
Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
– Klinische Kooperationsgruppe, Hämatologische Stammzelltransplantation der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand/Direktor: Prof. Dr. W. Hiddemann

Untersuchungen zur antigenspezifischen CD4⁺ Immunantwort bei der akuten myeloischen Leukämie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Brigitte Steger
aus Pfaffenhofen/Ilm
2014

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuerin:

Frau Prof. Dr. rer. nat. Dr. rer. biol. hum. habil Helga Schmetzer

Zweitgutachter:

Herr Prof. Dr. Vigo Heissmeyer

Dekan:

Herr Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.04.2015

Für meinen Fels in der Brandung,
in Liebe

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	13
Abstract	16
1. Einleitung	19
1.1. Akute Leukämien	19
1.1.1. Definition und Epidemiologie der AML	19
1.1.2. Das Krankheitsbild der AML	20
1.1.3. Ätiologie und Pathogenese der AML	20
1.1.4. Diagnostik und Klassifikation	21
1.1.5. Prognosekriterien	23
1.1.6. Therapie	24
1.2. Das Immunsystem	25
1.2.1. Subpopulationen der T-Lymphozyten	28
1.2.2. CD8 ⁺ T-Zellen	29
1.2.3. CD4 ⁺ T-Zellen, T-Helferzellen	30
1.3. Tumorimmunologie	31
1.4. Immuntherapie zur Behandlung von AML	32
1.4.1. GvL- versus GvH-Reaktivität	34
1.4.2. Nicht-zelluläre Immuntherapien	36
1.4.3. Zelluläre Immuntherapien	37
1.4.4. Leukämie-assoziierte Antigene (LAAs)	38
1.4.5. Nebenhistokompatibilitätsantigene (mHags)	40
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit	41
2. Material	42
2.1. Patientenmaterial/primäre Zellen	42
2.2. Zelllinien	42
2.3. Virusstock (mini-EBV)	43
2.4. Bakterienstamm für Klonierung	43
2.5. Vektor 43	
2.6. cDNA Klon, Expressionsklon	43
2.7. Primer und Sonden	43
2.7.1. Sequenzen	44
2.8. Antikörper	45
2.9. Reagenziensysteme (Kits)	47
2.10. Enzyme	48
2.11. Chemikalien und Reagenzien	48
2.12. Verbrauchsmaterialien	50

2.13.	Puffer und Lösungen	52
2.13.1.	Bakterienkultur	52
2.13.2.	Gelelektrophorese	52
2.13.3.	Puffer für Proteinaufreinigung.....	52
2.13.4.	ELISA-Puffer.....	53
2.13.5.	Western Blot	53
2.13.6.	Nährmedien für die Zellkultur	54
2.13.7.	Sonstige Lösungen und Puffer	54
2.14.	Technische Geräte	55
2.15.	Software und Bioinformatik-Tools.....	57
3.	Methoden.....	58
3.1.	Kultivierung von primären Zellen und Zelllinien	58
3.1.1.	Kultivierung adhärenter Zelllinien	58
3.1.2.	Kultivierung von Suspensionszellen.....	58
3.1.3.	Generierung und Kultivierung von EBV-transformierten B-Zelllinien (Mini-LCLs).....	58
3.1.4.	Kultivierung und Expansion von LAA/HA1-proteinspezifischen CD4 ⁺ T-Zellen	59
3.1.5.	Einzelzellklonierung	60
3.1.6.	Bestimmung der Zellzahl	61
3.1.7.	Einfrieren von Zellen.....	61
3.1.8.	Auftauen von Zellen.....	61
3.1.9.	Isolierung von mononukleären Zellen (MNCs)	61
3.1.10.	Bestrahlung von Zellen	62
3.2.	Bakteriologische Arbeiten	62
3.2.1.	Kultivierung von Bakterien.....	62
3.2.2.	Elektrotransformation von Bakterien	63
3.2.3.	Selektion und Expansion transformierter Bakterien	63
3.2.4.	Kryokonservierung prokaryotischer Zellen (Glycerin-Stocks)	63
3.3.	Molekularbiologische Arbeiten	63
3.3.1.	Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien	64
3.3.2.	Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Zellen.....	64
3.3.3.	Isolierung von zellulärer Gesamt-RNA	65
3.3.3.1.	Isolierung von RNA mittels „QUIAGEN“	65
3.3.3.2.	Isolierung von RNA mittels Chloroform-Extraktion	65
3.3.4.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	65
3.3.4.1.	Präparative PCR	66
3.3.4.2.	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase	66
3.3.4.2.1.	cDNA-Synthese mittels „Fermentas“	66
3.3.4.2.2.	cDNA-Synthese mittels „Superskript“	67
3.3.4.3.	TaqMan TM -PCR.....	67
3.3.4.4.	Analyse des VB-TCR-Repertoires mittels Spectratyping.....	68
3.3.5.	Enzymatische Spaltung von DNA.....	69
3.3.6.	Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente	69
3.3.7.	Ligation von DNA-Fragmenten	69
3.3.8.	Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen HEK293T Zellen.....	70
3.3.8.1.	Transfektion von HEK293T Zellen	70
3.3.9.	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	71
3.3.10.	DNA Gel-Extraktion	71
3.3.11.	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA.....	71
3.3.12.	Sequenzierung.....	72
3.4.	Durchflusszytometrie	72
3.4.1.	Charakterisierung der Zellen mittels Oberflächenfärbung.....	72
3.4.2.	CFSE-Markierung	73
3.4.3.	Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS, IFN-γ).....	73
3.4.4.	FACS-Sortierung	74
3.4.5.	Isolierung von T-Lymphozyten durch MACS-Separation	74
3.4.5.1.	Isolierung von CD4 ⁺ T-Zellen.....	75
3.4.5.2.	Isolierung von CD3 ⁺ T-Zellen.....	75
3.4.5.3.	Isolierung von CD8 ⁺ T-Zellen.....	76

3.5.	Funktionsanalysen	76
3.5.1.	⁵¹ Chromfreisetzungstest	76
3.5.2.	Fluorolyse Assay	77
3.5.3.	IFN- γ ELISPOT („Enzyme-linked Immunospot“)	78
3.5.4.	GM-CSF ELISA („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“)	79
3.6.	Proteinbiochemische Methoden	79
3.6.1.	Aufreinigung von Proteinen	79
3.6.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	80
3.6.3.	Nachweis von Proteinen im Western-Blot (WB)	80
4.	Ergebnisse	82
4.1.	Genexpressionsanalysen von PRAME, WT1 und PR3 in AML-Patienten	82
4.1.1.	Patientencharakteristika zu Genexpressionsanalysen	84
4.1.2.	Expressionsspiegel der LAAs in unterschiedlichen AML-Subtypen bei Erstdiagnose ..	86
4.1.3.	Simultane/parallele Überexpression von LAAs bei Erstdiagnose	90
4.1.4.	Expressionsspiegel der LAAs in unterschiedlichen Krankheitsstadien	91
4.1.5.	Expressionsspiegel in unterschiedlichen Zellkompartimenten	93
4.1.6.	Prognostische Signifikanz	95
4.2.	LAA/HA1-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Aktivität zur Bekämpfung der AML. 98	
4.2.1.	Patientencharakteristika zu Untersuchungen der (LAA/HA1-spezifischen) CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -vermittelnden Immunantwort	98
4.2.2.	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen sind an der Vermittlung von antileukämischen Immunreaktionen beteiligt	99
4.2.3.	Detektion von LAA-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen aus AML-Patienten nach SCT und DLI	101
4.2.4.	Experimente zur Funktion der CD4 ⁺ T-Zellen	103
4.2.4.1	Etablierung eines LAA/HA1-proteinspezifischen CD4 ⁺ T-Zell Expansionsmodell	104
4.2.4.1.1	Klonierung, Generierung und Aufreinigung von PRAME-, WT1-, PR3- und HA1-Proteinen in HEK293T Zellen	104
4.2.4.1.2.	Generierung von mini-LCLs aus AML-Patienten	105
4.2.4.1.3.	Flussdiagramm	105
4.2.4.2.	Nachweis von Zytokinen (IFN- γ ELISPOT, -ICS, GM-CSF ELISA) nach LAA/HA1-Proteinstimulation	106
4.2.4.3.	Funktionalitätsanalysen	107
4.2.4.3.1.	⁵¹ Chromfreisetzungstest	107
4.2.4.3.2.	Fluorolyse Assay	107
4.2.4.4.	T-Zellprofil der unstimulierten und LAA/HA1-proteinstimulierten CD4 ⁺ T-Zellen	110
5.	Diskussion	115
5.1.	Genexpressionsanalysen bekannter LAAs (PRAME, WT1, PR3)	116
5.1.1.	Unterschiedliche Strategien zur Definition von LAA-Überexpression in verschiedenen AML-Subtypen und deren Einfluss auf die Prognose	116
5.1.2.	LAA-Überexpression zur Detektion von MRD oder Oligoklonalität im Krankheitsverlauf der AML	119
5.1.3.	LAA-Überexpression in unterschiedlichen Zellkompartimenten	120
5.1.4.	Immuntherapie und LAA	121
5.2	CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kooperieren bei der Vermittlung einer antileukämischer Immunantwort	123
5.3.	Antileukämische Strategie mit immunogenen Zielantigenen	123
5.4.	Zytokinfreisetzung zur Beurteilung spezifischer T-Zell-Aktivität – Korezeptor unabhängige Bindung von MHC-I-restringiertem TCR auf CD4⁺ T-Zellen	125
5.5.	Etablierung des CD4⁺ Stimulationsmodells	126
5.5.1.	LAA/HA1-Proteine für die spezifische Stimulation von CD4 ⁺ T-Zellen	127
5.5.2.	CD40-CD40L Interaktion als „frühes prägendes Ereignis“ für T-Zellen	128
5.6.	Spezifische CD4⁺ T-Zellen mit antileukämischer zytotoxischer Funktion	129

5.7.	CD4 ⁺ T-Zell-Subtypanalyse als differenzierte Charakterisierung der Funktionalität	130
5.8	Fazit der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Untersuchungen	131
<i>Literaturverzeichnis</i>		<i>133</i>
<i>Anhang-I</i>		<i>143</i>
<i>Publikationen und Kongressbeiträge</i>		<i>152</i>
<i>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</i>		<i>154</i>
<i>DANKSAGUNG</i>		<i>155</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Vereinfachte schematische Darstellung zur Entwicklung von Blut- und Immunzellen	26
Abbildung 2:	Schema zur MHC-Klasse-I/-II Ag-Präsentation.....	27
Abbildung 3:	Zusammenfassende Darstellung der wichtigsten CD4 ⁺ Subpopulationen mit Funktion, charakteristischen Transkriptionsfaktoren zur Differenzierung und relevante immunmodulierende Zytokine.	31
Abbildung 4:	Modifizierte graphische Darstellung zellulärer Komponenten des Immunsystems und deren möglicher Einsatz zur Immuntherapie.....	33
Abbildung 5:	Immunologische Effekte bei einer allogenen SCT können zur GvHD- oder GvL-Effekten führen	35
Abbildung 6:	Rohdaten der TaqMan TM -PCR, exemplarisch an Patient #33 und der Jurkat Zelllinie.....	83
Abbildung 7:	RNA-Expressionsspiegel der LAAs aller Fälle mit Überexpression bei Erstdiagnose ..	87
Abbildung 8:	RNA-Expressionsspiegel aller Fälle mit durchschnittlicher Überexpression bei Erstdiagnose unterteilt nach FAB-Subtyp..	88
Abbildung 9:	Vergleich der RNA-Expressionsspiegel der LAAs in Fällen mit Überexpression bei Erstdiagnose bei pAML vs. sAML.....	89
Abbildung 10:	Vergleich der RNA-Expressionsspiegel der LAAs in Fällen mit Überexpression bei Erstdiagnose unterteilt in unterschiedliche zytogenetische Risikogruppen	89
Abbildung 11:	Vergleich der RNA-Expressionsspiegel der LAAs I) PRAME, II) WT1 und III) PR3 in unterschiedlichen Krankheitsstadien	91
Abbildung 12:	LAA-Expressionsprofile im Krankheitsverlauf von 6 AML-Patienten I) PRAME, II) WT1 und III) PR3.....	92
Abbildung 13:	Vergleich der RNA-Expressionsspiegel in PB- oder BM- Patientenproben in allen Proben mit Überexpression.....	94
Abbildung 14:	Einzelfallanalyse der RNA-Expression der analysierten LAAs in PB- oder BM-Proben.....	94
Abbildung 15:	Prädiktive Schwellenwerte aller Fälle (n = 47) bei Erstdiagnose für I) PRAME, II) WT1 und III) PR3 in pAML vs. sAML	96
Abbildung 16:	Dargestellt sind die anti-LAA-Peptid reaktiven CD8 ⁺ T-Zellen nach MHC-Multimer-Färbung und Spekatratyping in PB von AML-Patienten nach allogener SCT und/oder DLI.....	103
Abbildung 17:	Schematische Darstellung der Isolation, Separation und Stimulation der („untouched“) LAA/HA1-proteinstimulierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	105
Abbildung 18:	Flussdiagramm der durchgeführten Experimente.....	106
Abbildung 19:	IFN-γ ELISPOT am Beispiel von Patient #1.156.....	107
Abbildung 20:	Antileukämische lytische Aktivität der „in vivo“ entnommenen oder der „in vitro“ LAA/HA1-proteinstimulierten CD4 ⁺ T-Zellen, gezeigt durch einen Fluorolyse Assay.....	109
Abbildung 21:	Klinischer Verlauf der Erkrankung von Patient #1.158. Graphisch dargestellt ist der zeitliche Krankheitsverlauf mit Angaben zu Stadium, Therapie und Zeitpunkte der Probenentnahme	110
Abbildung 22:	Zelluläres CD4 ⁺ T-Zellprofil in Patient #1.158.. ..	111
Abbildung 23:	Zelluläres Profil der LAA/HA1-proteinstimulierten und -unstimulierten (Ausgangsmaterial/primäres Material, 'E3') CD4 ⁺ T-Zellen in Patient #1.158.	112
Abbildung 24:	Vergleich des CD4 ⁺ T-Zellprofil bei Fällen mit < 20 % Lyse im Vergleich zu > 20 % Lyse.	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	FAB-Klassifikation der AML.....	21
Tabelle 2:	WHO-Klassifikation der myeloiden Neoplasien.....	22
Tabelle 3:	Zytogenetische Risikogruppen der AML	23
Tabelle 4:	Zelllinien.....	42
Tabelle 5:	Verwendete Zielgene und Assay-ID der Genexpressionsanalysen	44
Tabelle 6:	Primersequenzen zur Klonierung	44
Tabelle 7:	Primersequenzen für TCR-PCR	45
Tabelle 8:	Sequenzierungsprimer	45
Tabelle 9:	Primäre Antikörper und Hersteller	45
Tabelle 10:	Patientencharakteristika zu Genexpressionsanalysen der LAAs	84
Tabelle 11:	LAA-Überexpression bei Erstdiagnose.	86
Tabelle 12:	Detektion von multiplen LAAs bei AML-Patienten bei Erstdiagnose	90
Tabelle 13:	Vergleich der multiplen LAA-Überexpression in AML-Patienten bei Erstdiagnose in pAML (n = 36) vs. sAML (n = 11).	90
Tabelle 14:	RNA-Expressionswerte (x-fache Überexpression) der Patienten, die mit dem FLAMSA-Protokoll therapiert wurden	97
Tabelle 15:	Patientencharakteristika zu Untersuchungen der HLA-I/HLA-II und der LAA/HA1-peptid-/proteinspezifischen CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -vermittelten Immunantwort	98
Tabelle 16:	Inhibierung der antileukämischen blastenlysisierenden Aktivität von unstimulierten, ,MNC' oder ,DC' stimulierten T-Zellen nach Blockierung der HLA Klasse-I und/oder HLA Klasse-II vermittelten T-Zellreaktion	101
Tabelle 17:	Antileukämische Funktionalität (detektiert durch Fluorolyse oder Chromfreisetzungstest)	108

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gamma
A	Adenin
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Ag	Antigen
AG	Arbeitsgruppe
AIM V	T-Zell Medium (serumfrei)
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
ALP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zelle („antigen-presenting cell“) oder Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	amerikanische Zellkultursammlung („American Type Culture Collection“)
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
BCG	Bacillus Calmette Guérin (attenuierter Lebendimpfstoff gegen Tuberkulose)
BFA	Brefeldin-A
bp	Basenpaar(e)
B-LCL	lymphoblastoide B-Zelllinie
BM-MNC	Mononukleäre Zellen des Knochenmark („Bone Marrow MonoNuclear Cells“; kurz: BM)
BSA	Rinderserumalbumin („Bovine Serum Albumin“)
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Cam	Chloramphenicol
cand.	candidates (latein)

CD	Differenzierungscluster („Cluster of Differentiation“)
cDNA	komplementäre DNA („complementary/copy DNA“)
CDS	kodierende Sequenz („Coding Sequence“)
CDR	komplementaritätsbestimmende Region („Complementarity Determining Region“)
CFSE	5-(6) Carboxyfluorescein Diacetat, Succinimidyl Ester
CIP	alkalische Phosphatase aus dem intestinalen Kälbertrakt („Calf Intestinal alkaline Phosphatase“)
CR	komplette Remission
CpG	CpG-Sequenzmotif
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CsA	Cyclosporin A
CO ₂	Kohlendioxid
d. h.	das heißt
dH ₂ O	Destilliertes (vollentsalztes) Wasser
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes (vollentsalztes) Wasser
Da	Dalton
Dgn	Erstdiagnose
DLI	Spenderlymphozyten-Infusion („Donor Lymphocyte Infusion“)
DMEM	Kulturmedium („Dulbecco's Modified Eagle-Medium“)
CML	chronisch myeloische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
et al.	et alii (und andere)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	AK-basiertes immunologisches Testverfahren („Enzym-linked Immunosorbent Assay“)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
evtl.	eventuell
FAB	Französisch-amerikanisch-britische Klassifikation zur zytomorphologischen Einteilung von akuten Leukämien („French-American-British“)
FACS	Durchflusszytometrie („Fluorescence Activated Cell Sorter“)
FasL	Fas-Liganden (ein Zelloberflächenprotein aus der TNF-Familie)

FCS	Fötales Kälberserum („Fetal Calf Serum“)
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
FLAMSA	Therapie mit Fludarabin, Ara-C und Amsacrin
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter“)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase
<i>gfp</i> , GFP	grün fluoreszierendes Protein („Green Fluorescent Protein“)
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor („Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor“)
GTP	Guanosintriphosphat
GvH	Transplantat gegen Empfänger („Graft-versus-Host“)
GvHD	Transplantat gegen Empfänger Erkrankung („Graft-versus-Host Diseases“)
GvL	Transplantat gegen Leukämie („Graft-versus-Leukaemia“)
Gy	Gray, Einheit der durch Radioaktivität und an der ionisierende Strahlung verursachte Energiedosis; beschreibt die pro Masse absorbierte Energie
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HA1	HA1-Gen („minor histocompatibility antigen HA1“)
HEK293T	adhärente, humane embryonale Nierenzelllinie (kurz: 293T)
HLA	Gene des MHC („Human Leukocyte Antigen“)
HL60	Suspensionszelllinie, humane AML (FAB M2)-Zelllinie
HvG	Empfänger gegen Transplantat („Host-versus-Graft“)
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
ID	Identifikation („identifier“)
IgG	Immunglobulin G
i. v.	intravenös
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IL-2	Interleukin 2
IP	Immunpräzipitation
IPSS	internationales Prognose-Beurteilungssystem („International Prognostic Scoring System“)
Jurkat	Suspensionszelllinie, humane ALL Zelllinie

k	Kilo
Kan	Kanamycin
Kasumi	Suspensionszelllinie, humane AML (FAB M2) Zelllinie
kDa	Kilodalton
K562	Suspensionszelllinie, humane CML Zelllinie
kg	Kilogramm
KIR	Keimbahn-kodierter inhibierender Rezeptoren
l	Liter
LAA	Leukämie-assoziierte Antigene
LB	Luria Bertani
LCL	Lymphoblastoide Zelllinien
LF	Laktoferrin
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
MACS	magnetisch aktivierte Zell-Sortierung („Magnetic Activated Cell Sorting“)
M	Molar
max.	maximal
mDC	mature dendritische Zellen („mature dendritic cell“)
MDS	myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MG	Molekulargewicht
mHag	Nebenhistokompatibilitätsantigene („minor Histocompatibility antigens“)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („Major Histocompatibility Complex“)
MNC	mononukleäre Zellen („MonoNuclear Cells“)
min	Minute
MPS	myeloproliferatives Syndrom
MRD	minimale Resterkrankung („minimal residual disease“)
mRNA	messenger RNA
Na	Natrium
Ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix
nm	Nanometer
NK	natürliche Killerzellen („natural killer cells“)
NTC	Nachweis von Kontaminationen („no template control“)
MW	Mittelwert
μ	Mikro
N	Normal

OD	Optische Dichte
o. g.	oben genannt
ORF	offener Leserahmen („Open Reading Frame“)
ORI	Replikationsursprung („Origin of Replication“)
p. i.	nach Infektion („post infection“)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
pAML	primäre AML
Pat. #	Patientennummer
PBS	Phosphat gepuffertes Salz („Phosphat Buffered Saline“)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase Chain Reaction“)
PCy7	Phycoerythrin-Cyanin-7
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PB-MNC	Periphere mononukleäre Blutzellen, kurz PB („Periperal Blood MonoNuclear Cells“; kurz: PB)
Pers	persistierende Erkrankung
pg	Pikogramm
PHA	Phytohämagglutinin
PR3	Proteinase3-Gen (PRTN3; „serine proteinase, neutrophil, Wegener granulomatosis autoantigen“)
PRAME	PRAME-Gen (bevorzugt exprimiertes Melanomantigen; „preferentially expressed antigen in melanoma“)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RPMI	Zellkulturmedium, am Roswell Park Memorial Institut entwickelt
Ramos	Suspensionszelllinie, humane Burkitt-Lymphom Zelllinie
Raji	Suspensionszelllinie, humane Burkitt-Lymphom Zelllinie
Rez	rezidivierende Erkrankung
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription
sAML	sekundäre AML
SAv-HRP	Streptavidin-Horseradish Peroxidase
SCT	Stammzelltransplantation („Stem Cell Transplantation“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („SodiumDodecylSulfat“)
sek	Sekunde
SNP	Polymorphismus einzelner Nukleotide („Single Nucleotide Polymorphism“)
s. o.	siehe oben
ss	einzelsträngig

SSC	Seitwärtsstreulicht („Side Scatter“)
s. u.	siehe unten
T	Thymin
TAA	tumorassoziierte Antigene
TAE	Tris Acetat EDTA
TBE	Tris Borsäure EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung („Tris Buffered Saline“)
TCR	T-Zell Rezeptor
TE	Tris EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TNF	Tumornekrosefaktor
TPB	Medium zur Bakterienkultur („Tryptose Phosphat Broth“)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TUM	Technische Universität München
U	Uracil
IU	internationale Einheit der Enzymaktivität („International Unit“)
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
vs.	versus
W	Watt
WB	Western-Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation („World Health Organisation“)
WT1	Wilm's Tumor Gen
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
Zellkomp.	Zellkompartiment

Zusammenfassung

Hintergrund:

T-Zellen tragen entscheidend zur Vermittlung von zellulären Antitumor-Immunreaktionen in Patienten mit AML (akuter myeloischer Leukämie) nach allogener SCT (Stammzelltransplantation) bei.

Von Tumoren exprimierte Leukämie-assoziierte Antigene (LAA), wie z. B. PRAME, WT1, PR3 oder mHags (Nebenhistokompatibilitätsantigene) wie z. B. HA1, können auf leukämischen Zellen überexprimiert vorliegen und dabei als Zielantigene fungieren. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit spezifischer Antigenerkennung des TCRs vermitteln dabei immunmodulierende und/oder zytotoxische Funktionen, übernehmen eine Schlüsselrolle bei der Eliminierung von Leukämiezellen und bilden ein immunologisches Gedächtnis aus.

Ziele:

Ziel dieser Arbeit war, einerseits die Expression der o. g. LAAs in Blut- (PB) und Knochenmarkproben (BM) von AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden mittels relativer Quantifizierung durch TaqManTM-PCR zu analysieren. Dabei sollte herausgearbeitet werden, ob AML-Subtyp- oder -Kompartiment- (PB, BM)spezifische Überexpressionen oder Mehrfachüberexpressionen vorliegen und ob diese mit Krankheitsstadien oder Risikogruppen korrelieren. Ferner sollten zelluläre LAA-spezifische Immunantworten bei AML-Patienten analysiert werden. Im Besonderen sollte die Frage geklärt werden, ob CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Zellen an der Vermittlung von antileukämischen Immunreaktionen beteiligt sind. Des Weiteren sollten LAA-spezifische CD8⁺ T-Zellen mittels Multimer-Technologie im Blut nach SCT nachgewiesen und mit dem klinischen Krankheitsverlauf der Patienten korreliert werden. Ferner sollten mit Hilfe eines neuartigen und modifizierten Protein-basierten Stimulationsmodell LAA/HA1-spezifische CD4⁺ T-Zellen expandiert und auf ihre zelluläre antileukämische Aktivität untersucht werden.

Ergebnisse:

1) LAA-Genexpression

Eine Überexpression der LAAs konnte in nahezu allen FAB-Subtypen mit vergleichbaren Überexpressionsraten wie in der Literatur beschrieben ermittelt werden. (Statistisch signifikant) höhere Überexpressionsraten für PB- im Vergleich zu BM-Proben konnten für WT1 und PR3 nachgewiesen werden. Multiple- und Kompartiment-spezifische LAA in AML-PB/-BM-Proben korrelierten mit der Prognose. Simultane RNA-Überexpressionen lagen in mehr als 50 % der Fälle vor; ob es sich dabei um Mehrfachexpressionen EINER ZELLE oder VERSCHIEDENER ZELLEN handelt ist unklar.

