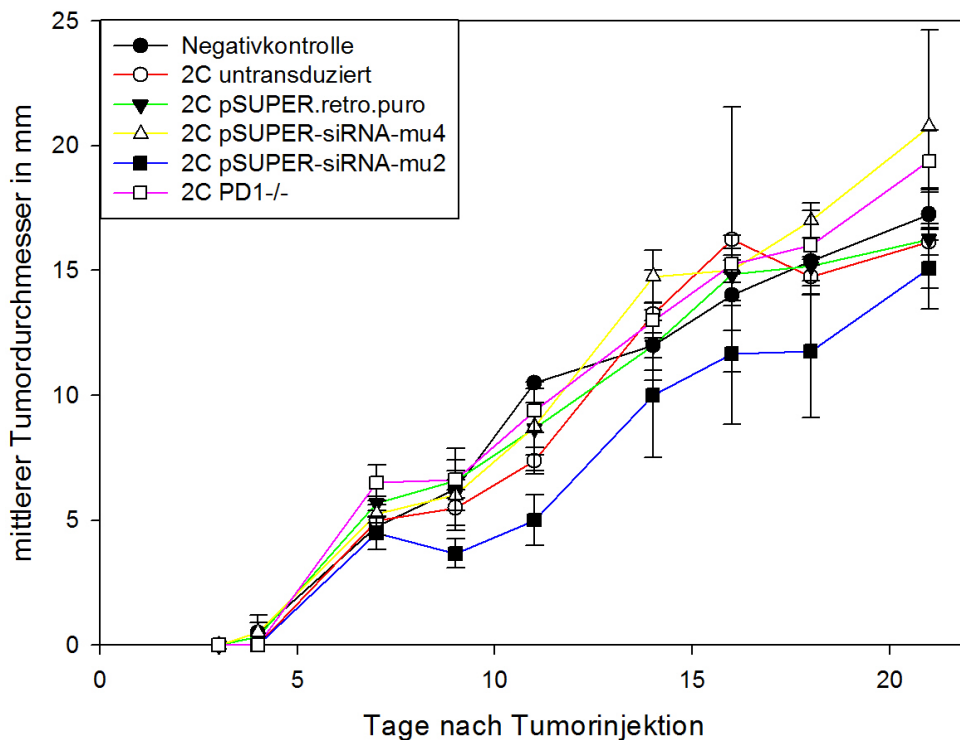


Abbildung 26: Tumorexperiment mit selektierten transduzierten 2C T-Zellen. 10^6 HTR.c Zellen wurden subkutan in die Flanke von P14RAG2^{-/-} Mäusen gespritzt. An Tag drei nach Tumordinjektion wurden jeweils 10^6 T-Zellen der unterschiedlichen Gruppen injiziert.

Durch die Selektion und die wiederholte Stimulation der injizierten T-Zellen waren diese nicht länger naiv sondern aktiviert. Um zu überprüfen, ob der aktivierte Zustand von T-Zellen selbst bei Abwesenheit von PD-1 eine Tumorkontrolle verhindern würde, verwendeten wir vier Mal stimulierte 2C und 2C PD1^{-/-} T-Zellen in verschiedenen Konzentrationen (10⁵, 10⁶ und 10⁷ 2C T-Zellen; 10⁵, 10⁶ und 4x10⁶ 2C PD1^{-/-} T-Zellen) in einem weiteren Experiment. Es zeigte sich, dass selbst bei Transfer von hundertmal höheren T-Zellzahlen 2C und 2C PD1^{-/-} T-Zellen das Tumorstadium unzureichend kontrolliert wurde. Die Tumore wuchsen alle aus und es fand keine Abstoßung statt. Es war also in keinem Fall möglich, mit mehrfach stimulierten 2C oder 2C PD1^{-/-} T-Zellen eine Tumorabstoßung zu erreichen (Abb. 27).

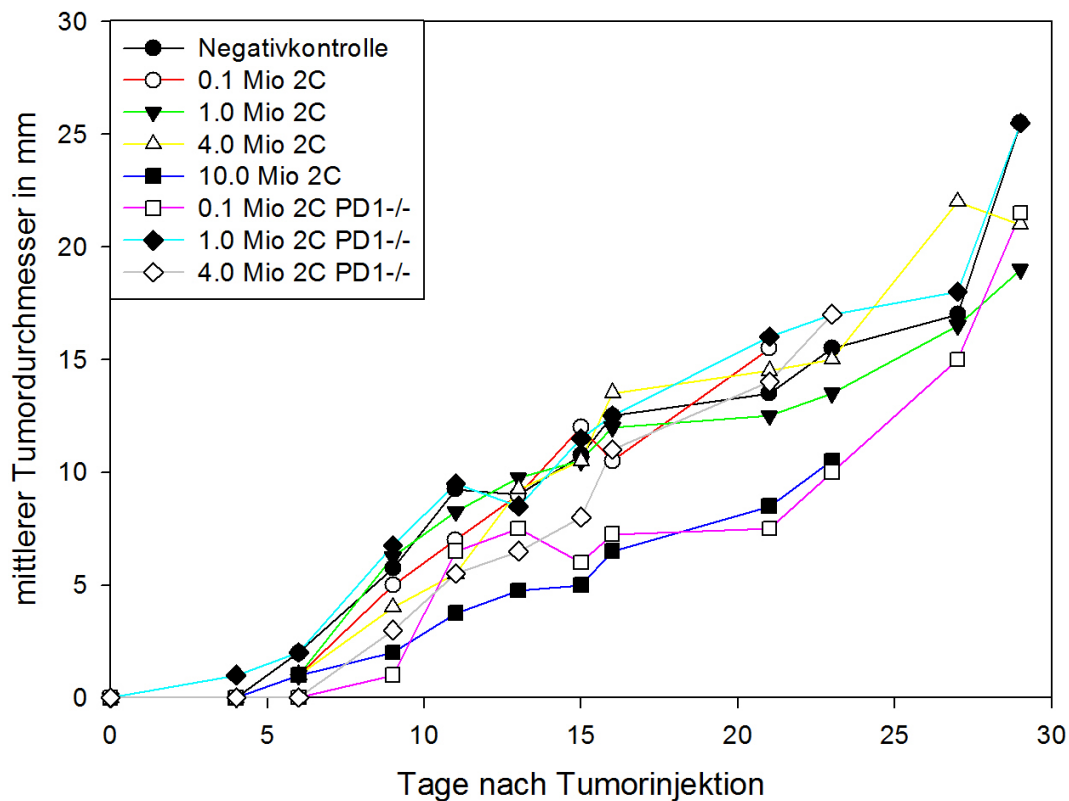


Abbildung 27: Tumorexperiment mit wiederholt restimulierten 2C T-Zellen. 10⁶ HTR.c Zellen wurden subkutan in die Flanke von P14 RAG2^{-/-} Mäusen injiziert. An Tag sechs nach Tumoringektion wurden jeweils die in der Legende angegebenen Mengen viermal restimulierter 2C und 2C PD1^{-/-} T-Zellen in die Tiere injiziert.

Die fehlende Tumorkontrolle durch die pSUPER-siRNA-mu2 transduzierten 2C T-Zellen beruhte daher nicht auf einer unzureichenden PD-1 Suppression sondern vielmehr auf einem *exhausted* Phänotyp nach repetitiver *in vitro* Stimulation. Über mehrere Stimulationsrunden mit Antibiotikum selektierte siRNA transduzierte 2C T-Zellen waren daher für einen *in vivo* Test der T-Zellaktivität nicht geeignet.

3.2 Suppression von PD-1 im humanen System

Es konnte gezeigt werden, dass in murinen tumorspezifischen T-Zellen die stabile Suppression von PD-1 mittels RNAi vermitteltem *knock-down* zu erhöhter Zytokinproduktion und Proliferation führt. Um die Methode für eine Anwendung in der Klinik interessant zu machen, galt es nun, die Ergebnisse aus dem murinen System auf humane T-Zellen zu übertragen.

Zunächst mussten funktionelle siRNA-Sequenzen gegen humanes PD-1 gefunden werden. Danach musste ein System aus tumorspezifischen T-Zellen und zugehörigem Tumor etabliert werden, das dem aus 2C TCR tg T-Zelle und B16.SIY entsprach. Anschließend sollte in diesem System PD-1 durch retrovirale Transduktion der T-Zellen mit siRNA unterdrückt und die so veränderten T-Zellen in verschiedenen funktionellen Assays charakterisiert werden.

3.2.1 SiRNA gegen humanes PD-1 und pSUPER-siRNA-hu-GFP

3.2.1.1 Transiente Transfektion der humanen B-Zelllinie CIRA2

Wie im Fall des murinen PD-1 Rezeptors, wird auch hPD-1 während der Aktivierung der T-Zellen exprimiert und wird danach wieder herunterreguliert. Um die Effektivität verschiedener siRNA-Sequenzen zu testen wurden CIRA2 Zellen, die PD-1 konstitutiv exprimieren, mittels Amaxa Elektroporation mit drei vorgefertigten doppelsträngigen siRNA-Molekülen der Firma Ambion transfiziert. Als Negativkontrolle wurde siRNA-negativ-FAM eingesetzt. SiRNA-hu1 und -hu3 erwiesen sich dabei als gleich effektiv und zeigten 22h nach Transfektion eine Reduktion der MFI auf 55 bzw. 54 verglichen mit 163 für siRNA-negativ-FAM transfizierte Zellen. siRNA-hu2 hatte keinen Effekt (Abb. 28).

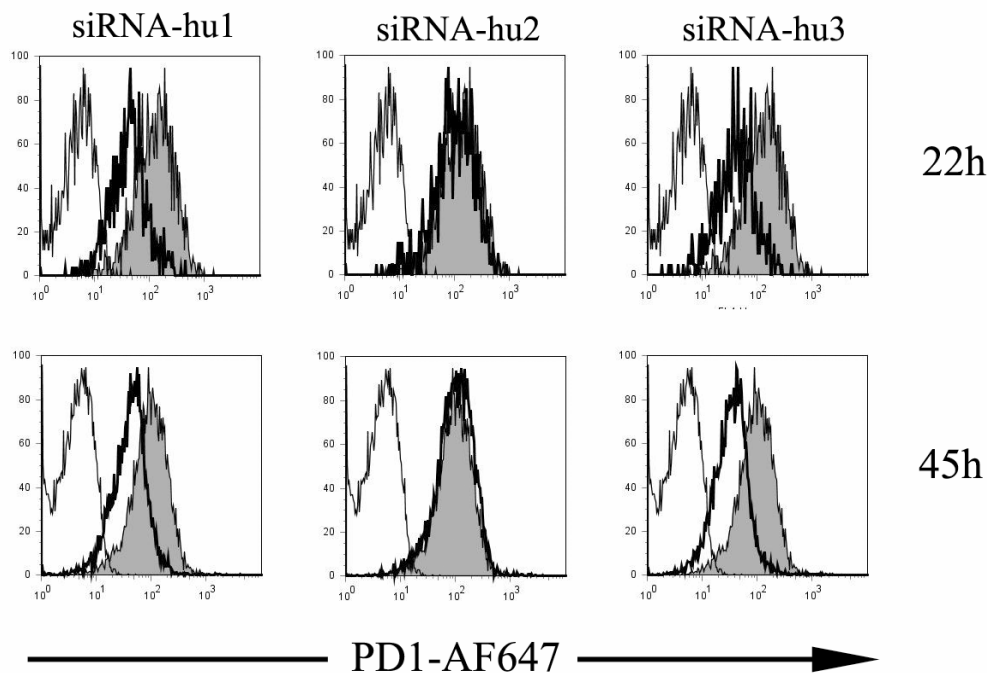


Abbildung 28: Transiente Transfektion von CIRA2 mit siRNA. CIRA2 Zellen wurden mit siRNA-hu1, -hu2, -hu3 und -negativ-FAM transfiziert und 22h und 45h nach Transfektion mittels FACS Analyse auf PD-1 Expression untersucht. Gefüllt: siRNA-negativ-FAM, fett: siRNA-hu1-3, fein: siRNA-negativ-FAM isotyp-AF647

3.2.1.2 Retrovirale siRNA-Vektoren gegen hPD-1 mit GFP-Expression

Um die Selektion über Antibiotika zu umgehen, wurden die siRNA-Sequenzen in das Plasmid pSUPER.retro.neo.GFP eingefügt. Es handelt sich dabei um das pSUPER-Plasmid mit einer Neomycin-Kassette anstelle der Puromycin-Kassette, sowie der genetischen Information für GFP. Zellen, die mit siRNA-Plasmiden, die auf pSUPER.retro.neo.GFP basieren, transduziert werden, exprimieren neben der siRNA auch das GFP-Protein und können so durch FACS-Sort aufgereinigt werden.

Die Sequenzen siRNA-hu1, -hu2 und -hu3 sowie drei weitere Sequenzen (-hu4, 5, 6), die aus der siRNA Bibliothek des NKI (AG Beijersbergen) zur Verfügung gestellt wurden, und die negative Sequenz shuffle wurden in pSUPER.retro.neo.GFP eingefügt. SiRNA-hu4 – 6 erwiesen sich später als nicht funktionell.

3.2.2 MART spezifischer T-Zellrezeptor und Melanomzelllinien

Der Weg zu tumorspezifischen T-Zellen über transgene Organismen wie die 2C TCR tg Maus, die nur einen bestimmten T-Zellrezeptor exprimieren, steht im humanen System nicht offen. Dennoch gibt es Wege, tumorspezifische T-Zellen zu gewinnen. In Ansätzen der adoptiven T-Zelltherapie werden z.B. TILs aus dem Tumor des Patienten gewonnen, und die tumorspezifische Population dieser Zellen wird *ex vivo* expandiert, um danach wieder in den Patienten transferiert zu werden. Dieser Prozess ist jedoch langwierig und aufwendig und die so gewonnen T-Zellen besitzen häufig nur eine niedrige Avidität (Rosenberg, Restifo et al. 2008). Ein schnellerer Weg um T-Zellen zu gewinnen, die für ein bestimmtes, bekanntes Tumorantigen spezifisch sind, ist die retrovirale Transduktion eines T-Zellrezeptors in periphere Blutlymphozyten. Heute sind viele tumorassoziierte Antigene und die DNA-Sequenz von T-Zellrezeptoren, die diese erkennen, bekannt.

3.2.2.1 Der 1D3 TCR

Für die Experimente wurde der Rezeptor 1D3, der für das MART-Peptid im MHC I-Komplex des HLA-A2 Haplotyps spezifisch ist (Dietrich, Le Gal et al. 2003; Jorritsma, Gomez-Eerland et al. 2007) von der AG Schumacher zur Verfügung gestellt. Der hier verwendete Rezeptor ist ein hybrider Rezeptor, bei dem die humanen konstanten Regionen durch murine konstante Regionen ersetzt wurden. Durch den zusätzlichen Austausch jeweils einer Aminosäure gegen einen Cysteinrest in der alpha- und der beta-Kette des Rezeptors wird eine zusätzliche Disulfidbrücke geschaffen. Diese Modifikationen dienen dazu, die Oberflächenexpression des exogenen T-Zellrezeptors zu erhöhen und die Ausbildung von Heterodimeren mit endogenen T-Zellrezeptorketten zu vermindern (Kuball, Dossett et al. 2007; Stauss, Cesco-Gaspere et al. 2007).

3.2.2.2 Melanomzelllinien

Als Zielzellen für 1D3 TCR transduzierte humane T-Zellen dienen Melanom Zelllinien, die das MART-Peptid exprimieren und HLA-A2 positiv sind. Es lagen verschiedene Zelllinien vor, die diesen Kriterien entsprachen. Um die Bedeutung der PD-1/PD-L1 Interaktion beim Angriff zytotoxischer T-Zellen zu testen, sollten die Zellen zudem PD-L1 bei Induktion mit IFN γ hoch regulieren. Wir testeten die MART⁺ HLA-A2⁺

Zelllinien Mel AKR, Mel ICL und Mel MTO mittels FACS-Analyse auf PD-L1 Expression vor und nach Zugabe von $\text{IFN}\gamma$. Alle drei Zelllinien regulieren PD-L1 bei $\text{IFN}\gamma$ Induktion hoch, wobei Mel MTO die höchste Expression zeigt. Vor der Induktion sind Mel AKR und Mel ICL nahezu und Mel MTO vollständig PD-L1 negativ (Abb. 29). Aufgrund dieser Ergebnisse wählten wir Mel MTO als Tumorzelllinie für unsere weiteren Experimente. Zudem untersuchten wir die Expression des MHC I-Komplexes auf den Zellen mit und ohne $\text{IFN}\gamma$ Induktion. Im Gegensatz zu der murinen Tumorzelllinie B16.SIY, die einen Defekt in der MHC Prozessierung aufweist, der durch exogenes $\text{IFN}\gamma$ aufgehoben werden kann, waren die humanen Melanomzelllinien auch ohne $\text{IFN}\gamma$ Induktion HLA-A2 positiv. Inkubation in Gegenwart von $\text{IFN}\gamma$ führt nicht signifikanten Veränderung der Expression (Abb. 23).

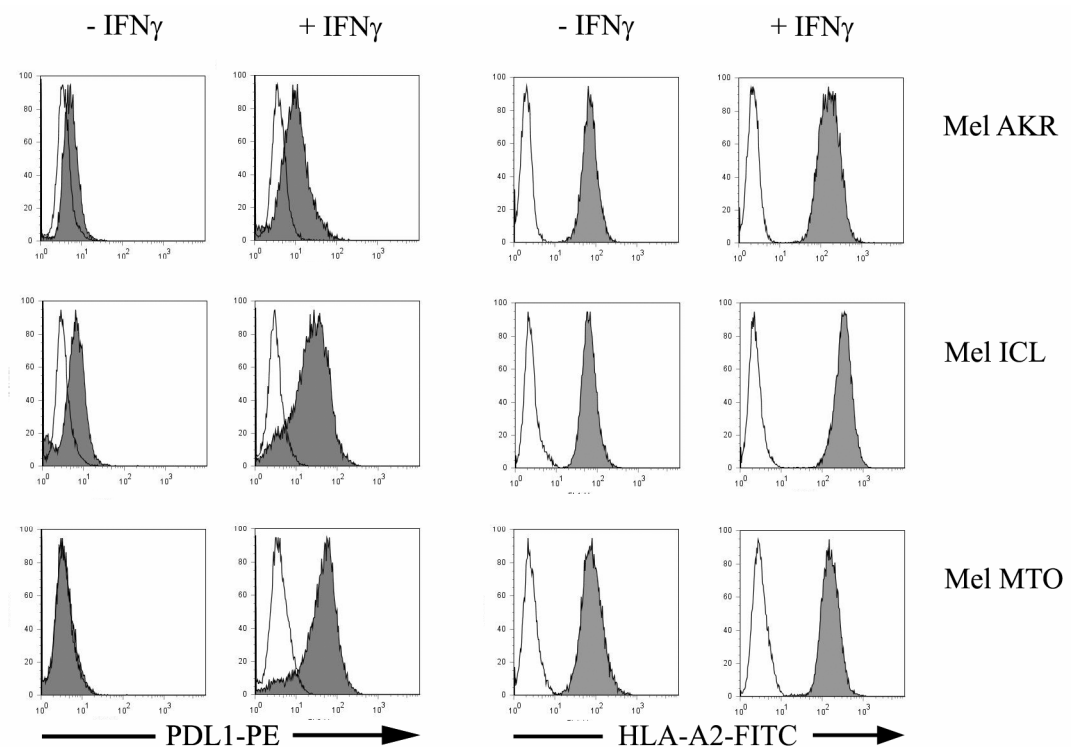


Abbildung 29: PD-L1 und HLA-A2 auf Melanom Zelllinien vor und nach $\text{IFN}\gamma$ Induktion. Die Zelllinien Mel AKR, Mel ICL und Mel MTO wurden 48h mit oder ohne 200ng/ml $\text{IFN}\gamma$ inkubiert. Anschließend wurde die PD-L1 und die HLA-A2 Expression mittels FACS-Analyse bestimmt. Leer: Isotyp-PE/ungefärbt, gefüllt: PDL1-PE/HLA-A2-FITC.

3.2.3 Retrovirale Transduktion humaner T-Zellen

Das Protokoll zur retroviralen Transduktion humaner peripherer Blutlymphozyten (hPBL) ist ein etabliertes Protokoll am NKI in Amsterdam und wurde ohne Veränderungen übernommen (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.4.2).