Um Expressionsprofile in unterschiedlichen Krankheitsstadien (mit unterschiedlicher Blastenzahl) besser miteinander vergleichen zu können, entwickelten wir ein Vergleichsmodell, das eine differenzierte Einschätzung der Tumorlast und damit ein verfeinertes MRD (minimale Resterkrankung) Monitoring erlaubt. Dabei wurden die ermittelten Expressionswerte rechnerisch auf 100 % Blasten adjustiert. Für die unadjustierten Daten konnte die höchste Überexpression bei Erstdiagnose, gefolgt von persistierender Erkrankung und Rezidiv ermittelt werden und bestätigen teilweise die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Im Vergleich dazu lag die höchste LAA-Überexpression (adjustierte Daten) bei persistierender Erkrankung vor und deutet auf eine gesteigerte LAA-Transkriptionsaktivität dieser Blasten hin. Wir konnten zeigen, dass eine geringe Expression an PRAME und WT1 und eine hohe Expression an PR3 mit einer günstigen Prognose korrelierte, wenngleich Mehrfachexpressionen letztgültige Aussagen erschweren.

Aus unseren LAA-Expressionsstudien folgern wir, dass unterschiedliche LAA-Überexpressionen in PB bzw. BM sowie simultane LAA-Expression möglicherweise das Ansprechen der Patienten auf Therapien beeinflusst: möglicherweise greifen manche Therapien besser PB- als BM-Blasten an; möglicherweise gibt es unterschiedlich therapiesensible Zellklone. Eine aussagekräftige Prognoseeinschätzung anhand der Expression einzelner Tumorantigene im Kontext aller tatsächlich exprimierter LAAs und möglicher Interferenzen in AML-Patienten scheint schwierig. Für eine verbesserte Vergleichbarkeit von Expressionsdaten verschiedener Arbeitsgruppen schlagen wir eine Standardisierung der Analyse, ähnlich der europäischen Leukämienetzstudie für WT1, sowie eine Adjustierung der Expressionsdaten auf 100 % Blasten vor. Ferner raten wir zu Mehrfachanalysen von LAAs im klinischen Verlauf, um ggf. (Mehrfach-)expressionen in unterschiedlichen Kompartimenten und Veränderungen frühzeitig erfassen zu können.

2) LAA/HA1-spezifische Immunantwort

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Rolle von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an (LAA/HA1-spezifischen) zellulären antileukämischen Immunantworten bei AML-Patienten untersucht werden.

Methodisch konnten wir mit Hilfe eines DC-basierten T-Zell Stimulationsmodells, in An- oder Abwesenheit von anti-HLA Klasse-I oder -II blockierenden AK, antileukämische Immunantworten sowohl in der CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellfraktion mit nachweislicher zellulärer Beteiligung der CD4⁺ T-Zellen ermitteln. Mittels MHC-Multimer-Technologie konnten LAA-spezifische HLA-A02-restringierte CD8⁺ T-Zellen in AML-Patienten nach SCT regelmäßig nachgewiesen werden. Dabei korrelierte die Anzahl und Menge der unterschiedlichen LAA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen scheinbar mit der Remissionsdauer. PRAME-MHC-Multimer-selektionierte CD8⁺ T-Zellen wiesen dabei eine starke klonale Geneinschränkung in der CDR3-V β -Region von TCRs auf – exemplarisch an einem Fall

mittels Spekratyping gezeigt. Die LAA-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-vermittelte Funktion korrelierte nicht mit intra-/extrazellulärer Zytokinfreisetzung, was darauf hinweist, dass Zytokinspiegel keine zuverlässigen Rückschlüsse auf die T-Zell-Funktionalität zulassen.

Mit Hilfe eines neuartigen LAA/HA1-Protein-basierten Expansionsmodells konnten unter Verwendung von zwei unterschiedlichen APC-Modellen entweder mit Hilfe von mini-LCLs oder CD4 depletierten MNCs (DCs, Monozyten und Makrophagen) LAA/HA1-spezifische CD4⁺ T-Zellen angereichert werden. Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz von mini-LCLs favorisieren wir CD4 depletierte MNCs als APC-Quelle und nahmen den Nachteil eines hohen Zellbedarfs in den Patienten-Proben in Kauf. Wir konnten zeigen, dass eine Anreicherung von LAA/HA1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen möglich ist: Wir konnten CD4⁺ T-Zellen nach LAA/HA1-Proteinstimulation anreichern und mit/ohne CD40L⁺ Präparation eine „Einzelzellklonierung“ durchführen. Als exemplarischen Beweis führten wir funktionelle Tests durch: zwar konnten wir keine Korrelation zwischen der Freisetzung bestimmter Zytokine und der antileukämischen Aktivität dieser CD4⁺ T-Zellen zeigen, jedoch exemplarisch an einem Patienten nachweisen, dass zytotoxische CD4⁺ T-Zellen leukämische Blasten lysieren können ohne dabei andere Zellen nicht-leukämischen Ursprungs zu eliminieren. Am effektivsten war dabei die CD40L⁺CD4⁺ T-Zellfraktion nach Stimulation. Phänotypische Analysen zeigten, dass die lytische Aktivität mit einer Zunahme von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen sowie einer Abnahme an naiven T-Zellen einherging. Eine Analyse der antileukämischen Aktivität von CD4⁺ T-Zellen, die direkt aus einem Patienten im klinischen Verlauf nach SCT präpariert worden waren, zeigte Korrelationen zwischen der Menge an antileukämisch aktiven CD4⁺ T-Zellen und der Stabilität der Remission.

Weitere Studien werden benötigt, die exemplarischen CD4⁺ T-Zell-Ergebnisse zu verifizieren und um ein genaueres Bild bezüglich der Rolle löslicher und zellulärer Mechanismen bei CD4⁺ T-Zell-vermittelten Immunreaktionen im Kontext der Aufrechterhaltung einer Remission in AML-Patienten nach SCT zu erhalten. Dazu sind weitere Charakterisierungen und spezifische Analysen der zytotoxischen CD4⁺ Effektorzell-Subpopulationen, insbesondere nach allogener SCT, nötig.

Abstract

Background:

T-cells contribute significantly to the mediation of cellular anti-tumor immune responses in patients with AML (acute myeloid leukemia) after allo SCT (stem cell transplantation). Leukemia-associated-antigens (LAA) e.g. PRAME, WT1 or PR3 or mHags (minor histocompatibility antigens; e.g. HA1) may be overexpressed in leukemic cells and be targets for immune reactions. CD4⁺ and CD8⁺ T-cells with specific antigen (Ag) recognition of TCRs mediate immunomodulatory and/or cytotoxic functions, have a crucial role in the elimination of leukemic cells and can develop an immunological memory.

Aims:

The aim of this work was on the one hand to analyze the expression profile of the LAAs in blood (PB) and bone marrow (BM) samples of AML-patients compared to healthy donors using relative quantification by TaqManTM-PCR. It should be identified whether AML-subtype- or -compartment-specific (PB, BM) overexpressions or multiple overexpressions occur and whether these profiles correlate with disease stages or risk groups. On the other hand LAA specific cellular immune responses should be analyzed in AML-patients. In particular the possible involvement of CD4⁺ and/or CD8⁺ T-cells in the mediation of antileukemic immune responses should be studied. Furthermore, LAA-specific CD8⁺ T-cells should be detected by multimer technology in PB of AML-patients after SCT and the results should be correlated with the clinical course of the patients. Moreover LAA/HA1-specific CD4⁺ T-cells should be expanded and characterized for their antileukemic function using a protein-based stimulation model developed and adapted by us.

Results:

1) LAA-genexpression

Overexpression of LAAs was found as described in almost all FAB-subtypes with comparable overexpression rates as described in the literature. (Statistically significant) higher overexpression rates for PB compared to BM samples were detected for WT1 and PR3. Multiple- and compartment-specific LAAs in AML-PB-/BM-samples correlated with prognosis. Simultaneous RNA-overexpressions were observed in more than 50 % of cases; whether multiple expressions occurred in ONE CELL or in DIFFERENT CELLS is still unclear.

For a better comparison of expression profiles in different stages of disease (characterized by different blast counts), we developed a comparative model, which allows a differentiated assessment of the tumor load and therefore a refined MRD (minimal residual disease)

monitoring. We adjusted the determined expression values calculatory to 100 % blasts. Highest LAA-overexpression rates were found at diagnosis, followed by persisting disease and relapse (unadjusted data) – thereby partially confirming results of other groups.

In comparison with the adjusted data, the highest LAA overexpression was detected in persisting disease and indicates an increased transcriptional activity of leukemic blasts in this stage. We were able to show that low expression rates of PRAME and WT1 and high expression rates of PR3 correlated with prognostically favorable risk groups, although multiple genexpressions impaired a final prediction.

We conclude that different LAA overexpressions in PB- or BM-samples and simultaneous/multiple overexpressions potentially influence the patients' response to therapy: some therapies may preferentially target PB- compared to BM-blasts, moreover the sensibility on different cell clones to chemotherapy may be variable. Predictive prognostical assessment based on individual LAA expression profiles in the context of all actually (over)-expressed LAAs and all possible interferences in AML-patients seems to be difficult. We recommend to establish a standardized analytical procedure (similar to the European LeukemiaNet Study for WT1), as well as to adjust detected expression profiles to 100 % blasts for a better comparability. In addition we recommend to analyze LAAs in the clinical course of the disease to possibly detect (multiple)-expressions in different cellular compartments and to recognize imminent changes of disease stages.

2) LAA/HA1-specific immune response

In the second part of this work the role of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells on (LAA/HA1-specific) cellular antileukemic immune responses in AML-patients should be analyzed.

We detected antileukemic immune responses of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell fractions with proven cellular involvement of CD4⁺ T-cells using a methodically adapted DC-based T-cell stimulation model in the presence or absence of anti-HLA-class-I or -II blocking Ab.

Moreover LAA-specific HLA-A02-restricted CD8⁺ T-cells were regularly detectable in AML-patients after SCT applying MHC-multimer-technology, with correlation of an increase of (multiple LAA) counts and amounts of different LAA-specific CD8⁺ T-cells and with the duration of remission. In PRAME-MHC-multimer selected CD8⁺ T-cells we could demonstrate a strong clonal gene restriction in the CDR3 region of the TCR-V β -chain, as exemplarily shown in one case by Spekratyping. No correlation could be found between LAA-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell-mediated functions and intra-/extracellular cytokine-release, pointing to the fact that cytokine-release is no reliable tool to analyse T-cell functionality.

Applying two novel LAA/HA1-protein based APC-based stimulation and expansion strategies LAA/HA1-specific CD4⁺ T-cells could be enriched using: "mini-LCLs" or "CD4 depleted MNC" (DCs, monocytes, and macrophages). Due to the low transfection efficiency of mini-LCLs, we favored CD4 depleted MNCs as APC source and accepted the disadvantage of an increased

cell requirement. We were able to prove that LAA/HA1-specific CD4⁺ T-cells can be enriched after LAA/HA1-protein stimulation and a “single-cell-cloning” with/without CD40L⁺ separation. As a “proof of principle”, we carried out functional tests: although we could not show correlations between the release of certain cytokines and antileukemic activity, however we could exemplarily demonstrate in one patient that cytotoxic CD4⁺ T-cells can lyse leukemic blasts without eliminating non-leukemic cells. The CD40L⁺CD4⁺ T-cell fraction represented the most effective antileukemic CD4⁺ T-cell fraction. Phenotypic analysis revealed that the antileukemic activity was associated with an increased effector memory as well as a decreased naive T-cell status. An analysis of the anti-leukemia-reactivity of CD4⁺ T-cells directly prepared from the patient in the clinical course of disease after SCT showed correlations between the amount of antileukemically active CD4⁺ T-cells and the stability of remission.

Further studies have to be performed to verify the exemplarily demonstrated CD4⁺ T-cell results and to achieve more detailed data about the role of soluble and cellular mechanisms involved in CD4⁺ T-cell-mediated immune responses, especially in the context of maintaining stable remissions in AML-patients after SCT. Continued characterizations and specific analyses of cytotoxic CD4⁺ effector-cell subpopulations, especially after allogeneic SCT are necessary.

1. Einleitung

1.1. Akute Leukämien

Rudolf Virchow prägte 1845 den Begriff „Leukämie“, der „weißes Blut“ bedeutet. Leukämien sind maligne Neoplasien des hämatopoetischen Systems. Man unterscheidet zwischen „chronischen“ und „akuten“ Leukämien, wobei akute Leukämien auch als „unreifzellige“ Leukämien bezeichnet werden, die durch eine fehlende Differenzierung, Ausreifung und eine Arretierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen charakterisiert sind und den chronischen „reifzelligen“ Leukämien gegenübergestellt werden. Die akute Leukämie ist geprägt durch die Expansion des malignen Zellklons, da physiologische Regulationsmechanismen versagt haben. Durch einen Proliferationsvorteil der malignen Vorläuferzellen („Blasten“) kommt es zur Verdrängung der normalen Hämatopoese und der Ausschwemmung dieser malignen Vorläuferzellen von Knochenmark in das periphere Blut, mit eventueller Infiltration der extramedullären Organe (Wilhelm and Wilms 2000). Abhängig vom abstammenden Zelltyp der Leukämie, kann zwischen „lymphatischer“ oder „myeloischer“ Leukämie differenziert werden. Weitere Klassifizierungsmöglichkeiten sind die Unterteilung nach der Ätiologie, in „primäre“ oder „sekundäre“ Leukämie (Wilhelm and Wilms 2000).

Klonale Erkrankungen des hämatopoetischen Systems mit ähnlichen Merkmalen lassen sich häufig nicht exakt klassifizieren und abgrenzen. Dazu gehören z. B. das myeloproliferative Syndrom oder das myelodysplastische Syndrom (Kolb 2000; Hiddemann, Braess et al. 2009). Neuere Studien zeigen, dass etwa 17 % der myelodysplastischen Syndrome in eine akute myeloische Leukämie übergehen können (Haferlach, Zenger et al. 2011).

1.1.1. Definition und Epidemiologie der AML

Akute Neoplasien des hämatopoetischen Systems treten in allen Altersstufen auf. Bei der akuten myeloischen Leukämie (**AML**) liegt die Krankheitshäufigkeit aller Leukämiefälle bei 80 – 90 % im Erwachsenenalter, im Vergleich zu 15 – 20 % der Leukämiefälle im Kindesalter. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt für die AML bei 67 Jahren. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko einer Neuerkrankung, mit steilem Anstieg ab dem 45-igsten Lebensjahr. Die altersabhängige Inzidenz liegt bei 3,5 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr mit erhöhter Inzidenzrate bei Männern im Vergleich zu Frauen

(<http://seer.cancer.gov>) (Siegel, Naishadham et al. 2012). Weltweit liegt die höchste Inzidenzrate in den Vereinigten Staaten, Australien und Westeuropa.

1.1.2. Das Krankheitsbild der AML

Das Krankheitsbild der **AML** ist geprägt von Knochenmarkinsuffizienz, die zu einer Verdrängung von gesunden, funktionstüchtigen, hämatopoetischen Zellen und zur Infiltration maligner Zellen in verschiedene Organe und Gewebe führt. Fehlende Differenzierung von Zellen führt zu Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie. Allgemeinsymptome, wie Mattigkeit, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, Kopfschmerzen, Schlaflosigkeit sowie Fieber unklarer Genese, Tachykardien und Belastungsdyspnöen, treten häufig plötzlich („akut“) auf und sind meist Folge einer schweren Anämie. Infolge einer verminderten Thrombozytenzahl, sowie den Mangel an Gerinnungsfaktoren und einer gesteigerten Fibrinolyseaktivität, kann es zu erhöhter Blutungsbereitschaft in Mund- und Rachenraum kommen. Aufgrund der verminderten Funktionstüchtigkeit der Leukozyten, besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko das sich z. B. in Mundsoor, Zahnfleischnekrosen, Stomatitis oder perianalen Abszessen manifestieren kann (Kolb 2000; Hiddemann, Braess et al. 2009).

1.1.3. Ätiologie und Pathogenese der AML

Bei der Entstehung und Entwicklung einer **AML** handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, bei der eine Vielzahl an Veränderungen in den hämatopoetischen Vorläuferzellen zur Leukämogenese führt. Ausgehend von einem „Einzel-Zell“ Ereignis verläuft die leukämische Transformation individuell variabel und resultiert in Arretierung der Zelldifferenzierung in verschiedenen Reifestadien der Hämatopoese. Fehlende oder mangelnde Regulationsmechanismen begünstigen die Leukämogenese. Viele Faktoren, die an der Entwicklung einer normalen Hämatopoese oder Leukämogenese beteiligt sind, sind bisher nicht bekannt (Cammenga 2005; Estrov 2010).

Man unterscheidet zwischen *de novo* AML-Formen, also den spontan entstandenen Transformationen und im Vergleich dazu, sekundäre AML-Formen, z. B. nach erfolgter Strahlen-/Chemotherapie (therapieassoziierte Leukämien) (Vardiman, Harris et al. 2002; Godley and Larson 2008) oder aus einem MDS/MPS hervorgegangene Formen. Die therapieassoziierten Leukämien sind häufig mit spezifischen Chromosomenaberrationen assoziiert (z. B. Deletion Chromosom 5/7) (Natelson 2007; Godley and Larson 2008).

In der Literatur sind verschiedene Risikofaktoren beschrieben, die mit einer Prädisposition bei der AML assoziiert sind (Natelson 2007). Unbestritten ist der Einfluss radioaktiver

Strahlung auf die Inzidenzrate von Leukämien und abhängig von der Strahlendosis, Expositionsdauer und Alter bei Exposition (Ichimaru, Ishimaru et al. 1978; Ishimaru, Otake et al. 1979; Ivanov, Tsyb et al. 2012). Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungsanalysen (FISH) zeigten einen deutlichen Anstieg an strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen (z. B. -7; del 20q13.2) nach radioaktiver Exposition (Nakanishi, Tanaka et al. 1999). Benzol oder Benzolderivate sowie Äthylenoxide, Pestizide oder organische Lösungsmittel gelten als weitere Risikofaktoren zur Induktion von AML oder MDS (Natelson 2007). Chromosomale Aberrationen, wie z. B. das Down-Syndrom, die Fanconi-Anämie (Velez-Ruelas, Martinez-Jaramillo et al. 2006; Auerbach 2009) oder das Bloom-Syndrom (Poppe, Van Limbergen et al. 2001) begünstigen die Entstehung von Leukämie.

1.1.4. Diagnostik und Klassifikation

Zur sicheren Diagnosestellung ist eine zytomorphologische Begutachtung von Blut- und Knochenmarkausstrichen mittels Pappenheim-Färbung in Kombination mit zytochemischen und immunzytologischen Analysen erforderlich. In den 70er Jahren wurde erstmals eine systematische Einteilung der akuten Leukämien erarbeitet (Bennett, Catovsky et al. 1976; Bennett, Catovsky et al. 1985; Yin, Medeiros et al. 2010). Basierend auf der so genannten „French-American-British“ (FAB)-Klassifikation bilden die zytomorphologischen und zytochemischen Merkmale (Myeloperoxidase MPO, unspezifische Esterase NSE, Glykogen in der PAS-Färbung) die Grundlage und erlauben eine Unterteilung der AML in neun Subtypen (Tabelle 1).

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML. Der Prozentsatz und die Angabe der Prognose bezieht sich auf den relativen Mittelwert der AML-Fälle bei Erwachsenen in den USA (aktualisiert 2007; entnommen <http://www.cancer.org>).

FAB-Subtypen	Definition	% AML bei Erwachsenen	Prognose
M0	undifferenzierte AML	5	ungünstige
M1	AML mit minimaler Differenzierung	15	intermediäre
M2	AML mit Differenzierung	20	gute
M3	akute promyelozytäre Leukämie	10	sehr gute
M4	akute myelomonozytäre Leukämie	25	intermediäre
M4eo	akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie	5	gute
M5	akute monozytäre Leukämie	10	intermediäre
M6	akute erythroide Leukämie	5	ungünstige
M7	akute megakaryoblastische Leukämie	5	ungünstige

Die Klassifikation der AML ist in 5 – 20 % der AML-Fälle (z. B. AML M0, M6, M7, biphänotypische Leukämie) allein nach Zytomorphologie und Zytochemie nicht ausreichend. Mit Hilfe der Immunphänotypisierung kann die Linienzugehörigkeit und der Reifegrad der Blasten differenziert werden. Typische panmyeloische Marker sind CD13, CD33, CD65 (Oberflächenantigene; „Cluster of Differentiation“). Zur weiteren Differenzierung der immunologischen Subtypen werden folgende Marker eingesetzt: in der monozytären Reihe CD64, und CD14, in der granulozytären CD15, CD16, und LF (Laktoferrin), in der erythrozytären Glykophorin A, in der thrombozytären CD41 und CD61, für NK-Zellen („natural killer“) CD16, CD56 und CD57. Reifegradassoziierte Antigene sind CD34, HLA-DR und CD117. Weitere wichtige diagnostische und prognostische Informationen liefert die klassische Chromosomen- bzw. FISH-Analyse. Da die FAB-Klassifikation keine zytogenetischen Marker bzw. eine daraus resultierende Risikobewertung berücksichtigt, wurde die AML-Klassifikation Ende der 1990er von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) modifiziert und erweitert, (Tabelle 2 (Vardiman, Harris et al. 2002; Vardiman, Thiele et al. 2009)). Die WHO-Klassifikation kombiniert morphologische, immunphänotypische, genetische und klinische Besonderheiten. Dabei wurde der Blastenanteil im Knochenmark bei Diagnosestellung einer AML und zur Abgrenzung zum MDS von 30 % auf 20 % reduziert. In der WHO-Klassifikation sind zudem klinische und biologische Subgruppen, wie z. B. das MDS, das MPS oder einige Arten von Sarkomen, berücksichtigt worden.

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der myeloiden Neoplasien. Bei der WHO-Klassifikation wurde für die Diagnosestellung der Blastenanteil von 30 % auf 20 % reduziert und klinische und biologische Subgruppen integriert. Einige Arten von Sarkomen, das myelodysplastische Syndrom oder das myeloproliferative Syndrom sind in dieser Klassifikation enthalten (Vardiman, Harris et al. 2002; Vardiman, Thiele et al. 2009).

AML-Typen	AML-Subtypen
AML mit typischen Chromosomenaberrationen	▪ AML mit t(8;21)(q22;q22), AML1/ETO
	▪ AML mit abnormen Eosinophilen im Knochenmark und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBFB/MYH11)
	▪ akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR) und Varianten
	▪ AML mit 11q23 (MLL) Abnormitäten
AML mit multilineären Dysplasie	▪ mit vorangegangenem MDS oder MDS/MPS
	▪ ohne vorangegangenem MDS oder MDS/MPS, aber mit Dysplasie in mindestens 50 % der Zellen in 2 oder mehr myeloischen Zellreihen
AML und MDS, therapie-assoziiert	▪ alkylierende Agentien/Bestrahlung assoziierte Typen
	▪ Topoisomerase-II Inhibitor assoziierte Typen
	▪ andere
AML, nicht anderweitig klassifiziert	▪ AML ohne Differenzierung
	▪ AML mit minimaler Differenzierung
	▪ AML mit Differenzierung

AML, nicht anderweitig klassifiziert	▪ akute myelomonozytäre Leukämie
	▪ akute monoblastische/akute monozytäre Leukämie
	▪ akute erythroide Leukämie (erythroide/myeloide und Erythroleukämie)
	▪ akute megakaryozytische Leukämie
	▪ akute basophile Leukämie
	▪ akute Panmyelose mit Myelofibrose
	▪ Myeloisches Sarkom

t Translokation, inv Inversion, del Deletion, q langer Arm eines Chromosoms, p kurzer Arm eines Chromosoms, +/- zusätzliches/fehlendes Chromosom.

1.1.5. Prognosekriterien

Da es sich bei der AML um eine sehr heterogene Erkrankung handelt, ist eine genaue Diagnosestellung und Klassifikation essentiell für die individuelle Therapie und Risikobewertung. Mit Hilfe der Zytogenetik können verschiedene chromosomale Aberrationen identifiziert und aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften, in prognostisch günstig, intermediäre oder in ungünstige Risikogruppen differenziert werden (siehe Tabelle 3 (Greenberg, Cox et al. 1997; Mrozek, Heinonen et al. 1997; Schoch and Haferlach 2002; Haferlach, Kern et al. 2004)). Generell weisen sekundäre AML-Formen eine ungünstigere Prognose auf als primäre AML-Formen. Zudem besteht bei der MDS in Abhängigkeit vom Subtyp ein vermehrtes Risiko der Transformation zur AML (Solenthaler and Tobler 2004). Dabei sind der Blastenanteil und der initiale Karyotyp prädiktive Parameter für das Überleben und das Risiko einer Transformation (Aul, Gattermann et al. 1992).

Tabelle 3: Zytogenetische Risikogruppen der AML.

Risikogruppe	Chromosomale Aberrationen
gute Prognose	t(15;17); t(8;21); inv/t(16)
ungünstige Prognose	del(5q); del(7q); -5; -7; inv/t(3); del/t(11q23); komplexer Karyotyp mit ≥ 3 Aberrationen
intermediäre Prognose	normaler Karyotyp, verbleibende Aberrationen

t Translokation, inv Inversion, del Deletion, q langer Arm eines Chromosoms, p kurzer Arm eines Chromosoms, +/- zusätzliches/fehlendes Chromosom.

1.1.6. Therapie

Verschiedene Protokolle wurden entwickelt, um Patienten mit **AML** zu behandeln. Wichtig für die Protokollwahl sind bei Diagnosestellung der Subtyp, Zytogenetik, Alter, Begleiterkrankungen (z. B. Infektionen) oder die Verfügbarkeit eines passenden Stammzellspenders. Prinzipiell kann man 2 Phasen der Therapie unterscheiden: Induktionstherapie und Post-Remissionstherapie (Konsolidierung). Zahlreiche Studien variieren die Art der Induktionstherapie und Post-Remissionstherapie sowie die zeitliche Abfolge der einzelnen Therapieabschnitte oder Zeitpunkt und Art der SCT. Das Ziel jeder Behandlung ist das Erreichen oder der Erhalt einer kompletten Remission (CR). Eine CR ist definiert durch: keine nachweisbaren Blasten im PB, die Hämatopoese muss sich auf Thrombozytenwerte $> 100.000/\mu\text{l}$ und Neutrophilenwerte $> 1.000/\mu\text{l}$ normalisieren und der Blastenanteil im BM muß bei $< 5\%$ liegen. Darüberhinaus dürfen keine extramedullären Manifestationen (Chlorome) vorliegen und keine transfusionsbedürftigen Anämien vorhanden sein (Cheson, Bennett et al. 2003). Entscheidend für die Prognose und das Langzeitüberleben ist das Erreichen und die Zeitspanne bis zu einer CR nach Diagnosestellung, d. h. je schneller eine CR erreicht wird, desto günstiger (Hiddemann, Braess et al. 2009).

Die „Standardinduktionstherapie“ besteht aus einer Kombination von Cytarabin (Zell-Zyklus spezifisch) und einem Anthrazyklin (Zell-Zyklus unspezifisch), in dem sogenannten 7 + 3 Schema, dabei liegt die Remissionsrate bei Erwachsenen zwischen 50 – 75 %, jedoch kann nur in 20 – 30 % eine längere Krankheitsfreiheit erzielt werden (Rai, Holland et al. 1981) mit einem deutlichen Absinken der CR-Rate in älteren Patienten.

Die Konsolidierungstherapie soll den Therapieerfolg der Induktionstherapie verbessern, CR erhalten, residuale Blasten (MRD) eliminieren und ein Rezidiv verhindern. Grundlage der Konsolidierungstherapie ist die Chemokonsolidierung (konventionell oder intensiv) oder die Chemoradiotherapie, jeweils in Kombination mit einer allogenen oder autologen hämatopoetischen SCT oder einer „low-dose“ Erhaltungstherapie (Tallman, Gilliland et al. 2005). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine intensive repetitive Chemotherapie mit hoch-dosierten AraC und einem Anthrazyklin oder AMSA die besten Überlebensergebnisse liefern (Hiddemann, Braess et al. 2009). Retrospektive Analysen verschiedener Studiengruppen und prospektive Studien konnten zeigen, dass eine intensive Chemokonsolidierung günstig für jüngere im Vergleich zu älteren Patienten ist (Bennett, Young et al. 1997; Buchner, Berdel et al. 2009). Sie wirkt sich günstig auf Krankheitsfreiheit und Überlebenszeit aus (Tallman, Gilliland et al. 2005). Die allogene SCT stellt die effektivste Therapieoption bei AML-Patienten dar. Sie ist assoziiert mit der geringsten Rezidivrate, jedoch mit einer erhöhten transplantationsassoziierten Morbidität und Mortalität, die bei etwa

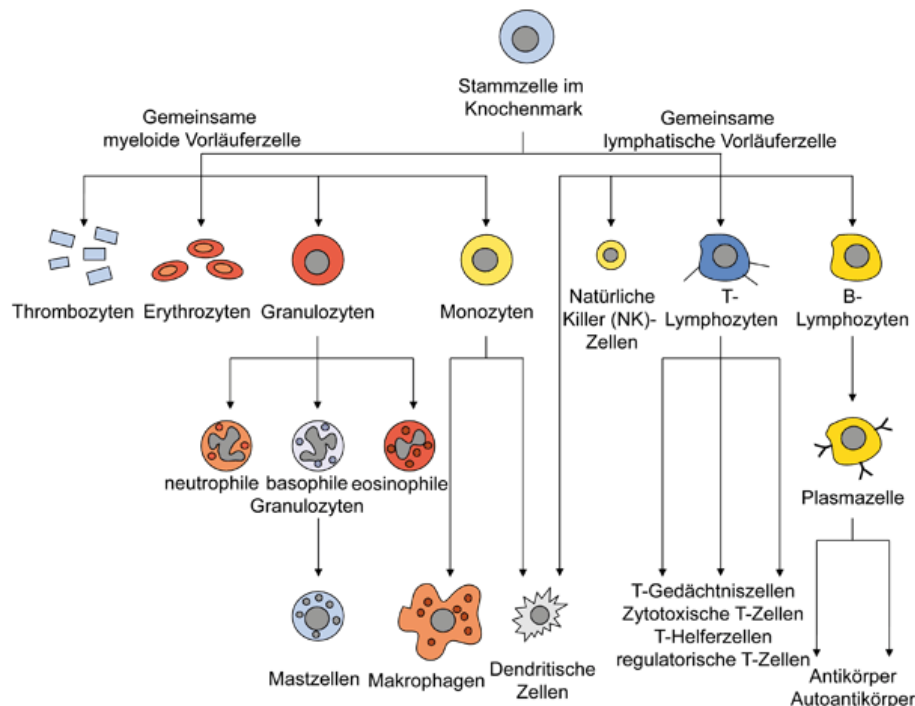
9 % liegt. Bei einer SCT in erster CR kann ein leukämiefreies Überleben in 55 – 77 % erzielt werden (Bennett, Young et al. 1997; Tallman, Gilliland et al. 2005; Schmid 2009). Generell muss das Risiko von transplantationsassoziierten Risiken dem leukämieassoziierten Risiko gegenübergestellt werden, der Trend geht in Richtung risikoadaptierter individueller Therapien (Krug, Buchner et al. 2011). Beispielsweise werden bestimmte AML-Subtypen erst im Rezidiv transplantiert und bei prognostisch sehr ungünstigen Subtypen, mündet die Induktion gleich in eine SCT (de Labarthe, Pautas et al. 2005; Schmid, Labopin et al. 2012).

1.2. Das Immunsystem

Das Immunsystem der Vertebraten besitzt eine Reihe von Abwehrmechanismen, um körpereigene und körperfremde Pathogene, wie z. B. Tumorzellen, Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten zu erkennen und zu eliminieren. Nachdem Krankheitserreger die äußere Barriere der Haut oder Schleimhaut überwunden haben, treffen diese auf Zellen des **angeborenen Immunsystems**. Diese erste und schnelle Verteidigungslinie umfasst humorale und zelluläre Bestandteile. Zelluläre Immunzellen, wie z. B. Makrophagen, Neutrophile oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen; „natural killer cell“), erkennen und binden an spezifische Oberflächenmuster ganzer Pathogengruppen (z. B. Lipopolysaccharide, ds-RNA, unmethylierte CpG Dinukleotide) und eliminieren sie. Humorale Bestandteilen des angeborenen Immunsystems, wie z. B. das Komplementsystems, Chemokine, Interferone oder Interleukine, wirken dabei unterstützend. Kann ein Krankheitserreger die erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems überwinden, wird das **adaptive Immunsystem** aktiviert. Dieses hochspezifische, sich ständig anpassende Abwehrsystem, mit nahezu unbegrenzter Vielfalt, entfaltet sich innerhalb von Tagen nach Infektion und richtet sich spezifisch gegen ein Antigen (Ag). Rezeptoren, die spezifisch ein antigenes Epitop erkennen, liegen entweder membrangebunden an der Zelloberfläche oder löslich als Antikörper (AK) vor. Weitere Eigenschaften des adaptiven Immunsystems sind die Fähigkeit zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses und der Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“.

Blut- oder Immunzellen differenzieren aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark (siehe Abbildung 1). Nach Festlegung eines Differenzierungsweges reifen die myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark, die der lymphatischen Vorläuferzellen im Thymus. Nach Determinierung zirkulieren die reifen Blut- oder naiven Immunzellen im Körper.

Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung zur Entwicklung von Blut- und Immunzellen. Über mehrere Differenzierungsschritte entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, Blut- und Immunzellen. Graphik entnommen: <http://www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/wachstumsfaktoren.php>, abgerufen 01.09.2014.

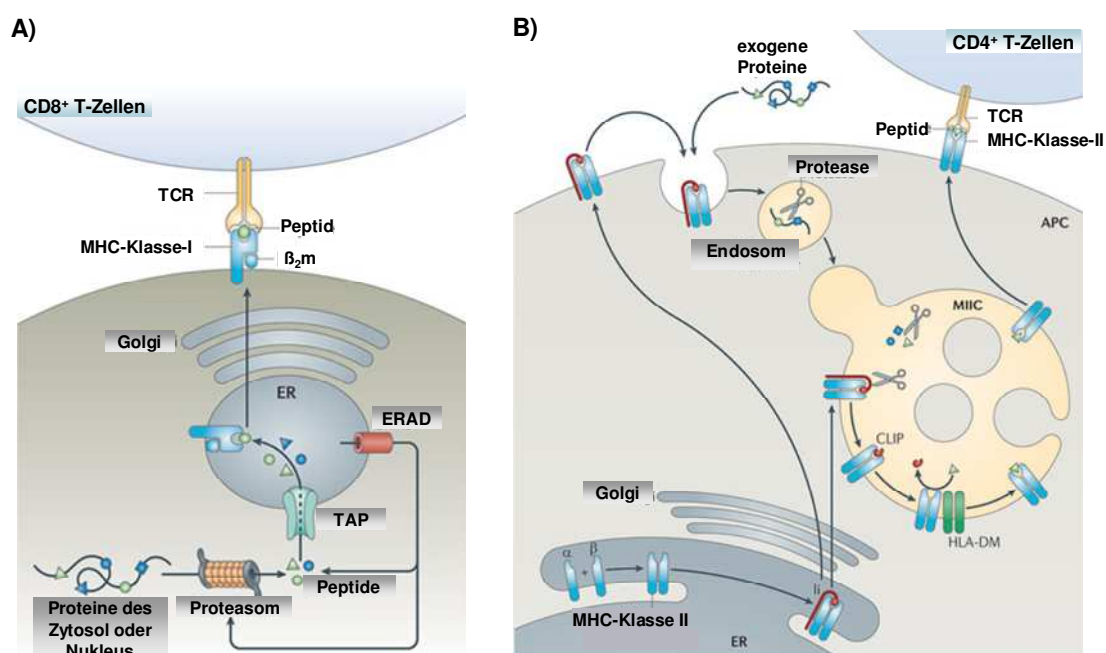


Das adaptive Immunsystem wird durch B- und T-Lymphozyten vermittelt. Erst nach direktem Zell-Zell-Kontakt mit einer „professionellen“ antigenpräsentierenden Zelle (APC; „antigen-presenting cell“) erfolgt die Aktivierung der Lymphozyten. Dabei sezernieren B-Zellen nach Aktivierung und Differenzierung zur Plasmazelle lösliche AK, sogenannte Immunglobuline (Ig), die dem membrangebundenen Antigenrezeptor einer B-Zelle entsprechen. Nach Bindung des AK an sein Ag ist das Pathogen „markiert“ und kann durch Phagozyten eliminiert werden. Ein großer Teil der aktivierten B-Zellen differenziert zur Plasmazelle, die restlichen bilden sich zu B-Gedächtniszellen aus. Nach Eliminierung des Ag erfolgt die Apoptose (programmierter Zelltod) der meisten APCs. Im Gegensatz zu Plasmazellen, die eine Lebensdauer von wenigen Tagen aufweisen, können B-Gedächtniszellen nach Jahren und erneutem Kontakt mit ihrem Ag sehr schnell zu Plasmazellen differenzieren.

Analog zu den B-Zellen erfolgt nach Aktivierung der naiven T-Lymphozyten durch APCs (z. B. mDC; „mature dendritic cell“) die Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten zu T-Effektorzellen (klonale Expansion). Dabei kann man funktional zwischen $CD8^+$ ($CD4^+$) zytotoxischen T-Zellen (CTLs) und immunmodulierenden $CD4^+$ T-Zellen (z. B. T_H1 , T_H2 , iT_{reg}) unterscheiden. CTLs können infizierte Zellen oder Tumorzellen direkt abtöten. Immunmodulierende $CD4^+$ T-Zellen, die auch als T-Helferzellen bezeichnet wurden, sezernieren Zytokine und exprimieren kostimulatorische Moleküle. Sie unterstützen und modulieren die Aktivierung von CTLs, Makrophagen und B-Zellen. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) liegt im Gegensatz zu den B-Zellen immer membrangebunden vor und erkennt nur

Epitope, die im Kontext von sogenannten MHC-Molekülen (Haupthistokompatibilitätskomplex; „major histocompatibility complex“) präsentiert werden. Codiert werden die MHC-Moleküle im humanem System durch die HLA-Gene (humane Leukozyten Antigene; „human leucocyte antigen“). Entdeckt wurden die MHC-Moleküle in der Transplantationsmedizin, bei der es infolge von Gewebeunverträglichkeiten zu Transplantatabstoßungsreaktionen kommt. Man unterscheidet zwischen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen. MHC-Klasse-I-Moleküle werden in allen kernhaltigen Zellen exprimiert und binden Epitope, die von zytoplasmatischen Proteinen stammen; sie werden von CTLs erkannt. MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren Epitope, die z. B. durch Endozytose aus dem extrazellulären Raum aufgenommen und in Vesikeln abgebaut wurden (siehe Abbildung 2 (Neeffjes, Jongmsa et al. 2011)). Sie werden von T-Helferzellen erkannt und befinden sich auf professionellen APCs (z. B. DCs, B-Zellen, Makrophagen, Langerhans Zellen) (Janeway C.A., Travers P. et al. 2002; Alberts B., Johnson A. et al. 2004).

Abbildung 2: Schema zur MHC-Klasse-I/II Ag-Präsentation, modifiziert nach Neeffjes et al. 2011 (Neeffjes, Jongmsa et al. 2011). **A)** Die Präsentation intrazellulärer Peptide durch MHC-Klasse-I erfolgt durch eine Reihe an Reaktionen. Nach Abbau der Proteine im Proteasom werden die gespaltenen Peptide über einen „Transporter“ (TAP) in das ER transportiert. Die MHC-Klasse-I-Moleküle werden mit den gespaltenen antigenen Peptiden beladen. Der beladene Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex wird freigesetzt und über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert und steht anschließend den $CD8^+$ T-Zellen zur Ag-Präsentation zur Verfügung. **B)** Im ER erfolgt der Zusammenbau der MHC-Klasse-II α - und β -Kette und bildet mit der invarianten Kette (Ii) einen Komplex (Ii-MHC-Klasse-II Heterotrimer) aus. Dieser Komplex wird anschließend über den Golgi-Apparat zum MHC-Klasse-II-Kompartiment (MIIC) entweder direkt und/oder über die Plasmamembran transportiert. Durch Endo- oder Phagozytose aufgenommene Proteine und invariante Ketten-Proteine (Ii) werden durch Proteasen des MIIC zu kürzeren Peptiden abgebaut. Die gespaltenen Klasse-II-assoziierten invarianten Ketten-Peptidfragmente (CLIP) verbleiben in der Peptidbindungstasche des MHC-Klasse-II-Dimers und werden durch antigene Peptide höherer Affinität mit Hilfe von Chaperonen (z. B. HLA-DM) ausgetauscht. Anschließend wird der beladene MHC-Klasse-II-Peptid-Komplex zur Plasmamembran transportiert und präsentiert den $CD4^+$ T-Zellen im Komplex das antigene Peptid (TCR T-Zell-Rezeptor, ER endoplasmatisches Retikulum, β_2m β_2 -Mikroglobulin, ERAP ER-assoziierte Protein Degradation („ER-associated protein degradation“), TAP Transporter („transporter associated with antigen processing“), APC antigenpräsentierende Zelle, CLIP Klasse-II-assoziierte invariante Kettenpeptide („class II-associated invariant chain peptide“), MIIC MHC-Klasse-II-Kompartiment („MHC class II compartment“), Ii invariante Kette).



Die Entwicklung/Reifung der T-Lymphozyten erfolgt im Thymus. Jede T-Zelle trägt einen Ag-Rezeptor mit **einer** Spezifität. Der TCR kommt in zwei unterschiedlichen Varianten vor und wird als Heterodimer aus α - und β - oder aus γ - und δ -Polypeptidketten gebildet, die jeweils mit Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Etwa 90 – 95 % der T-Zellen mit α : β -TCR zirkulieren im Blutkreislauf und lymphatischen Organ. Die restlichen 5 – 10 % der T-Zellen mit γ : δ -TCR und weitgehend unbekannter Funktion, zirkulieren besonder häufig in den Epithelien der Haut oder dem Darm. Im Weiteren wird unter dem Begriff des TCRs der α : β -TCR verwendet. Die beiden Polypeptidketten entstehen durch somatische Rekombination der V(D)J-Gensegmente bestehend aus einem variablen (V) in Kombination mit der „joining“ (J) und einem konstanten (C) Gensegment, zusätzlich enthält die β -Kette des TCRs noch ein „diversity“ (D) Element. Entscheidend für die Antigenerkennung sind die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR, „complementarity determining regions“) des TCRs, die im hypervariablen Bereich lokalisiert sind. Beispielsweise besitzt die CDR3-Region eine höhere Sequenzvariabilität als die CDR1- und CDR2-Region. Während der somatischen Rekombination werden eine Reihe von funktionsuntüchtigen und autoreaktiven Varianten erzeugt, die anschließend durch positive und negative Selektion eliminiert werden (Janeway C.A., Travers P. et al. 2002; Alberts B., Johnson A. et al. 2004; Chaplin 2010).

1.2.1. Subpopulationen der T-Lymphozyten

T-Lymphozyten nehmen bei der adaptiven, zellvermittelten Immunantwort eine Schlüsselposition ein. Bindet der TCR an sein im Kontext von MHC-Klasse-I oder –II präsentiertes Ag (und weiterer kostimulatorischer Moleküle), wird innerhalb der T-Zelle eine Signalkaskade zur Aktivierung und Proliferation ausgelöst. Dabei differenzieren naive $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu Effektor-T-Zellen (T_{eff}). Die meisten der Effektoren sterben nach Eliminierung des Pathogens, wenige verbleiben und bilden ein immunologisches Gedächtnis aus. Diese Gedächtnis-T-Zellen können in Effektor-Gedächtnis- (T_{em}) oder zentrale Gedächtnis- (T_{cm}) T-Zellen unterteilt werden mit unterschiedlicher Expression an Chemokinrezeptoren, Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen. Nach erneutem Kontakt der Gedächtnis-T-Zellen mit ihrem Ag können diese proliferieren und differenzieren zu Effektoren aus. Die relativen Anteile von T_{cm} und T_{em} im Blut variieren zwischen den $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, mit höheren Anteilen an T_{cm} in $CD4^+$ und T_{em} in $CD8^+$ T-Zellen. In Zellgewebe konnte ein charakteristisches Muster mit höheren Anteilen an T_{cm} in Lymphknoten und Tonsillen im Vergleich zu höheren Anteilen an T_{em} in der Lunge, der Leber oder im Darm nachgewiesen werden. Die Gesamtheit der T_{naive} , T_{eff} , T_{em} , T_{cm} und der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) bilden den T-Zellpool (Sprent and Surh 2002; Sallusto, Geginat et al. 2004).

Die T_{reg} wurden früher als Suppressor-T-Zellen bezeichnet und umfassen eine sehr heterogene Gruppe. Sie sind von besonderer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz, bieten Schutz vor Autoimmunerkrankungen (z. B. Typ-1 Diabetes) und regulieren inflammatorische oder antimikrobielle Reaktionen. T_{reg} können z. B. in natürlich vorkommende T_{reg} des Thymus oder in adaptive oder induzierbare T_{reg} der Peripherie unterteilt werden und können sowohl zur Gruppe der $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen gehören (Chaplin 2010). Von besonderem Interesse sind die T_{reg} bei der Vermittlung von Antitumor-Reaktionen. T_{reg} regulieren und kontrollieren verschiedene supprimierende Mechanismen. Nach Vignali et al. kann die Funktion der T_{reg} in vier Basismechanismen unterteilt werden: Wirkung auf Regulation und Modulation von inhibitorischen Zytokinen (IL-10, TGF- β , IL-35), von Granzym A/B vermittelter Zytolyse, von CD25-abhängiger Apoptose infolge von Entzug an freiem IL-2 und ferner die Entwicklung/„Reifung“ von DCs. All diese durch regulatorische T-Zellen vermittelten Mechanismen führen zu einer veränderten T-Zell-Effektorfunktion (Vignali, Collison et al. 2008).

1.2.2 $CD8^+$ T-Zellen

Etwa 30 – 40 % der im Blut oder den sekundären lymphatischen Organ zirkulierenden T-Zellen gehören zur Gruppe der $CD8^+$ T-Zellen ($CD8^+CD4^-$). Die Hauptaufgabe der $CD8^+$ T-Zellen liegt in ihrer zytotoxischen Funktion gegenüber infizierte Zellen oder Tumorzellen (Chaplin 2010). Dabei kann nach TCR-abhängiger MHC-Klasse-I-restringierter Initiierung zwischen zwei Hauptsignalwegen der CTL-Aktivierung differenziert werden: eine Ca^{2+} -abhängige Granzym/Perforin-vermittelte oder eine Ca^{2+} -unabhängige Fas/FasL-vermittelte Apoptose (Broere, Apasov et al. 2011).

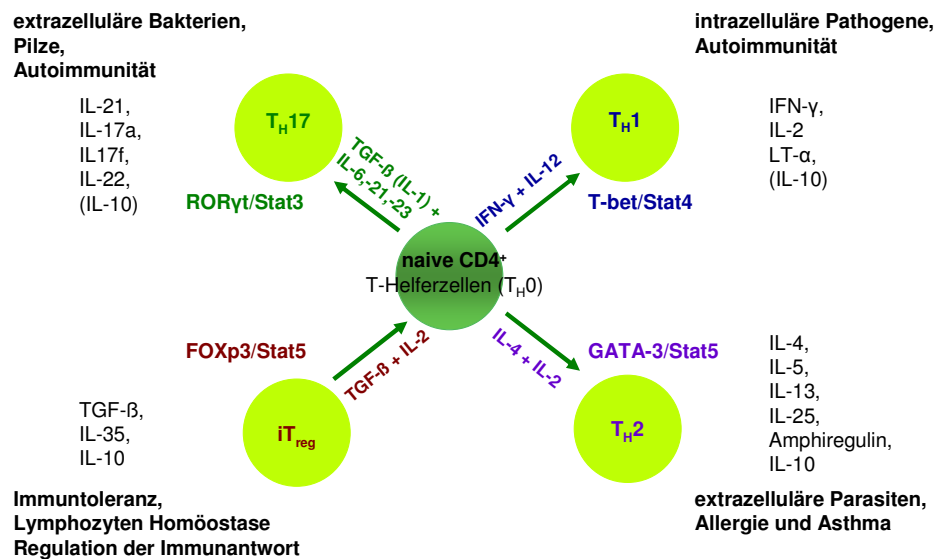
Zur Aufrechterhaltung der zytotoxischen Funktion oder um Gedächtnis-T-Zellen zu generieren werden verschiedene Überlebens- oder Todessignale benötigt. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass IL-2, IL-4, IL-15 oder IFN- γ die Aufrechterhaltung der Effektorfunktion und andere Zytokine die klonale Expansion der aktivierten CTL begünstigen oder für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses verantwortlich sind. (Dobrzanski, Reome et al. 2000). Anhand des sezernierten Zytokinprofils können zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen (T_c) in zwei Subpopulationen differenziert werden: T_c1 - oder T_c2 -Zellen. Dabei sezernieren T_c1 -Zellen vor allem IL-2 oder IFN- γ und T_c2 -Zellen IL-4, IL-5 oder IL-10. T_c1 -Zellen nutzen beide Hauptsignalwege zur Aktivierung, wohingegen T_c2 -Zellen hauptsächlich den Fas/FasL Signalweg nutzen (Halverson, Schwartz et al. 1997; Fowler and Gress 2000). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass allospezifische $CD8^+$ T-Zellen mit T_c2 -Phänotyp zu einer geringen GvHD aber gleichzeitig einen signifikanten GvL-Effekt induzierten (Fowler and Gress 2000).

1.2.3 CD4⁺ T-Zellen, T-Helferzellen

CD4⁺ T-Zellen (T_H) besitzen eine zentrale Rolle in der Steuerung des Immunsystems. Und lassen sich anhand ihrem Zytokinprofil in funktionell unterschiedliche Subpopulationen einteilen. Aus naiven CD4⁺ T-Zellen (T_{H0}) entwickeln sich vier unterschiedliche Subpopulationen. Die Subpopulationen umfassen: T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} und induzierbare regulatorische T-Zellen (iT_{reg}) nach Zhu et al. (Zhu and Paul 2008), die jedoch *in vivo* nicht eindeutig voneinander differenziert werden und gemischte Phänotypen aufweisen können (Kamradt and Ferrari-Kuhne 2011). Jede Subpopulation sezerniert selbst eigene typische Zytokine, die das Immunsystem modulieren und Zielzellen aktivieren. Die Entwicklung der Subpopulationen wiederum ist abhängig von der Aktivierungsart. Beispielsweise sezernieren Makrophagen oder NK-Zellen IL-12 und induzieren die Differenzierung in Richtung T_{H1}-Phänotyp. IL-4 produzierende basophile Granulozyten oder Mastzellen induzieren die Differenzierung hin zu T_{H2}-Zellen, wohingegen die Sezernierung von TGF-β oder IL-6 zu einer Ausbildung von T_{H17}-Zellen führt (Chaplin 2010).