3.2.3.1 Doppeltransduktion mit 1D3 TCR und pSUPER-siRNA-hu1-GFP

Um humane T-Zellen zu erhalten, die zugleich einen spezifischen T-Zellrezeptor und siRNA exprimieren, müssen jeweils ein Plasmid mit dem TCR und ein Plasmid mit einer siRNA, gleichzeitig in die Zellen transduziert werden. Dazu wurden die beiden viralen Überstände (TCR und siRNA) für die Kotransduktion im Verhältnis 1:1 gemischt und in die retrovirale Transduktion eingesetzt. Die so transduzierten humanen T-Zellen wurden an Tag 4 nach Transduktion mittels Durchflusszytometrie auf die Expression des 1D3 TCR (Tetramerfärbung) und der GFP-Expression der pSUPER-siRNA-GFP-Vektoren untersucht.

Auf diesem Weg konnten in der Regel bis zu 25% der CD4⁺ und bis zu 20% der CD8⁺ T-Zellen eines hPBL-Ansatzes doppelt mit 1D3 TCR und siRNA transduziert werden (Abb. 30).

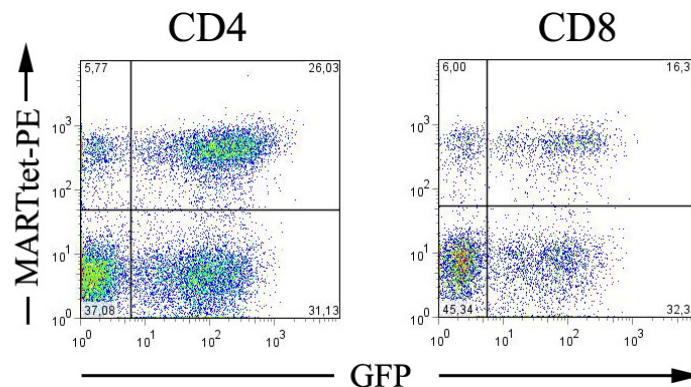


Abbildung 30: Transduktionseffizienz für Doppeltransfektion. PBLs wurden mit viralem Überstand für pMP71-1D3hmcys-TCR und pSUPER-siRNA-hu-GFP im Verhältnis 1:1 transduziert. Vier Tage nach der Transduktion wurde die Transduktionseffizienz durch FACS-Analyse überprüft. Die Zellen wurden dabei auf CD4 oder CD8 Expression vorgegattet.

3.2.3.2 PD-1 Expression bei wiederholter Stimulation humaner T-Zellen

Auf humanen T-Zellen wird PD-1 nach Aktivierung hoch reguliert. Nach einigen Tagen verringert sich die PD-1 Expression jedoch wieder (Blank, Kuball et al. 2006). Um einen Effekt der PD-1 Suppression durch siRNA feststellen zu können, mussten wir zunächst eine Methode der Restimulation finden, bei der PD-1 erneut hoch exprimiert wird.

Zu Beginn einer Transduktion werden naive humane PBLs durch eine hohe Dosis PHA ($2\mu\text{g/ml}$) in Gegenwart von IL-2 (20U/ml) aktiviert. Bei dieser unspezifischen Stimulation wird PD-1 sowohl auf CD8^+ als auch auf CD4^+ T-Zellen hoch reguliert, mit einem Maximum an Tag 2. Danach geht die Expression wieder zurück.

Zur Restimulation und Expansion der transduzierten T-Zellen wurde zunächst das etablierte Protokoll des NKI verwendet, wobei die Zellen mit einer deutlich niedrigeren Dosis PHA (100ng/ml) und IL-2 (20U/ml) restimuliert werden. Unter diesen Bedingungen kam es zu einer wesentlich geringeren Expression von PD-1 auf CD4^+ T-Zellen und so gut wie keiner PD-1 Expression auf CD8^+ T-Zellen (Abb. 31).

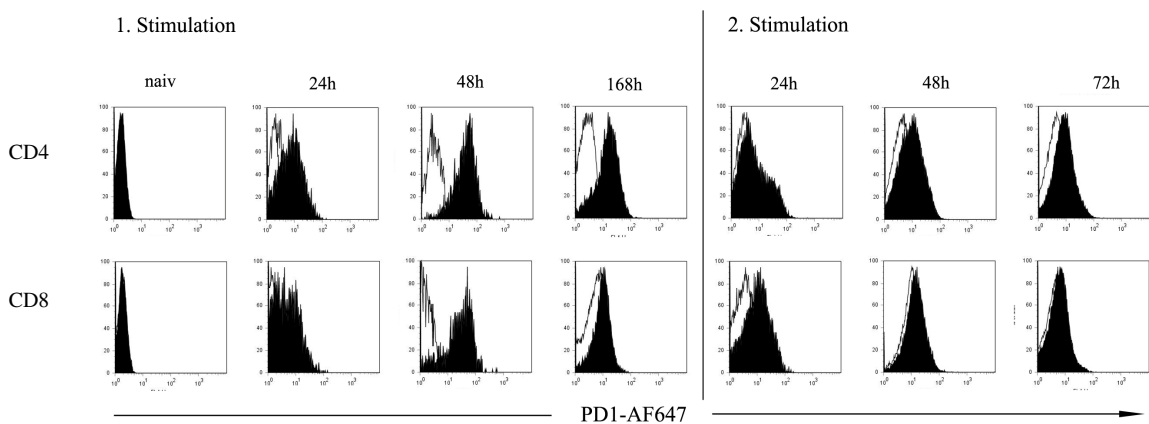


Abbildung 31: Stimulation und Restimulation von hPBLs nach NKI Standard Protokoll. Humane PBLs werden aus dem Blut von Blutspendern gewonnen. Die erste Stimulation erfolgt mit $2\mu\text{g/ml}$ PHA und 20U/ml IL-2 in Gegenwart von *feeder mix*. An Tag 7 der 1. Stimulation (168h) werden die Zellen mit 100ng/ml PHA und 20U/ml IL-2 in Gegenwart von frischem *feeder mix* restimuliert. Leer: Isotyp-AF647, gefüllt: anti-PD1-AF647.

Um eine erneute hohe PD-1 Expression der Zellen zu erreichen wurde für die retroviral mit dem 1D3 TCR transduzierten T-Zellen zunächst ein Ansatz mit spezifischer Stimulation der Zellen verfolgt. Dazu wurde der *feeder mix* aus frisch isolierten humanen PBLs und der humanen B-Zelllinie JY (HLA-A2) mit dem MART-Peptid inkubiert, das so in die MHC I Komplexe der Zellen integriert wurde. Des Weiteren

exprimiert JY die beiden Liganden B7.1 und B7.2 (Palmer and van Seventer 1997), die über Bindung an den Rezeptor CD28 ein kostimulatorisches Signal an T-Zellen vermitteln (Greenwald, Freeman et al. 2005). Die 1D3 TCR exprimierenden T-Zellen wurden dadurch mit ihrem spezifischen Stimulus und zugleich einem kostimulatorischen zweiten Signal versehen, wodurch ein möglicher *activation induced death* der Zellen reduziert werden sollte. Die so stimulierten T-Zellen wurden mit T-Zellen, die mit 100ng/ml PHA und 20U/ml IL-2 restimuliert worden waren, verglichen. Es stellte sich heraus, dass 1D3 TCR tg CD4⁺ T-Zellen bei spezifischer Stimulation eine deutlich höhere PD-1 Expression aufwiesen als bei Stimulation mit 100ng/ml PHA. 1D3 TCR tg CD8⁺ T-Zellen regulierten bei Restimulation mit 100ng/ml PHA PD-1 nicht wieder hoch, auch der spezifische Ansatz führte nur zu einem geringen Anstieg der PD-1 Expression (Abb. 32).

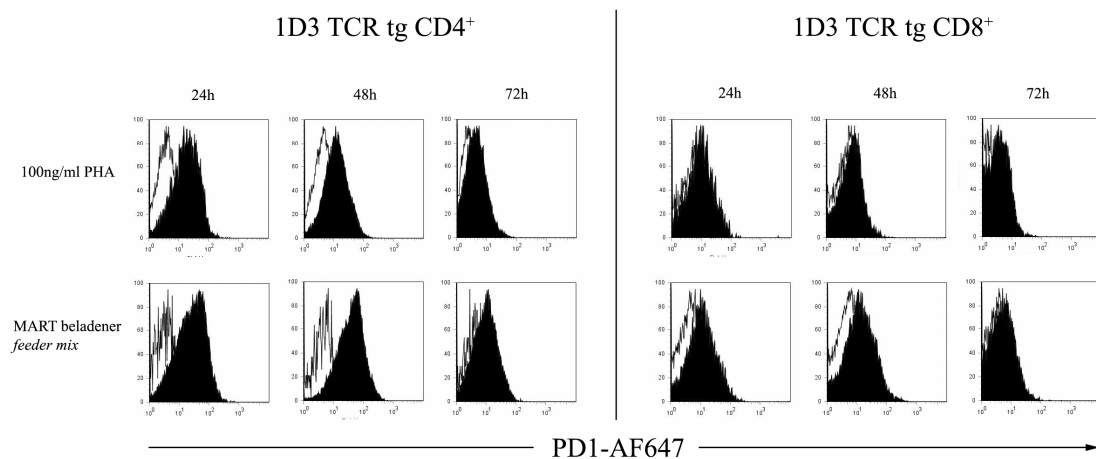


Abbildung 32: Restimulation 1D3 TCR tg PBLs nach dem NKI Standard Protokoll verglichen mit MART-Peptid beladenem *feeder mix*. Die Zellen wurden zum einen mit 100ng/ml PHA und 20 U/ml IL-2, zum anderen mit *feeder mix*, der zuvor für 1h mit dem MART-Peptid beladen worden war, restimuliert. Leer: Isotpy-AF647, gefüllt: PD1-AF647.

In einem zweiten Ansatz wurden verschiedene Konzentrationen von PHA (2 μ g/ml; 200ng/ml und 20ng/ml) und IL-2 (200U/ml, 20U/ml, 0U/ml) in allen möglichen Kombinationen ausgetestet. Es stellte sich heraus, dass Restimulation mit hohen Konzentrationen von PHA zu erhöhter PD-1 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen führt. Die Zugabe von IL-2 hatte keinen weiteren Effekt auf die PD-1 Expression der Zellen (Abb. 33).

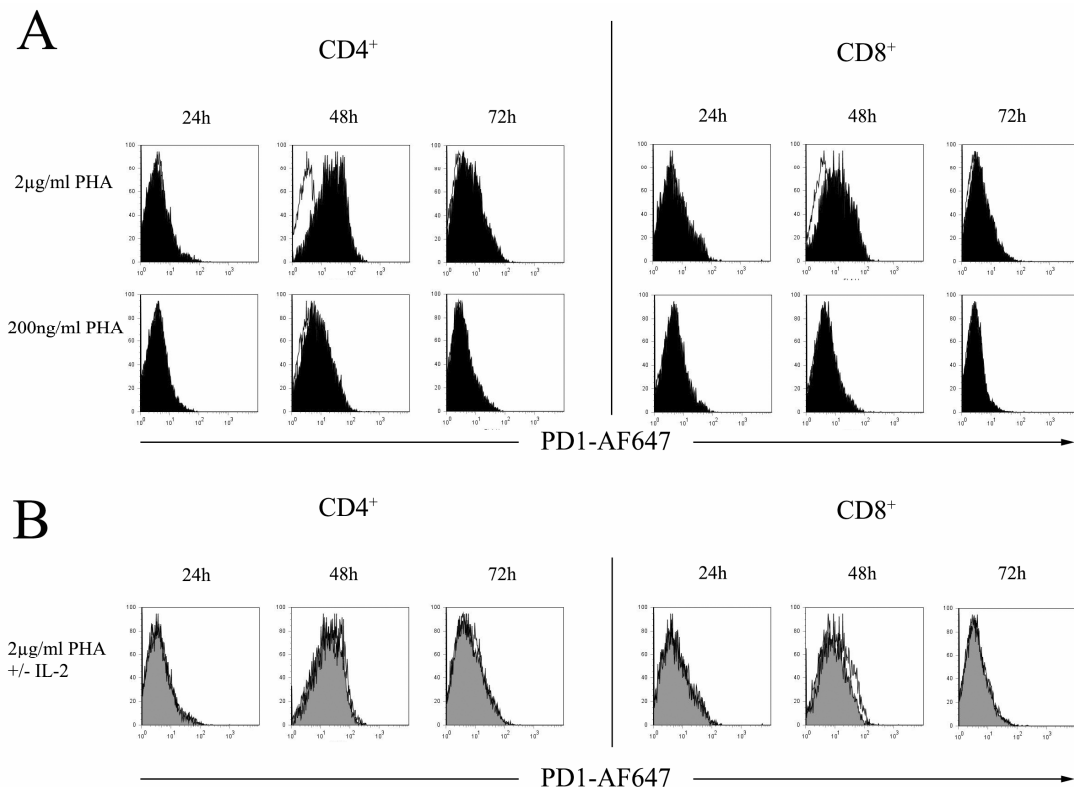


Abbildung 33: Restimulation humaner PBLs mit hoher oder niedriger PHA-Konzentration. A) Untransduzierte humane PBLs wurden mit 2 μ g/ml bzw. 200ng/ml PHA ohne IL-2 mit frischem *feeder mix* restimuliert. Leer: Isotyp-AF647, gefüllt: anti-PD1-AF647. B) Untransduzierte humane PBLs wurden mit 2 μ g/ml PHA und 0U/ml oder 200U/ml IL-2 mit frischem *feeder mix* restimuliert. Leer: 0U/ml IL-2, gefüllt: 200U/ml IL-2.

Aus diesen Erkenntnissen heraus legten wir folgendes Protokoll zur Stimulation und Restimulation der humanen T-Zellen fest. Die humanen PBLs werden durch 2 μ g/ml PHA mit 20U/ml IL-2 für die retrovirale Transduktion aktiviert. Anschließend werden die Zellen mit 100ng/ml PHA mit 20U/ml IL-2 weiter expandiert. Sollen die Zellen in funktionelle Assays eingesetzt werden, so werden sie zuvor durch eine hohe Dosis PHA (2 μ g/ml) ohne IL-2 für zwei Tage aktiviert.

3.2.3.3 Suppression der PD-1 Expression mittels pSUPER-siRNA in humanen T-Zellen

Zur Suppression der PD-1 Expression auf humanen T-Zellen mittels retroviraler Transduktion wurde das Plasmid pSUPER-siRNA-hu1-GFP und als Negativkontrolle pSUPER-shuffle-GFP verwendet. Die Zellen wurden gemäß Protokoll mit dem pMP71 1D3 hmcys TCR und dem pSUPER-GFP Plasmid kotransduziert und an Tag 4 nach Transduktion (entspricht Tag 6 nach Aktivierung) mittels Tetramerfärbung und Bestimmung der GFP-Expression auf die Transduktionseffizienz hin untersucht (vgl. Abb. 24). Am nächsten Tag wurden die T-Zellen für die FACS-Analyse mit 2µg/ml PHA restimuliert und an Tag 2 auf ihre PD-1 Expression hin untersucht. Für die 1D3 TCR tg CD4⁺ T-Zellen konnte durch retrovirale Transduktion mit pSUPER-siRNAhu1-GFP für die PD-1 Expression eine Reduktion der MFI auf 7, verglichen mit der MFI von 22 bei Transduktion mit pSUPER-shuffle-GFP, erreicht werden. Bei den 1D3 TCR tg CD8⁺ T-Zellen verringerte sich die MFI von 18 (shuffle) auf 11 (siRNA-hu1). Die Isotyp-Kontrollen ergaben eine MFI von 2 für CD4⁺, bzw. 5 für CD8⁺ 1D3 TCR tg pSUPER-siRNA-shuffle transduzierte T-Zellen. Es war also möglich, die PD-1 Expression auf aktivierten humanen T-Zellen zu unterdrücken (Abb. 34).

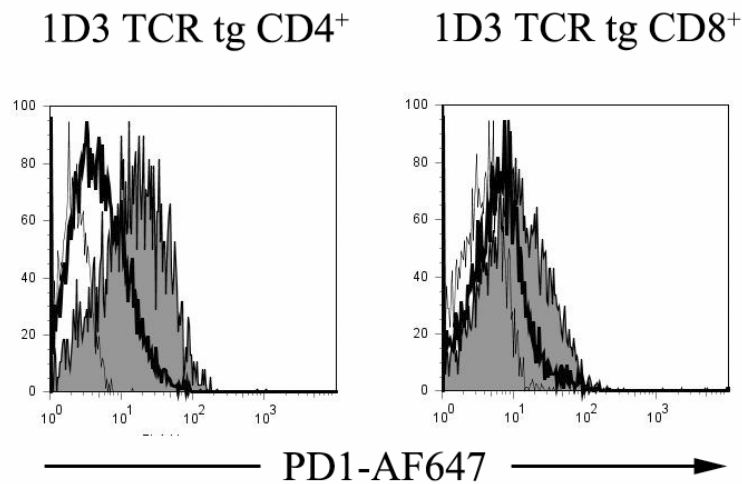


Abbildung 34: Suppression der PD-1 Expression auf humanen T-Zellen mittels retroviraler Transduktion. Humane PBLs wurden gemäß Protokoll mit pMP71 1D3 TCR hmcys und pSUPER-shuffle-GFP oder pSUPER-siRNA-hu1-GFP kotransduziert. Anschließend wurden sie für 2 Tage mit 2µg/ml PHA restimuliert und anschließend durch FACS Analyse auf ihre PD-1 Expression hin untersucht. Die Zellen wurden auf den 1D3 TCR, GFP und entweder CD4 oder CD8 vorgegattet. Gefüllt: pSUPER-shuffle-GFP, fett: pSUPER-siRNA-hu1-GFP, fein: pSUPER-shuffle-GFP Isotype-AF647

3.2.4 Funktionelle Assays mit siRNA transduzierten T-Zellen

Es stellte sich nun die Frage, ob die Reduktion der PD-1 Expression auf spezifischen humanen T-Zellen einen Einfluss auf deren Funktionalität hatte. Um dies zu prüfen wurde die Zytokinproduktion und die Zytotoxizität 1D3 TCR tg CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die mit pSUPER-shuffle-GFP oder pSUPER-siRNA-hu1-GFP transduziert worden waren, bei Koinkubation mit Mel MTO und Mel MTO IFN γ untersucht. Wie im murinen System wurde dabei zur Kontrolle zusätzlich noch ein blockierender anti-PD-L1 mAb eingesetzt, der Signaltransduktion über den PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg auf der Seite des Liganden unterdrückt (Blank, Kuball et al. 2006).

3.2.4.1 Zytokinproduktion: Intrazelluläres IFN γ mit und ohne anti-PD-L1

Zunächst sollte die IFN γ Produktion der siRNA transduzierten T-Zellen untersucht werden. Dazu wurden 1D3 TCR tg siRNA transduzierte T-Zellen, mit Golgi PlugTM behandelt und für vier Stunden mit Mel MTO (keine PD-L1 Expression) und Mel MTO IFN γ (starke PD-L1 Expression) kokultiviert. Durch die Zugabe von Golgi PlugTM wird verhindert, dass Vesikel des Golgi Apparates ihren Inhalt nach außen abgeben. IFN γ , das während der vier Stunden Inkubation gebildet wird, verbleibt so in den Zellen und kann im Anschluss durch Intrazellulärfärbung und FACS Analyse nachgewiesen werden.

3.2.4.1.1 Intrazelluläres IFN γ mit voraktivierten 1D3 TCR tg pSUPER-siRNA-GFP transduzierten T-Zellen

1D3 TCR tg, 1D3 TCR tg pSUPER-shuffle-GFP und 1D3 TCR tg pSUPER-siRNA-hu1-GFP transduzierte humane PBLs wurden nach der ersten Restimulation durch FACS Sort angereichert und nach CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufgetrennt. Nach der nächsten Stimulation zeigte sich, dass die 1D3 CD4⁺ Kulturen zu verschiedenen Anteilen 1D3 CD8⁺ Zellen enthielten (1D3: 61% CD8⁺, 26% CD4⁺, 1D3 shuffle: 51% CD8⁺, 27% CD4⁺; 1D3 siRNA-hu1: 7% CD8⁺, 81% CD4⁺). Die 1D3 CD8⁺ Kulturen hingegen enthielten kaum 1D3 CD4⁺ Zellen (1D3: 90% CD8⁺, 1% CD4⁺; 1D3 shuffle: 81% CD8⁺, 2% CD4⁺; 1D3 siRNA-hu1: 88% CD8⁺, 1% CD4⁺). Die restlichen Zellen in den Kulturen waren negativ für die Expression des 1D3 TCR.

Die T-Zellen wurden für zwei Tage mit 2µg/ml PHA in Gegenwart von *feeder mix* voraktiviert. Vor dem Experiment wurden die Kulturen mit anti-CD8-PercP-Cy5.5, MARTtet-PE und anti-PD1-AF647 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. MARTtet-PE positive Zellen, die CD8 negativ waren wurden als CD4⁺ definiert.

Die voraktivierten T-Zellen wurden für vier Stunden mit folgenden Tumorzellen in Gegenwart von Golgi PlugTM zusammen inkubiert: Mel MTO (spezifisch, kein PD-L1), Mel MTO IFN γ (spezifisch, PD-L1) und Mel GBU (keine MART Expression, unspezifisch). Zusätzlich wurde einmal anti-PD-L1 mAb und einmal Sandoglobulin als Negativkontrolle zu den Mel MTO IFN γ Ansätzen gegeben, um den Einfluss der Blockade von PD-L1 zu untersuchen.

Nach der Inkubation wurden die Zellen extrazellulär mit anti-CD8-PercP-Cy5.5 und MARTtet-APC und intrazellulär mit anti-IFN γ -PE gefärbt und durch FACS Analyse analysiert. Die *Gate*-Setzung ist in Kapitel 2.2.2.8.9.2 beschrieben.

Besonders für die CD4⁺ T-Zellen ließ sich ein deutlicher Effekt der PD-1 Suppression durch retrovirale Transduktion mit pSUPER-siRNA-hu1-GFP, verglichen mit pSUPER-shuffle-GFP oder keinem siRNA-Vektor, beobachten. Werden 1D3 TCR tg oder 1D3 TCR tg pSUPER-shuffle-GFP transduzierte CD4⁺ T-Zellen mit der PD-L1 hoch exprimierenden Tumorzelllinie Mel MTO IFN γ koinkubiert, so erreichen diese nur 48% bzw. 41% der IFN γ Produktion bei Inkubation mit PD-L1 negativen Mel MTO Zellen (100%). 1D3 TCR tg pSUPER-siRNA-hu1-GFP transduzierten T-Zellen produzierten deutlich mehr IFN γ , nämlich 76% des Wertes den sie bei Koinkubation mit Mel MTO erreichten.

Bei Zugabe von anti-PD-L1 mAb zu Mel MTO IFN γ erreichten 1D3 TCR tg und 1D3 TCR tg pSUPER-shuffle-GFP transduzierte CD4⁺ T-Zellen das Niveau von pSUPER-siRNA-hu1-GFP transduzierten Zellen, nämlich 77% bzw. 71% der IFN γ Produktion bei Inkubation mit Mel MTO. 1D3 TCR tg pSUPER-siRNA-hu1-GFP transduzierte CD4⁺ T-Zellen produzierten in Gegenwart von anti-PD-L1 mAb nicht mehr IFN γ als in Abwesenheit. Für CD8⁺ T-Zellen konnte in Tendenzen dasselbe Muster beobachtet werden, jedoch waren die Unterschiede sehr klein und nicht signifikant (Abb. 35, Tabelle 2).

Die CD8⁺ 1D3 T-Zellen in den für CD4⁺ angereicherten Kulturen unterscheiden sich in ihrer IFN γ Produktion nicht von den CD8⁺ T-Zellen, aus den sauberen CD8⁺ angereicherten Kulturen (nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass der Effekt der PD-1

Suppression auf CD8⁺ 1D3 T-Zellen nicht durch T-Helferzellen (CD4⁺) beeinflusst wird.

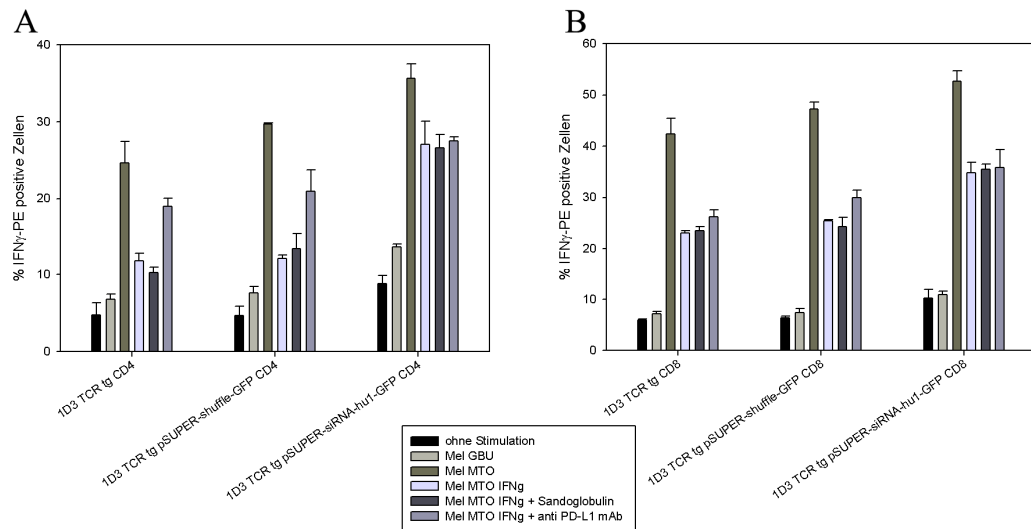


Abbildung 35: Intrazelluläres IFN γ in voraktivierten 1D3 TCR tg T-Zellen. 1D3 TCR tg, 1D3 TCR tg pSUPER-shuffle-GFP bzw. pSUPER-siRNA-hu1-GFP transduzierte T-Zellen wurden zwei Tage mit 2 μ g/ml PHA vorstimuliert. Anschließend wurden 13x10³ T-Zellen mit den entsprechenden Tumorzellen (E:T=1) für 4h koinkubiert. Wo angegeben wurde 10 μ g/ml anti-PD-L1 mAb, bzw. Sandoglobulin zugegeben. Es wurden jeweils drei wells pro Kombination angesetzt. Danach wurden die T-Zellen mit anti-CD8-PercP-Cy5.5, MARTtet-APC und anti-IFN γ -PE gefärbt und durch FACS Analyse untersucht. 1D3 TCR tg T-Zellen wurden auf MART-tet und CD8⁺ (B) bzw. CD8⁻ (CD4⁺) (A) vorgegattet. 1D3 TCR tg pSUPER-GFP T-Zellen wurden zusätzlich auf GFP-Expression vorgegattet.

	1D3 TCR tg CD4 ⁺		1D3 TCR tg CD8 ⁺	
	Mel MTO IFN γ	Mel MTO IFN γ + anti-PD-L1 mAb	Mel MTO IFN γ	Mel MTO IFN γ + anti-PD-L1 mAb
Ohne pSUPER-GFP	48 \pm 7%	77 \pm 10%	54 \pm 4%	62 \pm 6%
pSUPER-shuffle-GFP	41 \pm 1%	71 \pm 9%	54 \pm 2%	63 \pm 4%
pSUPER-siRNAhu1-GFP	76 \pm 9%	77 \pm 4%	66 \pm 5%	68 \pm 7%

Tabelle 2: IFN γ Produktion 1D3 TCR tg T-Zellen mit und ohne pSUPER-siRNA-hu1-GFP. Der Anteil IFN γ -PE positiver Zellen wurde mittels FACS-Analyse ermittelt. Der für Inkubation mit Mel MTO erreichte Wert wurde als 100% festgesetzt und die Werte der anderen Ansätze wurden dementsprechend berechnet.

3.2.4.1.2 Zytokinproduktion: IFN γ Produktion im ELISA mit 1D3 TCR tg CD8⁺ T-Zellen

Um zusätzlich zu den quantitativen Unterschieden (Abb. 35) eine qualitative Variation auf der Einzelzellebene darzustellen, wurden dieselben Zellen in einen IFN γ ELISA eingesetzt. In diesem Assay werden die Zellen für 18h mit den Zielzellen koinkubiert. Anschließend wird das IFN γ gemessen, das von den Zellen in den Überstand abgegeben wurde. Dadurch wird nicht nur analysiert, wie viele der Zellen IFN γ produzieren, sondern es können auch mögliche Unterschiede in der Produktionsrate des Zytokins festgestellt werden. Für den ELISA wurden dieselben Kombinationen aus T-Zellen, Tumorzellen und anti-PD-L1 mAb verwendet wie für die intrazelluläre IFN γ -Färbung. Die T-Zellen wurden dabei aber nicht mit Golgi PlugTM behandelt, so dass das IFN γ nach außen abgegeben werden konnte. Ferner wurden die Tumorzellen vor dem Versuch bestrahlt.

Auch im IFN γ ELISA konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen pSUPER-shuffle-GFP bzw. pSUPER-siRNA-hu1-GFP transduzierten 1D3 TCR tg CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden (Abb. 36).

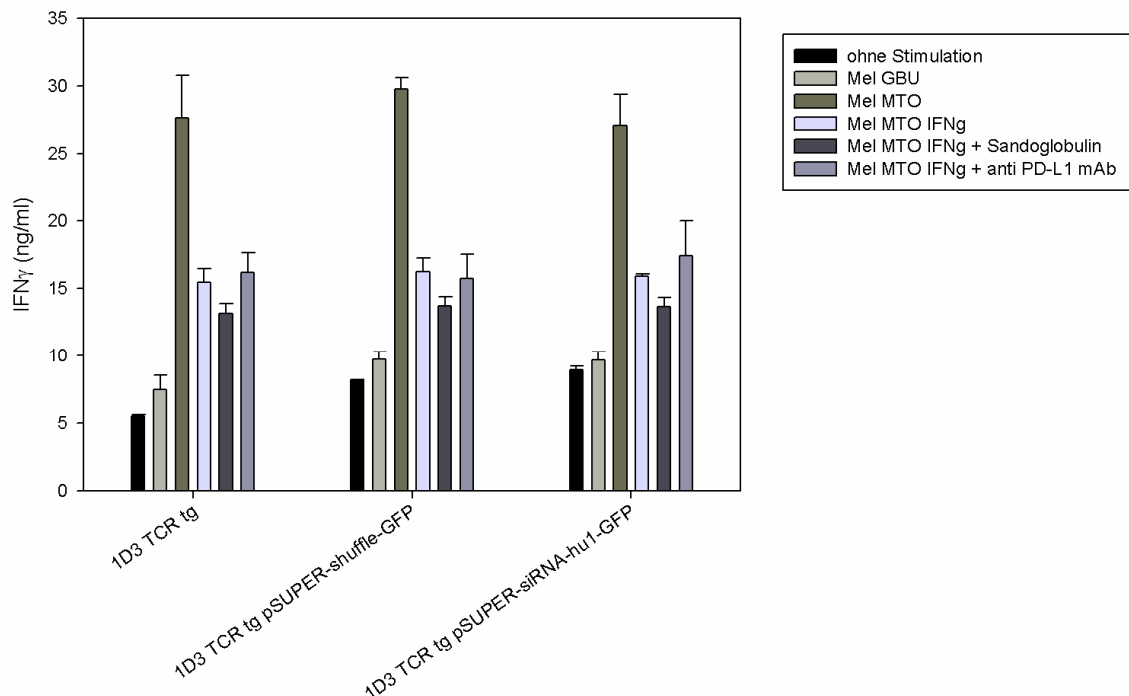


Abbildung 36: IFN γ ELISA mit 1D3 TCR tg pSUPER-siRNA-hu1-GFP transduzierten CD8⁺ T-Zellen. Es wurden dieselben T-Zellen mit dergleichen Vorbereitung verwendet, die auch in der IFN γ Intrazellulärfärbung eingesetzt wurden. Die Tumorzellen wurden vor dem Einsatz mit 70 Gy bestrahlt. Die T-Zellen und die Zielzellen mit und ohne Antikörper wurden zusammen für 18h inkubiert (13×10^3 Zellen, E:T = 1). Anschließend wurde die IFN γ Konzentration im Überstand durch ELISA bestimmt.

3.2.4.2 Zytotoxische Aktivität der Zellen über LAMP-Test

Um die zytotoxische Aktivität der T-Zellen zu untersuchen, wurde der so genannte LAMP-Test eingesetzt.

LAMP-1 (CD107a) ist ein Membranprotein, das man in der Membran von Vesikeln in der Zelle, jedoch nicht auf der Zelloberfläche selbst findet. Während des Angriffs einer T-Zelle auf eine Tumorzelle wandern Vesikel mit zytotoxischen Proteinen (z.B. Perforin, Granzyme B) an die Zelloberfläche und geben ihren Inhalt durch Fusion mit der Zellmembran nach außen ab. Durch diesen Prozess befindet sich LAMP-1 während eines T-Zellangriffs transient auf der Zelloberfläche (Rubio, Stuge et al. 2003).

Im Verlauf eines LAMP-Tests werden die zytotoxischen T-Zellen für vier Stunden mit spezifischen Tumorzellen in der Gegenwart von anti-CD107a-PE Antikörper inkubiert. Wenn das LAMP-1 Protein auf der T-Zelle erscheint, bindet der Antikörper und die LAMP-1 Expression kann im Anschluss durch FACS-Analyse nachgewiesen werden. Da die Auswertung eines LAMP-Tests durch FACS-Messung auf T-Zellebene stattfindet, kann neben anti-CD107a-PE noch auf andere Marker gegatet werden (anti-CD8-PercP-Cy5.5, MARTtet-APC, GFP), um sicherzustellen, dass nur die LAMP-1 Expression auf den gewünschten Zellen in die Auswertung miteinfließt.

Der LAMP-Test wurde mit denselben Zellen und im selben Versuchsaufbau durchgeführt wie die IFN γ Intrazellulärfärbung (siehe 3.2.4.1.1). Der einzige Unterschied bestand darin, dass kein Golgi PlugTM, dafür aber anti-CD107a-PE Antikörper zu den T-Zellen gegeben wurde. Nach der vierstündigen Inkubation wurden die Zellen zusätzlich mit anti-CD8-PercP-Cy5.5 und MARTtet-APC gefärbt. Die Gate-Setzung folgte demselben Schema wie bei der IFN γ Färbung (vgl. Kapitel 2.2.2.8.9.2), lediglich mit anti-CD107a-PE statt anti-IFN γ -PE.

Wie auch bei der IFN γ Intrazellulärfärbung ist ein Effekt der Transduktion der Zellen mit pSUPER-siRNA-hu1-GFP besonders bei den CD4⁺ T-Zellen zu beobachten. Bei Inkubation mit Mel MTO IFN γ wird die LAMP-Expression von 1D3 TCR tg und 1D3 TCR tg pSUPER-shuffle-GFP CD4⁺ T-Zellen auf 37% bzw. 45% des Wertes bei Inkubation mit Mel MTO (100%) reduziert. 1D3 TCR tg pSUPER-siRNA-hu1-GFP CD4⁺ transduzierte Zellen hingegen erreichen immer noch 74% des Wertes von Mel MTO. Die Zugabe von anti-PD-L1 mAb zu Mel MTO IFN γ erhöht die LAMP-Expression auf 1D3 TCR tg und 1D3 TCR tg pSUPER-shuffle-GFP CD4⁺ T-Zellen wieder auf 72% bzw. 73%. 1D3 TCR tg pSUPER-siRNA-hu1-GFP transduzierte CD4⁺

T-Zellen zeigen ebenfalls eine leicht erhöhte LAMP-Expression in Gegenwart von Mel MTO IFN γ bei Zugabe von anti-PD-L1 mAb (82%) (Abb. 37 A, Tabelle 3).

Für die Ansätze mit CD8⁺ T-Zellen sind die Unterschiede wiederum klein, jedoch treten sie deutlicher hervor als bei der IFN γ Intrazellulärfärbung (Abb. 37 B, Tabelle 3). Dies und der leichte synergistische Effekt von siRNA-hu1 und anti-PD-L1 mAb, der sich für die CD4⁺ T-Zellen beobachten lässt, spricht dafür, dass der LAMP-Test etwas empfindlicher ist als die IFN γ Intrazellulärfärbung.

Auch beim LAMP-Test verhalten sich CD8⁺ T-Zellen, unabhängig von der Anwesenheit von CD4⁺ T-Zellen, vergleichbar (nicht gezeigt).

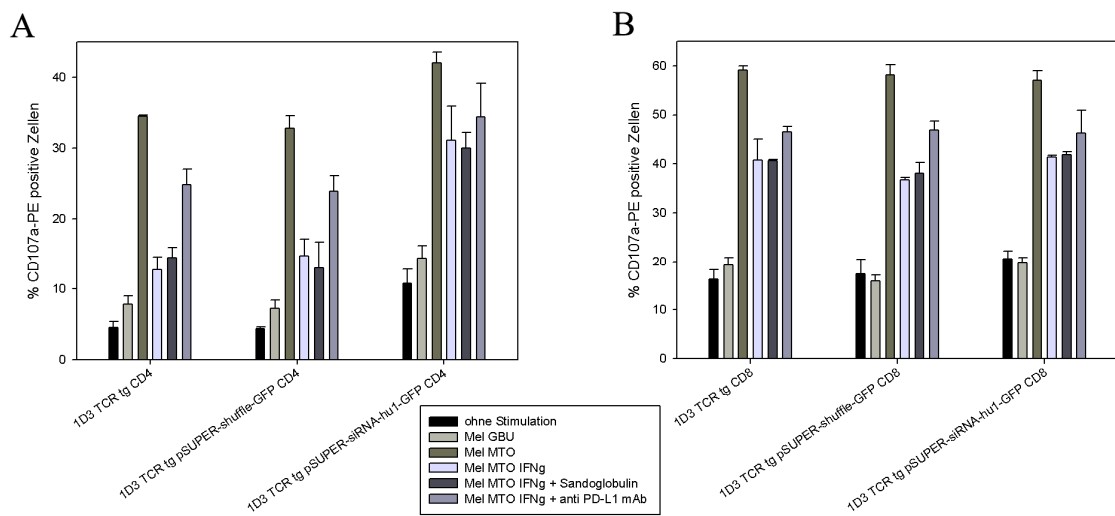


Abbildung 37: LAMP auf voraktivierten 1D3 TCR tg T-Zellen. 1D3 TCR tg, 1D3 TCR tg pSUPER-shuffle-GFP bzw. pSUPER-siRNA-hu1-GFP transduzierte T-Zellen wurden zwei Tage mit 2 μ g/ml PHA vorstimuliert. Anschließend wurden 13x10³ T-Zellen mit den entsprechenden Tumorzellen (E:T=1) und anti-CD107a-PE für 4h koinkubiert. Wo angegeben wurde 10 μ g/ml anti-PD-L1 mAb, bzw. Sandoglobulin zugegeben. Es wurden jeweils drei wells pro Kombination angesetzt. Danach wurden die T-Zellen mit anti CD8-PerCP-Cy5.5 und MARTtet-APC gefärbt und durch FACS Analyse untersucht. 1D3 TCR tg T-Zellen wurden auf MART-tet und CD8⁺ (B) bzw. CD8⁻ (CD4⁺) (A) vorgegattet. 1D3 TCR tg pSUPER-GFP T-Zellen wurden zusätzlich auf GFP-Expression vorgegattet.

	1D3 TCR tg CD4 ⁺		1D3 TCR tg CD8 ⁺	
	Mel MTO IFN γ	Mel MTO IFN γ + anti-PD-L1 mAb	Mel MTO IFN γ	Mel MTO IFN γ + anti-PD-L1 mAb
Ohne pSUPER-GFP	37 \pm 5%	72 \pm 6%	69 \pm 7%	79 \pm 2%
pSUPER-shuffle-GFP	45 \pm 8%	73 \pm 8%	63 \pm 2%	81 \pm 4%
pSUPER-siRNAhu1-GFP	74 \pm 12%	82 \pm 12%	73 \pm 3%	81 \pm 9%

Tabelle 3: LAMP-1 auf 1D3 TCR tg T-Zellen mit und ohne pSUPER-siRNA-hu1-GFP. Der Anteil CD107a-PE positiver Zellen wurde mittels FACS-Analyse ermittelt. Der für Inkubation mit Mel MTO erreichte Wert wurde als 100% festgesetzt und die Werte der anderen Ansätze wurden dementsprechend berechnet.

Wir waren also in der Lage, PD-1 auf humanen T-Zellen mittels retroviraler Transduktion mit pSUPER-siRNA-hu1-GFP zu supprimieren. Für 1D3 TCR tg CD4⁺ T-Zellen führte die Verringerung der PD-1 Expression zu erhöhter IFN γ -Produktion und Zytotoxizität bei Angriff auf PD-L1 exprimierende Tumorzellen. Die Zugabe von anti-PD-L1 mAb erreichte für IFN γ denselben Effekt wie die Transduktion mit pSUPER-siRNA-hu1-GFP. Im Fall des LAMP-Zytotoxizitäts-Tests wird durch die Zugabe von anti-PD-L1 zu PD-1 supprimierten T-Zellen, der Grad der LAMP-1 Expression zusätzlich leicht erhöht. Für CD8⁺ T-Zellen waren dieselben Effekte in Ansätzen zu sehen, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant.