Die entscheidenden Signalwege und Transkriptionsfaktoren (siehe Abbildung 3), die beispielsweise an der T_{H1}-Differenzierung beteiligt sind, sind z. B. Stat-4 und T-bet. T_{H1}-Zellen, vermitteln Immunreaktionen gegen intrazelluläre Pathogene, Viren oder sind an Autoimmunerkrankungen (z. B. Multiple Sklerose) beteiligt. Die wichtigsten durch T_{H1}-Zellen sezernierten Zytokine sind z. B. IFN-γ oder IL-2. Beispielsweise hat IL-2 einen Einfluss auf die Ausbildung von CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen. T_{H2}-Zellen sind an Immunreaktionen gegen extrazelluläre Parasiten oder Asthma beteiligt, wohingegen T_{H17}-Zellen Immunreaktion gegen extrazelluläre Bakterien oder Pilze vermitteln. T_{H2}-Zellen produzieren Interleukine (z. B. IL-4, -5, -9, -10) und GM-CSF (Chaplin 2010). Sie sind z. B. durch IL-4-Freisetzung hauptverantwortlich für AK-Klassenwechsel in B-Zellen (Kamradt and Ferrari-Kuhne 2011). Sie exprimieren Transkriptionsfaktoren wie z. B. GATA-3. T_{H17}-Zellen hingegen sezernieren z. B. IL-17a und IL-17f und beeinflussen dadurch die Aktivierung von z. B. neutrophilen Granulozyten und exprimieren z. B. den Transkriptionsfaktor RORγt. Die Zuordnung der sezernierten T_H-Zytokine kann in den einzelnen Publikationen variieren. (Zhu and Paul 2008; Chaplin 2010).

Abbildung 3: Zusammenfassende Darstellung der wichtigsten CD4⁺ Subpopulationen mit Funktion, charakteristischen Transkriptionsfaktoren zur Differenzierung und relevante immunmodulierende Zytokine, modifiziert nach (Zhu and Paul 2008). (T_H T-Helferzellen, IL Interleukin, TGF transformierender Wachstumsfaktor „transforming growth factor“, LT Lymphotoxin, IFN Interferon, Signalweg und Transkriptionsfaktoren: (RORγt/Stat3), (FOXP3/Stat5), (GATA-3/Stat5) und (T-bet/Stat4)).



Aufgrund der hohen Diversität von CD4⁺ T-Zellen, ihrer Bedeutung und einzigartigen Funktion (Aktivierung, Regulation) für das Immunsystem, bieten CD4⁺ T-Zellen eine Alternative zu den bisherherigen Immuntherapien und sind bisher weit unterschätzt (Muranski and Restifo 2009).

1.3. Tumورimmunologie

Das Immunsystem besitzt die Fähigkeit, Tumorzellen aufzuspüren, zu überwachen und zu eliminieren. Diese Hypothese der **Tumorüberwachung** („immune surveillance“) wurde erstmals von Burnet und Thomas erstellt, in den 60er Jahren publiziert (Burnet 1970; Martinez and de Gruij 2008) und über Jahre sehr kontrovers diskutiert. Beobachtungen an z. B. immunsupprimierten Patienten nach Nierentransplantation zeigten ein 300 – 400-fach erhöhtes Risiko an virusassoziierten Tumoren, wie z. B. dem Karposi Sarkom, zu erkranken (Penn 1988). Neuere Studien zeigten ein erhöhtes Risiko auch für nicht virusassoziierte Tumore (Dunn, Bruce et al. 2002). In tierexperimentellen Versuchen an immunkompetenten und immundefizienten Mäusen konnte die Hypothese der Tumorüberwachung bestätigt werden (Schreiber, Old et al. 2011; Vesely, Kershaw et al. 2011; Yaguchi, Sumimoto et al. 2011). Ein weiterer Meilenstein in der Tumورimmunologie, war die Entdeckung der tumorassoziierten Antigene (TAAs), Tumorabstoßungsantigene oder Tumorantigene (Klein 1966). TAAs sind zelleigene Proteine, die in malignen Zellen exprimiert und über den MHC-Komplex an der Zelloberfläche präsentiert werden. Über diesen Mechanismus können sie

von Immunzellen (z. B. T-Zellen, NK-Zellen) erkannt und eliminiert werden. TAAs werden in verschiedene Klassen unterteilt, wie z. B. Onkogene, Tumorsuppressorgene, Differenzierungsantigene, gewebespezifische Antigene oder onkovirale Antigene (Janeway C.A., Travers P. et al. 2002). Tumorzellen können der Erkennung durch das Immunsystem entgehen, indem sie eine hohe genetische Vielfalt und Instabilität aufweisen, ungehemmt proliferieren und fremdes Gewebe infiltrieren bzw. metastasieren. Dieser als **Tumorflucht** („immune escape“) bezeichnete Mechanismus ist durch Immunsuppression und Immunresistenz gekennzeichnet (Yaguchi, Sumimoto et al. 2011). Verschiedene Mechanismen sind bekannt, wie sich Tumorzellen der T-Zell-Erkennung entziehen können. Beispielsweise können Tumorzellen durch fehlende Prozession (z. B. durch epigenetische Modifikation) oder Präsentation an TAAs der T-Zell-Erkennung entkommen (Campoli and Ferrone 2008). Weitere Mechanismen sind z. B. das Fehlen oder Herunterregulieren an HLA Klasse-I Antigenen, das Fehlen wichtiger kostimulatorischer Signale (z. B. CD40, CD28), die Sekretion immunsupprimierender Chemokine und Zytokine (z. B. TGF- β , IL-6, VEGF) oder die fehlende Sekretion an T-Zell Wachstumsfaktoren (z. B. IL-2). Wenig ist bekannt über die Rolle der Präsentation, Regulation oder des Fehlens von HLA Klasse-II Antigenen und von kostimulatorischen Molekülen bei der Tumorflucht bei AML (van Luijn, Chamuleau et al. 2012). Tumorzellen beeinflussen nicht nur die T-Zellen bzw. APCs im direkten Zell-Zell-Kontakt, hier hemmen sie Erkennung, Reifung, Proliferation und Funktion, sondern sie schaffen sich ein Mikromilieu („microenvironment“), in dem APCs und naive T-Zellen nicht angelockt werden, einwandern oder aktiviert werden können (Khong and Restifo 2002; Yaguchi, Sumimoto et al. 2011).

Bei der Tumorüberwachung wird zwischen drei Phasen unterschieden. In der ersten Phase werden Tumorzellen erkannt und durch das angeborene und adaptive Immunsystem eliminiert, bevor der Tumor klinisch sichtbar wird („Eliminierung“). In der zweiten Phase erfolgt die Selektion, in der einzelne Tumorvarianten der Eliminierungsphase entgehen können. Das adaptive Immunsystem wird moduliert, so dass sich Immunsystem und Tumorzellen das Gleichgewicht halten („Äquilibrium“). Sie ist die längste der drei Phasen. In der dritten Phase werden Tumore klinisch sichtbar, sie entziehen sich der Tumorüberwachung und Eliminierung („Tumorflucht“) (Schreiber, Old et al. 2011).

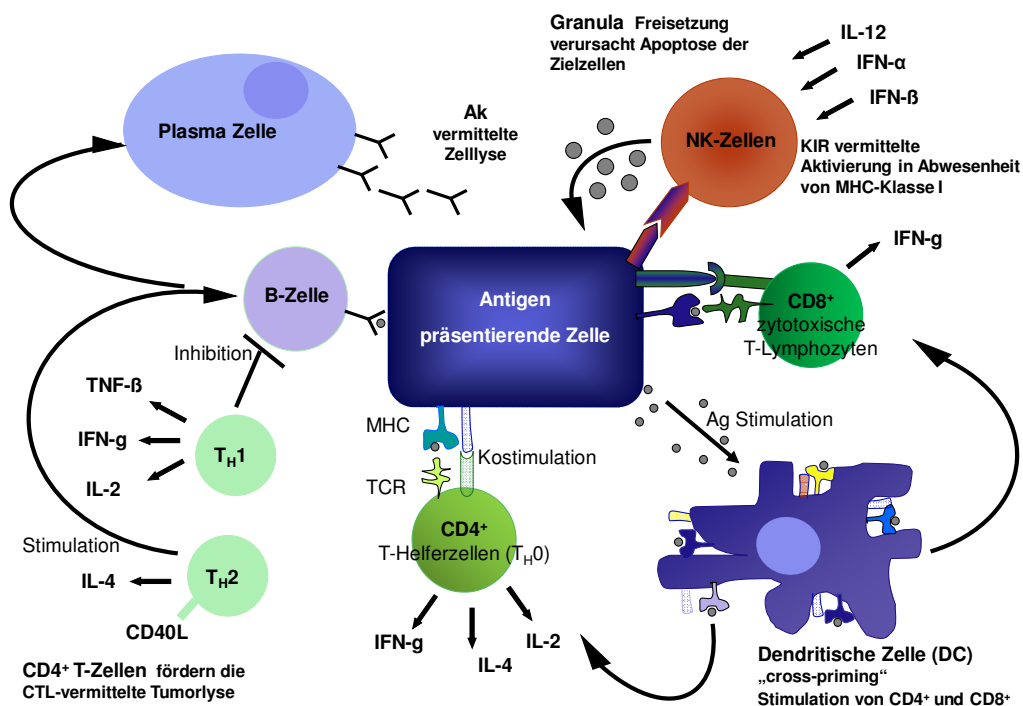
1.4. Immuntherapie zur Behandlung von AML

Die ideale Methode unerwünschte Immunreaktionen (z. B. Autoimmunerkrankungen, Allergien, Transplantatabstoßung, Tumorflucht) zu regulieren ist das Immunsystem selbst und damit die Immunantwort gezielt zu modulieren und so eigene hochwirksame und spezifische Mechanismen zu stimulieren.

Man unterscheidet bei der Tumor-Immuntherapie zwischen einer aktiven (z. B. Zytokine) und passiven (z. B. AK) Immuntherapie. Dabei wird bei der aktiven Immuntherapie versucht *in vivo* Immunzellen (z. B. T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen) spezifisch oder unspezifisch zu aktivieren. Im Vergleich dazu werden bei der passiven Immuntherapie spezifische Effektoren (z. B. AK, Effektorzellen) zugeführt. Um bessere Therapieergebnisse zu erzielen, können beide (aktive und passive) Immuntherapien kombiniert eingesetzt werden.

Zugleich können Immuntherapien in zelluläre und nicht-zelluläre Immuntherapien unterteilt werden. Abbildung 4 zeigt die zellulären Komponenten des Immunsystems und deren Einsatz bzw. Modifikationsmöglichkeiten zur Immuntherapie.

Abbildung 4: Zelluläre Komponenten des Immunsystems und deren möglicher Einsatz zur Immuntherapie, modifiziert nach (Guinn, Mohamedali et al. 2007). Nahezu alle zellulären Komponenten der normalen Immunantwort können modifiziert werden um die antitumorale Wirksamkeit von Immuntherapien zu erhöhen. Dabei werden die Wechselwirkungen zwischen Tumorzelle, normaler Immunantwort und dem Mikromilieu analysiert und in Hinblick auf ihren Einsatz als mögliche Immuntherapeutika untersucht. APCs wie z. B. Tumorzellen können genetisch verändert werden, um verstärkt MHC, Ag, kostimulatorische Moleküle und/oder Zytokine zu exprimieren. Diese veränderten Tumorzellen stimulieren die Immunantwort der T-Zellen (CTLs und T-Helferzellen), B-Zellen, DC und/oder der NK-Zellen. Die stimulierten T-Helferzellen setzen wiederum Zytokine frei, die die Immunantwort der CTLs, T-Helferzellen (T_H), B-Zellen, DCs und/oder der NK-Zellen beeinflussen bzw. verstärken. Beispielsweise kann durch Peptid-Vakzinierung die Ag-Präsentation moduliert werden oder durch die Gabe von AK die AK-vermittelte Zellyse induziert werden. Weitere zelluläre Immuntherapien basieren z. B. auf Peptid- oder RNA- „gepulsten“ DCs zur verbesserten Ag-Präsentation oder die Verwendung von NK-Zelllinien zur gezielten T-Zell Stimulation.



Bei der zellulären Immuntherapie werden z. B. T-Zellen, NK-Zellen oder DCs, bei der nicht-zellulären Immuntherapie z. B. Vakzine (z. B. LAA-Peptid-Vakzine mit oder ohne Adjuvantien), Tumor-AK oder Immunmodulatoren (z. B. Zytokine) eingesetzt. Von entscheidender Bedeutung für die Effektivität einer Immuntherapie sind die

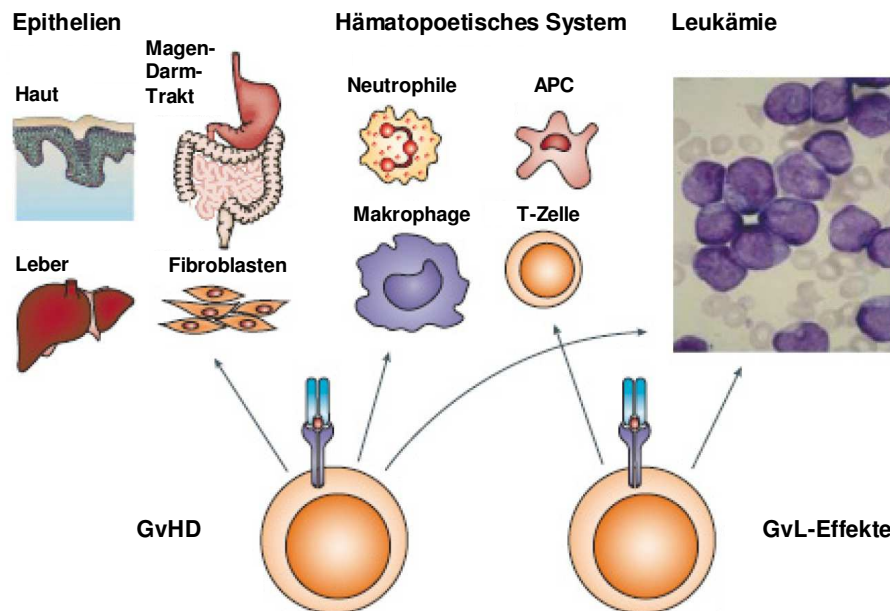
Wechselwirkungen zwischen Effektorzellen, T-Helferzellen (T_H), kostimulatorischen Molekülen und der Tumorzelle und verdeutlichen die Komplexität einer antileukämischen Immuntherapie (Alatrash and Molldrem 2010). Ziel der gerichteten (evtl. individuellen) Immuntherapie ist, eine möglichst lang anhaltende, am besten eine kurative Immunantwort mit vergleichsweise geringem Nebenwirkungsprofil auszulösen.

1.4.1. GvL- versus GvH-Reaktivität

Grundsätzlich können Transplantationen mit körpereigenen Zellen des Patienten (autolog), mit Zellen eines eineiigen Zwilling (syngen) oder mit Zellen eines anderen HLA-kompatiblen Spenders (allogen) erfolgen. Die genetischen Unterschiede zwischen Transplantat-Empfänger und -Spender können bei einer allogenen SCT zu schwerwiegenden immunologischen Komplikationen, bis hin zur Abstoßung bzw. zum Versagen des Transplantats führen. Dabei kann sich die Immunreaktion des Transplantats gegen den Empfänger (GvH; „Graft-versus-Host“) oder das Immunsystem des Empfängers gegen das Transplantat (HvG; „Host-versus-Graft“) richten.

Die Hauptursache für Immunreaktionen bei einer allogenen SCT beruhen auf den genetischen Unterschieden in den MHC-Klasse-I und -II kodierenden HLA-Genen. Dabei erkennen alloreaktive T-Zellen fremde MHC-Moleküle und führen im Transplantat-Empfänger zu unerwünschten akuten oder chronischen GvHD. Je nach Schwere der auftretenden Veränderungen in der Haut, in den Schleimhäuten des Magen-Darm-Trakts sowie in der Leber und der Lunge werden GvH-Reaktionen in Grad I – IV eingeteilt. Die akute GvHD bildet sich innerhalb der ersten 100 Tage nach SCT aus; nach 100 Tagen werden die unerwünschten Immunreaktionen als chronische GvHD bezeichnet, die Übergänge können dabei fließend sein. Unerwünschte Immunreaktionen bei HLA-identischer SCT beruht auf Unterschieden der Nebenhistokompatibilitätsantigene (mHags) und kann in etwa 50 % von HLA-identischen Knochenmarkstransplantationen zwischen Geschwistern beobachtet werden und führt dabei zu einer verminderten, abgeschwächten T-Zellreaktion (Appelbaum 2003; Falkenburg, van de Corput et al. 2003; Kolb, Schmid et al. 2004; Shlomchik 2007; Ferrara, Levine et al. 2009). mHags, die ausschließlich auf hämatopoetischen Zellen exprimiert vorliegen, eröffnen die Möglichkeit, erwünschte GvL-Effekte („Graft-versus-Leukaemia“) von unerwünschten GvH-Effekten zu separieren, da alloreaktive Spender-T-Lymphozyten gezielt leukämische Blasten eliminieren können. Liegen jedoch Polymorphismen in ubiquitären mHags vor, treten neben den erwünschten GvL-Effekt auch der unerwünschte GvH-Effekt auf (Bleakley and Riddell 2004).

Abbildung 5: Immunologische Effekte bei einer allogenen SCT können zur GvHD oder GvL-Effekten führen. Spenderlymphozyten, die spezifisch exprimierte mHags sowohl auf hämatopoetischen als auch epithelialen Zellen des Empfängers erkennen, sind vermutlich die Ursache der GvHD. Gleichzeitig können diese T-Zellen einen GvL-Effekt auslösen, wenn die mHags ausschließlich auf Leukämiezellen exprimiert und durch Spender-T-Lymphozyten erkannt werden, ohne dabei eine GvHD auszubilden; modifiziert nach (Bleakley and Riddell 2004).



Eindeutige Belege für die immunologische Beeinflussbarkeit von Leukämien konnte erstmals im Mausmodell Ende der 50er Jahre von Barnes und Loutit erbracht werden, in der mittels allogener SCT residuelle Blasten eliminiert werden konnten (Barnes and Loutit 1957). Kurze Zeit später konnte im humanen Modell gezeigt werden, dass eine syngene (bis 2,5-fach höher) oder autologe SCT mit einer höheren Rezidivrate assoziiert ist als eine allogene SCT (Champlin and Gale 1984; Horowitz, Gale et al. 1990). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Patienten, die nach einer allogenen SCT eine unerwünschte akute und chronische GvHD entwickelten, ein geringeres Rezidivrisiko aufwiesen (Weiden, Flournoy et al. 1979). Verursacht werden GvL-Effekte in AML-Patienten nach SCT durch $CD4^+$, $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen (natürliche Killerzellen; „natural killer cells“) des Spenders leukämische Zellen zu eliminieren (Bleakley and Riddell 2004; Barrett 2008; Barrett and Le Blanc 2010).

Weitere Belege für die bedeutende Rolle der T-Zellen bei der Eliminierung von leukämischen Blasten wurde in einer retrospektiven Analyse von Leukämien ermittelt, die eine deutliche Zunahme der Rezidivrate nach T-Zell-Depletion zur GvHD-Prophylaxe und eine Zunahme an Transplantatabstoßungen beobachten konnten (Marmont, Horowitz et al. 1991). Weitere klare Beweise für den GvL-Effekt in Leukämien konnte in unserer Arbeitsgruppe erbracht werden: hier konnte gezeigt werden, dass in rezidierten CML-Patienten nach erfolgter SCT eine langanhaltende Remission mit Hilfe einer DLI etabliert werden konnte (Kolb, Mittermuller et al. 1990). Im Vergleich dazu ist die Erfolgsrate bei AML- oder MDS-Patienten deutlich geringer (Kolb, Schattenberg et al. 1995; van Rhee and Kolb 1995; Kolb 2008).

GvH- und GvL-Effekte sind miteinander gekoppelt. Beispielsweise kann durch T-Zell-Depletion des allogenen Transplantats der Schweregrad einer GvHD verringert werden. Parallel dazu wird die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßung, das Auftreten von sekundärer Infektionen und die Rezidivrate erhöht (Shlomchik 2007).

Um das therapeutische Potential einer allogenen SCT zu optimieren, d. h. den GvL-Effekt zu maximieren und den GvH-Effekt zu minimieren, gibt es neben der DLI als zelluläre adoptive Immuntherapie weitere verschiedene immuntherapeutische Ansätze. Im Folgenden werden verschiedene Immuntherapien erläutert.

1.4.2. Nicht-zelluläre Immuntherapien

Verschiedene Immuntherapien werden als adjuvante AML-Therapien eingesetzt oder befinden sich in der klinischen Evaluierung (Guinn, Mohamedali et al. 2007; Barrett and Le Blanc 2010; Smits, Lee et al. 2011). Das **Zytokin** IL-2 wurde seit den 80er Jahren in verschiedenen Studien eingesetzt, um in AML-Patienten die Funktion von T-Zellen und NK-Zellen zu stärken und dadurch einem Rezidiv vorzubeugen. IL-2 fungiert als Proliferations- und spezifischer zytotoxischer Stimulationsfaktor für T- und NK-Zellen (Malkovsky and Sondel 1987) und wirkt wie alle Zytokine pleiotrop und weist dadurch häufig ein starkes Nebenwirkungsprofil auf (Holler 2000). In verschiedenen nicht-randomisierten Studien konnte nach hochdosierter IL-2-Gabe eine Remission in Patienten mit fortgeschrittener Leukämie beobachtet werden (Buyse, Squifflet et al. 2011). Weitere Studien zeigten keinen Einfluss von IL-2 auf Überleben und Leukämie-freiem Überleben bei Patienten mit akuter Leukämie und allogener SCT (Blaise, Attal et al. 2000). Aufgrund des Dosis-abhängigen Nebenwirkungsprofils, das in etwa 0,7 % zu therapieassoziierten Todesfällen führen kann (Holler 2002), der insgesamt niedrigen Remissionsrate unter Hochdosistherapie und der widersprüchlichen Ergebnisse in verschiedenen Studien (Alatrash and Molldrem 2010) gibt es verschiedene Ansätze, die IL-2 Therapie, z. B. durch synergistischen Einsatz verschiedener Zytokine oder durch Kombination mit Histamin-Dihydrochlorid (HDC) zu optimieren (Romero, Thoren et al. 2009). Weitere viel versprechende Zytokine in der AML-Therapie sind z. B. IL-12, IL-15, IFN- α , IFN- γ , TNF- α oder GM-CSF (Holler 2000; Barrett and Le Blanc 2010).

Weitere Immuntherapeutika beruhen auf dem Einsatz von humanisierten monoklonalen **AK**. Der Antitumor-Effekt beruht dabei auf verschiedenen Mechanismen. So kann durch Induktion des Komplementsystems die Tumorzelle lysiert werden oder durch Bindung des AK an Apoptose-vermittelnde Rezeptoren der Tumorzelle Apoptose induziert werden. Vorteil von AK-basierten Immuntherapeutika liegen in der hohen Spezifität und dem vergleichsweise geringen Nebenwirkungsprofil. Beispielsweise wird bei der AML ein anti-CD33 AK

eingesetzt, der spezifisch maligne myeloide Zellen eliminiert (Peiper, Ashmun et al. 1988; Barrett and Le Blanc 2010). Um die Wirksamkeit der Therapie zu erhöhen, ist eine Koppelung der AK mit Radionukleotiden, Zellgiften oder Zytostatika oder der Einsatz von bispezifischen AK (Buhmann, Stanglmaier et al. 2013) möglich (Holler 2000).

Weiterer Einsatz von Immuntherapeutika in der AML sind **DNA-** oder **Peptid-Vakzine**. Der immunologische Effekt einer DNA-basierten Vakzine beruht auf der Induktion einer CD8⁺ T- und B-Zell-Immunantwort die spezifisch antigenpräsentierende Tumorzellen lysieren können. Vorteil einer DNA-Vakzine gegenüber Peptid-Vakzinen ist die Präsentation auf beiden MHC-Klasse-I und –II-Molekülen (Guinn, Mohamedali et al. 2007).

Verschiedene Ag-spezifische Peptid-basierte Vakzine befinden sich in klinischen Phase-I/II oder –III Studien. Voraussetzung für ihren Einsatz sind die Überexpression in leukämischen Blasten und das Vorhandensein des entsprechenden HLA-Typs. Greiner et al. beschreibt mehr als 13 potentielle LAAs, die bei der AML überexprimiert vorliegen und sich dadurch als mögliche Kandidaten zur Immuntherapie eignen (Greiner, Dohner et al. 2006). Das Prinzip der antileukämischen zytotoxischen Immunantwort beruht auf der Ag-Präsentation des Peptids auf einer APCs nach Vakzinierung und der Aktivierung von CD8⁺ T-Zelle und anschließender Erkennung des MHC-Klasse-I präsentierenden Peptid-Epitops auf der Zielzelle. Letztendlich erfolgt nach erneuter Bindung der aktivierten T-Zelle die Freisetzung von Granzym B, Perforin und FasL.

Um die Effektivität der DNA- oder Peptid-basierten Vakzine zu erhöhen, können Adjuvantien wie z. B. BCG (Bacillus Calmette Guérin; attenuierter Lebendimpfstoff gegen Tuberkulose) oder inkomplettes Freund's Adjuvants (Öl-in-Wasser-Emulsion) in Kombination mit GM-CSF, heteroklitische Peptide (modifizierte Peptide zur Steigerung ihrer Immunogenität; durch Austausch einzelner Aminosäuren kann z. B. die Bindungsaffinität an ihr MHC-Molekül und im Folgendem die T-Zellantwort gesteigert werden) oder Peptidpools eingesetzt werden (Trojan, Witzens et al. 2001; Zirlik, Zahrieh et al. 2006; Barrett and Rezvani 2007).