Abschließend lässt sich sagen, dass der PD-1/PD-L1 Signaltransduktionspfad die Aktivität humaner T-Zellen unterdrückt und dass die Reduktion der PD-1 Expression auf spezifischen T-Zellen mittels retroviraler Transduktion mit pSUPER-siRNA-hu1-GFP einen positiven Effekt auf Zytokinproduktion und Zytotoxizität der Zellen hat.

4 Diskussion

Der koinhibitorische Rezeptor PD-1 wird auf T-Zellen nach deren Aktivierung exprimiert und reguliert die T-Zellaktivität bei Bindung an den Liganden PD-L1 herunter. Der negative Einfluss des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges wurde sowohl im Tiermodell (Blank, Brown et al. 2004) als auch für humane T-Zellen (Blank, Kuball et al. 2006) gezeigt. Der Ligand PD-L1 wird auf zahlreichen humanen Tumoren exprimiert und ist meist mit einer schlechten Prognose verbunden (Thompson, Gillett et al. 2004). Auf Grund dieser Erkenntnisse geht man davon aus, dass die Interaktion von PD-1 und PD-L1 am *Tumour – Escape* beteiligt ist. Eine Unterbrechung der PD-1/PD-L1 Bindung stellt daher einen möglichen Ansatz zur Tumorummuntherapie dar.

Eine solcher Eingriff in den Signaltransduktionsweg kann durch blockierende Antikörper stattfinden, die sowohl gegen den Rezeptor als auch gegen den Liganden gerichtet sein können. Zwei blockierende Antikörper gegen den PD-1 Rezeptor wurden bereits in Phase I Studien getestet, Phase II Studien werden gerade durchgeführt [(Brahmer, Topalian et al. 2008) ASCO Abstract, (Berger, Rotem-Yehudar et al. 2008)]. Die systemische Blockade von negativen Signaltransduktionswegen in T-Zellen bricht die periphere Toleranz und kann zu Autoimmunnebenwirkungen führen, wie dies z.B. für den anti-CTLA-4 mAb bekannt ist (Korman, Peggs et al. 2006). Es war daher das Ziel dieser Doktorarbeit, den PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg selektiv auf TAA-spezifischen T-Zellen zu inhibieren.

Als Methode wurde die stabile Integration von gegen PD-1 gerichteten siRNA-Sequenzen in das Genom von T-Zellen mittels retroviraler Transduktion gewählt. Diese Methode fand bereits in murinen T-Zellen Anwendung [z.B. stabiler *knock-down* der Metalloprotease ADAM10 in CD4⁺ OTII TCR tg T-Zellen (Li, Wang et al. 2007)].

Zunächst wurde das System im 2C Mausmodell etabliert und anschließend auf humane T-Zellen übertragen. Der Effekt der PD-1 Reduktion auf die T-Zellaktivität wurde in verschiedenen Assays analysiert.

4.1 Reduktion der PD-1 Expression auf 2C TCR tg murinen T-Zellen

4.1.1 Transiente Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression auf 2C TCR tg T-Zellen

Zuerst mussten siRNA-Sequenzen generiert werden, die die PD-1 Expression in murinen T-Zellen unterdrücken. Da der PD-1 Rezeptor auf naiven T-Zellen nicht exprimiert und erst bei Aktivierung der T-Zellen hoch reguliert wird (Blank, Brown et al. 2004), wurde zunächst eine Tumorzelllinie mit konstitutiver PD-1 Expression zur Testung eingesetzt. Die Verwendung einer Tumorzelllinie als Modell für primäre Lymphozyten wurde bereits von anderen angewendet. McManus *et al.* konnten zeigen, dass sich die Ergebnisse, die sie bei Transfektion der Thymozyten-Zelllinie E10 mit siRNA erhielten, auf primäre murine T-Zellen übertragen ließen. Es war daher nahe liegend, zunächst mit Zellen zu arbeiten, die sich durch eine konstante Expression von PD-1 auszeichneten.

Es wurden daher zunächst mehrere hämatologische Tumorzelllinien mittels Durchflusszytometrie analysiert, wobei auf der T-Zelllymphom-Zelllinie EL4 eine hohe PD-1 Expression gefunden wurde (Abb. 9).

Zunächst wurden siRNA-Sequenzen getestet, die von der Firma Ambion (*Silencer® predesigned siRNA*) bezogen wurde. Als Negativkontrolle wurde eine FAM-gelabelte siRNA (siRNA-negativ-FAM, *Silencer® FAM™ labeled Negative Control #1 siRNA*) gewählt, die durch das Fluorochrom zugleich als Kontrolle für die Transfektionseffizienz diente.

EL4 Zellen wurden zuerst mit den verschiedenen siRNA Sequenzen durch Elektroporation mit dem Amaxa™-System transfiziert. Aus den Angaben des Herstellers (www.amaxa.com) geht hervor, dass für EL4-Zellen bei Transfektion mit einem GFP-Plasmid eine Transfektionseffizienz von ca. 65% zu erwarten war. Dieser Wert konnte in einigen Fällen mit bis zu 90% sogar noch übertroffen werden (Abb. 10). Die Transfektionseffizienz für die FAM-gelabelte siRNA Negativkontrolle lag stets bei 90% oder höher. Dies ist könnte auf die geringe Größe der siRNA-Nukleotide zurückzuführen sein.

Nach der Transfektion mit den verschiedenen siRNA-Molekülen wurden die transfizierten EL4 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten durch durchflusszytometrische Analyse auf ihre PD-1 Oberflächenexpression hin untersucht. Es stellte sich heraus,

dass zwei Sequenzen (siRNA-mu1, -mu2) in der Lage waren die PD-1 Expression deutlich zu reduzieren, wobei siRNA-mu2 den stärksten Effekt hatte. Die transiente Hemmung erreichte das Maximum bei ca. 48h und war bis zu 72h wirksam (Abb. 11). Diese Ergebnisse für die Dauer der transient siRNA-vermittelten Suppression eines Oberflächenproteins in einer Tumorzelllinie korrelieren mit den Beobachtungen von McManus *et al.* (McManus, Haines et al. 2002).

Diese Ergebnisse sollten anschließend in primären 2C T-Zellen reproduziert werden. Hierfür war die Aktivierung der Zellen nötig, da der PD-1 Rezeptor erst bei Stimulierung der Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Nishimura, Agata et al. 1996). Für die 2C T-Zellen konnte eine Transfektionseffizienz von bis zu 67% für ein GFP-Kontrollplasmid erreicht werden, bei einer Überlebensrate von ca. 45%. Auch diese Ergebnisse entsprechen den Angaben des Herstellers, die Transfektionseffizienz lag sogar höher als angegeben (40%).

Um einen funktionalen Effekt der siRNA nachzuweisen, wurden die siRNA-transfizierten 2C T-Zellen nach der Transfektion und einer Ruhephase erneut stimuliert, um die Oberflächenexpression von PD-1 heraufzuregulieren. 48h nach Transfektion und 44h nach Restimulation wurde die PD-1 Oberflächenexpression durch FACS-Analyse bestimmt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da die PD-1 Expression am zweiten Tag nach Stimulation am höchsten ist (Blank, Brown et al. 2004) und ein Effekt der siRNA daher am deutlichsten sein sollte. Wir konnten zeigen, dass auch in primären 2C T-Zellen eine Reduktion der PD-1 Expression durch transiente Transfektion mit siRNA zu erreichen war. Die Effizienzen der unterschiedlichen siRNA-Sequenzen in 2C T-Zellen (Abb. 12) korrelierten gut mit den Ergebnissen, die bei der transienten Transduktion von EL4-Zellen beobachtet worden waren (Abb. 11). Auch in unserem Modell war es also möglich, die an einer Zelllinie gewonnenen Erkenntnisse auf primäre T-Zellen zu übertragen.

Die transiente Transfektion von 2C T-Zellen mit siRNA-mu1 und -mu2 führte bereits zu einer statistisch signifikant höheren IFN γ Produktion. Die effektivste Sequenz, siRNA-mu2, führte außerdem, ebenfalls statistisch signifikant, zu einer erhöhten IL-2 Produktion. Die transiente Reduktion der Oberflächenexpression des koinhibitorischen Rezeptors PD-1 zum Zeitpunkt des T-Zellangriffs auf eine PD-L1 exprimierende Tumorzelle war also bereits ausreichend, um die spezifische T-Zellantwort tendenziell zu verstärken (Abb. 14).

Vergleicht man die Ergebnisse jedoch mit Daten, die mit 2C PD1^{-/-} T-Zellen gewonnen wurden, so waren die Effekte der siRNA vermittelten PD-1 Suppression marginal. 2C PD1^{-/-} T-Zellen zeichneten sich, verglichen mit 2C T-Zellen, durch eine zehnfach bis fünfzehnfach höhere Zytokinproduktion aus (Blank, Brown et al. 2004). Die Tatsache, dass transiente Transfektion mit gegen PD-1 gerichteter siRNA nur zu einem geringen Anstieg der Zytokinmenge führt, ist darauf zurückzuführen, dass die transfizierten T-Zellen bei Aktivierung immer noch eine gewisse Menge PD-1 exprimieren (Abb. 12). Des Weiteren dürfte die fehlende PD-1 Expression auf T-Zellen der 2C PD1^{-/-} Maus während der Thymusschule zu einem veränderten T-Zellrepertoire führen, was einen direkten Vergleich erschwert (Blank, Brown et al. 2003; Keir, Latchman et al. 2005). Um die Effektivität der Inhibition der PD-1 Oberflächenexpression auf 2C T-Zellen zu verstärken war es daher nötig, die siRNA stabil in die Zellen einzubringen, um so PD-1 kontinuierlich zu supprimieren.

4.1.2 Stabile Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression auf 2C TCR tg T-Zellen

Um einen stabilen PD-1 *knock-down* in 2C TCR tg T-Zellen zu erreichen, wählten wir die retrovirale Transduktion mit dem siRNA-Vektor pSUPER. Durch diese Technik werden shRNA-Moleküle exprimiert, die dann durch den RNAi Apparat der Zellen in die funktionelle siRNA umgewandelt werden (Brummelkamp, Bernards et al. 2002; Hannon 2002).

Zunächst wurde ein Protokoll zur retroviralen Transduktion der 2C T-Zellen etabliert. Dazu wurde ein in unserem Labor vorliegendes Protokoll zur retroviralen Transduktion von Tumorzellen modifiziert, wobei zwei Veröffentlichungen zur Transduktion muriner T-Zellen zur Orientierung herangezogen wurden, nämlich Zhang *et al.* (Zhang, Tsang et al. 2003) und Kessels *et al.* (Kessels, Wolkers et al. 2005). Zhang *et al.* verwenden das kationische Polymer Polybrene, um die Anlagerung der Viruspartikel an die Zellen zu erleichtern. Sie zeigten zudem, dass der zusätzliche Einsatz des Fibronectin-Moleküls CH-296 keine erhöhte Transduktionseffizienz erbrachte. Aus diesem Grund, entschieden wir uns, die retrovirale Transduktion in Gegenwart von Polybrene durchzuführen. Zur Gewinnung des retroviralen Überstandes wurden Kessels *et al.* herangezogen, da diese dieselbe Verpackungszelllinie, Phoenix eco, einsetzten. Zudem wurde der Einsatz des Plasmids pCL-eco, das eine zusätzliche Kopie der viralen Gene

Gag, Pol und Env des MMuLV enthält, zur Erhöhung des viralen Titers, gewählt. Es wurden keine Titerbestimmungen durchgeführt, es bestätigten sich jedoch die Ergebnisse von Kessels *et al.*, dass mindestens 40% der Verpackungszellen mit dem Zielplasmid transfiziert sein müssen, wenn ein hoher Grad an retroviraler Transduktion der Zielzellen erreicht werden soll.

Um Zellen retroviral zu transduzieren, müssen sich diese zum Zeitpunkt der Transduktion teilen, damit die retrovirale DNA die Kernhülle überwinden kann. Dazu werden frisch isolierte T-Zellen vor der Transduktion stimuliert. Zhang *et al.* verwendeten Splenozyten aus C57BL/6 und aus BALB/C Mäusen, die entweder mit Concanavalin A oder mit anti-CD3/28 mAb aktiviert worden waren. Als optimalen Zeitpunkt zur Transduktion ermittelten sie Tag 1 nach Aktivierung. Eine Wiederholung der Transduktion an Tag 2 führte zu keinem signifikanten Anstieg der Transduktionseffizienz. Kessels *et al.* transduzierten ihre T-Zellen an Tag 2 nach Stimulation mit ConcanavalinA und IL-7.

Es wurden verschiedene Aktivierungsmethoden und Zeitpunkte getestet und es stellte sich heraus, dass 2C T-Zellen, die mit P815.B71 (B7.1 transduzierte Mastozytom-Zelllinie, die das TCR relevante Antigen stark exprimiert) stimuliert worden waren, besser zu transduzieren waren als mit anti-CD3/28 mAb stimulierte Zellen. Zudem führte in den Versuchen eine zweite Transduktion an Tag 2 nach Stimulation zu einer deutlich erhöhten Transduktionseffizienz (Tabelle 1). Dies zeigt, dass es notwendig ist, für T-Zellen unterschiedlicher Mausstämme, verschiedene Aktivierungsmethoden und Transduktionszeitpunkte zu testen, um die optimalen Bedingungen zu ermitteln.

Unter Verwendung des von uns etablierten Protokolls konnten Transduktionseffizienzen von bis zu 68% erreicht werden. Die Transduktionseffizienz von Zhang *et al.* lag bei 80%, allerdings unter Verwendung einer anderen Verpackungszelllinie und bei vorheriger Aufkonzentrierung des retroviralen Überstands. Kessels *et al.* verwendeten dieselbe Verpackungszelllinie und benützten Retronektin (CH-296)-beschichtete Platten für die Transduktion, mit einer Transduktionseffizienz zwischen 5 und 40%. Dies zeigt, dass wir mit unserem Protokoll eine gute Transduktionseffizienz für 2C TCR tg T-Zellen erreichen konnten, und dass die Methode mit Polybrene einer retroviralen Transduktion in Retronektin-beschichteten Platten in nichts nachsteht.

Um das Repertoire an siRNA Sequenzen über die drei in der transienten Transfektion getesteten Sequenzen gegen murines PD-1 hinaus zu erweitern, wurden mit der sfold - Software sieben weitere potenzielle siRNA Sequenzen bestimmt. Diese Sequenzen

sowie siRNA-mu2 wurden in das pSUPER.retro.puro Plasmid, das speziell für die retrovirale Transduktion von shRNA Konstrukten entworfen wurde, integriert (Brummelkamp, Bernards et al. 2002). pSUPER.retro.puro besitzt eine Puromycin-Kassette, so dass transduzierte Zellen durch Selektion mit Puromycin angereicht werden können.

Um die Effizienz der siRNA-Vektoren zu testen, wurden 2C T-Zellen mit den acht siRNA-Plasmiden transduziert und mit Puromycin über mehrere Stimulationsrunden selektiert. Es stellte sich heraus, dass neben siRNA-mu2 noch drei weitere siRNA-Sequenzen die PD-1 Oberflächenexpression effizient reduzierten (siRNA-mu4, -mu7, -mu10) (Abb. 17).

Für die folgenden Experimente zur T-Zellaktivität siRNA transduzierter 2C T-Zellen wurden siRNA-mu2 und -mu4 gewählt, da diese beiden Sequenzen einmal eine hohe und einmal eine intermediäre Reduktion der MFI im FACS zeigten (Abb. 18). Der Einsatz von siRNA-mu4 als Zwischenstufe zwischen untransduzierten und siRNA-mu2 transduzierten 2C T-Zellen, ermöglichte es, zu untersuchen, inwiefern der Grad der PD-1 Reduktion einen Einfluss auf die Funktionalität der 2C T-Zellen hat.

Die Methode der RNAi supprimiert die Expression des betroffenen Proteins auf mRNA-Ebene (Hannon 2002). Die Effektivität der shRNA, die durch ein pSUPER-shRNA Plasmid in eine Zelle eingeführt wird, spiegelt sich daher auch in der mRNA-Menge wieder. Um den Effekt der eingeführten siRNA auf die PD-1 Expression weiter zu überprüfen, wurde daher eine RT-PCR mit der Gesamt-RNA aus naiven, stimulierten, pSUPER.retro.puro, pSUPER-siRNA-mu2 und -mu4 transduzierten 2C T-Zellen, sowie 2C PD1^{-/-} T-Zellen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass pSUPER-siRNA-mu2 und -mu4 transduzierte 2C T-Zellen deutlich weniger mRNA für PD-1 enthielten, als Zellen die mit dem Kontroll-pSUPER.retro.puro Plasmid transduziert worden waren. Naive 2C T-Zellen, die noch kein PD-1 exprimieren (Nishimura, Agata et al. 1996), sowie 2C PD1^{-/-} T-Zellen enthielten keine PD-1 mRNA. Im Fall der PD-1^{-/-} T-Zellen muss man beachten, dass lediglich die Transmembrandomäne von PD-1 *ausgeknockt* wurde. Das Protein kann so nicht auf die Zelloberfläche gelangen und in der Signaltransduktion wirksam werden, es kann jedoch durch intrazelluläre Antikörperfärbung nachgewiesen werden. In der RT-PCR wird kein PCR-Produkt gebildet, da einer der Primer in dem fehlenden DNA-Abschnitt bindet.

Betrachtet man die siRNA-transduzierten T-Zellen, so war auch auf mRNA-Ebene pSUPER-siRNA-mu2 effektiver als pSUPER-siRNA-mu4 (Abb. 19). Die Ergebnisse

stimmen also mit unseren Erkenntnissen auf Proteinebene (Durchflusszytometrie) überein.

Seit die RNAi als Methode zur gezielten Suppression von Proteinen über künstlich eingeführte siRNA oder shRNA-Moleküle etabliert wurde, wurden auch so genannte *off target* Effekte in den modifizierten Zellen beobachtet. Dabei handelt es sich um Effekte, die nicht auf die Suppression des Zielgens zurückzuführen sind. Es ist bekannt, dass lange doppelsträngige RNA-Moleküle in Säugerzellen als Signale für eine virale Infektion erkannt werden und das angeborene Immunsystem aktivieren (Jacobs and Langland 1996). Aus diesem Grund werden kurze siRNA-Moleküle mit einer Länge von 21 bis 23 Basenpaaren verwendet. Selbst bei dieser Länge wurde in einigen Fällen eine Induktion von Markern des angeborenen Immunsystems beobachtet. Auch Veränderungen in den Zellen durch Nebeneffekte der Transfektion oder Transduktion und der Selektion über Antibiotika sind nicht auszuschließen. Aus diesem Grund ist es erforderlich, eine unspezifische siRNA, die nicht gegen das Zielprotein gerichtet ist, einzusetzen, um eine Kontrollzelle zu erhalten, die auf die gleiche Weise behandelt wurde wie die Zellen, die mit der funktionellen siRNA modifiziert wurden (Gartel and Kandel 2006).

Da die Firma Ambion die Sequenz ihrer Negativkontroll-siRNA nicht offen legt, wurde eine weitere Negativkontrolle entworfen. Dazu wurde die Sequenz der siRNA-mu2 gemischt (*shuffled*). Verschiedene Kombinationen wurden mit der PD-1 Gensequenz abgeglichen und die Variante mit den geringsten Übereinstimmungen wurde als siRNA-shuffle ausgewählt und in das pSUPER.retro.puro Plasmid eingefügt. Die Transduktion von 2C T-Zellen mit pSUPER-siRNA-shuffle hatte keinen Einfluss auf die PD-1 Expression der Zellen (Abb. 18).

Um *off target* Effekte und Nebeneffekte von Transduktion und Selektion weiter ausschließen zu können, wurden parallel zur PD-1 Oberflächenexpression weitere verschiedene Aktivierungsmarker durch FACS-Analyse untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression von CD28 und CTLA-4 (CD28 Rezeptorfamilie) sowie von CD44, CD62L, CD25, PD-L1 und Fas nicht durch die eingeführte siRNA verändert wurde (Abb. 20).

Nachdem die Methode der retroviralen Transduktion mit siRNA zur Verminderung der PD-1 Oberflächenexpression auf 2C T-Zellen etabliert und unspezifische Effekte der siRNA soweit wie möglich ausgeschlossen worden waren, wurde die Zytokinproduktion und Proliferationsfähigkeit der Zellen analysiert.

Zunächst verglichen wir die Zytokinproduktion von pSUPER-siRNA-shuffle, -mu2 und -mu4 transduzierten 2C T-Zellen. Es stellte sich heraus, dass 2C T-Zellen, die mit der effektivsten siRNA (mu2) transduziert worden waren, mehr als doppelt soviel IFN γ produzierten, als die Zellen mit pSUPER-siRNA-shuffle oder -mu4 (Abb. 21). Wie hypothetisiert, konnte die Zytokinproduktion durch eine stabile PD-1 Suppression deutlich verbessert werden. Die Zytokinmengen von 2C PD1^{-/-} T-Zellen konnten jedoch nicht erreicht werden (Blank, Brown et al. 2004). Dies ist darauf zurückzuführen, dass auf den siRNA-supprimierten T-Zellen immer noch eine Restmenge PD-1 zu finden ist, während 2C PD1^{-/-} T-Zellen den Rezeptor überhaupt nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren. Für eine graduelle Abstufung der Signaltransduktion je nach Menge der PD-1 Oberflächenexpression spricht, dass die intermediäre siRNA-mu4, die eine geringere PD-1 Suppression bewirkt als siRNA-mu2, keinen Effekt auf die Zytokinproduktion hat.

Eine weitere Möglichkeit, den PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg zu unterbrechen, ist der Einsatz blockierender Antikörper, die den Liganden abdecken. Blank *et al.* konnten zeigen, dass die Zugabe von anti-PD-L1 mAb während der Stimulation von 2C T-Zellen mit B16.SIY IFN γ die Zytokinproduktion mehr als verdoppeln konnte (Blank, Brown et al. 2004). Wir setzten einen blockierenden Antikörper im Zusammenhang mit pSUPER-siRNA-mu2 oder -mu4 transduzierten 2C T-Zellen ein, und konnten so in beiden Fällen eine erhöhte IFN γ Produktion erreichen. Die Differenz in der IFN γ Produktion von siRNA-mu2 und -mu4 transduzierten 2C T-Zellen wurde dabei verringert und es wurden nahezu gleiche Zytokinmengen erreicht (Abb. 23). Dies zeigt erneut, dass die Unterbrechung der PD-1/PD-L1 Signaltransduktion durch PD-1 *knock-down* nicht vollständig ist, und dass die zusätzliche Blockade des Liganden eine weitere Verbesserung der T-Zellaktivität bewirkt.

Im direkten Vergleich besaßen 2C PD1^{-/-} T-Zellen einen deutlichen Vorteil gegenüber den siRNA transduzierten 2C T-Zellen. Selbst die Kombination aus reduzierter PD-1 Expression und anti-PD-L1 mAb war nicht ausreichend, um die bis zu fünfmal höhere Zytokinproduktion der *knock-out* Zellen zu erreichen (Abb. 24). Dies stimmt auch mit Beobachtungen von Blank *et al.* überein, die mit 2C PD1^{-/-} T-Zellen die zehn- bis sechzehnfache Menge an Zytokinen im Vergleich mit 2C T-Zellen erreichen konnten, bei denen die Blockade mit anti-PD-L1 mAb aber ebenfalls nur zu etwas mehr als einer Verdopplung der Zytokinproduktion führte. Hinzukommt, dass die funktionellen Assays erst nach mehreren Runden Stimulation in Gegenwart von Antibiotikum zur Selektion

siRNA transduzierter T-Zellen stattfinden konnten. Es möglich, dass die parallel stimulierten 2C PD1^{-/-} T-Zellen, denen das Wachstum nicht durch Antibiotika erschwert wurde, zum Zeitpunkt der Versuche in einem vitaleren Zustand waren.

Anschließend wurde die Proliferation von siRNA-shuffle, -mu2 und -mu4 transduzierten 2C T-Zellen bei Stimulation mit B16.SIY E12 IFN γ . Es konnte gezeigt werden, dass Zellen mit siRNA-mu2 2,6-mal und mit siRNA-mu4 1,5 mal mehr ³H-Thymidin einbauten, als Zellen die die Negativkontrolle siRNA-shuffle erhalten hatten (Abb. 22). In Einklang mit der verbesserten Zytokinproduktion konnte die PD-1 Inhibition auch die, mittels ³H-Thymidin-Aufnahme gemessene, Proliferation verbessern.

Tumoren, die aus der Injektion von HTR.c Tumorzellen in P14 RAG2^{-/-} Mäusen entstehen, können von 2C PD1^{-/-} T-Zellen abgestoßen werden, während 2C T-Zellen, die PD-1 regulär exprimieren, nicht in der Lage sind, das Tumorstadium zu kontrollieren. Im etablierten 2C Tumormodell wurden naive T-Zellen in die Empfängertiere injiziert, die Injektion der Tumorzellen fand am Tag darauf statt (Blank, Brown et al. 2004). Wir waren in der Lage diese Ergebnisse zu reproduzieren, wobei die naiven T-Zellen erst zwei bzw. sechs Tage nach der Tumordinjektion in die Tiere gebracht wurden (Abb. 25).

Allerdings konnte dieses Modell nicht auf repetitiv stimulierte 2C T-Zellen übertragen werden, da hier die 2C PD1^{-/-} T-Zellen wie auch die 2C T-Zellen nicht in der Lage waren, eine Tumorkontrolle auszuüben (Abb. 27).

Es ist anzunehmen, dass die 2C T-Zellen während der wiederholten Stimulation und Konfrontation mit Antigen in einen *exhausted* Phänotyp übergehen. *T cell exhaustion* bezeichnet ein Phänomen, dass bei chronischen Viruserkrankungen sowohl im Tiermodell [LCMV (Zajac, Blattman et al. 1998; Wherry, Ha et al. 2007)] als auch bei humanen Erkrankungen [z.B. HIV, HBV, HCV (Letvin and Walker 2003; Pantaleo and Koup 2004; Rehermann and Nascimbeni 2005)] beobachtet wird. Dabei liegen virusspezifische Effektor-T-Zellen vor, die jedoch nicht mehr in der Lage sind, infizierte Körperzellen anzugreifen. Zudem werden keine Gedächtnis-T-Zellen ausgebildet. *Exhausted T cells* weisen sich durch eine ganze Reihe von Veränderungen aus, u.a. Überexpression verschiedener koinhibitorischer Rezeptoren, z.B. PD-1, Veränderung der Signaltransduktion von T-Zellrezeptor und Zytokinen, veränderte Expression von Genen, die mit Chemotaxis, Adhäsion und Migration in Verbindung stehen, sowie Stoffwechseldefizite. Wie auch die über mehrere Runden stimulierten 2C

T-Zellen, besitzen *exhausted T cells* einen Phänotyp mit hoher CD44 Expression, niedriger CD62L Expression und hoher PD-1 Expression (Wherry, Ha et al. 2007). Es liegen inzwischen Veröffentlichungen vor, die zeigen, dass durch Blockade des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges *exhausted T cells* reaktiviert werden können, was zu verbesserter Zytokinproduktion, T-Zellproliferation, zytotoxischer Aktivität und verminderter Virenlast führt [Mausmodell LCMV (Barber, Wherry et al. 2006), HIV (Day, Kaufmann et al. 2006)].

In dem von uns verwendeten Tumormodell hingegen, war die Blockade, oder vielmehr Abwesenheit des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges im Fall der 2C PD1^{-/-} T-Zellen nicht ausreichend, um den *in vitro* induzierten *exhausted* Phänotyp zu revidieren und Tumorkontrolle zu ermöglichen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass noch andere Faktoren eine Rolle spielen, so wurde z.B. erst kürzlich gezeigt, dass noch weitere koinhibitorische Rezeptoren wie LAG-3 auf *exhausted T cells* exprimiert werden und dass die gleichzeitige Blockade von LAG-3 und PD-1 einen synergistischen Effekt auf die T-Zellaktivität hatte (Blackburn, Shin et al. 2009). Über lange Zeit selektionierte siRNA transduzierte 2C T-Zellen sind daher nicht für *in vivo* Experimente geeignet.

Aufgrund dieser Probleme, waren wir im Rahmen dieser Arbeit nicht in der Lage den *in vitro* Effekt der pSUPER-siRNA-mu2 Transduktion von 2C T-Zellen, in einem PD-1 abhängigen *in vivo* Modell zu überprüfen.

4.2 Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression auf tumorspezifischen humanen T-Zellen

Nachdem das Prinzip der stabilen Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression durch retrovirale Transduktion mit siRNA-Vektoren im murinen System etabliert worden war, und eine funktionelle Beeinflussung von 2C TCR tg T-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde das System auf humane T-Zellen übertragen.

4.2.1 Transiente Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression auf der humanen B-Zelllinie CIRA2

Um funktionelle siRNA-Sequenzen gegen humanes PD-1 zu finden, wurde zunächst nach derselben Strategie vorgegangen, die auch im murinen System angewandt worden war, die siRNA-Moleküle in einer humanen Tumorzelllinie (CIRA2, B-Zelllinie), die

PD-1 konstitutiv exprimiert, getestet. Die Zellen wurden mittels AmaxaTM-Transfektion transfiziert und es konnten zwei Sequenzen detektiert werden, die die PD-1 Oberflächenexpression supprimierten (Abb. 28).

4.2.2 Stabile Reduktion der PD-1 Expression auf 1D3 TCR transduzierten humanen T-Zellen

Im humanen System ist neben dem allgemeinen Erfolg einer Methode stets auch die klinische Umsetzbarkeit im Auge zu behalten. Um retroviral transduzierte T-Zellen im Rahmen einer Immuntherapie an Patienten einsetzen zu können, müssen die T-Zellen im geschlossenen System unter GMP (*good manufacturing practice*)-Bedingungen hergestellt werden können. Eine langwierige Selektion über Antibiotika würde sich dabei schwierig gestalten. Deshalb wählten wir für unsere *in vitro* Experimente ein System, in dem wir siRNA-transduzierte T-Zellen ohne zusätzliche Selektion über die Expression von GFP identifizieren konnten. Dies ermöglicht zum einen eine Selektion transduzierter T-Zellen durch FACS-Sort um diese für *in vitro* Versuche anzureichern, zum anderen liefert es eine Möglichkeit, den Anteil transduzierter T-Zellen zu bestimmen. Da die Möglichkeit besteht, dass das GFP im Patienten immunogen ist, müsste für eine klinische Anwendung eine andere Lösung gefunden werden. Eine nahe liegende Lösung wäre die Kombination von transgenem TCR und siRNA in einem Vektor, so dass transduzierte T-Zellen über die TCR-Expression erkannt werden könnten.

Zunächst wurden jedoch siRNA-Sequenzen siRNA-hu1 und -shuffle in den Vektor pSUPER.retro.neo.GFP eingefügt, der neben der gewünschten siRNA auch das GFP-Protein kodiert. Auf diese Weise konnten transduzierte T-Zellen durch ihre GFP-Expression identifiziert werden.

Als Möglichkeit auf schnellem und reproduzierbarem Weg humane tumorspezifische T-Zellen mit hoher Affinität zu gewinnen, wurde die Transduktion mit dem MART-spezifischen Rezeptor 1D3 gewählt (Dietrich, Le Gal et al. 2003; Jorritsma, Gomez-Eerland et al. 2007). Ein weiterer wichtiger Grund für die Auswahl dieses Rezeptors besteht darin, dass zurzeit am NKI ein klinischer Versuch der Phase I mit 1D3 transduzierten T-Zellen gestartet wird. Sollte die Kotransduktion mit gegen PD-1 gerichteter siRNA tatsächlich zu einer verbesserten T-Zellaktivität führen, so wäre es

kein weiter Schritt, die siRNA in einem zweiten Teil des klinischen Versuchs mit einzusetzen.

Unter Verwendung des am NKI etablierten Protokolls für retrovirale Transduktion humaner PBLs wurden Doppeltransduktionen mit dem 1D3 TCR und den pSUPER-siRNA-GFP Plasmiden durchgeführt. Dazu wurden separat hergestellte retrovirale Überstände im Verhältnis eins zu eins gemischt und eingesetzt. Dabei konnte eine Doppel-Transduktionseffizienz von ca. 25% für die CD4⁺ und 20% für die CD8⁺ T-Zellen eines Ansatzes erreicht werden (Abb. 30). Zusammengenommen waren um die 20% der Lymphozyten 1D3 und GFP positiv. Retrovirale Transduktion mit zwei oder mehreren Plasmiden wird durchaus häufiger durchgeführt, z.B. (Heemskerk, de Paus et al. 2001; de Paus, van de Wetering et al. 2008). Jedoch werden die Transduktionseffizienzen meistens nicht angegeben, da die gewünschten Zellen durch FACS-Sort angereichert werden. Abad *et al.*, die sich explizit mit der Mehrfach-Transduktion von humanen T-Zellen in einem einzigen Transduktionsschritt befassen, erreichten eine Transduktionseffizienz von ca. 6,5% aller Zellen eines Ansatzes für Doppeltransfektionen. Sie verwendeten dabei keine stabile Verpackungszelllinie, sondern kotransfizierten 293T Zellen mit je einem Plasmid für gag-pol, env und dem gewünschten Konstrukt (Abad, Serrano et al. 2002). Unsere Transduktionseffizienz war also mehr als doppelt so hoch als die bis dato publizierten Anteile.

Bevor die Suppression der PD-1 Oberflächenexpression auf 1D3 TCR transduzierten T-Zellen und deren mögliche Effekte auf die Aktivität der T-Zellen untersucht werden konnte, musste die PD-1 Expression auf diesen Zellen während wiederholter Stimulation charakterisiert werden. Zu Beginn der Transduktion wurden naive PBLs aus Spenderblut isoliert und mit einer hohen Dosis PHA in Gegenwart von IL-2 aktiviert. Unter diesen Bedingungen wird PD-1 sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Zellen hoch exprimiert, mit einem Maximum an Tag 2. Folgt man dem am NKI etablierten Protokoll um transduzierte T-Zellen über einen längeren Zeitraum zu kultivieren, mit einer deutlich niedrigeren Menge an PHA mit derselben Menge IL-2, so kommt es nur zu einer äußerst geringen erneuten Expression von PD-1 auf den T-Zellen (Abb. 31). Die Restimulationsbedingungen wurden daher angepasst, damit repetitiv eine hohe PD-1 Expression nach Restimulation auftrat (Abb. 33).

Nachdem die optimalen Bedingungen zur Induktion der PD-1 Expression auf humanen T-Zellen in unserem System gefunden worden waren, wurde die PD-1 Expression auf Zellen untersucht, die mit pSUPER-siRNA-hu1-GFP oder pSUPER-siRNA-shuffle-

GFP transduziert und für zwei Tage mit der hohen Dosis PHA stimuliert worden waren. Sowohl die CD4⁺ als auch die CD8⁺ T-Zellen mit pSUPER-shuffle-GFP zeigten in der Durchflusszytometrie eine deutliche PD-1 Expression, wobei die CD4⁺ T-Zellen jedoch einen höheren Wert erreichten als die CD8⁺ T-Zellen. Transduktion mit pSUPER-siRNA-hu1-GFP führte in beiden Fällen zu einer deutlichen Reduktion der PD-1 Expression (Abb. 34)

4.2.3 Funktionelle Assays mit pSUPER-siRNA-GFP transduzierten MART-spezifischen humanen T-Zellen

Um die funktionelle Bedeutung der PD-1 Reduktion auf humanen T-Zellen untersuchen zu können, etablierten wir ein TCR-Tumor System, das dem aus 2C TCR und B16.SIY im Mausmodell entsprach. Der dazu gewählte 1D3 TCR erkennt das MART-1 Peptid im HLA-A2 MHC-Komplex. Es wurden daher HLA-A2 positive Melanomzelllinien, die MART positiv waren gesucht und deren PD-L1 Expression mit und ohne Induktion durch IFN γ analysiert. Alle drei vorliegenden Zelllinien (MelAKR, MelICL und MelMTO) regulierten in Anwesenheit von IFN γ PD-L1 hoch. MelMTO zeigte dabei die höchste Expression des Liganden und war zudem im nicht-induzierten Zustand für PD-L1 vollständig negativ. Im Gegensatz zu B16.SIY wird auf den humanen Melanomzelllinien der MHC-Komplex auch ohne Induktion mit IFN γ exprimiert (Abb. 29). Als Negativkontrolle wurde die Zelllinie MelGBU gewählt, die MART negativ ist. Zusätzlich zur Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression auf den T-Zellen kam ein blockierendes anti-PD-L1 mAb [Klon 5-496, (Selenko-Gebauer, Majdic et al. 2003)] zum Einsatz. Dieser Antikörper war bereits in einem System aus p53TCR transduzierten T-Zellen und der Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1851 eingesetzt worden und hatte zu erhöhter Zytokinproduktion und lytischer Aktivität humaner T-Zellen geführt (Blank, Kuball et al. 2006).

Humane T-Zellen wurden mit dem 1D3 TCR und siRNA-hu1 oder siRNA-shuffle transduziert und durch FACS-Sort für 1D3⁺ GFP⁺ CD4⁺ oder CD8⁺ angereichert. Nach einer weiteren Restimulation fanden sich in den CD4⁺ Kulturen auch CD8⁺ T-Zellen, wohingegen die CD8⁺ Kulturen nahezu keine CD4⁺ T-Zellen enthielten.

4.2.3.1 Zytokinproduktion PD-1 supprimierter humaner T-Zellen

Da die Population wie oben erwähnt nicht 100% CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen enthielten, entschieden wir uns gegen eine ELISpot Analyse, bei der alle IFN γ produzierenden T-Zellen eines Ansatzes erfasst werden, ohne dass zwischen CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen unterschieden werden könnte, und für eine Zytokinanalyse über Durchflusszytometrie. Die Zytokinproduktion der siRNA-transduzierten tumorspezifischen T-Zellen wurde mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung untersucht. Bei dieser Art Experiment lässt sich vor allem der Anteil der Zellen feststellen, die IFN γ produzieren. Über die Menge des Zytokins, die von den Zellen hergestellt werden lässt sich nur bedingt eine Aussage treffen.

Es kamen standardgemäß sechs verschiedene Bedingungen für die Stimulation der siRNA-transduzierten 1D3 TCR tg T-Zellen zum Einsatz:

1. *Ohne Stimulation*: Es wurden keine Tumorzellen mit den T-Zellen inkubiert, wodurch diese keinen Stimulus erhielten.
2. *Mel GBU*: Als Negativkontrolle wurde die Melanomzelllinie Mel GBU eingesetzt, die für das MART-Peptid negativ ist, und daher nicht durch den 1D3 TCR erkannt wird.
3. *Mel MTO*: Als Positivkontrolle wurde die Melanomzelllinie Mel MTO eingesetzt, die MART im HLA-A2 MHC-Komplex exprimiert. Ohne IFN γ -Induktion ist Mel MTO für PD-L1 negativ und es findet keine Inhibition über den PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg statt.
4. *Mel MTO IFN γ* : Um den Effekt der PD-1/PD-L1 Interaktion auf die 1D3 TCR tg T-Zellen zu untersuchen wurden IFN γ -vorbehandelte Mel MTO Zellen auf denen PD-L1 induziert ist verwendet. Die T-Zellen erhalten so ihren spezifischen Stimulus, können jedoch durch PD-L1 inhibiert werden.
5. *Mel MTO IFN γ + Sandoglobulin*: Mel MTO IFN γ Zellen wurden zusammen mit Sandoglobulin zu den T-Zellen gegeben. Sandoglobulin diente hier als Isotyp-Kontrolle für den blockierenden anti-PD-L1 mAb.
6. *Mel MTO IFN γ + anti-PD-L1 mAb*: Mel MTO IFN γ Zellen wurden zusammen mit anti-PD-L1 mAb zu den T-Zellen gegeben. Durch die Zugabe des blockierenden Antikörpers sollte der Effekt der durch IFN γ induzierten PD-L1 Expression negiert werden. Dies ermöglicht eine direkte Kontrolle der PD-1/PD-L1 Interaktion.

Es wurden jeweils CD4⁺ und CD8⁺ 1D3 TCR T-Zellen, die mit keiner siRNA, siRNA-hu1 oder siRNA-shuffle transduziert worden waren, untersucht. Da die Analyse der IFN γ Produktion durch Intrazellulärfärbung stattfand, konnten gezielt *Gates* auf CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen in den Kulturen gesetzt werden, so dass die CD8⁺ T-Zellen in den CD4⁺ Kulturen ohne Probleme ausgeschlossen werden konnten.

Bei Stimulation mit Mel MTO IFN γ erreichten PD-1 supprimierte CD4⁺ 1D3 TCR tg T-Zellen nahezu die doppelte IFN γ -Produktion verglichen mit T-Zellen, die mit der Negativkontrolle transduziert worden waren. Im Fall der CD8⁺ T-Zellen fällt dieser Effekt weniger deutlich aus, er ist jedoch ebenfalls vorhanden (Abb. 35).