1.4.3. Zelluläre Immuntherapien

Zelluläre Immuntherapien werden als adjuvante AML-Therapie nach einer Standardtherapie eingesetzt, um residuelle leukämische Zellen zu eliminieren oder um ein immunologisches Gedächtnis auszubilden bzw. zu verstärken. Verschiedene Studien unterstützen die Hypothese einer gezielten Immunmodulation zur Eliminierung und Aufrechterhaltung der Remission. So konnte z. B. in AML-Patienten mit Chemo-induzierter Remission nach adoptivem Transfer von inaktivierten, autologen Leukämiezellen eine erhöhte Aktivität der Lymphozyten nachgewiesen werden (Powles, Balchin et al. 1971; Smits, Lee et al. 2011). Eine weitere Option zur Verbesserung der Immuntherapie kann durch genetische

Modifikation der AML-Zellen erfolgen. Beispielsweise können durch Transduktion **viraler Vektoren** (z. B. von Adenoviren, Retroviren) Gene für die Expression von z. B. GM-CSF, CD80 oder IL-2 eingebracht werden, um T-Zellen oder NK-Zellen gezielt zu aktivieren.

Ein weiterer Fokus der zellulären Immuntherapie liegt auf den **DCs**, die als professionelle APCs als effektive Stimulatoren der naiven und ruhenden T-Zellen fungieren. Van Tendeloo und Kollegen konnten in einer klinischen Phase-I/II Studie bei der DCs durch Elektroporation mit WT1 mRNA transfiziert und anschließend als autologe Vakzine eingesetzt wurden, in 5 von 10 Patienten eine molekulare Remission nachgewiesen. Gleichzeitig konnte das klinische Ansprechen mit einem Anstieg an WT1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen korreliert werden (Van Tendeloo, Van de Velde et al. 2009).

NK-Zellen entwickeln sich aus lymphoiden Vorläuferzellen und werden zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems gezählt, da sie keine Ag-spezifischen Oberflächenrezeptoren tragen, sie umfassen etwa 3 – 15 % der im Blut, etwa 5 % der in der Niere und etwa 25 % der in der Leber zirkulierender Lymphozyten. Ihre Regulation erfolgt über eine Reihe von Keimbahn-kodierten aktivierenden und inhibierenden (z. B. KIR) Rezeptoren. Neben ihrer zytotoxischen Funktion sezernieren NK-Zellen verschiedene Zytokine (z. B. IFN- α , TNF- α , IL-10, GM-CSF) und Chemokine und beeinflussen durch direkten Zell-Zell-Kontakt (z. B. Ag-Präsentation auf DCs) das adaptive Immunsystem. NK-Zellen können tumor- oder virusinfizierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung lysieren. Des Weiteren konnte im Mausmodell und später in klinischen Studien nach allogener haploidentischer SCT gezeigt werden, dass NK-Zellen spezifisch leukämische Zellen eliminieren konnten, ohne dabei eine GvHD zu verursachen. Die molekularen Mechanismen der NK-vermittelnden GvL-Effekte sind unklar (Janeway C.A., Travers P. et al. 2002; Ruggeri, Capanni et al. 2002; Barrett 2008; Alatrash and Mollidrem 2010; Vivier, Raulet et al. 2011).

1.4.4. Leukämie-assoziierte Antigene (LAAs)

Man kann drei Klassen von Antigenen unterscheiden, die in GvL-Effekten und GvHD bei der AML involviert sind (Barrett 2008): ubiquitäre mHags vermitteln GvL- und GvH-Effekte, mHags, die nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, vermitteln ausschließlich einen GvL-Effekt und LAAs können sowohl GvL- als auch GvH-Effekte vermitteln. Verschiedene TAAs, die im Kontext der Leukämie auch als LAAs bezeichnet werden, wurden in den letzten Jahren identifiziert und charakterisiert (Greiner, Bullinger et al. 2008). Häufig liegen LAAs bei AML-Patienten überexprimiert vor. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass anti-LAA-spezifische CD8⁺ T-Zellen spezifisch LAA-überexprimierende Blasten lysieren können (Rezvani, Yong et al. 2008; Schmitt, Schmitt et al. 2008). Folgende

LAAs wurden in dieser Arbeit näher analysiert und werden im Folgenden ausführlicher beschrieben.

Das **PRAME-Gen** (bevorzugt exprimiertes Melanomantigen; „preferentially expressed antigen in melanoma“) ist auf Chromosom 22 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit 509 Aminosäuren. Es wurde erstmalig isoliert in humanen Melanomzellen (Ikeda, Lethe et al. 1997; Griffioen, Kessler et al. 2006). PRAME wird in lymphoiden und myeloiden Erkrankungen und soliden Tumoren exprimiert. Die Funktion ist bisher weitgehend unklar (Steinbach, Hermann et al. 2002). Neuere Studien zeigen, dass PRAME möglicherweise den RAR (Retinolsäure-Rezeptor; „retinoic acid receptor“) Signalweg supprimiert (Epping, Wang et al. 2005) und die Zell-Proliferation, Apoptose und Tumorbildung moduliert (Tajeddine, Gala et al. 2005; Spanaki, Perdikogianni et al. 2007). Dabei kann PRAME sowohl als Tumorsuppressorgen als auch als Onkogen fungieren. PRAME wurde als TAA charakterisiert, das durch CTLs erkannt wird (Paydas, Tanriverdi et al. 2005). Greiner et al. konnten eine PRA100- und PRA300-spezifische T-Zellantwort in AML-Patienten nachweisen (Greiner, Schmitt et al. 2006).

Das **Wilm's Tumor Gen** (WT1) ist auf Chromosom 11p13 lokalisiert und kodiert für einen Zink-Finger Transkriptionsfaktor (Call, Glaser et al. 1990; Haber, Buckler et al. 1990). Zunächst wurde WT1 als Tumorsuppressorgen identifiziert, das bei Wilm's Tumoren, einem Nephroblastom in Kindern, entdeckt wurde (Sugiyama 2010) und in ca. 5 – 10 % mutiert vorliegt (Scharnhorst, van der Eb et al. 2001). WT1 kodiert für 10 Exons mit etwa 3 kb mRNA, das in unterschiedlichen Spleißvarianten prozessiert wird. WT1 ist involviert in der Regulierung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung während der embryonalen Entwicklung und beschränkt sich dabei auf die Expression in bestimmten Gewebe, wie z. B. Uterus, Niere oder Gonaden. WT1 fungiert sowohl als Tumorsuppressorgen als auch als Onkogen (Scharnhorst, van der Eb et al. 2001; Morrison, English et al. 2005; Yang, Han et al. 2007). Im Erwachsenen wird WT1 im zentralen Nervensystem (ZNS), im urogenitalen System oder in hämatopoetischen Gewebe, in geringen Konzentrationen exprimiert. Deutlich überexprimiert wird WT1 in soliden Tumoren oder adulten Leukämien, mit einer Überexpression in bis zu 90 % der AML-Fälle (Ostergaard, Olesen et al. 2004; Guinn, Mohamedali et al. 2007).

Das **Proteinase3-Gen** (PRTN3; „serine proteinase, neutrophil, Wegener granulomatosis autoantigen“) ist lokalisiert auf Chromosom 19, kodiert für maximal 256 Aminosäuren und kommt in unterschiedlichen Spleißvarianten vor. Proteinase3 ist beispielsweise identisch zu Myeloblastin, einem in myeloiden Zellen wachstumsfördernden Protein oder zu p29b einem antibiotisch wirkenden Protein der Neutrophilen. Die proteolytische Aktivität von Proteinase3 konnte nachgewiesen werden (Schwartz, Hagen et al. 2000; Csernok, Holle et al. 2008). Proteinase3 ist involviert in Zellwachstum, –differenzierung und –modulation von humanen

Leukämiezellen und kann in AML und CML überexprimiert vorliegen. Proteinase3 wurde als TAA identifiziert (Dengler, Munstermann et al. 1995; Molldrem, Dermime et al. 1996; Greiner, Ringhoffer et al. 2004). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten mit Hilfe von PR1, einem Proteinase3-Epitope, eine antileukämische CTL-Antwort induzieren (Molldrem, Dermime et al. 1996; Kuball, de Boer et al. 2011). Sie lysierten dabei spezifisch LAA-überexprimierende Blasten (Rezvani, Yong et al. 2008).

1.4.5. Nebenhistokompatibilitätsantigene (mHags)

Histokompatibilitätsantigene spielen eine entscheidende Rolle bei Gewebetransplantationen und sind verantwortlich für GvHD. mHags sind intrazelluläre Peptide, die eine alloimmune T-Zellreaktion auslösen können. Dabei ist die T-Zellantwort immer MHC-restringiert. Praktisch jedes Zellprotein kann als mHag fungieren und kann von mitochondrialer DNA, Y-Chromosom oder autosomalen Chromosom kodiert werden (Spierings, Wieles et al. 2004). Neuere Untersuchungen zeigen einen extrem hohen Polymorphismus einzelner Nukleotide (~ 90.000 SNPs) im humanen Genom, die zu geringen Änderungen der Proteinsequenz und damit zu einer möglicherweise hohen Anzahl an immunogenen mHags führen (Bleakley and Riddell 2011). Bei der allogenen, HLA-identischen SCT und einer anschließenden DLI kann eine GvHD und ein kurativer GvL-Effekt beobachtet werden. Dabei wird im allogenen HLA-identischen Setting die Immunreaktion vermutlich hauptsächlich durch mHags verursacht (Tait, Maddison et al. 2001; Goulmy 2006). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass bei einer allogenen SCT zwischen einem männlichen Empfänger und weiblichen Spender eine höhere Wahrscheinlichkeit vorliegt an GvHD zu erkranken bei gleichzeitiger geringerer Rezidivrate (Gratwohl, Hermans et al. 2001; Falkenburg, Marijt et al. 2002).

Das humane **HA1-Gen** („minor histocompatibility antigen HA1“) ist lokalisiert auf Chromosom 19p13.3 und codiert für etwa 1.136 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 125 kDa und kommt in unterschiedlichen Spleißvarianten vor. Die Peptide werden über den normalen intrazellulären Signalweg der Antigenprozessierung entwickelt und können durch MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Komplex präsentiert werden. HA1- ist neben HA2- und HA3-Proteinen an einer Signalkaskade beteiligt, die das Zytoskelett reorganisiert. Dabei sind HA1 und HA3 Gegenspieler der Rho-ähnlichen GTPasen und an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt. Die Familie der Rho-GTPasen sind an Zelladhäsion, -beweglichkeit und Umbau des Aktin-Zytoskeletts beteiligt und fungieren häufig als molekulare Schalter (Spierings, Wieles et al. 2004). Bisherige Studien zeigen eine selektive bzw. restringierte Expression von HA1 in hämatopoetischen Zellen mit einer geringen oder keinen Expression in nicht-hämatopoetischen Zellen (Bleakley and Riddell 2011). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass HA1- und HA2-spezifische CTL

leukämische Blasten eliminieren und das leukämische Zellwachstum *in vitro* hemmen (Bleakley and Riddell 2011).

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

In den letzten Jahren wurden LAAs (PRAME, WT1, PR3) und mHags (HA1) identifiziert, die in AML-Patienten im Vergleich zu Gesunden überexprimiert vorliegen und als mögliche Zielantigene einer Immuntherapie dienen und sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen aktivieren können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragen bearbeitet werden.

- 1) Untersuchungen zu LAA-Expressionen bei AML-Patienten:
 - a. Kann eine vermehrte Genexpression der LAAs (PRAME, WT1, PR3) bei AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden?
 - b. Kann eine Überexpression in allen AML-Subtypen nachgewiesen werden bzw. tritt eine AML-Subtyp-spezifische oder Kompartiment-spezifische (PB vs. BM) Expression auf?
 - c. Gibt es Hinweise auf Überexpressionen multipler LAAs?
 - d. Korrelieren LAA-Expressionsprofile mit Krankheitsstadien oder mit prognostischen Subgruppen?
 - e. Kann anhand der Expressionsprofile eine prognostische Risikoeinschätzung getroffen werden?
 - 2) Nachweis LAA-spezifischer T-Zellen bei AML-Patienten:
 - a. Sind sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen an der antileukämischen Immunantwort bei AML-Patienten beteiligt?
 - b. Sind bei AML-Patienten nach SCT LAA-spezifische CD8⁺ T-Zellen nachweisbar und ist dies prognostisch relevant?
 - c. Korreliert der Nachweis LAA-spezifischer CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen mit einer spezifischen Zytokinfreisetzung, einer klonalen V β -Geneinschränkung oder dem klinischen Verlauf der Patienten?
 - d. Können LAA/HA1-spezifische CD4⁺ T-Zellen aus Patienten mit Protein-basierten Stimulationsverfahren expandiert werden? Können Rückschlüsse auf ihre Funktion getroffen werden? Und kann dies mit einem typischen T-Zellprofil korreliert werden?
-

2. Material

Die zur normalen Laboreinrichtung gehörenden Glas- und Plastikutensilien sind nicht gesondert aufgeführt.

2.1. Patientenmaterial/primäre Zellen

Im Rahmen meiner Dissertation wurden mir Patientenproben von Frau Prof. Dr. Helga Schmetzer (Med. III Klinikum Großhadern der Ludwig Maximilian-Universität München) für die LAA-Analysen überlassen. Es handelte sich dabei um humane periphere mononukleäre Blutzellen (Peripheral Blood Mononuclear Cell, kurz: PB) oder Knochenmarkzellen (kurz: BM). Für die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Analysen wurden heparinisiertes Material von Patienten und freiwilligen Spendern nach Aufklärung durch die KMT-Ambulanz verwendet. Das Ethikvotum lag vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MNC (mononukleäre Zellen) von mehr als 120 Proben von Patienten mit AML in verschiedenen Krankheitsstadien und zu unterschiedlichen Zeitpunkten oder von gesunden Probanden analysiert. Die Patientencharakteristika zu den LAA-Analysen oder zu den CD4⁺ Experimenten sind in den entsprechenden Kapiteln gegeben.

2.2. Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet und wurden mir von verschiedenen Arbeitsgruppen des Helmholtz-Zentrums zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Zelllinien

Zellen	ATCC- oder DSMZ-Nummer	Zelltyp	Referenz
HEK293T	CRL-11268	Humane embryonale Nierenzellen	(Graham, Smiley et al. 1977)
Raji	CCL-86	Humane Burkitt-Lymphom Zellen	(Pulvertaft 1964)
Ramos	CRL-1596	Humane Burkitt-Lymphom Zellen	(Benjamin, Magrath et al. 1982)
HL60	CCL-240	Humane AML (FAB M2) Zellen	(Gallagher, Collins et al. 1979)
Jurkat	ACC-287	Humane ALL Zellen	(Schneider, Schwenk et al. 1977)
K562	CCL-243	Humane CML Zellen	(Koeffler and Golde 1980)
Kasumi-1	CRL-2724	Humane AML (FAB M2) Zellen	(Asou, Tashiro et al. 1991)

T2	CRL-1992	Humane Hybridomzellen, TAP defizient	(Salter, Howell et al. 1985)
mini-LCL	-	mini-EBV transformierte B-Zellen	(Kempkes, Pich et al. 1995)
Fibroblasten	-	aus Hautzellen von Patienten hergestellt	-

ATCC American Type Culture Collection, DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

2.3. Virusstock (mini-EBV)

Mini-EBV (Epstein-Barr-Virus mit fehlenden lytischen Genen) für die Infektion und Transformation von B-Zellen in mini-LCLs von Patienten/gesunden Spendern wurden mir von Dr. Milosevic Slavoljub, AG Prof. Dr. Dolores Schendel, Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz-Zentrum München, zur Verfügung gestellt.

2.4. Bakterienstamm für Klonierung

Elektrokompetenter Bakterienstamm XL1-Blue wurde mir von Dr. Milosevic Slavoljub, AG Prof. Dr. Dolores Schendel, Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz-Zentrum München, zur Verfügung gestellt.

2.5. Vektor

modifizierter pCMV-Vektor

Invitrogen™, Karlsruhe/D – IMI

2.6. cDNA Klon, Expressionsklon

cDNA Klon PR3 (PRTN3; IRAMP995)

imaGenes, Berlin/D

cDNA Klon HA1 (HMHA1; IRATp970)

imaGenes, Berlin/D

Expressionsklon WT1 (IOH27111)

imaGenes, Berlin/D

2.7. Primer und Sonden

Die Primer und Sonden, die zu Genexpressionsanalysen der LAAs eingesetzt und analysiert wurden, wurden als inventarisierte TaqMan® Gene Expression Assays von Applied Biosystems, Warrington/UK bezogen. Restliche Primer (Klonierung, TCR-PCR) wurden von

BioSpring, Frankfurt/D und Oligo(dT)-Primer, Random Hexamer-Primer wurden von Roche bezogen.

2.7.1. Sequenzen

Die verwendeten Zielgene und Assay-IDs sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Zielgene und Assay-ID der Genexpressionsanalysen

Zielgene	Assay-ID
Eukaryotische 18 S rRNA	Hs 99999901_s1
Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Hs 999905_m1
Wilms tumor 1 (WT1)	Hs 1103754_m1
Preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME)	Hs 0196132_m1
Proteinase 3 (PR3)	Hs 1597752_m1

Die zur Klonierung verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Primersequenzen zur Klonierung

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Enzym
WT1 sense	ATAGAGCTCCCTGCAGGACCCGGCTTCCA	Sac I
WT1 antisense	ATAGGTACCAAAGCGCCAGCTGGAGTTTGG	Kpn I
WT1 forward	GAGAAGGGTTACAGCACGGTC	Kpn I
WT1 reverse	ATAGGTACCTAAGCGCCAGCTGGAGTTTGG	-
PRAME sense	ATAGGATCCAATGGAACGAAGGCGTTTGTGG	BamH I
PRAME antisense	ATAAGATCTGGTTAGGCATGAAACAGGGGCA	Bgl II
PR3 sense	ATACTCGAGAATGGCTCACCGGCCCC	Xho I
PR3 antisense	ATAGGTACCAGGGGCGGCCCTTGGCCTC	Kpn I
HA1 sense	ATAGGATCCAATGTTCTCCAGGAAGAAACGAG	BamH I
HA1 antisense	ATAAGATCTGCACGAATTCCGGCTGCCTTTC	Bgl II

Die zur TCR-PCR verwendeten Primersequenzen nach Zhou *et al.* 2006 sind in Tabelle 7 aufgelistet (Zhou, Srivastava *et al.* 2006). Zur Sequenzierung wurde der VP-1 oder VP-2 Primer verwendet.

Tabelle 7: Primersequenzen für TCR-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
VP-1	GCIITKTIYTGGTAYMGACA
VP-2	CTITKTWTTGGTAYCIKCAG
CP-1	GCACCTCCTCCCATTAC

I= inosine, W = A/T, M = A/C, Y= C/T, K = G/T.

Die zur Sequenzierung eingesetzten Primer nach Klonierung sind in Tabelle 8 angegeben. Für die Sequenzierung der TCR-V β -Kette können die Sequenzen der Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 8: Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
CMV Pro forward	GGCGGTAGGCGTGTA
pCMV antisense	TGGCAACTAGAAGGCACAGT
pEF forward	AGCCTCAGACAGTGGTTC
BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG

2.8. Antikörper

Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Primäre Antikörper und Hersteller

Antikörper	Hersteller
Anti-Human CD3 FITC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD3 PE	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Anti-Human CD3 PCy7	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD3 APC	BD Pharmingen™, Heidelberg/D CALTAG™ Laboratories, Hamburg/D
Anti-Human CD4 FITC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Anti-Human CD4 PE	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD4 PCy7	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD4 APC	CALTAG™ Laboratories, Hamburg/D
Anti-Human CD 8 FITC	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Anti-Human CD8 PE	BD Pharmingen™, Heidelberg/D

Anti-Human CD8 APC	BD Pharmingen™, Heidelberg/D CALTAG™ Laboratories, Hamburg/D
Anti-Human CD14 FITC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD14 PE	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD14 APC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD 15 FITC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD 19 FITC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD19 PE	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD19 APC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD25 FITC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD27 FITC	AbD Serotec, Düsseldorf/D
Anti-Human CD33 APC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD34 PE	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD34 APC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F CALTAG™ Laboratories, Hamburg/D
Anti-Human CD45RO APC	CALTAG™ Laboratories, Hamburg/D
Anti-Human CD56 APC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD69 APC	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Anti-Human CD71 PE	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD117 PE	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD117 APC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD127 PE	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human CD154 (CD40L) FITC	AbD Serotec, Düsseldorf/D
Anti-Human CD154 (CD40L) PE	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Anti-Human CD154 (CD40L) APC	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Anti-Human CCR7 PCy7	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Anti-Human IFN-γ PE	CALTAG™ Laboratories, Hamburg/D
Anti-Human HLA ABC FITC	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Anti-Human HLA-A0201 PE	AbD Serotec, Düsseldorf/D
Anti-Human Fibroblast PE	AbD Serotec, Düsseldorf/D
FITC Mouse Anti-Human IFN-γ	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Isotypenkontrolle Maus IgG1 FITC	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Isotypenkontrolle Maus IgG1 PE	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Isotypenkontrolle Maus IgG2b PE	AbD Serotec, Düsseldorf/D

Isotypenkontrolle Maus IgG1 PCy7	Beckman Coulter™ Immunotech, Marseilles/F
Isotypenkontrolle Maus IgG1 APC	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Anti-His ₆ (Western-Blot)	Roche GmbH, Mannheim/D
ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody	Amersham Bioscience, Freiburg/D

2.9. Reagenziensysteme (Kits)

AP Conjugate Substrate Kit	Bio-Rad, München/D
BD Cytfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
CD4 ⁺ T cell Isolation Kit II (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
CD8 ⁺ T cell Isolation Kit II (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
CellTrace™CFSE Cell Proliferation Kit for flow cytometry	Invitrogen™, Karlsruhe/D
ELISpot for Human Interferon-γ	MABTECH AB, Hamburg/D
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Freiburg/D
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot/D
Human GM-CSF ELISA Set	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
IFN-γ Secretion Assay	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
JETSTAR Plasmid Purification Kit (Maxi)	Genomed, Löhne/D
Pan T cell Isolation Kit II (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Dreieich/D
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden/D
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden/D
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden/D
RNase free DNase Set	Qiagen, Hilden/D
ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix with MgCl ₂	Sigma, St. Louis/USA
RED Taq® Ready Mix™ PCR Reaction Mix with MgCl ₂	Sigma, St. Louis/USA
TaqMan® Universal Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt/D
TMB Substrate Reagent Set	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
PCR Master Mix	Promega Corporation, Madison/USA

2.10. Enzyme

CIP	New England BioLabs, Schwalbach/D
Cytostim	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Buchs/CH
Restriktionsendonukleasen BamH I, BigI II, Eco R I, Not I, Xho I, Kpn I, Sac I, NEB I–III (Puffer)	New England BioLabs, Schwalbach/D
Ribonuclease A	MBI Fermentas
RNase A	Sigma-Aldrich, Buchs/CH
SuperSript™ III Reverse Transkriptase	Invitrogen™, Karlsruhe/D
T4 DNA-Ligase	Roche GmbH, Mannheim/D
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D

2.11. Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt/D
Agar	Oxoid
Ampicillin	Sigma, St.Louis/USA
Agarose	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt/D
AP Color Development Buffer (2x)	Bio-Rad, München/D
7-AAD (7-Aminoactinomycin D)	BD Pharmingen™, Heidelberg/D
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit/USA
BenchMark™ His tagged Protein Standard	Invitrogen™, Karlsruhe/D
Borsäure	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
Brefeldin A Ready Made Solution	Sigma-Aldrich St. Louis/USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg/D Bromma, Schweden
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAA Laboratories GmbH, Pasching/A
Carboxymethylzellulose	Sigma-Aldrich, München/D
CFSE	Roche, Mannheim/D
Chloroform	Sigma-Aldrich, München/D
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München/D
Chrom ⁵¹	Hartmann Analytic, Hannover/D
Complete	Roche, Mannheim/D
Essigsäure	Merck, Darmstadt/D
Ethanol	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D

Ethylendiamintetraacetylsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt/D
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg/D
Desoxyribonukleotide	Roche, Mannheim/D
DMSO	Merck, Darmstadt/D
dNTP	Roche, Mannheim/D
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt/D
Formaldehyd	Merck, Darmstadt/D
Fötales Kälberserum, Sera Plus (FCS)	PAN Biotech, Passau/D
FuGENE® 6 Transfections Reagent	Roche, Mannheim/D
Glycerol	Sigma-Aldrich, München/D
Glycin	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
Glyzerin	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
H ₂ O (RNase und DNase frei)	Fluka BioChemika, Buchs/CH
H ₂ SO ₄ (2N)	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
Heparin-Natrium 25 000 I.E	B. Braun Melsungen AG, Melsungen/D
Hepes	ICN Biomedicals, Ohio/USA
HEPES	Serva GmbH, Heidelberg/D
Humanserum Typ AB	PAN Biotech, Passau/D
Hybond™ Nitrocellulose Membran	Amersham Bioscience, Freiburg/D
IL-2	Roche, Mannheim/D
Imidazol	Merck, Darmstadt/D
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt/D
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D
Kalium-Hydrogencarbonat	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
Kalziumchlorid	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
Kristallviolett	Merck, Darmstadt/D
LB-Medium	Invitrogen™, Karlsruhe/D
L-Glutamin	Gibco BRL®, Eggenstein/D
L-Glutamin	Serva, Heidelberg/D
Magermilchpulver	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
Magnesiumchlorid	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
Methanol	Merck, Darmstadt/D
Natriumacetat	Merck, Darmstadt/D
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt/D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
NaOH	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt/D

Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden/D
N,N'-Bisacrylamid	Serva, Heidelberg/D
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen™, Karlsruhe/D
PEI (Polyethylenimin)	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
PHA	Sigma-Aldrich, München/D
Phenol/Chloroform	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
peQ GOLD Universal Agarose	peQ Lab, Erlangen/D
Presision Plus Protein™ Standards	Bio-Rad, München/D
Propidium-Jodid	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
Select Agar	Invitrogen™, Karlsruhe/D
SDS	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
TEMED p.a.	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
TRI Reagent™	Sigma-Aldrich, München/D
Tris	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
Trypanblau	Biochrom KG, Berlin/D
Tryptose Phosphate Broth	Biochrom KG, Berlin/D
Tween 20	Sigma-Aldrich, München/D
Urea	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe/D
Yeast Extract	Gibco BRL®, Eggenstein/D
100 bp DNA-Größenstandard Gene Ruler	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot/D
1 kb DNA-1 Größenstandard Gene Ruler	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot/D
2-Mercaptoethanol (βME)	Carl ROTH, Karlsruhe/D

2.12. Verbrauchsmaterialien

Butterfly Multifly® Kanülen-Set 21G	SARSTEDT, Nümbrecht/D
Cell Strainer 40 µm Nylon	Millipore, Eschborn/D
Elektrotransformationsküvette	Bio-Rad, München/D
ELISPOT Platten MSHAN 4510	Millipore, Schwalbach/D
Einmalkanülen Terumo ,23Gx1' Hypodermic Needles	TERUMO Europe N.V., Leuven/B Henry Schein Inc. Melville/USA
Einmalhandschuhe Sempercure® Edition Sempercure® Nitrile	Semperit Technische Produkte GmbH Sempermed®, Wien/A
Einmal-Pasteurpipetten	ROTH, Karlsruhe/D

Einmalpipetten (Costar Stripette®) 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Costar, Corning Inc., New York/USA
FACS-Röhrchen 5 ml, 10 ml	BD Falcon™, Heidelberg/D
Kryoröhrchen, Cryo Tube Vials	Nunc, Wiesbaden/D
LumaPlate TM-96	PerkinElmer, Überlingen/D
MACS® Cell Separation Columns (MS, LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
Millex® GP Filter Unit, 0,22 µm	Millipore, Eschborn/D
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems Darmstadt/D Thermo Scientific, Dreieich/D
Parafilm® M Verschlussfolie	American National Can™, Chicago/USA
PCR-Platten, 96-well (TaqMan)	Applied Biosystems Darmstadt/D
Perfusor®-Spritzen 20 ml, 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen/D
Pipettenspitzen	Nerbe, Winsen/D Eppendorf, Hamburg/D Roth, Karlsruhe/D
-Filtertips	ART®, MBP Molecular BioProducts San Diego/USA Nerbe, Winsen/D
QIAshredder-Säulen	Qiagen, Hilden/D
Reaktionsgefäße: 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml 15 ml, 50 ml	Eppendorf, Hamburg/D BD Falcon™, Heidelberg/D
Röntgenfilm Kodak, BioMax MR	Eastman KODAK Company, Rochester/USA
Spectra-Por® Dialysemembran MWCO 6 – 8 kDa, #132 650	Spectrum Europe B.V., DG Breda/NL
Steritop™, Porengröße 0,22 µm GP Express PLUS Membran	Millipore, Eschborn/D
Ultrazentrifugenröhrchen (UltraClear)	Beckmann, München/D
Whatman 3 MM-Paper	Whatman, Maidstone/UK
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	TPP®, Trasadingen/CH
Zellkulturplatten 96, 48, 24	TPP®, Trasadingen/CH Greiner, Frickenhausen/D BD Falcon™, Heidelberg/D
Zellkulturschalen 60/15 mm, 150/20 mm	Nunc™, Wiesbaden/D
Zellkulturschaber	Corning Inc., New York/USA

2.13. Puffer und Lösungen

Alle Pulvermedien wurden nach Herstellerangaben angesetzt und autoklaviert oder sterilfiltriert (\varnothing 0,22 μm).

2.13.1. Bakterienkultur

Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Einfriermedium	50 %ige Glycerinlösung
Luria-Bertani(LB)-Medium	10 g Caseinextrakt 5 g Yeast Extrakt 5 g NaCl 1 g Glukose ad 1 l ddH ₂ O, pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % Agar
SOB-Medium	Difco™ SOB-Medium BD, Maryland/USA
S.O.C-Medium	200 ml SOB-Medium 0,4 g Glucose

2.13.2. Gelelektrophorese

Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml in ddH ₂ O
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 1 l ddH ₂ O

2.13.3. Puffer für Proteinaufreinigung

Imidazol Elutionspuffer	0,5 M Imidazol ad 50 ml ddH ₂ O, pH 7,0
Urea Lysepuffer	8 M Urea 10 mM Tris 100 mM NaH ₂ PO ₄ 1x H ₂ O 20 mM Imidazol 0,05 % (v/v) Tween 20 ad 1 l ddH ₂ O, pH 7,9 – 8,0

2.13.4. ELISA-Puffer

Assay Diluent	PBS 10 % FCS
Coating-Puffer	0,1 M Sodium Carbonate 7,13 g NaHCO ₃ 1,59 g Na ₂ CO ₃ ad 1 l ddH ₂ O, pH 9,5
ELISA-Waschpuffer	PBS 0,5 % Tween 20
Stopp-Lösung	2 N H ₂ SO ₄

2.13.5. Western Blot

Blockierungs-Puffer	Western Blot-Waschpuffer 1 %/5 % Milchpulver
4 % Sammelgel	4 % Acrylamid 1x Sammelgelpuffer 0,15 % APS 0,1 % TEMED
1x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCL pH 6,8 0,1 % SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x) pH 8,3	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
TBS-Puffer (10x) pH 7,6	200 mM Tris 8 % NaCl
10 % Trenngel	10 % Acrylamid 4x Trenngelpuffer 0,1 % APS 0,1 % TEMED
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % SDS
Western Blot-Transferpuffer pH 8,3	1x SDS-PAGE Laufpuffer 20 % Methanol
Western Blot-Waschpuffer	TBS-Puffer pH 7,6 (1x) 0,05 % Tween 20

2.13.6. Nährmedien für die Zellkultur

Einfríermedium	90 % FCS/HS 10 % DMSO
HEK293T	Dulbeccos-MEM, low Glucose 10 % FCS 1 % L-Glutamin (200 mM) 1 % Natrium-Pyruvat (100 mM) 0,8 % Gentamicin 10 mg/ml 0,5 % Fungizone Amphoterin B
LCL/HS-LCL	RPMI 1640-Medium 10 % FCS/HS 1 % L-Glutamin (200 mM) 1 % Natrium-Pyruvat (100 mM) 1 % Non essential Amino Acids 100x 0,5 % L-Gentamicin (10 mg/ml) 0,5 % Fungizone Amphoterin B
T-Lymphozyten	AIM V® 10 % HS 1 % L-Glutamin (200 mM) 1 % HEPES (1 M) 0,8 % L-Gentamicin (10 mg/ml) 0,5 % Fungizone Amphoterin B
Tumorzelllinien/T2-Zellen	RPMI 1640 10 % FCS 1 % L-Glutamin (200 mM) 1 % Penicillin + Streptomycin

FCS bzw. HS wurden vor Gebrauch 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert und anschließend sterilfiltriert (\varnothing 0,22 μ m), aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.13.7. Sonstige Lösungen und Puffer

AIM V®	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
ALP-Conjugate Substrate Kit	Bio-Rad, München/D 4,5 ml dH ₂ O 200 μ l AP Colour Development Buffer 50 μ l AP Colour Reagent A 50 μ l AP Colour Reagent B
BD FACS Flow™	BD Biosciences, Heidelberg/D
BD FACS Rinse Solution	BD Biosciences, Heidelberg/D
BD FACS Clean Solution	BD Biosciences, Heidelberg/D
BD comp Beads	BD Biosciences, Heidelberg/D
BD comp Beads Anti-Mouse Igk	BD Biosciences, Heidelberg/D

Beads Flow Count™ Fluorospheres	Beckman Coulter™, Marseilles/F
Bicoll Separating Solution (Ficoll)	Biochrom AG, Berlin/D
D-MEM (low Glucose)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
Fungizone Amphotericin B	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
L-Gentamicin (10 mg/ml)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
L-Glutamin (200 mM)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
L-Glucose	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
MACS-Puffer	PBS mit 0,5 % BSA
Non essential Amino Acids (100x)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
Opti-MEM	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Apotheke Innenstadt Uni München 8,1 g NaCl 0,862 g Na ₂ HPO ₄ 0,248 g KH ₂ PO ₄
Penicillin-Streptomycin (100x)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
Phytohämagglutinin (PHA, 5 µg/ml)	Gibco BRL®, Rockville/USA
rhIL-2 (10 IU/µl)	Roche, Mannheim/D
RPMI-1640	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D
Sodium-Pyruvat (100 mM)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe/D

2.14. Technische Geräte

ABI Prism™ (TaqMan™) 7300 Sequence Detector	Applied Biosystem, Foster City/USA
Bakterien-Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau/D
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific, Edison/USA
Bestrahlungsanlage ¹³⁷ Cs, HWM-D-2000	Gammacell, Ottawa/Ca
Durchflusszytometer: FACS Calibur™ LSR-II™ FACSAria™ Cell Sorter	BD Biosciences, Heidelberg/D BD Biosciences, Heidelberg/D BD Biosciences, Heidelberg/D
Drucker	HP LaserJet P3500 PCL6
Elektrophorese-Kammer, horizontal Horizon 58	Gibco/BRL® life Technologies, Eggenstein/D
Elektroporator Gene Pulser XCell™	Bio-Rad, München/D
ELISA-Reader Sunrise™ Absorbance Reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim/D
Flockeneisbereiter AF-200	Scotsman® Ice Systems, Mailand/I

Gefrierschränke: -20 °C -80 °C HFU 686 Plus -80 °C Ult 2090	LIEBHERR und PRIVILEG/D Heraeus Instruments GmbH, Osterode/D Revco
Geldokumentationssystem InGenius	Ltf Labortechnik, Wasserburg/D Syngene, Cambridge/UK
Gelkammern und Kämme	Amersham Bioscience, Fairfield/USA Biometra, Göttingen/D
Intelli Mixer	NeoLab, Heidelberg/D
Kühlschränke (4 °C)	PRIVILEG/D
Laborwaagen, B6, P120, PC440	Mettler, Giessen/D
MACS [®] MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
Magnetrührer	IKA Werke, Staufen/D
Mastercycler [®] Gradient	Eppendorf, Hamburg/D
Mightly Small Transphor (Blotting Kammer)	Amersham Bioscience, Fairfield/USA
Mikroskope: Telaval 31 Axiovert 10	Zeiss AG, Jena/D Zeiss AG, Jena/D
Mikrowelle	Alaska, Berlin/D
NanoDrop ND-1000	PEQLAB, Erlangen/D
Neubauer improved-Zählkammer	Labor Optik, Freidrichsdorf/D
Netzgeräte für Gelelektrophorese	Pharmacia Biotech, Freiburg/D
Netzgerät Model 200/2.0	Bio-Rad, München/D
Netzgerät PowerPac 300	Bio-Rad, München/D
OctoMACS [™] Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
PCR-Geräte Gene Amp 2700 Mastercycler [®] Gradient	Perkin Elmer, Rodgau/D Eppendorf, Hamburg/D
pH-Meter, inoLab [®] ph 720	WTW, Weilheim/D
Pipettiergeräte: Pipettboy comfort Pipettboy acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald/D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg/D Gilson, Columbus/USA
QuadroMACS [™] Seperator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
Röntgenfilm Entwicklermaschine Optimax	Typon Medical, Krauchthal/CH
Sicherheitswerkbank: HERASafe NU AIR	Heraeus Instruments GmbH, Osterode/D Vertrieb wissenschaftlicher Instrumente
Spectrophotometer Beckmann DU [®] 640 NanoDrop NP-1000	Beckman Coulter GmbH, Krefeld/D Thermo Fischer Scientific, Wilmington MA/USA

Thermomixer	
Comfort	Eppendorf, Hamburg/D
Kompakt	Eppendorf, Hamburg/D
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg/D
Transferpipetten 8/12 (Mehrkanalpipette)	Eppendorf, Hamburg/D Brand GmbH & Co KG, Wertheim/D
UV-Transilluminator	peQ Lab, Erlangen/D
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich/CH
Wasserbad	GFL-Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel/D
WB-Entwicklermaschine CP1000	AGFA, Köln/D
Zellkultur-Inkubator	
HERACell	Heraeus Instruments GmbH, Osterode/D
APT.Line CB	BINDER GmbH, Tuttlingen/D
Zentrifugen:	
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Osterode/D
Rotina 35 R	Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen/D
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg/D
Kleinzentrifuge EBA 12 R	Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen/D
Rotanta 460 R	Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen/D
Rota Super 40	Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen/D

2.15. Software und Bioinformatik-Tools

ABI 7300 SDS System Software	Applied Biosystem, Foster City/USA
BD CellQuest™	BD Biosciences, Heidelberg/D
Clone Manager 7	Scientific & Educational Software, Cary NC/USA
EndNote 9.0	Wintertree Software Inc., Canada
FlowJo™	Oregon Corporation, Ashland/USA
Magellan™ Standard Software	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim/D
Microsoft Office 2003	Microsoft Corporation, Redmond/USA
SPSS Software 15.0	IBM SPSS Inc., Markham/Canada
Vector NTI	Invitrogen™, Karlsruhe/D

<http://www.bimas.cit.nih.gov/>,

<http://www.dgho-onkopedia.de/onkopedia/leitlinien>,

<http://www.expasy.org/tools/#proteome>,

<http://www.imgt.org/GenelInfoServlets/htdocs/>,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed>,

http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52337/index_ger.html

3. Methoden

3.1. Kultivierung von primären Zellen und Zelllinien

Steril entnommene primäre Zellen bzw. Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank) verarbeitet. Um Kontaminationen mit Pilzen, Hefen und Bakterien zu vermeiden, wurden die Zellen mit sterilen Medien, Lösungen und Verbrauchsmaterial im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.1.1. Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die HEK293T Zelllinie (kurz: 293T) ist eine humane embryonale Adenovirus transformierte Nierenzelllinie und trägt das SV-40 large T-Antigen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Transfektionskompetenz aus. 293T Zellen wurden für die Transfektion und Proteinexpression als Monolayer-Kultur in Zellkulturschalen vermehrt. Die Zellen wurden spätestens bei Erreichen der Konfluenz alle 2 – 3 Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:6 passagiert. Dazu wurden 3 ml Trypsin/EDTA Lösung zu den vorab mit PBS gewaschenen Zellen gegeben, kurz geschwenkt und solange im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen durch Klopfen vom Boden lösten. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen, anschließend bei 1.500 rpm, 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert, in einem definierten Volumen aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach Erreichen einer gewünschten Zelldichte wurden die Zellen zur Transfektion eingesetzt.

3.1.2. Kultivierung von Suspensionszellen

Die humanen Suspensionszelllinien K562, Jurkat, Ramos, Raji, HL60 und Kasumi (siehe Tabelle 4) wurden in 75 cm²-Zellkulturflächen mit 20 – 30 ml Tumorzell-Medium inkubiert. Nach etwa 2 – 3 Tagen wurde bis zu ³/₄ der Zellsuspension abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

3.1.3. Generierung und Kultivierung von EBV-transformierten B-Zelllinien (Mini-LCLs)

Lymphoblastoide B-Zelllinien (B-LCL) sind humane, mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV)-

transfizierte und immortalisierte B-Zellen. Von verschiedenen Patienten wurden EBV-transfizierte mini-LCLs generiert, bei denen die lytischen Gene des EBV fehlen.

Zur Generierung wurden pro well 5×10^5 Zellen der non-CD4⁺ Fraktion (CD4 depletierte MNCs) in 150 µl HS-LCL-Medium aufgenommen und mit CsA (Cyclosporin A, Endkonzentration: 1 µg/ml) versetzt und anschließend mit 50 µl Virusüberstand transfiziert. Das Endvolumen betrug 200 µl in einer 96-well-Platte. Pro Patient wurden 3-Ansätze angelegt. Am nächsten Tag wurden 50 % des Mediums ausgetauscht. Alle 2 – 3 Tage wurde diese Prozedur wiederholt. Die Zellen wurden je nach Bedarf 1:2 bis 1:3 gesplittet. Nach 4 – 6 Wochen und erfolgreicher Transfektion wurde auf eine Zugabe von CsA im Medium verzichtet.

Der virushaltige Kulturüberstand einer mini-EBV infizierten B-Zelllinie wurde mir von Dr. Miloseciv Slavoljub, AG Prof. Dr. Dolores Schendel am Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz-Zentrum München, zur Verfügung gestellt.

3.1.4. Kultivierung und Expansion von LAA/HA1-proteinspezifischen CD4⁺ T-Zellen

Nach Isolierung von „untouched“ CD4⁺ T-Zellen durch negative MACS[®] („Magnetic Activated Cell Sorting“) Separation wurden diese stimuliert und expandiert und anschließend auf Reaktivität bzw. Spezifität im IFN-γ ELISPOT, durch intrazelluläre Zytokine Färbung (IFN-γ), GM-CSF ELISA, Chromfreisetzungstest oder im Fluorolyse Assay getestet (siehe Abbildung 17/18).

Pro Patient wurden 2 – 3 wells in einer flachen 24-well-Platte angesetzt. Pro well wurden 1×10^6 CD4⁺ T-Zellen in 2 ml T-Zell-Medium bis zum nächsten Tag bei 37 °C, bei 5 % CO₂ inkubiert. Parallel dazu wurden $1 – 1,5 \times 10^6$ CD4 depletierte MNCs (non-CD4⁺ Zellfraktion) in 2 ml T-Zell Medium aufgenommen und mit bis zu 20 – 30µl LAA/HA1 Protein-Mix, bestehend aus PRAME-, WT1-, PR3-, und HA1-Proteinen, beladen und für 16 – 24 h im Brutschrank inkubiert. Die eingesetzte Proteinkonzentration lag dabei bei max. 1,0 µg/ml je Protein. Alternativ dazu wurden neben der CD4 depletierten MNCs, nach erfolgreicher mini-EBV Transformation, mini-LCLs als APCs eingesetzt. Die Proteinbeladung wurde analog zu den CD4 depletierten MNCs durchgeführt. Da es sich bei mini-LCLs um sehr große Zellen handelt, wurden pro 24-well $0,6 – 1,0 \times 10^6$ Zellen eingesetzt.

Am nächsten Tag wurden die LAA/HA1-proteinbeladenen APCs mit 43 Gray bzw. die mini-LCLs mit 80 Gray bestrahlt. Anschließend wurden die bestrahlten Zellen bei 1.500 rpm für 10 min abzentrifugiert, um freie Radikale nach der Bestrahlung zu minimieren. Beide Zellfraktionen wurden vereint. Am nächsten Tag wurden 20 IU IL-2/ml zugegeben und für 10 – 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurden alle 2 – 3 Tage die

Zellen auf Wachstum, Proliferation und Mediumverbrauch optisch im Lichtmikroskop überprüft. Bei starkem Mediumverbrauch wurde die Hälfte des Medium (inklusive 20 IU IL-2/ml) ausgetauscht. Nach 10 – 14 Tagen erfolgte die Restimulierung mit LAA/HA1-proteinbeladenen APCs. Ab Passage 6 wurden die expandierten CD4⁺ T-Zellen auf Reaktivität bzw. Spezifität überprüft (siehe Funktionalitätstests). Alle durchgeführten Experimente der Patienten sind im Flussdiagramm in Abbildung 18 zusammengefasst.

3.1.5. Einzelzellklonierung

Für die „Einzelzellklonierung“ wurden vor und nach Sortierung (Patienten #1.155, #1.156, #1.158) die „LAA/HA1-proteinspezifischen“ CD4⁺ T-Zellen gezählt. Pro Patient wurden im 96-well Rundbodenformat jeweils 2 Platten, mit 1-, 3-, 9- oder 1-, 3-, 6-CD4⁺ T-Zellen pro well (Σ 6 Platten/pro Ansatz), eingesetzt. Bei der „Einzelzellklonierung“ wird ein Zellklon expandiert, so dass eine Analyse des TCR und eine Charakterisierung des Zellkons möglich ist.

Am Vortag wurden APCs (mini-LCLs oder CD4 depletierte MNCs), 16 – 24 h, mit LAA/HA1 Protein-Mix beladen. „Feederzellen“, bestehend aus 3 – 5 MNCs unterschiedlicher gesunder Probanden mit identischer Zellzahl, wurden aufgetaut, in T-Zell-Medium resuspendiert und gezählt. Anschließend wurden die LAA/HA1-proteinbeladenen APCs und die Feederzellen in der Bestrahlungsanlage bestrahlt. Die Feederzellen und die CD4 depletierten MNCs wurden mit 43 Gray, die mini-LCLs mit 80 Gray bestrahlt. Im Anschluss wurde der „Klonierungsansatz“ wie folgt pipettiert: 3×10^4 Feederzellen/well wurden mit 1×10^3 LAA/HA1-proteinbeladenen APCs/well, 20 IU IL-2/ml, 3,33 μ l/ml PHA (75 μ g/ μ l), 1-, 3-, 9- oder 1-, 3- 6-CD4⁺ T-Zellen/well in 20 ml T-Zell Medium aufgenommen.

Anschließend wurden je 200 μ l des Klonierungsansatzes in die 96-well Platte verteilt und für 10 – 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 3 – 4 Tagen wurde das T-Zell-Medium vorsichtig abgenommen und durch frisches T-Zell-Medium mit 20 IU IL-2/ml ersetzt. PHA wirkt auf T-Zellen proliferierend und aktivierend und induziert bei längerer Einwirkzeit durch gesteigerte Sekretion des Fas(CD95)-Liganden Apoptose.

Die proliferierenden T-Zellklone wurden nach 10 – 14 Tagen mit erneutem Klonierungsansatz expandiert. Bei gutem Wachstum wurden die einzelnen Klone gepickt und in einer flachen 96-well-Platte, 48-well-Platte usw. expandiert. Der „Klonierungsansatz“ wurde jeweils an das erhöhte Volumen angepasst.

3.1.6. Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe der Trypanblau-Färbung wurde in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl der lebenden Zellen bestimmt.

10 µl der verdünnten, gefärbten Zellsuspension wurde auf eine Neubauer-Zählkammer appliziert. Nach Auszählen von 4 Großquadraten unter dem Lichtmikroskop wurde der Mittelwert (n) aus den ausgezählten Großquadraten gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Unter Berücksichtigung der Kammergröße kann die Zellzahl pro ml ermittelt werden: $\text{Zellzahl/ml} = n \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$ (Kammergröße).

Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden die Zellzahl/ml mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension multipliziert.

3.1.7. Einfrieren von Zellen

Je nach Zellzahl und Zellart wurden unterschiedliche Zellkonzentrationen zum Einfrieren gewählt. Maximale Konzentration war dabei 1×10^7 Zellen/ml. Dazu wurden die Zellen in einem Spitzbodenröhrchen bei 1.500 rpm für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen resuspendiert und in 1 ml Einfriermedium (FCS/HS + 10 % DMSO) aufgenommen und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Zur Vermeidung von Eiskristallen wurden die Zellen in einen „Einfrier-Container“ mit einer definierten Abkühltemperatur von 1 °C/h für mindestens 24 h bei -80 °C gelagert. Kurzfristige Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C, langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -176 °C.

3.1.8. Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Durch Zentrifugation bei 1.500 rpm für 5 – 10 min wurde das toxische DMSO (Dimethylsulfoxid) entfernt und das Zellpellet in dem gewünschten, vorgewärmten Kulturmedium aufgenommen.

3.1.9. Isolierung von mononukleären Zellen (MNCs)

Mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation können mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PB-MNCs, kurz: PB) oder des Knochenmarks (BM-MNCs, kurz: BM) von Erythrozyten, Granulozyten oder toten Zellen des Blutes oder Knochenmarks getrennt werden.

Hierbei wurde das heparinisierte Vollblut oder Knochenmark 1:1 oder 1:2 mit PBS verdünnt und jeweils 25 ml dieser Mischung vorsichtig über 25 ml Ficoll in einem 50 ml Spitzbodenröhrchen geschichtet. Nach Zentrifugation (2.500 rpm, 20 min, ohne Bremse) wurden die PB- oder BM-MNCs aus der Interphase abgenommen. Nach zweimaligem Waschen (1.500 rpm, 10 min, mit Bremse) wurde die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die isolierten MNCs entweder portioniert eingefroren (siehe 3.1.7.), über MACS sortiert (siehe 3.4.5.) und eingefroren oder die RNA (Ribonukleinsäure) isoliert und eingefroren (siehe 3.3.3.).

3.1.10. Bestrahlung von Zellen

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in einer Bestrahlungsanlage mit einer Cäsium¹³⁷-Quelle. Durch die Bestrahlung wird eine weitere Teilung der Zellen verhindert und ist somit für die lebenden Zellen letal. Das kostimulatorische Potenzial (z. B. Ag-Präsentation, Ag-Expression, Zytokinproduktion) der Zelle bleibt dabei jedoch erhalten.

Folgende proteinbeladenen APCs (CD4 depletierte MNCs, mini-LCLs) oder für die „Einzelzellklonierung“ eingesetzte „Feederzellen“ wurden mit 43 Gray (CD4 depletierte MNCs) oder 80 Gray (mini-LCLs, „Feederzellen“) bestrahlt. Anschließend wurden die bestrahlten Zellen mit T-Zell-Medium gewaschen, um die Konzentration an freien Radikalen zu reduzieren. Im Anschluss standen die proteinbeladenen APCs zur Stimulierung der CD4⁺ T-Zellen oder die „Feederzellen“ zur „Einzelzellklonierung“ zur Verfügung.

3.2. Bakteriologische Arbeiten

Für die Klonierung (Transformation, Selektion und Expansion) und die Gewinnung von Proteinen wurden Bakterienkulturen verwendet.