Dieses Ergebnis stimmt damit überein, dass die CD4⁺ T-Zellen bei der Voraktivierung eine höhere PD-1 Expression und damit eine insgesamt größere Reduktion des Rezeptors für das negative Signal aufweisen (Abb. 34). Zudem haben auch andere Arbeitsgruppen die Erfahrung gemacht, dass CD4⁺ T-Zellen deutlicher von einer Blockade des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges profitieren, als CD8⁺ T-Zellen. Blank *et al.* verwendeten einen ähnlichen Ansatz aus tumorspezifischen T-Zellen und PD-L1 exprimierenden Tumorzelllinien und konnten zeigen, dass durch Blockade mittels anti-PD-L1 mAb die Zytokinproduktion sowohl für CD4⁺ als auch CD8⁺ tumorspezifische T-Zellen erhöht werden konnte (Blank, Kuball et al. 2006). Wintterle *et al.* untersuchten ebenfalls die Aktivität von tumorspezifischen T-Zellen bei Unterbrechung des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges durch blockierenden anti-PD-L1 mAb (Wintterle, Schreiner et al. 2003). Auch hier war der Effekt der Unterbrechung des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionswege für die CD4⁺ T-Zellen deutlicher zu erkennen als für die CD8⁺ T-Zellen.

Als Nächstes stellte sich die Frage, ob eine zusätzliche Blockade des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges auf Seiten des Liganden durch anti-PD-L1 mAb, die IFN γ -Produktion der PD-1 supprimierten Zellen weiter erhöhen würde, wie dies im Mausmodell der Fall war.

SiRNA-transduzierte 1D3 TCR tg T-Zellen wurden daher mit Mel MTO IFN γ in der Gegenwart von anti-PD-L1 mAb oder einer Isotyp-Kontrolle stimuliert. Es stellte sich heraus, dass für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die siRNA-hu1 transduziert waren, die IFN γ -Produktion durch Zugabe des blockierenden Antikörpers nicht weiter erhöht werden konnte (Abb. 35). Im Fall der T-Zellen, die keine siRNA oder siRNA-shuffle erhalten hatten, erreichten die Zellen bei Zugabe von anti-PD-L1 mAb nahezu die selben Werte, wie die siRNA-hu1 transduzierten T-Zellen.

Die Suppression der PD-1 Oberflächenexpression auf 1D3 TCR tg CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, führte zu einer deutlich verbesserten Zytokinproduktion. Zudem ist die Unterbrechung des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges durch die Reduktion der Oberflächenexpression des PD-1 Rezeptors auf den T-Zellen sehr effektiv, so dass eine zusätzliche Blockade des Liganden mittels mAb kaum einen weiteren Vorteil bringt.

Durch die CD8⁺ 1D3 TCR tg T-Zellen in den für CD4⁺ Zellen angereicherten Kulturen ergab sich die Möglichkeit, zu überprüfen, ob die Anwesenheit von PD-1 supprimierten T-Helfer-Zellen (CD4⁺) einen Einfluss auf die zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) in der Kultur hatte. Es stellt sich heraus, dass sich die CD8⁺ T-Zellen mit und ohne CD4⁺ T-Zellen identisch verhielten (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte IFN γ Produktion der PD-1 supprimierten CD8⁺ T-Zellen ist daher ausschließlich auf die Reduktion der PD-1 Expression auf den Zellen selbst zurückzuführen.

Um die IFN γ Produktion der Zellen über einen längeren Zeitraum zu überprüfen, und um eventuelle quantitative Effekte zu untersuchen, wurde für die CD8⁺ T-Zellen zusätzlich ein IFN γ ELISA durchgeführt. Bei diesem Versuchsansatz konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen PD-1 supprimierten und nicht-supprimierten T-Zellen festgestellt werden. Auch die Zugabe des blockierenden anti-PD-L1 mAbs hatte keinen Einfluss (Abb. 36).

4.2.3.2 Zytotoxizität PD-1 supprimierter humaner T-Zellen

Um die Zytotoxizität der PD-1 supprimierten T-Zellen zu untersuchen, wurde der so genannte LAMP-Test durchgeführt. Bei diesem Versuchsansatz wird nach vier Stunden Inkubation mit den entsprechenden Tumorzellen die Oberflächenexpression des Proteins LAMP-1 (CD107a) auf den tumorspezifischen T-Zellen bestimmt.

Für die Untersuchung der zytotoxischen Aktivität der unterschiedlichen T-Zellgruppen wurde derselbe Versuchsaufbau gewählt wie für die intrazelluläre IFN γ Färbung.

Im LAMP-Test konnte bei Stimulation mit Mel MTO INF γ eine deutlich erhöhte Oberflächenexpression des LAMP-Proteins für die siRNA-hu1-GFP transduzierten CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden, verglichen mit den siRNA-shuffle-GFP transduzierten Zellen. Für die CD8⁺ T-Zellen fiel der Effekt der PD-1 Suppression wiederum geringer aus.

Parallel zu diesen Ansätzen wurde die Stimulation mit Mel MTO INF γ in Gegenwart von anti-PD-L1 mAb durchgeführt. Im Falle des LAMP-Test konnte eine geringfügige

Steigerung der LAMP-Expression auf siRNA-hu1 transduzierten 1D3 TCR tg T-Zellen bei Zugabe des blockierenden Antikörpers festgestellt werden.

Im Fall der 1D3 TCR tg T-Zellen, die keine siRNA oder siRNA-shuffle erhalten hatten, wurden bei Zugabe von anti-PD-L1 mAb nahezu die selben Werte, wie für die siRNA-hu1 transduzierten T-Zellen erreicht (Abb. 37).

Alles in allem spiegelt der LAMP-Test die Ergebnisse der IFN γ Intrazellulärfärbung wieder und ist vielleicht sogar etwas empfindlicher in Hinsicht auf einen additiven Effekt von PD-1 Suppression und PD-L1 Blockade.

Blank *et al.* führten für ihr TCR-Tumormodell einen klassischen *Chrome Release Assay* mit CD8⁺ T-Zellen durch. Bei Zugabe des blockierenden anti-PD-L1 mAb konnten sie eine Steigerung der spezifischen Lyse erreichen. Rubio *et al.*, die den hier verwendeten LAMP-Test entwickelten, untersuchten die Korrelation zwischen spezifischer Lyse und LAMP-Oberflächenexpression und fanden, dass die Ergebnisse dieser beiden unterschiedlichen Assays gut korrelierten (Rubio, Stuge et al. 2003). Aus diesem Grund ist es unter Vorbehalt möglich, die Ergebnisse aus einem *Chrome Release Assay* und einem LAMP-Test miteinander zu vergleichen.

Der Einfluss der Unterbrechung des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges ist für CD4⁺ T-Zellen wesentlich deutlicher zu erkennen. Die Zugabe von anti-PD-L1 mAb und die Reduktion der PD-1 Oberflächenexpression durch siRNA-hu1-GFP führen zu einer vergleichbaren Steigerung der LAMP-Expression bei Stimulation mit Mel MTO INF γ . Zumindest im Fall der CD4⁺ T-Zellen zeigt die siRNA-hu1 die gleiche Effektivität, die durch die Blockade durch anti-PD-L1 mAb erreicht werden kann.

Abschließend lässt sich sagen, dass die stabile Suppression von PD-1 mittels siRNA sowohl im murinen als auch im humane System die T-Zellaktivität in Gegenwart des Liganden PD-L1 erhöht. Für das 2C Mausmodell konnte *in vitro* erhöhte INF γ Produktion und Proliferation der PD-1 siRNA transduzierten T-Zellen nachgewiesen werden. Die Zugabe von anti-PD-L1 mAb führte zu einem weiteren Anstieg der INF γ Produktion, was darauf schließen lässt, dass die mit siRNA erreichte Suppression von PD-1 im Maussystem unvollständig war.

Im humanen System konnte eine deutlich bessere siRNA Sequenz identifiziert werden. Hier zeigte sich, dass durch Reduktion der PD-1 Expression mittels siRNA die INF γ Produktion und die LAMP-Expression von tumorspezifischen T-Zellen in Gegenwart von PD-L1 erhöht werden kann. Die Zugabe von anti-PD-L1 mAb führte im LAMP-

Test zu einer weiteren Steigerung der LAMP-Expression. Generell erwiesen sich die CD4⁺ T-Zellen als empfindlicher für die Unterbrechung des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges als CD8⁺ T-Zellen.

4.3 Ausblick

Der adoptive Transfer tumorspezifischer T-Zellen ist ein viel versprechender Ansatz im Feld der Tumormimmuntherapien. In verschiedenen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass tumorspezifische T-Zellen, die in einen Patienten transferiert wurden, in der Lage sind, zum Tumor zu gelangen und diesen auch zu infiltrieren. Eine lang anhaltende Tumorkontrolle findet allerdings nur in einigen Fällen statt. Die mangelnde Aktivität der tumorspezifischen T-Zellen im *Tumor Environment* wird auf die Entstehung von Tumorzellen mit einem *Tumor - Escape* Phänotyp zurückgeführt. Ein Aspekt des *Tumor - Escape* Phänomens ist die Expression koinhibitorischer Liganden auf den Tumorzellen, wodurch T-Zellen negativ reguliert werden. Eine weitere Modulation durch die Blockade koinhibitorischer Moleküle könnte daher das Ansprechen der *non responding* Patienten verbessern.

Antikörper, die gegen die koinhibitorischen Rezeptoren auf den T-Zellen gerichtet sind (z.B. CTLA-4, PD-1) führen zu einer systemischen Blockade der regulatorischen Signaltransduktionswege, wodurch es allerdings zu Autoimmun-Nebeneffekten kommen kann (Korman, Peggs et al. 2006). Die autoimmunen Nebenwirkungen können dabei entweder durch nicht-tumorspezifische T-Zellen, die ein körpereigenes Selbstantigen erkennen und deren periphere Toleranz durch die Antikörper-Blockade gebrochen wurde, oder aber durch tumorspezifische T-Zellen, die ein körpereigenes TAA erkennen, verursacht werden. Indem wir versuchten, eine Methode zu finden, die die systemische Unterbrechung des PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweges vermeidet, ließe sich zumindest die erste Ursache der Autoimmun-Nebeneffekte ausschalten.

Die retrovirale Transduktion von T-Zellen mit hochaffinen T-Zellrezeptoren gegen bekannte TAA ist eine Möglichkeit zur Gewinnung tumorspezifischer T-Zellen, die bereits in klinischen Studien getestet wurde bzw. demnächst in unserem Institut (NKI, Amsterdam) getestet wird (Morgan, Dudley et al. 2006; Rosenberg, Restifo et al. 2008). Auch wenn diese Therapien in einigen Patienten Erfolge zeigen, so ist die allgemeine Erfolgsrate noch immer enttäuschend.

Der Einsatz von siRNA, die gegen Rezeptoren der negativen Kostimulation der T-Zellen, z.B. PD-1, gerichtet sind, verschafft den tumorspezifischen T-Zellen einen Vorteil beim Angriff auf Tumorzellen, die die korrespondierenden Liganden, z.B. PD-L1 exprimieren. Unsere *in vitro* Experimente, vor allem mit humanen T-Zellen, zeigten, dass die Effektivität der siRNA durchaus mit der Effektivität von blockierendem anti-PD-L1 mAb vergleichbar war.

Problematisch erwies sich jedoch die niedrige Doppeltransduktionseffizienz. Hier könnte die Schaffung eines retroviralen Plasmids, das gleichzeitig die Information der alpha- und beta-Kette des TAA-spezifischen T-Zellrezeptors und eine oder auch mehrere siRNA-Sequenzen, gegen einen oder mehrere koinhibitorische Rezeptoren, in sich vereint, Abhilfe schaffen. So könnte in einem Transduktionsschritt (mit Transduktionseffizienzen von bis zu 50%) tumorspezifische T-Zellen geschaffen werden, die auf negative Kostimulation weniger empfindlich reagieren.

Tumorzellen finden immer wieder Wege, sich durch verschiedene Mechanismen dem Angriff durch das Immunsystem zu entziehen. Um eine erfolgreiche Immuntherapie gegen Krebserkrankungen zu finden, ist es daher unerlässlich, verschiedene Ansätze und Methoden zu kombinieren. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte Methode der retroviralen Transduktion mit siRNA um die negative Kostimulation von tumorspezifischen T-Zellen zu reduzieren, ist ein weiteres Werkzeug, das im Kampf gegen Krebs eingesetzt werden könnte.

5 Zusammenfassung

Der koinhibitorische PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg reguliert die T-Zellaktivität negativ und ist an der Aufrechterhaltung der peripheren Immuntoleranz beteiligt. Defekte führen im Tiermodell und im Menschen zu Autoimmunerkrankungen. In der Tumorummunologie findet man den Rezeptor PD-1 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten, während der Ligand von zahlreichen Tumorarten exprimiert wird. Tumorspezifische T-Zellen können auf diesem Weg durch Tumoren gehemmt werden. Der PD-1/PD-L1 Signaltransduktionsweg stellt daher einen Ansatzpunkt für Immuntherapien dar. Eine Möglichkeit den Signaltransduktionsweg zu unterbrechen ist der systemische Einsatz blockierender Antikörper, wie sie für den koinhibitorischen Rezeptor CTLA-4 bereits in der Klinik verwendet werden. Der Einsatz von anti-CTLA-4 mAb ist jedoch mit Autoimmun-Nebenwirkungen verbunden, da die periphere Toleranz gebrochen wird.

Um Autoimmun-Nebenwirkungen einer systemischen Blockade zu vermeiden, wurde RNAi durch retrovirale Transduktion mit siRNA-Vektoren als Methode gewählt, den Signaltransduktionsweg ausschließlich auf tumorspezifischen T-Zellen herunterzuregulieren.

Im 2C TCR tg Mausmodell konnten durch Transduktion mit siRNA-Vektoren die Effektorfunktionen (Zytokinproduktion, Proliferation) der T-Zellen gegen PD-L1 exprimierende Tumorzellen verbessert werden.

Im humanen System wurde der MART-spezifische 1D3 TCR, der in Kürze in einer klinischen Phase I Studie zum Einsatz kommen wird, verwendet, um TAA-spezifische T-Zellen zu generieren. Durch Doppeltransduktion der T-Zellen mit dem 1D3 TCR und einer gegen PD-1 gerichteten siRNA, wurden MART-spezifische T-Zellen mit PD-1 *knock-down* geschaffen.

Die Expressionshemmung von PD-1 in 1D3 TCR transduzierten T-Zellen führte zu stärkerer Zytokinproduktion und lytischer Aktivität der T-Zellen in Gegenwart von PD-L1. Dieser Effekt ließ sich besonders ausgeprägt in CD4⁺ T-Zellen beobachten.

Im Anschluss an die zur Zeit geplanten Studie zu retroviral eingebrachtem 1D3 TCR könnte in einer Folgestudie die Doppeltransduktion mit siRNA getestet werden, mit dem Ziel, die klinische Ansprechrate zu verbessern, ohne dabei die Autoimmunität, die durch nicht TAA-spezifische T-Zellen vermittelt wird zu verschärfen.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AICD	activation induced cell death
APC	Antigen presenting cell
BTLA	B and T lymphocyte attenuator
CCL22	Chemokine (C-C motif) ligand 22,
CCR4	Chemokine (C-C motif) receptor 4
CD	Cluster of differentiation
cFLIP	cellular FLICE-inhibitory protein
CMV	Cytomegalievirus
CR	Conserved region
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4</i>
DC	Dendritic cell
dsRNA	Doppelsträngige RNA
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
Env	Envelope
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FADD	Fas-associated protein with Death Domain
FAM	Fluorescein-acetoxymethyl
FasL	Fas-Ligand
Gag	Gruppenantigene
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony- stimulating factor
gp100	Glykoprotein 100
ICOS	Inducible costimulator
IFN	Interferon
IgV	Immunglobulin, variable Domäne
IL	Interleukin
IVC	individually ventilated cages
KIR	Killer inhibitory receptor
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	Monoclonal antibody
MART-1	Melanoma Antigen Recognized by T-cells
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence

	B
MMuLV	Moloney murine leukemia virus
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NFATc1	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen, zytoplasmatisch, calcineurin-abhängig-1
NKG2D	Natural killer group 2D
NKI	Nederlands Kanker Instituut (Netherlands Cancer Institute)
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	Non obese diabetic
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1	Programmed death receptor-1
PD-L1	Programmed death receptor-1 ligand-1
PD-L2	Programmed death receptor-1 ligand-2
PHA	Phytohämagglutinin
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbolmyristatazetat
RAG	Recombination activation gene
RNAi	RNA Interferenz
Runx1	Runt related transcription factor 1
SCID	Severe combined immunodeficiency
SH2	Src homology domain 2
SHP-1/2	SH2-Domäne enthaltende Tyrosinphosphatase 1/2
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Short interfering RNA
SLE	Systemischen Lupus erythematodes
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPF	specific pathogen free
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAP	Transporter assoziiert mit Antigenpräsentation
TCR	T cell receptor
TGF- β	Transforming growth factor- β
TIL	Tumour infiltrating lymphocytes
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg	Regulatorische T-Zelle
WT	Wildtyp
ZAP-70	Zeta-assoziiertes Protein von 70 kDa
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2 Plasmide und siRNA-Moleküle

6.2.1 Plasmide

pLeGFP-N1 (BD bioscience, Clontech)

pmaxGFP (Amaxa)

pSUPER.retro.puro (Oligoengine)

pSUPER.retro.neo.GFP (Oligoengine)

pMP71-ID3hmcys (Dietrich, Le Gal et al. 2003):

1-561 5' LTR MPSV/SFFV
3031-3620 3' LTR MPSV

SD 622-635
SA 1082-1095
Packaging single 636-1081

1D3 Alfa 2090-2899 with 180 T>C
1D3Alfa
V human alfa 2.1
J human alfa 45
C Mouse alfa

1D3 Beta 1103-2023 with 191 S>C
1D3Beta
V human beta 14.1
J human beta 2.5
C mouse beta

P2A Linker 2024-2089

Ori 4054-4727

Amp Gene Rev/com 4872-5732

CTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTT
CAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCAAACAGGATATCTGTGGTAA
GCAGTTCCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCAAACAG
GATATCTGTGGTAAAGCAGTTCCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGC
GGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTG
AAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCT
TCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGCGCCAGTCCCTCCGAT
AGACTGCTCGCCCGGTACCCGTATCCCAATAAAGCCTCTTGCTGTTTGCATCCGAATCGT
GGACTCGCTGATCCTTGGGAGGGTCTCCTCAGATTGATTGACTGCCACCTCGGGGGTCTTTC