3.2.1. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien für die jeweiligen Experimente erfolgte in antibiotikahaltigen LB-Flüssigmedium bei 150 rpm und 37 °C im Schüttelinkubator als Übernachtskultur. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden antibiotikahaltige LB-Agarplatten zum Ausstrich der Bakterien bei 37 °C im Inkubator ÜN eingesetzt. Für mehrere Wochen waren die LB-Agarplatten bei 4 °C haltbar. Zur Langzeitlagerung wurden die Bakterien als Glycerinstocks bei -80 °C gelagert.

3.2.2. Elektrotransformation von Bakterien

Um eine ausreichende Konzentration an Plasmid-DNA zu erhalten, wurde mittels elektrokompetenter Bakterien (XL1-Blue) die benötigte Plasmid-DNA transformiert und expandiert. Dazu wurde 1 Aliquot (1 ml) der elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. 20 µl der elektrokompetenten Zellen wurden mit 1 µl des Ligationsansatzes versetzt. Die Transformation erfolgte in einer Elektrotransformationsküvette (0,1 cm) unter Einwirkung eines Elektroimpulses (1,8 kV). Anschließend wurde die Bakteriensuspension zügig mit S.O.C-Medium versetzt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz bei 3.000 rpm für 10 min zentrifugiert, 800 µl des Überstandes verworfen und das verbleibende Bakterienpellet in den restlichen 200 µl resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde auf einer ampicillinhaltigen (100 µg/ml) LB-Agarplatte (Selektionsplatte) ausplattiert und ÜN, bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Analyse der Einzelkolonien erfolgte durch weiterführende molekularbiologische Methoden.

3.2.3. Selektion und Expansion transformierter Bakterien

Da die verwendeten elektrokompetenten Bakterien keine Ampicillinresistenz trugen, konnten sie nach erfolgreicher Transformation mit der Plasmid-DNA auf Selektionsplatten (LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin) selektioniert werden.

Für eine MINI-Plasmidpräparation wurden 5 – 10 Bakterienkolonien in je 5 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin (100 µg/ml) überführt und ÜN, wie oben beschrieben (siehe 3.2.1.) inkubiert. Am Abend des nächsten Tages wurde 20 µl der Vorkultur verwendet, um 200 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) anzupfen, anschließend ÜN im Schüttler bei 37 °C und 150 rpm inkubiert und für die MAXI-Plasmidpräparation eingesetzt.

3.2.4. Kryokonservierung prokaryotischer Zellen (Glycerin-Stocks)

Zur Langzeitlagerung wurden 500 µl der Übernachtskultur einer MAXI-Plasmidpräparation 1:1 mit einer 50 %igen Glycerinlösung versetzt und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.3. Molekularbiologische Arbeiten

Alle Arbeiten mit Enzymen wurden auf Eis durchgeführt. Auf einen Verweis in den entsprechenden Kapiteln wurde verzichtet.

3.3.1. Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

Die Isolation von Plasmid-DNA wurde alternativ als MINI- oder MAXI-Plasmidpräparation durchgeführt. Die Bakteriensuspension der Übernachtskultur wurde für die MAXI-Plasmidpräparation bei 5.000 rpm und Raumtemperatur (RT) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und Plasmid-DNA mit Hilfe des „JETstar Plasmid Purification MAXI bzw. MINI Kits“ (Genomed) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration, Reinheit und die Sequenz der isolierten DNA bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA (Transfektion von 293T Zellen) bei -20 °C gelagert. Für die MINI-Plasmidpräparation (analytischer Maßstab) wurden etwa 1 ml der Übernachtskultur in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt, für 10 min bei 3.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die weitere Isolierung der Plasmid-DNA wurde das MAXI-Protokoll modifiziert. Das Bakterienpellet wurde mit je 100 µl der Puffer E1 – E3 behandelt (E1 (+ RNase) homogenisiert, E2 lysiert, E3 neutralisiert)), anschließend für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Tube überführt und die DNA mit 1 ml 100 %igem Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation für 20 min, bei 14.000 rpm und 4 °C wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 50 µl H₂O (frei von RNase und DNase) gelöst. Die isolierte DNA wurde anschließend enzymatisch verdaut und auf die richtige Fragmentgröße mittels Gelelektrophorese getestet. Falls das Fragment nachweisbar war, wurde dieser Bakterienklon in die MAXI-Plasmidpräparation eingesetzt.

3.3.2. Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Zellen

Die Extraktion erfolgte nach dem „Blood and Body Fluid Spin Protocol“ von Qiagen nach Herstellerangaben: Das Zellpellet wurde in 180 µl PBS gelöst (Endvolumen 200 µl) und die Zellsuspension mit 20 µl Proteinase K und 200 µl Lysepuffer (AL) versetzt und bei 56 °C für 10 min aufgeschlossen. Nach Zugabe von 200 µl absolutem Ethanol wurde die Lösung auf die DNA-bindende Säule pipettiert und durch Zentrifugation (8.000 rpm, 1 min, RT) nicht bindender Bestandteile abgetrennt. Nach zweimaligem Waschen und einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt (14.000 rpm, 2 min, RT) zur Trocknung der Säule, wurde die DNA mit 200 µl Elutionspuffer (AE) eluiert. Nach Isolierung der DNA wurde die Konzentration bestimmt und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.3. Isolierung von zellulärer Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden 2 unterschiedliche Methoden eingesetzt.

3.3.3.1. Isolierung von RNA mittels „QUIAGEN“

Die erste Methode zur Präparation der Gesamt-RNA aus „tierischen“ Zellen basiert auf dem „RNeasy Mini Protokoll“ von QUIAGEN. Das Prinzip der Extraktion beruht auf der pH und salzabhängigen Affinität von Nukleinsäuren zu Silica-Gel-Membranen. Durch Veränderung der Ionenkonzentration können Nukleinsäuren eluiert werden.

Die Präparation wurde modifiziert und eine zusätzliche enzymatische Spaltung (DNase) durchgeführt. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angabe des Herstellers. Eluiert wurde die RNA zweimal mit 20 µl RNase-freien H₂O. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Gesamt-RNA bei -80 °C gelagert.

3.3.3.2. Isolierung von RNA mittels Chloroform-Extraktion

Die zweite Methode war die Isolierung von Gesamt-RNA mittels Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraktion (TRI-ReagentTM von Sigma-Aldrich). Dazu wurden die Zellen 1-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml TRI-ReagentTM zugegeben, vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Lyse und Dissoziation des Nuklein-Protein-Komplexes wurde 0,2 ml Chloroform zugegeben, gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde zur vollständigen Phasentrennung zentrifugiert (12.000 rpm, 15 min, 4 °C). Nach Abnahme der wässrigen Phase und anschließendem Waschen und Fällern mit eiskaltem Isopropanol und 70 %igen Ethanol wurde die RNA nach Zentrifugation (12.000 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das RNA-Pellet getrocknet und in RNase-freiem H₂O gelöst. Zum vollständigen Lösen der RNA wurde diese auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (Mullis, Faloona et al. 1986) dient der selektiven Vervielfältigung (Amplifikation) kleinster Mengen an DNA mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase. In dem zyklischen Verfahren werden definierte DNA-Abschnitte (Templates) wiederholt verdoppelt.

Oligonukleotide, die zu definierten Sequenzabschnitten komplementär sind und direkt an der Zielsequenz liegen, dienen als Primer (Startermoleküle) für die DNA-Synthese. Je nach PCR-Programm wiederholen sich die verschiedenen Phasen der PCR (Denaturierung, Bindung, Extension) und nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen (zwischen 30 – 45 Zyklen) wird eine exponentielle Vervielfältigung (2^n) der Zielsequenz erreicht.

3.3.4.1. Präparative PCR

Für die PCR-Reaktionen, die für die anschließende Klonierung oder für die VB-PCR eingesetzt wurden, wurde der PCR-Master-Mix (2x) der Firma Promega verwendet, der alle für die PCR benötigten Komponenten enthält: Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, $MgCl_2$ und ein geeigneter PCR-Puffer (pH = 8,5). Je nach Ansatz wurden die entsprechenden Primer eingesetzt. Folgende Cyclerbedingungen wurden gewählt: Initiale Denaturierung von 95 °C für 2 min gefolgt von der Amplifikation mit Denaturierung bei 95 °C für 30 sek, Primerbindung zwischen 50 – 58 °C für 30 sek und der Elongation bei 72 °C für 1 min und einer finalen Elongation bei 72 °C für 5 – 10 min. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gekühlt gelagert.

3.3.4.2. cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Bei der cDNA-Synthese wird an einzelsträngiger RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT-Reaktion) ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Dabei dient ein Oligonukleotid-Primer (Oligo dT-Primer, Random-Hexamer-Primer oder spezifischer Primer) als Startpunkt für die Reaktion.

Oligo dT-Primer binden spezifisch am Poly(A)-Schwanz der mRNA, spezifische Primer nur an die komplementäre Sequenz. Mit Hilfe von Random-Hexamer-Primern (kurze unspezifisch bindende Primer) wird beliebige RNA, sequenzspezifisch in cDNA umgeschrieben. Dabei variiert die Länge des erhaltenen DNA Fragments in Abhängigkeit von der eingesetzten Random-Hexamer-Konzentration.

3.3.4.2.1. cDNA-Synthese mittels „Fermentas“

Für die Analyse der LAAs wurde der cDNA-Synthese Kit der Firma Fermentas verwendet. Zunächst wurden in einem Vorversuch Oligo-dT-Primer und Random-Hexamer-Primer für die cDNA-Synthese vergleichend geprüft. Nach Auswertung wurden für alle weiteren cDNA-Synthesen Random-Hexamer-Primer verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben

des Herstellers in einem 60 µl Ansatz, dabei wurden 300 ng Gesamt-RNA/60 µl Ansatz eingesetzt.

300 ng der Gesamt-RNA wurde mit 3 µl Random-Hexamer-Primer versetzt und mit H₂O (RNase und DNase frei) auf 33 µl aufgefüllt und bei 70 °C für 5 min linearisiert. Anschließend wurden 12 µl 5x Reaktionspuffer, 3 µl RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20 U/µl) und 6 µl 10 mM dNTP-Mix zugegeben und bei 25 °C für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 6 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl) wurde der Ansatz bei 25 °C für 10 min und anschließend bei 37 °C für 60 min inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion bei 70 °C für 10 min inaktiviert und auf 4 °C abgekühlt. Um evtl. kontaminierende DNA nachzuweisen wurde für jede Probe ein Kontrollansatz mit 100 ng Gesamt-RNA/20 µl ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Nach Synthese wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

3.3.4.2.2. cDNA-Synthese mittels „Superskript“

Zur Präparation von cDNA aus sehr geringer RNA-Konzentration (10 pg – 5 µg Gesamt-RNA oder 10 pg – 500 ng an mRNA) wurde der Synthese-Kit „SuperScript™ III Reverse Transcriptase“ der Firma Invitrogen™ eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mit Random-Hexamer-Primern im 20 µl Ansatz nach Angaben des Herstellers.

1 µl Random-Hexamer-Primer und 1 µl 10 mM dNTP-Mix wurden zu 11 µl der Gesamt-RNA pipettiert und bei 65 °C für 5 min und anschließend bei 4 °C für 1 min inkubiert. Folgende Komponenten wurden zugegeben: 4 µl 5x First-Strand Puffer, 1 µl 0,1 M DTT und 1 µl SuperScript™ III RT (200 U/µl) und gut gemischt. Im Anschluss wurden die Ansätze bei 25 °C für 5 min und anschließend für 45 min bei 50 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte bei 70 °C für 15 min und einer abschließenden Kühlung bei 4 °C. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

Die Methode wurde zur Analyse der TCRs von T-Zellklonen mittels Vβ-PCR verwendet. Eingesetzt wurden unabhängig von der Konzentration bis max. 11 µl Gesamt-RNA, wie vom Hersteller empfohlen.

3.3.4.3. TaqMan™-PCR

Mit Hilfe der TaqMan™-PCR können definierte Nukleotidabschnitte über spezielle fluorogene Sonden amplifiziert und quantifiziert werden. Das 5'-Ende dieses Oligonukleotides ist mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (ein Fluoreszein-Derivat, 6-FAM (6'-Carboxy-Fluorescein)) und das 3'-Ende z. B. mit einem Quencher-Farbstoff (ein Rhodamin-Derivat, TAMRA (Tetramethyl-Rhodamin)) markiert. Das 3'-Ende ist zusätzlich über einen

Phosphatrest blockiert. Wird die Sonde über Licht der Wellenlänge von 488 nm angeregt, wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt.

Nach sequenzspezifischer Bindung des Primerpaares und der Sonde, trifft die Polymerase bei der Polymerisation auf die Sonde, die dann verdrängt und durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zerschnitten wird. Reporter- und Quencher-Farbstoff werden räumlich getrennt, der FRET unterbunden und das Reportersignal kann spezifisch detektiert werden. Das Reportersignal ist dabei proportional zu der Menge an generiertem PCR-Produkt.

Die Messung und Auswertung erfolgte mit dem 7.300 Real-Time-PCR-System und der SDSv1.3.1 Software von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.

Pro 20 µl Ansatz wurden 2 µl cDNA (entspricht 10 ng t-RNA), 10 µl Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1 µl Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und 7 µl H₂O (RNase und DNase frei) gemischt. Die Messung erfolgte im 20 µl Ansatz. Folgende Cyclerebedingungen wurden gewählt: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen mit Denaturierung, Bindung und Extension bei 95 °C für 15 sek und bei 60 °C für 60 sek, nach Protokoll des Herstellers.

Eingesetzt wurde die TaqManTM-PCR zur Detektion der LAAs (PRAME, WT1, PR3). Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und 18S rRNA wurden als endogene Kontrollen mitgeführt und zur Normalisierung der Expression verwendet. Die Auswertung erfolgte durch relative Quantifizierung und beruht auf der $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode. Gesunde Probanden wurden als Kontrolle und Referenz für die normale Genexpression mitgeführt. Folgende Berechnungen wurden durchgeführt:

$Ct_{Zielgen} - Ct_{GAPDH \text{ oder } 18S \text{ rRNA}} = \Delta Ct$ in AML-Proben und von gesunden Spendern; $\Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{MW \text{ gesunder Spender}} = \Delta\Delta Ct$. Der Schwellenwert wurde bei $RQ = 1$ festgelegt.

Zudem adjustierten wir die gemessenen LAA-Expressionswerte auf die in den Einzelproben gemessenen Blastenanteile und konnten dadurch adjustierte (normierte) Expressionsprofile in Korrelation mit Krankheitsstadien erstellen.

Alle Messungen erfolgten in Triplikaten, die Kontrollen wurden in Einfachmessungen ermittelt. Zur Auswertung wurde der Mittelwerte verwendet. Folgende Kontrollen wurden mitgeführt: cDNA der Jurkat Zelllinie (Positivkontrolle), cDNA ohne Reverse Transkriptase (Nachweis von Kontaminationen mit genomischer DNA) und NTC („no template control“, Nachweis von Kontaminationen).

3.3.4.4. Analyse des V β -TCR-Repertoires mittels Spectratyping

Mittels der Spectratyping Technologie kann basierend auf der PCR-Methode die Länge der CDR3-Region des TCRs, beispielsweise in der V β /J β -Regionen, gemessen werden und

hinsichtlich Heterogenität und Klonalität analysiert werden. Nach Identifizierung und Charakterisierung von möglichen prädominanten T-Zellklonen können diese mit klinischen oder experimentellen Daten verglichen werden (Schuster, Buhmann et al. 2008).

Die V β -Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau cand. Dr. rer. nat. Susanne Reuther, Abteilung Prof. Dr. med. Arndt Borkhardt, Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und klinischer Immunologie der Heinrich Heine Universität, Düsseldorf.

3.3.5. Enzymatische Spaltung von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann DNA spezifisch gespalten und geeignete Schnittstellen für Vektoren und Inserts generiert werden, sowie Ligationsansätze oder Plasmidpräparationen anhand der erhaltenen Fragmentgrößen kontrolliert werden.

Nach Auswahl geeigneter Primer und PCR-Amplifikationen für die Klonierung der Plasmid-DNA, wurden für die Inserts geeignete Restriktionsschnittstellen eingebracht. Der „Restriktionsverdau“ erfolgte in dem vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffer für 1 – 2 h, bei 37 °C. Bei „Verdau“ mit zwei Enzymen, wurde der Puffer verwendet, der für beide am kompatibelsten war. Evtl. musste ein sequentieller „Verdau“ durchgeführt werden. Die Kontrolle der erhaltenen Fragmentgrößen erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Anschließend erfolgte die DNA-Aufreinigung über Gel-Extraktion. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

3.3.6. Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

Die Dephosphorylierung von DNA soll die Religierung des leeren Vektors in Ligationsansätzen verhindern. Dazu werden die terminalen 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer CIP („Calf Intestinal alkaline Phosphatase“) abgespalten. Vektor-DNA (1 – 3 μ g) wurde mit 1 U CIP und dem entsprechenden 10x Puffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Aktivität über Agarose-Gelelektrophorese gestoppt und aufgereinigt. Dephosphorylierte Vektoren können direkt aus dem Gel (siehe 3.3.10.) isoliert und anschließend bei -20 °C gelagert oder direkt in die Ligation (siehe 3.3.7.) eingesetzt werden.

3.3.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte mittels T4-DNA-Ligase, ÜN bei 16 °C oder für 1 h bei 22 °C. In einem 10 μ l Ansatz wurden 1 U T4-DNA-Ligase mit dem entsprechenden 10x

Puffer eingesetzt. Vektor und Insert wurden im Verhältnis 1:3 verwendet. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Ligationsansatz bei -20 °C gelagert.

3.3.8. Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen HEK293T Zellen

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI, 1 mg/ml), welches stark an DNA bindet und mit ihr einen Komplex ausbildet. Durch Endozytose gelangt der Komplex in die Zelle. Für die Transfektion wurden HEK293T Zellen verwendet. HEK293T Zellen besitzen die Fähigkeit über den SV40-ORI („Origin of Replication“) die eingebrachte DNA episomal zu replizieren. Die daraus resultierende hohe Kopienzahl führt zu einer erhöhten transienten Expression an rekombinanten Proteinen.

3.3.8.1. Transfektion von HEK293T Zellen

Einen Tag vor Transfektion wurden pro Ansatz (z. B. PRAME, WT1, PR3 oder HA1) 10 Zellkulturschalen (Ø 150 mm) mit je $0,8 - 1,0 \times 10^7$ 293T Zellen in je 20 ml 293T-Medium aufgenommen, ausgesät und ÜN im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden pro Ansatz 450 µg gereinigte Plasmid-DNA (z. B. PRAME, WT1, PR3 oder HA1; siehe 3.3.1.) mit 15 ml OptiMEM I (GIBCO; stabilisiert die Komplexbildung) gemischt und mit 675 µl PEI (1 mg/ml) versetzt und für 15 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium von den 293T Zellen abgenommen. Nach Inkubation wurde der Transformationsansatz zu 200 ml Kulturmedium gegeben, gut gemischt und jeweils etwa 21 ml auf die Zellkulturschalen verteilt. Die Zellen wurden für 6 – 12 h im Brutschrank inkubiert, anschließend erfolgte eine Zugabe von 20 – 30 ml Kulturmedium zu den transfizierten 293T Zellen. Nach 48 – 72 h wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das Kulturmedium bis auf 10 ml abgenommen und die Zellen mit dem restlichen Kulturmedium von den Zellkulturschalen gespült und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen transferiert. Anschließend wurde zentrifugiert (10 min, 5.000 rpm und RT) und der Überstand abgenommen. Bis zur weiteren Proteinaufreinigung (siehe 3.6.1.) wurde das Zellpellet bei -20 °C eingefroren oder sofort weiter verarbeitet.

3.3.9. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese. Im elektrischen Feld erfolgt die Trennung der negativ geladenen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe. Mit Hilfe von Ethidiumbromid (EtBr, interkaliert in die DNA-Doppelhelix) können die DNA-Banden visualisiert und anhand eines mitgeführten Größenstandards die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden.

Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer gelöst und je nach DNA-Fragmentgröße, in einer Konzentration von 1 – 1,5 % eingesetzt. Die gelöste Agarose wurde mit 0,5 µg/ml EtBr versetzt. Die Bandentrennung erfolgte bei 80 – 120 V. Unter UV-Licht (UV-Transilluminator) wurden die Banden sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.3.10. DNA Gel-Extraktion

Zur Extraktion spezifischer Banden aus dem Agarose-Gel wurde der „MiniElute Gel Extraction Kit“ von QUIAGEN verwendet. Die Durchführung erfolgte modifiziert nach Herstellerprotokoll.

Nach Detektion und Dokumentation wurden spezifische Banden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit QG-Puffer bedeckt und für 10 min bei 50 °C inkubiert. Nach vollständigem Lösen des Agarose-Gels wurden die Säulen mit der gelösten DNA beladen und bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule 1-mal mit PE-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Nach erneuter Zentrifugation zur Trocknung der Säule wurde die DNA zweimal mit 20 µl H₂O (RNase und DNase frei) extrahiert, die Konzentration mittels OD bestimmt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.3.11. Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde im Spektralphotometer bestimmt. Dabei wurde die Extinktion (optische Dichte, OD) der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) in einer Quarzküvette bestimmt. Der Reinheitsgrad und die RNA- bzw. DNA-Konzentration wurden über die Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Eine optimale Aufreinigung liegt bei einem Quotienten $_{260/280}$ von 1,8 – 2,0 vor. Höhere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Salzen und Zuckern, niedrigere Werte auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. 1 OD_{260} entspricht 40 µg/ml einzelsträngiger (ss) RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger (ds) DNA.

3.3.12. Sequenzierung

Zur Sequenzierung von dsDNA wurde die Desoxyribonukleotid-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte durch die Firma Sequiserve in Vaterstetten. Eingesetzt wurde die Sequenzierung zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung von Plasmid-DNA und zur V β -Analyse der TCRs von T-Zellklonen.

3.4. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie („Fluorescence Activated Cell Sorting“, FACS) können einzelne fluoreszenzmarkierte Zellen anhand ihrer Größe, Granularität, intrazellulärer oder Oberflächenmolekülen detektiert und charakterisiert werden. Dabei werden Einzelzellen durch eine Kapillare gesaugt und durch einen Laserstrahl geführt. Die durch die Zellen verursachte Lichtstreuung wird an Detektoren gemessen und korreliert mit Größe und Granularität der Zellen. Die Größe bzw. das Volumen der Zellen wird durch das Vorwärtsstreulicht („Forward Scatter“, FSC, Lichtbeugung) und die Granularität der Zellen durch das Seitwärtsstreulicht („Sideward Scatter“, SSC, Lichtbrechung) detektiert. Dadurch können verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden. Durch Setzen von „gates“ können einzelne Zellpopulationen betrachtet werden. Nach Färbung von intrazellulären oder Oberflächenmolekülen durch fluoreszenzmarkierte Antikörper (AK), erfolgt die Anregung im Laserlicht und einer Detektion der Fluoreszenzemission. Die Fluoreszenzemission liefert eine Aussage über die gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper und somit über die Expression der detektierten Moleküle.

Die Messung erfolgte am FACS™ Calibur oder LSR-II™, die Auswertung erfolgte mittels CellQuest™ oder FlowJo™ Software.

3.4.1. Charakterisierung der Zellen mittels Oberflächenfärbung

Für 2×10^5 Zellen/200 μ l PBS wurden je nach Herstellerangaben 2 – 10 μ l des fluoreszenzmarkierten Antikörpers des zu untersuchenden Oberflächenmoleküls zugegeben. Nach Inkubation der Zellsuspension für 15 min bei Raumtemperatur (RT) oder 30 min bei 4 °C jeweils in Dunkelheit wurde die Zellsuspension 1-mal mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 50 μ l abgesaugt und 100 μ l PBS zugegeben.

Bei jeder Messung wurde eine Isotypenkontrolle (Negativkontrolle) mitgeführt. Die Isotypenkontrolle wurde identisch zur Probe behandelt.

Falls eine Vitalitätsbestimmung mittels 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) durchgeführt werden sollte, wurde der Farbstoff kurz vor der FACS-Messung (Endkonzentration: 10 mg/ml) zugegeben. 7-AAD interkaliert in die DNA (spezifisch zwischen Cytosin und Guanin) und färbt nur tote Zellen an, deren Zellmembran beschädigt ist. Durch Legen eines geeigneten „gates“ können die 7-AAD-negativen lebenden Zellen von den toten Zellen getrennt und quantifiziert werden.

3.4.2. CFSE-Markierung

Proliferierende T-Zellen sollten sortiert werden. Dazu wurde der Farbstoff CFDA-SE (5-(6)Carboxyfluorescein Diacetat, Succinimidyl Ester; CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Invitrogen™) verwendet. CFDA-SE diffundiert durch die Zellmembran ins Zytoplasma und bindet an die Aminogruppe zytoplasmatischer Proteine, ohne deren Funktion zu beeinträchtigen. Nach Abspaltung zweier Azetatgruppen wird CFDA-SE in Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE) umgewandelt. Im Zuge der Zellteilungen wird der Farbstoff nur zur Hälfte an die Tochterzelle weitergegeben und eignet sich zur Analyse und Quantifizierung von proliferierenden Zellen.

Dazu wurden Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und auf 5×10^5 Zellen/ml in PBS eingestellt. Anschließend wurde der Farbstoff (Endkonzentration: 1 μ M) zu den Zellen gegeben und 8 min im Brutschrank inkubiert. Während der Inkubation wurden die Zellen alle 4 min vorsichtig geschwenkt. Nach Zentrifugation und zweimaligen Waschen mit RPMI 1640 (ohne Zusätze), zur Eliminierung von ungebundenem CFDA-SE oder der deacetylierten Form CFSE, wurden die Zellen in T-Zell-Medium aufgenommen und gezählt. Anschließend wurden die T-Zellen zur Restimulierung eingesetzt, nach 12 Tagen erneut stimuliert und nach Färbung durchflusszytometrisch sortiert (siehe 3.4.4.).