ATTTGGAGGTTCCACCGAGATTTGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCCCCGCCGGG
AGGTAAGCTGGCCAGCGGTTCGTTTCGTGTCTGTCTCTGTCTTTGTGCGTGTGGTGTGCCGGCAT
CTAATGTTTGCCTGCGTCTGTACTAGTTGGCTAACTAGATCTGTATCTGGCGGTCCCGCGG
AAGAAGTACGAGTTCGTATTCCCGGCCGACCCCTGGGAGACGTCCAGCGGCCTCGGG
GGCCCGTTTTGTGGCCATTCTGTATCAGTTAACCTACCCGAGTCGGACTTTTTGGAGCTCCG
CCACTGTCCGAGGGGTACGTGGCTTTGTTGGGGACGAGAGACAGAGACTTCCCGCCCC
GTCTGAATTTTTGCTTTTCGGTTTTACGCCGAAACCGCGCCGCGCTTTGTCTGTGCAGCAT
CGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATTAGCTCGACAAAGTT
AAGTAATAGTCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCAGCCGCCATGGCCCCGCGGTGCTGG
GCTACGTGGTGTGTGCTGCTGGGAGCCGGCCCTCTGGAGGCCAGGTGACCCAGAACC
AGATACCTGATCACCGTGACCGGCAAGAAGCTGACCGTGACCTGCCAGAACATGAACC
ACGAGTACATGAGCTGGTACAGACAGGACCCCGCCCTGGGCTGAGACAGATCTACTACAG
CATGAACGTGGAGGTGACCGACAAGGGCGACGTGCCCGAGGGCTACAAGGTGTCCCGGAAG
GAGAAGAGGAACTTCCCCCTGATCCTGGAGAGCCCCAGCCCCAACAGACCAGCCTGTACTT
CTGTGCCAGCAGCCTGAGCGGCACCACCGCCGACGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCAGA
CTGCTGGTGTGGAGGAGGACCTGAGGAACGTGACCCCCCAAGGTGTCCCTGTTTCGAGCC
CAGCAAGGCCGAGATCGCCAACAAGCAGAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGGCCAGGGGCTTC
TTCCCCGACCACGTGGAGCTGTCTTGGTGGGTGAACGGCAAGGAGGTGCACAGCGGCCTGT
GCACCGACCCCCAGGCCTACAAGGAGAGCAACTACAGCTACTGCCTGAGCAGCAGGCTGAG
AGTGAGCGCCACCTTCTGGCACAACCCAGGAACCACTTCCGCTGTCAGGTGCAGTTCCACG
GCCTGAGCGAGGAGGACAAGTGGCCCGAGGGCAGCCCCAAGCCCGTGACCCAGAACATCAG
CGCCGAGGCCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCATCACCAGCGCCAGCTACCACCAGGGCGTG
CTGTCCGCCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACACTGTACGCCGTGCTGGT
GTCCGGCCCTGGTGTGATGGCCATGGTGAAGAAGAAGAACAGCGGCAGCGGCCGCCACCAAC
TTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAAAACCCTGGGCCCATGATGAAGAGCC
TGAGGGTGTGCTGGTGTGATCCTGTGGCTGCAGCTGTCCTGGGTGTGGAGCCAGCAGAAGGA
GGTGGAGCAGAATAGCGGCCCTCTGAGCGTGCCCCGAGGGCGCCATCGCCAGCCTGAACTGT
ACCTACAGCGACAGAGGCAGCCAGAGCTTCTTCTGGTACAGGCAGTACAGCGGCAAGAGCC
CCGAGCTGATCATGTTTATCTACAGCAACGGCGACAAGGAGGACGGCAGATTCACCGCCCA
GCTGAACAAGGCCAGCCAGTACGTGTCCCTGCTGATCAGAGACAGCCAGCCTAGCGATAGC
GCCACCTACCTGTGTGCCCTGGGCGGAGGAGCCGACGGCCTGACCTTCGGCAAGGGCACCC
ACCTGATCATCCAGCCCCGACATCCAGAACCCCGAGCCCCCGCTGTACCAGCTGAAGGACCCC
AGAAGCCAGGACAGCACCCCTGTGCCTGTTACCCGACTTCGACAGCCAGATCAACGTGCCCA
AGACCATGGAGAGCGGCACCTTCATCACCAGACAAGTGCCTGCTGGCATGAAGGCCATGGA
CAGCAAGAGCAACGGCGCCATCGCCTGGTCCAACCAGACCAGCTTCACATGCCAGGACATC
TTCAAGGAGACCAACGCCACCTACCCCGACGCGACGTGCCCTGCGACGCCACCCTGACCG
AGAAGAGCTTCGAGACCGACATGAACCTGAACTTCCAGAACCTGAGCGTGATGGGCCTGAG
AATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGAGGCTGTGGAGCAGCT
GAATTCGGATCCAAGCTTAGGCCTGCTCGCTTTCTTGGTGTCCCATTCTATTAAGGTTCTCT
TTGTTCCCTAAGTCCAATACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATT
CTGCCTAGCGCTAAGCTTAACACGAGCCATAGATAGAATAAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAG
AAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCAT
TTTGCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACA
GAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTC
AGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGT
TCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTT
TCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTCCCCAAGGACCTGAAATGACCTGTGCCTTAT
TTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAAT
AAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCCTCCGATAGACTGCGTCCCGGGTA
CCCGTGTCTCAATAAACCCCTCTTGACGTTGCATCCGACTCGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGA
GGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTGCCACCTCGGGGGTCTTTCACTTCGAGCAGCTTGGCGT
AATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATAC
GAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT
TGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAA
TCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACT
GACTCGTGCCTCGGTTCGTTTCGGTTCGCGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGGCGTAAT
ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAATGTGAGCAAAAGGCCAGCA
AAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCCGCTTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTG
ACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG
ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTAC

CGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAG
 GTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTT
 AGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGAC
 TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTG
 CTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATC
 TGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACA
 AACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAG
 GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCA
 CGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
 AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAAT
 GCTTAATCAGTGTAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATAGTTGCCTGAC
 TCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATG
 ATACCGCAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAA
 GGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGC
 CGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTAC
 AGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTACAGTCCCGTTCCCAACGATC
 AAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGA
 TCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAT
 TCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCA
 TTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATAC
 CGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAAC
 TCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGA
 TCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGC
 CGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAAT
 ATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGA
 AAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGA
 AACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCG
 CGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGTCCCGGAGACGGTACAGCT
 TGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCG
 GGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATG
 CGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCAT
 TCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTG
 GCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAC
 GACGTTGTA AACGACGGCCAGTGAATTAGTACT

6.2.2 siRNA-Moleküle

mu: murines PD-1

hu: humanes PD-1

Um Oligonukleotide für die Integration in pSUPER-Vektoren zu erhalten, siehe Kapitel 2.2.5.10. Die 3'-Überhänge der doppelsträngigen siRNAs (Kleinbuchstaben) gehören nicht zur Sequenz und müssen für die Integration in Oligonukleotide weggelassen werden. siRNA-mu1 bis -mu3, sowie siRNA-hu1 – hu3 sind *Silencer® predesigned siRNA* der Firma Ambion.

siRNA	Position	Sequenz (sense)	Sequenz (anti-sense)
mu1	1326 bp downstream START	5'- GGU GGG AAA UUC GUA GAC Utt -3'	5'- AGU CUA CGA AUU UCC CAC Ctg -3'
mu2	1041 bp downstream START	5'- GCU CAC UUC AGG UUU ACC Att -3'	5'- UGG UAA ACC UGA AGU GAG Ctc -3'
mu3	617 bp downstream START	5'- GCA AGG ACG ACA CUC UGA Att -3'	5'- UUC AGA GUG UCG UCC UUG Ctt -3'
mu4	34bp upstream START	5'-GCU ACU GAA GGC GAC ACU Gtt-3'	5'- CAG TGT CGC CTT CAG TAG Ctt-3'
mu5	441bp downstream START	5'-AUC CUG GAG ACC UCA ACA Att-3'	5'-UUG UUG AGG UCU CCA GGA Utt-3'
mu6	573bp downstream START	5'- GUC UUC UGC UCA ACA AGU A-tt-3'	5'-UAC UUG UUG AGC AGA AGA Ctt-3'
mu7	580bp downstream START	5'-GCU CAA CAA GUA UGU CAG Att-3'	5'-UCU GAC AUA CUU GUU GAG Ctt-3'
mu8	46bp downstream START	5'-CAC CAU UGU CUU CAC UGA Att-3'	5'-UUC AGU GAA GAC AAU GGU Gtt-3'
mu9	846bp downstream START	5'-CAU UGU UCU UGG CCU CUU Utt-3'	5'-AAA GAG GCC AAG AAC AAU Gtt-3'
mu10	45bp upstream START	5'-AAG AGG AGA CUG CUA CUG Att-3'	5'-UCA GUA GCA GUC UCC UCU Utt-3'
hu1	292 bp downstream START	5'- AGG CGC AGA UCA AAG AGA Gtt -3'	5'- CUC UCU UUG AUC UGC GCC Utg -3'
hu2	196 bp downstream START	5'- AAC UGG UAC CGC AUG AGC Ctt -3'	5'- GGC UCA UGC GGU ACC AGU Uta-3'
hu3	177 bp downstream STOP	5'- GGA CUC AUG UCU CAA UGC Ctt -3'	5'- GGC AUU GAG ACA UGA GUC Ctg -3'
hu4	215bp downstream START	5'-CGC CAC CUU CAC CUG CAG Ctt-3'	5'-GCU GCA GGU GAA GGU GGC Gtt-3'
hu5	1331bp downstream START	5'-CUU GGG GGC UGG UUG GAG Att-3'	5'-UCU CCA ACC AGC CCC CAA Gtt-3'
hu6	1503bp downstream START	5'- GGU CAG AAG AGC UCC UGG Ctt-3'	5'-GCC AGG AGC UCU UCU GAC Ctt-3'
Shuffle	-	5'-UCC GUC UAG AGC UUA UAC Ctt-3'	5'-GGU AUA AGC UCU AGA CGG Att-3'

6.3 Puffer und Medien

6.3.1 Zellkulturmedien

Zellkulturmedium für murine Zellen

D-MEM (Gibco)	500 ml
FCS (inaktiviert, PAA)	50 ml
2'-Mercaptoethanol (50 ml PBS + 84µl 2'-Mercaptoethanol; Sigma-Aldrich)	1 ml
MOPS-Puffer (1M, pH 7,2; Fluka)	5 ml
<i>Yellow Mix</i> mit L-Arginin, Folsäure, L-Asparagin (1 l PBS mit 11,6 g L-Arginin, 0,6 g Folsäure, 3,6 g L-Asparagin, Sigma-Aldrich)	5 ml
Pen/Strep (10000U/ml Penicillin/ 10mg/ml Streptomycin, Gibco)	5 ml
Glutamin (200mM, Biochrom AG)	5 ml

Zellkulturmedium für humane Melanomzelllinien

RPMI (Gibco)	500 ml
FCS (inaktiviert, greiner bio one)	50 ml
Pen/Strep (50000U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, Roche)	1 ml

Zellkulturmedium für humane PBLs (Ijssel's Medium (Yssel, De Vries et al. 1984))

IMDM (Gibco)	500ml
Normales Humanes Serum (NHS; Invitrogen)	10ml
Pen/Strep (50000U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, Roche)	1 ml
Ijssel's supplement	25ml

Ijssel's supplement:

IMDM	500 ml
BSA (Albumin Fraktion V, Roth)	25 g
Ethanolamine (Merck)	20 µl
Insulin (Sigma)	50 mg
Transferin (Roche)	400 mg
Linolsäure	20 µl
Ölsäure	20 µl

Einfriermedium:

FCS (inaktiviert, greiner bio one)	40 ml
DMSO (Sigma)	10 ml
Zellmedium je nach Zellart	50 ml

LB-Medium (*E.coli*)

1% Trypton

0,5% Hefeextrakt

1% NaCl

In Aqua dest. aufgelöst

6.3.2 Puffer und Lösungen**PBS:** Dulbecco's PBS, without Ca²⁺ and Mg²⁺ (PAA)**FCS:** hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 min (PAA)**DMSO:** Dimethyl Sulfoxid (Sigma-Aldrich)**Ficoll:** Pancoll human (PAN Biotec)**Aufreinigungspuffer Dynal:** D-MEM + 10% FCS und PBS + 0,1% BSA**Aufreinigungspuffer SpinSep:** D-MEM + 2% FCS**FACS-Puffer (Regensburg):** PBS + 2% FCS + 0,02% Natriumazid (NaN₃) (Merck)**FACS-Puffer (Amsterdam):** PBS + 2% BSA + 0,02% Natriumazid (NaN₃)**Saponin-Puffer:** PBS + 0,1% Saponin (Fluka) + 0,1% BSA**Formaldehyd:** 37% Lösung in Wasser (Sigma-Aldrich)**TAE-Puffer (50x)**

242,3g (2M) Tris

20,5 g (250mM) Natriumacetat

18,5 g (50 mM) EDTA

Mit Eisessig auf pH 7,8 einstellen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Loading Dye (10x): 100mM EDTA, pH 8,0

60% Glycerin

0,25% (w/v) Bromphenolblau

0,25% (w/v) Xylencyanol

ACK-Lyse-Puffer

8,29 g Ammoniumchlorid (Merck)

1 g Kaliumhydrogencarbonat (Fluka)

37,2 g Titriplex III (Merck)

In 800ml H₂O auflösen und mit 1N HCl auf pH 7,2 einstellen, auf 1000 ml auffüllen.

ELISA:

Coating-Puffer: 0,1M NaHCO₃ (Merck)

Waschpuffer: PBS + 0,05% TritonX-100 (Sigma-Aldrich)

TMB-Puffer: 0,5M Na₂HPO₄ (Merck)

0,5M Zitronensäure (Merck)

In H₂O dest., pH 5,0

TMB-Substratlösung: TMB-Tablette (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine dihydrochloride, Sigma-Aldrich), gelöst in 12ml TMB-Puffer + 10µl H₂O₂

6.4 Verwendete Software und Internetseiten

FlowJo (TreeStar, Inc., Ashland, OR)

TotalLab (TL) 100 (Biosystematica, Wales, UK)

Signaplot 10.0 (Systat Software, San Jose, USA)

Excel (Microsoft)

<http://sfold.wadsworth.org/> (Sfold software)

6.5 Verbrauchsmaterial und Geräte

6.5.1 Verbrauchsmaterial

Pipette, Zellkulturflaschen und Zellkulturplatten wurden über CorningCostar bezogen, soweit nicht anders angegeben.

6.5.2 Geräte

Sterilbank LaminaAir HB2448 (Heraeus)

Brutschrank Heraeus 6000 (Heraeus)

Zentrifuge Megafuge 3.0R (Heraeus)

Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus)

FACS: FACScalibur (BD Pharmingen)

Sorter: FACSaria (BD Pharmingen)

Mikroskop: Axioskop 2 Plus (Zeiss)

Nanodrop (Thermo Scientific)

6.6 Anbieterverzeichnis

Abbott	Wiesbaden
Amersham Biosciences	Buckinghamshire, UK
BD Pharmingen	Heidelberg/ San Diego, CA
Biochrom AG	Berlin
CellSystems	St. Katharinen
Corning Costar	New York, USA
Dianova	Hamburg
Ebioscience	San Diego, CA
Fluka	Seelze
Gen-Probe Inc.	San Diego, CA
Gibco, Invitrogen	Karlsruhe
Greiner	Frickenhausen
Hartmann Analytic	Braunschweig
Heraeus	Hanau
Invitrogen	Karlsruhe
Invitrogen Dynal	Oslo, Norwegen
Leica	Wetzlar
Medac	Hamburg
Merck	Darmstadt
Minvera Biolabs	Berlin
Novartis	Arnhem
PAA	Linz, Österreich

PAN Biotech	Aidenbach
Perkin Elmer Life Sciences	Boston, USA
PromoKine	Heidelberg
R&D Systems	Minneapolis, USA
Roche Applied Sciences	Mannheim
Roth	Karlsruhe
Sigma-Aldrich	Steinheim
Terumo	Leuven, Belgien
Thermo Scientific	Waltham, MA
TIBmolbiol	Berlin
Zeiss	Jena

7 Literaturverzeichnis

- (1997). "Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials: Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group." *J Natl Cancer Inst* **89**(21): 1616-20.
- Abad, J. L., F. Serrano, et al. (2002). "Single-step, multiple retroviral transduction of human T cells." *J Gene Med* **4**(1): 27-37.
- Abbas, A. K. and A. H. Lichtman (2005). *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, Elsevier Saunders.
- Agata, Y., A. Kawasaki, et al. (1996). "Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes." *Int Immunol* **8**(5): 765-72.
- Algarra, I., A. Collado, et al. (1997). "Altered MHC class I antigens in tumors." *Int J Clin Lab Res* **27**(2): 95-102.
- Andreola, G., L. Rivoltini, et al. (2002). "Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles." *J Exp Med* **195**(10): 1303-16.
- Ansari, M. J., A. D. Salama, et al. (2003). "The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice." *J Exp Med* **198**(1): 63-9.
- Arai, H., D. Gordon, et al. (1997). "Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13862-7.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. (2003). "CD4+CD25+ regulatory cells from human peripheral blood express very high levels of CD25 ex vivo." *Novartis Found Symp* **252**: 67-88; discussion 88-91, 106-14.
- Barber, D. L., E. J. Wherry, et al. (2006). "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection." *Nature* **439**(7077): 682-7.
- Bauer, S., V. Groh, et al. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." *Science* **285**(5428): 727-9.
- Belli, F., A. Testori, et al. (2002). "Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings." *J Clin Oncol* **20**(20): 4169-80.
- Bennett, F., D. Luxenberg, et al. (2003). "Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses." *J Immunol* **170**(2): 711-8.
- Berger, R., R. Rotem-Yehudar, et al. (2008). "Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies." *Clin Cancer Res* **14**(10): 3044-51.
- Blackburn, S. D., H. Shin, et al. (2009). "Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection." *Nat Immunol* **10**(1): 29-37.
- Blank, C., I. Brown, et al. (2003). "Absence of programmed death receptor 1 alters thymic development and enhances generation of CD4/CD8 double-negative TCR-transgenic T cells." *J Immunol* **171**(9): 4574-81.
- Blank, C., I. Brown, et al. (2004). "PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells." *Cancer Res* **64**(3): 1140-5.
- Blank, C., J. Kuball, et al. (2006). "Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro." *Int J Cancer* **119**(2): 317-327.

- Brahmer, J. R., S. Topalian, et al. (2008). "Safety and activity of MDX-1106 (ONO-4538), an anti-PD-1 monoclonal antibody, in patients with selected refractory or relapsed malignancies." *J Clin Oncol* **26**(15S (May 20 Supplement)): Abstract 3006.
- Brown, J. A., D. M. Dorfman, et al. (2003). "Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production." *J Immunol* **170**(3): 1257-66.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards, et al. (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." *Science* **296**(5567): 550-3.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." *Prog Exp Tumor Res* **13**: 1-27.
- Carter, L. L., M. W. Leach, et al. (2007). "PD-1/PD-L1, but not PD-1/PD-L2, interactions regulate the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **182**(1-2): 124-34.
- Chappell, D. B., T. Z. Zaks, et al. (1999). "Human melanoma cells do not express Fas (Apo-1/CD95) ligand." *Cancer Res* **59**(1): 59-62.
- Chemnitz, J. M., R. V. Parry, et al. (2004). "SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation." *J Immunol* **173**(2): 945-54.
- Chen, J., H. N. Eisen, et al. (2003). "A model T-cell receptor system for studying memory T-cell development." *Microbes Infect* **5**(3): 233-40.
- Chen, J. J., Y. Sun, et al. (1998). "Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L)." *Science* **282**(5394): 1714-7.
- Chen, L., P. McGowan, et al. (1994). "Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity." *J Exp Med* **179**(2): 523-32.
- Cheng, X., Z. Zhao, et al. (2007). "The PD-1/PD-L pathway is up-regulated during IL-12-induced suppression of EAE mediated by IFN-gamma." *J Neuroimmunol* **185**(1-2): 75-86.
- Coulie, P. G., V. Karanikas, et al. (2001). "A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10290-5.
- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med* **10**(9): 942-9.
- Davis, H. E., M. Rosinski, et al. (2004). "Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation." *Biophys J* **86**(2): 1234-42.
- Day, C. L., D. E. Kaufmann, et al. (2006). "PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression." *Nature* **443**(7109): 350-4.
- de Paus, R. A., D. van de Wetering, et al. (2008). "IL-23 and IL-12 responses in activated human T cells retrovirally transduced with IL-23 receptor variants." *Mol Immunol* **45**(15): 3889-95.
- De Smedt, T., M. Van Mechelen, et al. (1997). "Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function." *Eur J Immunol* **27**(5): 1229-35.
- de Vries, T. J., A. Fourkour, et al. (1997). "Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human

- melanoma cell lines and in human melanocytic lesions." Cancer Res **57**(15): 3223-9.
- Dietrich, P. Y., F. A. Le Gal, et al. (2003). "Prevalent role of TCR alpha-chain in the selection of the preimmune repertoire specific for a human tumor-associated self-antigen." J Immunol **170**(10): 5103-9.
- Dong, H., S. E. Strome, et al. (2003). "Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis." J Clin Invest **111**(3): 363-70.
- Dong, H., S. E. Strome, et al. (2002). "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." Nat Med **8**(8): 793-800.
- Doran, T., H. Stuhlmiller, et al. (1997). "Oncogene and cytokine expression of human colorectal tumors responding to immunotherapy." J Immunother **20**(5): 372-6.
- Dranoff, G. (2004). "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy." Nat Rev Cancer **4**(1): 11-22.
- Dranoff, G., E. Jaffee, et al. (1993). "Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3539-43.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2005). "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." J Clin Oncol **23**(10): 2346-57.
- Dyall, J., J. B. Latouche, et al. (2001). "Lentivirus-transduced human monocyte-derived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes." Blood **97**(1): 114-21.
- Ehrlicher, P. (1909). "Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung." Ned. Tijdschr. Geneesk. **5**: 273-290.
- Fife, B. T., I. Guleria, et al. (2006). "Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway." J Exp Med **203**(12): 2737-47.
- Finger, L. R., J. Pu, et al. (1997). "The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors." Gene **197**(1-2): 177-87.
- Fontana, A., K. Frei, et al. (1989). "Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice." J Immunol **143**(10): 3230-4.
- Freeman, G. J., A. J. Long, et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." J Exp Med **192**(7): 1027-34.
- Fyfe, G., R. I. Fisher, et al. (1995). "Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy." J Clin Oncol **13**(3): 688-96.
- Gajewski, T. F. (1996). "B7-1 but not B7-2 efficiently costimulates CD8+ T lymphocytes in the P815 tumor system in vitro." J Immunol **156**(2): 465-72.
- Gajewski, T. F., F. Fallarino, et al. (2001). "Immunization of HLA-A2+ melanoma patients with MAGE-3 or MelanA peptide-pulsed autologous peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin 12." Clin Cancer Res **7**(3 Suppl): 895s-901s.
- Garrido, F. and I. Algarra (2001). "MHC antigens and tumor escape from immune surveillance." Adv Cancer Res **83**: 117-58.
- Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, et al. (1997). "Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours." Immunol Today **18**(2): 89-95.

- Gartel, A. L. and E. S. Kandel (2006). "RNA interference in cancer." Biomol Eng **23**(1): 17-34.
- Girolomoni, G. and P. Ricciardi-Castagnoli (1997). "Dendritic cells hold promise for immunotherapy." Immunol Today **18**(3): 102-4.
- Gorsch, S. M., V. A. Memoli, et al. (1992). "Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer." Cancer Res **52**(24): 6949-52.
- Grabie, N., I. Gotsman, et al. (2007). "Endothelial programmed death-1 ligand 1 (PD-L1) regulates CD8+ T-cell mediated injury in the heart." Circulation **116**(18): 2062-71.
- Greenwald, R. J., G. J. Freeman, et al. (2005). "The B7 family revisited." Annu Rev Immunol **23**: 515-48.
- Guleria, I., A. Khosroshahi, et al. (2005). "A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance." J Exp Med **202**(2): 231-7.
- Hahne, M., D. Rimoldi, et al. (1996). "Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape." Science **274**(5291): 1363-6.
- Hamanishi, J., M. Mandai, et al. (2007). "Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3360-5.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." Nature **418**(6894): 244-51.
- Hayashi, M., T. Kouki, et al. (2008). "Association of an A/C single nucleotide polymorphism in programmed cell death-ligand 1 gene with Graves' disease in Japanese patients." Eur J Endocrinol **158**(6): 817-22.
- Heemskerk, M. H., R. A. de Paus, et al. (2001). "Dual HLA class I and class II restricted recognition of alloreactive T lymphocytes mediated by a single T cell receptor complex." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6806-11.
- Herr, H. W. (2007). "Age and outcome of superficial bladder cancer treated with bacille Calmette-Guerin therapy." Urology **70**(1): 65-8.
- Hirano, F., K. Kaneko, et al. (2005). "Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity." Cancer Res **65**(3): 1089-96.
- Hornung, M., S. A. Farkas, et al. (2006). "DX5+ NKT cells induce the death of colitis-associated cells: involvement of programmed death ligand-1." Eur J Immunol **36**(5): 1210-21.
- Ichihara, F., K. Kono, et al. (2003). "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers." Clin Cancer Res **9**(12): 4404-8.
- Inman, B. A., T. J. Sebo, et al. (2007). "PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression." Cancer **109**(8): 1499-505.
- Ishida, Y., Y. Agata, et al. (1992). "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death." Embo J **11**(11): 3887-95.
- Iwai, Y., M. Ishida, et al. (2002). "Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12293-7.
- Iwai, Y., S. Terawaki, et al. (2005). "PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells." Int Immunol **17**(2): 133-44.
- Iwai, Y., S. Terawaki, et al. (2003). "PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver." J Exp Med **198**(1): 39-50.

- Jacobs, B. L. and J. O. Langland (1996). "When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA." Virology **219**(2): 339-49.
- Javia, L. R. and S. A. Rosenberg (2003). "CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens." J Immunother **26**(1): 85-93.
- Jorritsma, A., R. Gomez-Eerland, et al. (2007). "Selecting highly affine and well-expressed TCRs for gene therapy of melanoma." Blood **110**(10): 3564-72.
- Keir, M. E., G. J. Freeman, et al. (2007). "PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues." J Immunol **179**(8): 5064-70.
- Keir, M. E., Y. E. Latchman, et al. (2005). "Programmed death-1 (PD-1):PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes." J Immunol **175**(11): 7372-9.
- Keir, M. E., S. C. Liang, et al. (2006). "Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance." J Exp Med **203**(4): 883-95.
- Kessels, H. W., M. C. Wolkers, et al. (2005). "Gene transfer of MHC-restricted receptors." Methods Mol Med **109**: 201-14.
- Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." Nat Immunol **3**(11): 999-1005.
- Kinsella, T. M. and G. P. Nolan (1996). "Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus." Hum Gene Ther **7**(12): 1405-13.
- Kirkwood, J. M., M. H. Strawderman, et al. (1996). "Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684." J Clin Oncol **14**(1): 7-17.
- Konishi, J., K. Yamazaki, et al. (2004). "B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression." Clin Cancer Res **10**(15): 5094-100.
- Kono, K., H. Kawaida, et al. (2006). "CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers." Cancer Immunol Immunother **55**(9): 1064-71.
- Korman, A. J., K. S. Peggs, et al. (2006). "Checkpoint blockade in cancer immunotherapy." Adv Immunol **90**: 297-339.
- Kranz, D. M., S. Tonegawa, et al. (1984). "Attachment of an anti-receptor antibody to non-target cells renders them susceptible to lysis by a clone of cytotoxic T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(24): 7922-6.
- Kroner, A., M. Mehling, et al. (2005). "A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis." Ann Neurol **58**(1): 50-7.
- Krupnick, A. S., A. E. Gelman, et al. (2005). "Murine vascular endothelium activates and induces the generation of allogeneic CD4+25+Foxp3+ regulatory T cells." J Immunol **175**(10): 6265-70.
- Kuball, J., M. L. Dossett, et al. (2007). "Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells." Blood **109**(6): 2331-8.
- Latchman, Y. E., S. C. Liang, et al. (2004). "PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10691-6.
- Leach, D. R., M. F. Krummel, et al. (1996). "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade." Science **271**(5256): 1734-6.
- Lee, P., F. Wang, et al. (2001). "Effects of interleukin-12 on the immune response to a multipeptide vaccine for resected metastatic melanoma." J Clin Oncol **19**(18): 3836-47.

- Lee, S. H., Y. A. Lee, et al. (2006). "Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population." *Arthritis Res Ther* **8**(6): R163.
- Letvin, N. L. and B. D. Walker (2003). "Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections." *Nat Med* **9**(7): 861-6.
- Li, N., Y. Wang, et al. (2007). "Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3." *EMBO J* **26**(2): 494-504.
- Liang, S. C., Y. E. Latchman, et al. (2003). "Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses." *Eur J Immunol* **33**(10): 2706-16.
- Liyanaige, U. K., T. T. Moore, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." *J Immunol* **169**(5): 2756-61.
- Lowe, S. W., E. Cepero, et al. (2004). "Intrinsic tumour suppression." *Nature* **432**(7015): 307-15.
- Mackensen, A., B. Herbst, et al. (2000). "Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells." *Int J Cancer* **86**(3): 385-92.
- Mackensen, A., N. Meidenbauer, et al. (2006). "Phase I Study of Adoptive T-Cell Therapy Using Antigen-Specific CD8+ T Cells for treatment of Patients With Metastatic Melanoma." *J Clin Oncol* **24**(31): in press.
- Mackensen, A., H. Veelken, et al. (1997). "Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by immunization with autologous tumor cells and interleukin-2 gene transfected fibroblasts." *J Mol Med* **75**(4): 290-6.
- Madrenas, J., R. H. Schwartz, et al. (1996). "Interleukin 2 production, not the pattern of early T-cell antigen receptor-dependent tyrosine phosphorylation, controls energy induction by both agonists and partial agonists." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9736-41.
- Magnus, T., B. Schreiner, et al. (2005). "Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS." *J Neurosci* **25**(10): 2537-46.
- Maker, A. V., G. Q. Phan, et al. (2005). "Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study." *Ann Surg Oncol* **12**(12): 1005-16.
- McManus, M. T., B. B. Haines, et al. (2002). "Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes." *J Immunol* **169**(10): 5754-60.
- Medema, J. P., J. de Jong, et al. (2001). "Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11515-20.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, et al. (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." *Cell* **68**(5): 869-77.
- Morgan, R. A., M. E. Dudley, et al. (2006). "Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes." *Science* **314**(5796): 126-9.
- Motzer, R. J., J. Bacik, et al. (2002). "Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* **20**(1): 289-96.
- Nakanishi, J., Y. Wada, et al. (2007). "Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers." *Cancer Immunol Immunother* **56**(8): 1173-82.

- Nauts, H. C., G. A. Fowler, et al. (1953). "A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study." Acta Med Scand Suppl **276**: 1-103.
- Naviaux, R. K., E. Costanzi, et al. (1996). "The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses." J Virol **70**(8): 5701-5.
- Nielsen, C., D. Hansen, et al. (2003). "Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes." Tissue Antigens **62**(6): 492-7.
- Nielsen, C., L. Ohm-Laursen, et al. (2005). "Alternative splice variants of the human PD-1 gene." Cell Immunol.
- Nishimura, H., Y. Agata, et al. (1996). "Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes." Int Immunol **8**(5): 773-80.
- Nishimura, H., T. Honjo, et al. (2000). "Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice." J Exp Med **191**(5): 891-8.
- Nishimura, H., N. Minato, et al. (1998). "Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses." Int Immunol **10**(10): 1563-72.
- Nishimura, H., M. Nose, et al. (1999). "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." Immunity **11**(2): 141-51.
- Nishimura, H., T. Okazaki, et al. (2001). "Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice." Science **291**(5502): 319-22.
- Nomi, T., M. Sho, et al. (2007). "Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer." Clin Cancer Res **13**(7): 2151-7.
- Nurieva, R., S. Thomas, et al. (2006). "T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals." Embo J **25**(11): 2623-33.
- Oestreich, K. J., H. Yoon, et al. (2008). "NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation." J Immunol **181**(7): 4832-9.
- Okazaki, T. and T. Honjo (2005). "Pathogenic roles of cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy." Trends Mol Med **11**(7): 322-6.
- Okazaki, T. and T. Honjo (2006). "The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance." Trends Immunol **27**(4): 195-201.
- Okazaki, T. and T. Honjo (2007). "PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application." Int Immunol **19**(7): 813-24.
- Okazaki, T., A. Maeda, et al. (2001). "PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13866-71.
- Okazaki, T., Y. Tanaka, et al. (2003). "Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice." Nat Med **9**(12): 1477-83.
- Old, L. J., E. A. Boyse, et al. (1962). "Antigenic properties of chemically induced tumors." Ann. NY Acad. Sci. **101**: 80-106.
- Palmer, E. M. and G. A. van Seventer (1997). "Human T helper cell differentiation is regulated by the combined action of cytokines and accessory cell-dependent costimulatory signals." J Immunol **158**(6): 2654-62.

- Pantaleo, G. and R. A. Koup (2004). "Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know." Nat Med **10**(8): 806-10.
- Pardoll, D. (2003). "Does the immune system see tumors as foreign or self?" Annu Rev Immunol **21**: 807-39.
- Pardoll, D. M. (2002). "Spinning molecular immunology into successful immunotherapy." Nat Rev Immunol **2**(4): 227-38.
- Parry, R. V., J. M. Chemnitz, et al. (2005). "CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms." Mol Cell Biol **25**(21): 9543-53.
- Penn, I. (1988). "Tumors of the immunocompromised patient." Annu Rev Med **39**: 63-73.
- Peterson, A. C., H. Harlin, et al. (2003). "Immunization with Melan-A peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin-12 induces clinical activity and T-cell responses in advanced melanoma." J Clin Oncol **21**(12): 2342-8.
- Petroff, M. G., L. Chen, et al. (2003). "B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface." Biol Reprod **68**(5): 1496-504.
- Phan, G. Q., J. C. Yang, et al. (2003). "Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8372-7.
- Pircher, H., E. E. Michalopoulos, et al. (1987). "Molecular analysis of the antigen receptor of virus-specific cytotoxic T cells and identification of a new V alpha family." Eur J Immunol **17**(12): 1843-6.
- Porgador, A., O. Mandelboim, et al. (1997). "Natural killer cell lines kill autologous beta2-microglobulin-deficient melanoma cells: implications for cancer immunotherapy." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13140-5.
- Probst, H. C., K. McCoy, et al. (2005). "Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4." Nat Immunol **6**(3): 280-6.
- Prokunina, L., C. Castillejo-Lopez, et al. (2002). "A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans." Nat Genet **32**(4): 666-9.
- Prokunina, L., L. Padyukov, et al. (2004). "Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope." Arthritis Rheum **50**(6): 1770-3.
- Rehermann, B. and M. Nascimbeni (2005). "Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection." Nat Rev Immunol **5**(3): 215-29.
- Riker, A., J. Cormier, et al. (1999). "Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma." Surgery **126**(2): 112-20.
- Robak, T. (2006). "Current treatment options in hairy cell leukemia and hairy cell leukemia variant." Cancer Treat Rev **32**(5): 365-76.
- Rodenko, B., M. Toebes, et al. (2006). "Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange." Nat Protoc **1**(3): 1120-32.
- Rooney, C. M., C. A. Smith, et al. (1998). "Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients." Blood **92**(5): 1549-55.
- Rosenberg, S. A., P. Aebersold, et al. (1990). "Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction." N Engl J Med **323**(9): 570-8.

- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, et al. (1993). "Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer." J Natl Cancer Inst **85**(8): 622-32.
- Rosenberg, S. A., N. P. Restifo, et al. (2008). "Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy." Nat Rev Cancer **8**(4): 299-308.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, et al. (1998). "Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma." Nat Med **4**(3): 321-7.
- Rosenberg, S. A., J. R. Yannelli, et al. (1994). "Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2." J Natl Cancer Inst **86**(15): 1159-66.
- Rubio, V., T. B. Stuge, et al. (2003). "Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells." Nat Med **9**(11): 1377-82.
- Rutz, S. and A. Scheffold (2004). "Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems." Arthritis Res Ther **6**(2): 78-85.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-64.
- Salama, A. D., T. Chitnis, et al. (2003). "Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **198**(1): 71-8.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Press.
- Schwartz, R. H. (1990). "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." Science **248**(4961): 1349-56.
- Selenko-Gebauer, N., O. Majdic, et al. (2003). "B7-h1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy." J Immunol **170**(7): 3637-44.
- Sha, W. C., C. A. Nelson, et al. (1988). "Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice." Nature **335**(6187): 271-4.
- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-11.
- Sheppard, K. A., L. J. Fitz, et al. (2004). "PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ ." FEBS Lett **574**(1-3): 37-41.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, et al. (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." Cell **68**(5): 855-67.
- Stauss, H. J., M. Cesco-Gaspere, et al. (2007). "Monoclonal T-cell receptors: new reagents for cancer therapy." Mol Ther **15**(10): 1744-50.
- Strome, S. E., H. Dong, et al. (2003). "B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma." Cancer Res **63**(19): 6501-5.
- Thompson, R. H., M. D. Gillett, et al. (2004). "Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17174-9.
- Thompson, R. H., S. M. Kuntz, et al. (2006). "Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up." Cancer Res **66**(7): 3381-5.

- Toebes, M., M. Coccoris, et al. (2006). "Design and use of conditional MHC class I ligands." Nat Med **12**(2): 246-51.
- Totsuka, T., T. Kanai, et al. (2005). "Regulation of murine chronic colitis by CD4+CD25- programmed death-1+ T cells." Eur J Immunol **35**(6): 1773-85.
- Townsend, S. E. and J. P. Allison (1993). "Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells." Science **259**(5093): 368-70.
- Valmori, D., J. F. Fonteneau, et al. (1998). "Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues." J Immunol **160**(4): 1750-8.
- Vibhakar, R., G. Juan, et al. (1997). "Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes." Exp Cell Res **232**(1): 25-8.
- Walter, E. A., P. D. Greenberg, et al. (1995). "Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor." N Engl J Med **333**(16): 1038-44.
- Wan, B., H. Nie, et al. (2006). "Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis." J Immunol **177**(12): 8844-50.
- Wang, J., T. Yoshida, et al. (2005). "Establishment of NOD-Pdcd1-/- mice as an efficient animal model of type I diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(33): 11823-8.
- Wang, Q., D. Ye, et al. (2008). "Programmed cell death 1 genotypes are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus among Chinese." Arch Dermatol Res **300**(2): 91-93.
- Wang, S. C., C. H. Lin, et al. (2007). "Ligands for programmed cell death 1 gene in patients with systemic lupus erythematosus." J Rheumatol **34**(4): 721-5.
- Watanabe, N., M. Gavrieli, et al. (2003). "BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1." Nat Immunol **4**(7): 670-679.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4." Science **270**(5238): 985-8.
- Wherry, E. J., S. J. Ha, et al. (2007). "Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection." Immunity **27**(4): 670-84.
- Wiendl, H., M. Mitsdoerffer, et al. (2003). "Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies." Faseb J **17**(13): 1892-4.
- Wintterle, S., B. Schreiner, et al. (2003). "Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis." Cancer Res **63**(21): 7462-7.
- Wolf, D., H. Rumpold, et al. (2006). "Telomere length of in vivo expanded CD4(+)/CD25 (+) regulatory T-cells is preserved in cancer patients." Cancer Immunol Immunother **55**(10): 1198-208.
- Woo, E. Y., C. S. Chu, et al. (2001). "Regulatory CD4(+)/CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer." Cancer Res **61**(12): 4766-72.
- Wu, C., Y. Zhu, et al. (2006). "Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance." Acta Histochem **108**(1): 19-24.
- Yamazaki, T., H. Akiba, et al. (2002). "Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC." J Immunol **169**(10): 5538-45.

- Yssel, H., J. E. De Vries, et al. (1984). "Serum-free medium for generation and propagation of functional human cytotoxic and helper T cell clones." J Immunol Methods **72**(1): 219-27.
- Zajac, A. J., J. N. Blattman, et al. (1998). "Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function." J Exp Med **188**(12): 2205-13.
- Zaks, T. Z., D. B. Chappell, et al. (1999). "Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition." J Immunol **162**(6): 3273-9.
- Zhang, T., T. C. Tsang, et al. (2003). "Efficient transduction of murine primary T cells requires a combination of high viral titer, preferred tropism, and proper timing of transduction." J Hematother Stem Cell Res **12**(1): 123-30.
- Zhang, X., J. C. Schwartz, et al. (2004). "Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1." Immunity **20**(3): 337-47.
- Zhu, B., I. Guleria, et al. (2006). "Differential role of programmed death-ligand 1 [corrected] and programmed death-ligand 2 [corrected] in regulating the susceptibility and chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **176**(6): 3480-9.
- Zucchelli, S., P. Holler, et al. (2005). "Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics." Immunity **22**(3): 385-96.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten drei Jahren bei meinem Weg zur Promotion unterstützt haben.

Zuerst gilt mein Dank Christian Blank für die engagierte Betreuung dieser Arbeit. Besonders möchte ich mich bei ihm bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, das letzte Jahr meiner Doktorarbeitszeit in Amsterdam am NKI zu verbringen und so meinen wissenschaftlichen, wie auch menschlichen Horizont zu erweitern.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Mackensen und Herrn Prof. Dr. L. Lehle für die (fakultätsinterne) Übernahme der Betreuung der Dissertation.

Meinen alten Laborkollegen in Regensburg, Christine Luginger und Joachim Schweiger ein herzliches Danke schön! für die Unterstützung im Labor und die schöne Zeit.

Ein großes Dankeschön geht an die Mitglieder der Abteilung Immunologie des NKI in Amsterdam. Es hat sehr viel Spaß gemacht, mit euch zu arbeiten (und zu segeln, und paintball zu spielen). Ein besonderer Dank an Jules Gadiot, Andrew Kaiser und Gavin Bendle für die Unterstützung bei den Mausexperimenten, sowie Raquel Gomez und Bianca Heemskerk, die mich in die Arbeit mit humanen Zellen eingeführt haben. Außerdem möchte ich mich bei Willeke van de Kastele für die große Hilfe bedanken, die sie mir im Labor war, sowie für ihren ansteckenden Enthusiasmus.

Hartelijk bedankt!

Lukas Kremmler, the crazy sjerman! Vielen Dank für den Spaß, den wir zusammen in Regensburg im Labor und später in Amsterdam hatten.

Bei Kerstin Schuster möchte ich mich für die Unterstützung bei meinen ersten Schritten in die Immunologie bedanken und für die Freundschaft über das Labor hinaus. Der Wannepad war leer ohne dich.

Meiner kleinen Schwester Eva, vielen Dank für die seelische Unterstützung!

Meinen Eltern, Udo und Gertraud Borkner, danke ich für Alles. Ihr habt mich bei jedem Schritt meines Weges unterstützt und wart immer für mich da. Einfach nur Danke.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, 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 des Literaturzitats gekennzeichnet.

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

Ansbach, den _____

Lisa Borkner