Die Detektion von CFSE im FACS erfolgt im FITC Kanal. Pro Zellteilung reduziert sich die Fluoreszenz um 50 %.

3.4.3. Intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS, IFN- γ)

Für die intrazelluläre Färbung von IFN- γ in isolierten, restimulierten CD4⁺ T-Zellen wurden die Zellen 2 h nach Restimulierung mit 1 μ g/ml Brefeldin-A (BFA, Sigma-Aldrich) inkubiert. BFA inhibiert den Transport von Proteinen in den Golgi-Apparat in eukaryotischen Zellen und inhibiert dadurch die Sekretion von Proteinen. Die Folge ist eine Akkumulation von Proteinen

im Endoplasmatischen Retikulum (ER), wodurch eine höhere Konzentration an IFN- γ bei der intrazellulären Färbung detektiert werden kann. Nach weiterer Inkubation der Zellen im Brutschrank für 5 h wurden diese geerntet und abzentrifugiert und 1-mal mit MACS-Puffer (PBS + 0,5 % BSA) gewaschen. Anschließend erfolgte die Oberflächenfärbung (CD154-PE, CD4-PCy7, CD8-APC) bei 4 °C. Nach 2-maligem Waschen mit MACS-Puffer erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen für 20 min bei 4 °C mit Fixations-/Permeabilisations-Lösung (BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit BD Perm/Wash™ Puffer (1x) gewaschen. Die Lösung bewirkt eine Permeabilisierung der Membran und ermöglicht den Influx des Antikörpers und die Bindung an das intrazelluläre Zytokin. Im Anschluss erfolgte die intrazelluläre Färbung von IFN- γ für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Nach erneutem 2-maligen Waschen mit BD Perm/Wash™ Puffer (1x) wurde das Zellpellet in 200 μ l MACS-Puffer aufgenommen und im FACS (Calibur™ oder LSR-II) detektiert. Für jede Probe wurde eine Isotypenkontrolle mitgeführt.

Bei einer höheren Expression von IFN- γ der LAA/HA1-proteinstimulierten CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (GFP-proteinstimulierte oder HEK 293T-proteinstimulierte CD4⁺ T-Zellen) liegt möglicherweise eine LAA/HA1-spezifische T-Zellreaktion vor.

3.4.4. FACS-Sortierung

Nach erfolgreicher Stimulierung und Expansion wurden die CD4⁺ T-Zellen vor Sortierung mit CFSE markiert. Nach 12 Tagen wurden die Zellen erneut restimuliert und nach 16 h geerntet und mit Oberflächenmolekülen gefärbt. Vor Sortierung wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellsiebs vereinzelt. Die Sortierung erfolgte im FACS Aria™ Cell Sorter. Dabei wurden die Zellen anhand folgendem Markerprofils isoliert: CFSE_{low}, CD4⁺, CD154⁺ und in die „Einzelzellklonierung“ (siehe 3.1.5.) eingesetzt.

3.4.5. Isolierung von T-Lymphozyten durch MACS-Separation

Eine einfache und kommerziell erhältliche Methode zur Isolierung von T-Lymphozyten (kurz: T-Zellen) aus PB-MNC, ist die MACS-Separation („Magnetic Activated Cell Sorting“) der Firma Miltenyi Biotec. Das Prinzip beruht auf kleinen Metallkügelchen (sog. „Microbeads“), die mit spezifischen Antikörpern fusioniert sind. Die Zellen werden mit spezifischen „Microbeads“ inkubiert und über eine positive Selektionssäule, in der sich ein Magnet befindet, zurückgehalten und isoliert. Bei positiver Selektion („touched“) wird die gewünschte Zellfraktion direkt mit spezifischen Antikörper-beads markiert und isoliert. Vorteil ist hierbei

die bessere Reinheit der Zielfraktion. Bei der negativen Selektion („untouched“) werden alle Zellen außer der Zielfraktion aus dem Zellgemisch depletiert. Vorteil hierbei ist kein vorheriger Kontakt der T-Zellen mit Antikörpern.

3.4.5.1. Isolierung von CD4⁺ T-Zellen

Die CD4⁺ T-Zellen wurden anhand des CD4⁺ T-Zell Isolationskit II von Miltenyi Biotec durch Depletion der non-CD4⁺ T-Zellen negativ isoliert. Die non-CD4⁺ T-Zellfraktion (z. B. CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten) wurden mit einer Mischung aus Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , Glycophorin A und Biotin-konjugierten „Microbeads“ markiert. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Hersteller-Protokoll. Nach erfolgter 10-minütiger Inkubation der Zellsuspension mit der Antikörper-Mischung, folgte eine 15-minütige Inkubation mit den „Microbeads“. Nach dem Waschen und Zentrifugation (1.500 rpm, 10 min) wurden die Zellen in 500 – 1.000 μ l MACS-Puffer aufgenommen. Danach wurden die CD4⁺ T-Zellen über eine MACS-Säule (MS- oder LS-Säule) und anschließendem 3-maligen Waschen mit MACS-Puffer magnetisch isoliert. Da für die weiteren Versuche auch die non-CD4⁺ Fraktion benötigt wurde, wurde nach Entfernen der MACS-Säule vom Magneten diese Fraktion aufgefangen. Die Zellen aller Fraktionen wurden in der Neubauer-Zählkammer gezählt und die Reinheit der CD4⁺ Fraktion sowie die Konzentration der CD19⁺ Zellen der non-CD4⁺ Fraktion mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Bis zur weiteren Verarbeitung der Fraktionen wurden die Zellen bei -80 °C asserviert.

3.4.5.2. Isolierung von CD3⁺ T-Zellen

Die CD3⁺ T-Zellen wurden mit Hilfe des Pan T-Zell Isolationskit II negativ oder positiv durch CD3 MicroBeads jeweils von Miltenyi Biotec isoliert. Dabei wurden entweder die non-T-Zellen (z. B. B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten) mit einer Mischung aus Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und Glycophorin A oder die CD3⁺ T-Zellen direkt mit Biotin-konjugierten „Microbeads“ markiert. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Hersteller-Protokoll und analog zu Kapitel 3.4.5.1. Nach Separation der CD3⁺ und non-CD3⁺ Fraktion wurden die Zellzahlen in der Neubauer-Zählkammer sowie die Reinheit der CD3⁺ Fraktion mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Bis zur weiteren Verarbeitung der Fraktionen wurden die Zellen bei -80 °C asserviert.

3.4.5.3. Isolierung von CD8⁺ T-Zellen

Die CD8⁺ T-Zellen wurden anhand des CD8⁺ T-Zell Isolationskit von Miltenyi Biotec über negative Selektion isoliert. Die non-CD8⁺ T-Zellen (z. B. CD4⁺, B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten) wurden mit einer Mischung aus Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD4, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ und CD235a (Glycophorin A) und Biotin-konjugierten „Microbeads“ markiert. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Hersteller-Protokoll und analog zu Kapitel 3.4.5.1. Nach Separation der CD8⁺ und non-CD8⁺ Fraktion wurden die Zellzahlen in der Neubauer-Zählkammer ermittelt sowie die Reinheit der CD8⁺ Fraktion mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Bis zur weiteren Verarbeitung der Fraktionen wurden die Zellen bei -80 °C asserviert.

3.5. Funktionsanalysen

LAA/HA1-proteinspezifische wurde von -unspezifischen CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe von Zytokin-Assays (IFN- γ ELISPOT, GM-CSF ELISA, ICS („intracellular cytokine staining“, IFN- γ)) sowie durch Funktionsassays (⁵¹Chromfreisetzungstest, Fluorolyse Assay) unterschieden.

3.5.1. ⁵¹Chromfreisetzungstest

Die zytotoxische Aktivität wurde in einem 4 h Standard ⁵¹Chromfreisetzungstest analysiert. Diese Methode basiert auf der Quantifizierung von freigesetztem radioaktivem Chrom aus toten Zellen, nach Effektorzell-vermittelter Lyse. Um eine möglichst optimale Effektoraktivität zu gewährleisten, wurden die Effektoren am Tag 8 nach Restimulierung eingesetzt.

Um die zytotoxische Aktivität von Einzelklonen zu testen, wurden 24 h vor der Durchführung des Assays, 1x10⁶ non-CD4⁺ T-Zellen (Zielzellen) mit den einzelnen Proteinen PRAME, WT1, PR3, HA1 und HEK293T (Negativkontrolle) mit jeweils 0,9 μ g Protein beladen. Am nächsten Tag wurden die Zielzellen mit radioaktivem Natrium-Chromat (Na₂⁵¹CrO₄, kurz ⁵¹Cr, 50 μ Ci) für 1 h inkubiert. Nach 2-maligen Waschen, zur Entfernung von nicht-inkorporiertem ⁵¹Cr, wurden die Zielzellen auf eine Zellzahl von 2.000 Zellen/50 μ l; die Effektorzellen auf eine Zellzahl von 20.000 Zellen/50 μ l eingestellt. Das eingesetzte Effektor:Target Ratio (E:T Ratio) betrug 10:1. Anschließend wurden jeweils 50 μ l von Effektor- und Zielzellen in eine 96-well-Spitzbodenplatte transferiert. Nach Inkubation für 4 h bei 37 °C wurden 50 μ l des Überstandes entnommen und die freigesetzte Radioaktivität detektiert. Der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{100 \times (\text{detektierte } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})}{(\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung})}$$

Die spontane Freisetzung ergab sich aus der Inkubation der Zielzellen ohne Zugabe von Effektorzellen. Die berechnete spezifische Zytotoxizität muss dabei höher als die ermittelte Zytotoxizität der Negativkontrolle sein.

3.5.2. Fluorolyse Assay

Die lytische Aktivität von Effektor-T-Zellen wurde auch durch den Fluorolyse Assay (Grabrucker, Liepert et al. 2010), durch Quantifizierung viabler fluoreszenzmarkierter Zielzellen nach Inkubation mit den Effektorzellen ermittelt.

Zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten wurden unstimulierte MNCs, CD4⁺ T-Zellen („untouched“) oder LAA/HA1-proteinstimulierte CD4⁺ T-Zellen vor und nach FACS-Sortierung und Klonierung als Effektorzellen eingesetzt. Blasten-angereicherte MNCs nach CD3⁺ T-Zell-Isolation wurden für die Targetzellfärbung eingesetzt. Als Targetkontrollen dienten des Weiteren Fibroblasten (generiert aus Hautzellen des Patienten), MNCs oder CD4⁺ T-Zellen zu unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten (siehe Tabelle 15).

Die Messung und Auswertung erfolgte am FACS Calibur™ mittels CellQuest™- Software.

Pro Messung wurden 3 Ansätze benötigt: Isotypenkontrolle, „Nullkontrolle“ mit getrennt inkubierten Target- und Effektorzellen zur Bestimmung der spontanen Lyse und der eigentliche „Hauptversuch“ mit vereinten Target- und Effektorzellen. Nach Auftauen und Zählen der Zellen wurden pro Ansatz 50.000 Effektor- (E) und 50.000 Zielzellen (T) im Verhältnis 1:1 eingesetzt.

Blasten wurden mit CD117-PE und CD34-APC, Monozyten bzw. myeloische Zielzellen mit CD14-FITC und CD33-APC, Fibroblasten mit HLA ABC-FITC und FIB-PE gefärbt. T-Zell-Targetmarkierung (z. B. CD3, CD4) erfolgten mit CD3-FITC oder CD4-FITC.

Nach Färbung und Entfernen überschüssiger ungebundener Farbstoffe durch Waschen und anschließender Zentrifugation, wurden E und T gemischt und für 4 h bzw. 24 h im Brutschrank inkubiert. Für die Bestimmung der Kontrollwerte wurden E und T getrennt im Brutschrank inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Proben entnommen und bis zur Messung auf Eis gestellt. Die E und T der Kontrollwert wurden vereint und alle Proben, außer der Isotypenfärbung, mit 1 µl 7AAD-Lösung (zur Vitalitätsbestimmung, BD Pharmingen)/20 µl Probe versetzt und für 5 – 10 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl PBS zu den Proben gegeben und mit 50 µl Beadlösung (Beads Flow Count™ Fluorospheres, Beckmann Coulter) versetzt. Mittels der Beads wurde die Anzahl der Signale („events“) für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff von Hauptwert und Nullkontrolle kalibriert. Anschließend wurden die Proben gemessen und die

lebenden 7AAD-negativen Zellen quantifiziert. Nach Messung erfolgte die Auswertung, dazu wurde nach Isotypeneinstellung der Kontrollwert und Hauptwert wie folgt berechnet:

- $\text{Kontrollwert} = (\text{Anzahl der Signale des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes des Kontrollwertes}) / (\text{Anzahl der Signale der Nullkontrolle})$
- $\text{Hauptwert} = (\text{Anzahl der Signale des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes des Hauptwertes}) / (\text{Anzahl der Signale der Beads im Hauptwert})$
- $(\text{Hauptwert} / \text{Kontrollwert}) \times 100 = \text{Differenz in \%}$

Daraus wurde der Prozentsatz der spezifischen Lyse wie folgt bestimmt:

- $100 - \text{Differenz in \%} = \text{spezifische Lyse in \%}$

3.5.3. IFN- γ ELISPOT („Enzyme-linked Immunospot“)

Mit Hilfe des ELISPOT-Assays können einzelne Zellen, die Zytokine sezernieren, in einer Zellpopulation detektiert werden. Mittels des IFN- γ ELISPOT wurde die Spezifität/Reaktivität der generierten, LAA/HA1-stimulierten CD4⁺ T-Zellen auf LAA/HA1 Antigene überprüft.

24 h vor Testung wurden die CD4 depletierten MNCs/Mini-LCLs (als APCs) mit Protein-Mix oder einzelnen Proteine (PRAME, WT1, PR3 oder HA1) beladen (spezifische Reaktion).

Um zwischen Background und tatsächlicher Ag-spezifischer Reaktion unterscheiden zu können, wurden APCs mit GFP-Protein (LAA/HA1-unspezifische Reaktion) oder HEK293T-Protein (Negativkontrolle) beladen. Als Assaykontrolle wurden PHA-stimulierte CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern (PHA, Endkonzentration: 250 ng/ml) eingesetzt.

Die Durchführung erfolgte im 96-well Format mit einer PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Millipore, MSHAN 4510). Die Membran mit Anti-IFN- γ mAb 1-D1K (15 μ g/ml; Mabtech) bei 4 °C ÜN „gecoated“. Am nächsten Tag wurden die Platten 6-mal mit je 200 μ l T-Zell Medium gewaschen und anschließend für 30 – 60 min mit T-Zell Medium geblockt. Beladene APCs wurden mit CD4⁺ T-Zellen in einem Volumen von 200 μ l vereint und auf die AK-gekoppelten ELISPOT Platten überführt und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen verworfen und die Platte 6-mal mit PBST (PBS mit 0,05 % Tween 20) gewaschen. Anschließend wurde 50 μ l biotinylierter Anti-IFN- γ mAK 7-B6-1 (Endkonzentration: 1 μ g/ml) zugegeben. Nach einer Inkubation von 2,5 – 3 h wurden die Platten 6 x mit PBST gewaschen und weitere 2,5 – 3 h mit 50 μ l einer 1:1.000 Verdünnung von Streptavidin-ALP bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten weitere 6-mal mit PBST gewaschen, bevor sie mit 50 μ l/well ALP Konjugate Substrat-Kit (BioRad) gefärbt wurden. Nach 15 – 60 min wurde die Färbereaktion mit dH₂O abgestoppt. Nach Trocknung der Platten erfolgte die Auswertung durch Scannen der Wells am PC. Um Ag-spezifische von unspezifischen Reaktionen zu unterscheiden wurde die Differenz der Spots aus beiden Ansätzen ermittelt.

3.5.4. GM-CSF ELISA („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“)

Die Freisetzung von GM-CSF durch CD4⁺ T-Effektorzellen wurde nach Stimulation in einem 100 µl Ansatz nach Angaben des Herstellers (BD OptEIA™, Human GM-CSF ELISA Set) bestimmt. Dazu wurden 100 µl des Stimulationsansatzes aus Kapitel 3.5.3. abgenommen und eingesetzt.

Das Prinzip des ELISAs ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, mit der lösliche Ag mit einem AK detektiert werden können.

Am Vortag wurde mit einem spezifischen Fängerantikörper (primärer AK) die 96-well-Flachbodenplatte beschichtet (1:250 Verdünnung in „Coating“-Puffer) und ÜN bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten 3-mal mit Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween 20) gewaschen und für 1 h bei RT blockiert (PBS mit 10 % FCS). In der Zwischenzeit wurde der im Set mitgelieferte GM-CSF Standards seriell verdünnt. Nach erneutem Waschen der Platten, wurden jeweils 100 µl von Standard und Überstand des Stimulationsansatzes in die Wells pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem 5-maligen Waschen, wurden 100 µl der Detektionslösung (Detektions-AK wurde 1:1.000 verdünnt in PBS mit 10 % FCS und mit 1:250 mit SA_v-HRP versetzt) in die Wells pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend 7-mal gewaschen und mit 100 µl Substrat-Lösung (TMB Substrate Reagent Set von BD, 1:1 Substrate A/Substrate B) inkubiert. Die enzymatisch vermittelte Farbreaktion wurde gestartet und durch Zugabe von 2 N H₂SO₄ gestoppt, daraus resultierte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Farbintensität ist dabei direkt proportional zur umgesetzten Substratmenge und damit indirekt proportional zur Menge an gebundenem GM-CSF. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte am ELISA Reader Sunrise™ von Tecan. Um Ag-spezifische (LAA/HA1-spezifisch) von unspezifischen Reaktionen zu unterscheiden, wurde die Differenz der Ansätze von Effektorzellen mit GFP-/HEK293T- oder LAA/HA1-proteinbeladenen APCs ermittelt. Anhand der Standardgeraden kann die Konzentration an freigesetztem GM-CSF abgeschätzt werden.

3.6. Proteinbiochemische Methoden

3.6.1. Aufreinigung von Proteinen

Das Zellpellet (siehe 3.3.8.1.) wurde mit 8 M Urea-Lysepuffer resuspendiert, die Zellen lysiert und anschließend für 10 min, 14.000 rpm und 4 °C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das

Zellpellet wurde verworfen. Das abgenommene Lysat wurden mit 300 µl Ni-NTA Agarose versetzt und für 4 – 12 h unter ständigem Schwenken (Intelli Mixer, NeoLab) bei 25 rpm inkubiert, um die His-tag Proteine an die Ni-Beads zu binden. Nach Zentrifugation bei 2.500 rpm für 5 min wurde der Überstand komplett verworfen und die gekoppelten Proteine 3-mal mit Lysepuffer gewaschen und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Elution 3-mal mit 200 µl Elutionspuffer (0,5 M Imidazol, pH 7,0). Nach Zentrifugation wurde das Eluat in 2 ml Tubes überführt, mit einer semipermeablen Dialysemembran verschlossen (Spectra-Por[®], 6 – 8 kDa), um Ionen und Proteine, kleiner als 6 kDa von den gereinigten Protein, zu trennen. Die Dialyse der Proteine erfolgte für 2 – 3 Tage in PBS. Dabei wurde PBS alle 12 h gewechselt. Bis zum Nachweis der Proteine im WB wurden die Proteine bei -20 °C gelagert.

3.6.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Pierce[®] BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific verwendet. Anhand einer mitgeführten Standardgeraden, wurde die Konzentration der Proben ermittelt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die aufgereinigten Proteine (siehe 3.6.1.) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Messung erfolgte am ELISA Reader Sunrise[™] von Tecan.

3.6.3. Nachweis von Proteinen im Western-Blot (WB)

Mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens können Proteine entsprechend ihrer Größe und Ladung in einer Trägermatrix (denaturierenden SDS-Gele) mittels Gelelektrophorese getrennt und auf eine Trägermembran (z. B. Nitrozellulosemembran) im „Tank-Blotting“-Verfahren elektrotransferiert werden. Die Detektion der Proteine erfolgte über einen primären AK, der spezifisch gegen das Protein oder gegen spezifische „tags“ (z. B. His-tag) gerichtet ist. Über einen fluorogenen sekundären AK lässt sich das Protein auf dem Röntgenfilm sichtbar machen.

Vor dem Einsetzen der Proteine ins Polyacrylamid-Gel wurden diese aufgetaut und resuspendiert. Es wurden 15 µl des jeweiligen Proteins und Protein-Elutionspuffer abgenommen und in ein „Tube“ überführt und mit 5 µl Auftragspuffer (4x NuPAGE[®] LDS Sample Buffer, Invitrogen[™]) versetzt und zur Linearisierung der Proteine für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Der Protein-Elutionspuffer wurde als negative Kontrolle mitgeführt, um mögliche Kontaminationen des Elutionspuffers zu analysieren. Um die Banden zuordnen zu können wurde ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt.

Nach dem Zusammenbau der Gelkammer wurde das 10 %ige Trenngel aus 1,5 M TRIS (ph 8,8), 10 % SDS, 30 % Polyacrylamid, 1 % APS, 0,04 % TEMED und H₂O gegossen. Nach Einfüllen von etwa 7 ml Trenngel wurde es mit ca. 2,5 ml Überschichtungspuffer (1,5 M TRIS plus H₂O im Verhältnis 1:8) aufgefüllt. Nach Polymerisation des Gels durch Zugabe von APS und TEMED wurde das 4 %ige Sammelgel aus 0,5 M TRIS (ph 6,8), 10 % SDS, 30 % Acrylamid, 1,5 % APS und 0,1 % TEMED gegossen. Nach Entfernen des Überschichtungspuffers wurde das Sammelgel in die Gelkammer gefüllt und der Gelkamm eingesteckt, nach Polymerisation wurde der Gelkamm entfernt, die Geltaschen mit H₂O gespült und mit den Proben beladen. Die Auftrennung erfolgte mit 1x Laufpuffer, bei 120 V für 15 min und anschließend bei 200 V für ca. 30 min, bis die Lauffront des Auftragspuffers aus dem Gel heraus lief. Als nächstes erfolgte der Transfer auf die Nitrozellulosemembran. Dazu wurde die „Blottingkammer“ zusammengebaut. Zu beachten ist dabei, dass die Membran mit H₂O äquilibriert und anschließend in „Blottingpuffer“ eingelegt und das Gel und die Membran luftblasenfrei in die „Blottingkammer“ gelegt werden muss. Da die Proteine im Gel negativ geladen sind, muss die „Blottingkammer“ in die „Blottingapparatur“ so eingelegt werden, dass die Proteine zur Anode und in Richtung der Membran wandern kann. Der Transfer erfolgte bei 120 V für 60 min. Der erfolgreiche Transfer konnte anschließend bei Bedarf durch Anfärbung mit Ponceau-Rot überprüft werden.

Im Anschluss erfolgte eine Blockierung nicht besetzter Bindestellen für Proteine mit 5 % Magermilchpulver in TBST (1x TBS mit 0,05 % Tween) für 1 h bei RT um eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers zu unterdrücken. Nach 3-mal Waschen der Nitrozellulosemembran für 5 min mit TBST wurde die Membran ÜN bei 4 °C mit dem primären Antikörper (1:5.000 Anti-His₆ monoklonaler AK von Roche, in TBST mit 1 % Magermilchpulver) inkubiert. Anschließend 3-mal mit TBST gewaschen und für 1 h mit sekundärem AK (1:1.000 Anti-Mouse Ig, HRP von Amersham) inkubiert. Nach erneutem 3-maligen Waschen der Membran mit TBST und 1-maligem Waschen mit 1x TBS wurde die Membran mit einer Färbelösung (Pierce ECL *Western Blotting* Substrat) inkubiert. Die Färbelösung wurde zuvor im Verhältnis 1:1 der Reagenzien 1 und 2 hergestellt. Nach einminütiger Inkubation der Färbelösung wurde die Membran in eine Frischhaltefolie eingeschlagen und für 1 – 20 min auf einem Röntgenfilm (Kodak BioMax MR, Eastman KODAK Company) exponiert. Die Dauer richtete sich nach der Signalintensität. Die Zuordnung und Größenbestimmung der Proteinbanden erfolgte über einen mitgeführten Molekulargewichtsstandard (Precision Plus ProteinTM Standards, Bio-Rad; BenchMarkTM His tagged Protein Standard, InvitrogenTM).

4. Ergebnisse

Trotz intensiver Therapien kann bei AML-Patienten mit einem Alter < 60 Jahren nur bei ca. 70 – 80 % eine CR mittels Induktionstherapie erzielt werden, wobei die zweijährige Überlebensrate nur bei 46 % liegt. Die CR-Rate und die Überlebensrate älterer Patienten ist deutlich schlechter (Jabbour, Estey et al. 2006). Es besteht ein dringender Bedarf an neuen Therapieansätzen, um residuelle leukämische Zellen zu erfassen. Eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von Tumoren übernehmen dabei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit immunmodulierender und/oder zytotoxischer Funktion, mit spezifischer Antigenerkennung des TCRs und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Essentiell für die T-Zell-vermittelten GvL-Effekte haben dabei im Kontext von MHC die präsentierten Zielantigene auf leukämischen Zellen.

In den letzten Jahren wurden LAAs (PRAME, WT1, PR3) und mHags (HA1) identifiziert, die in AML-Patienten im Vergleich zu Gesunden überexprimiert vorliegen, als mögliche Zielantigene einer Immuntherapie dienen können und sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen aktivieren.

Die Ergebnissdarstellung dieser Arbeit gliedert sich in zwei Themengebiete:

- 1) Genexpressionsanalysen von PRAME, WT1 und PR3
- 2) LAAs/HA1-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

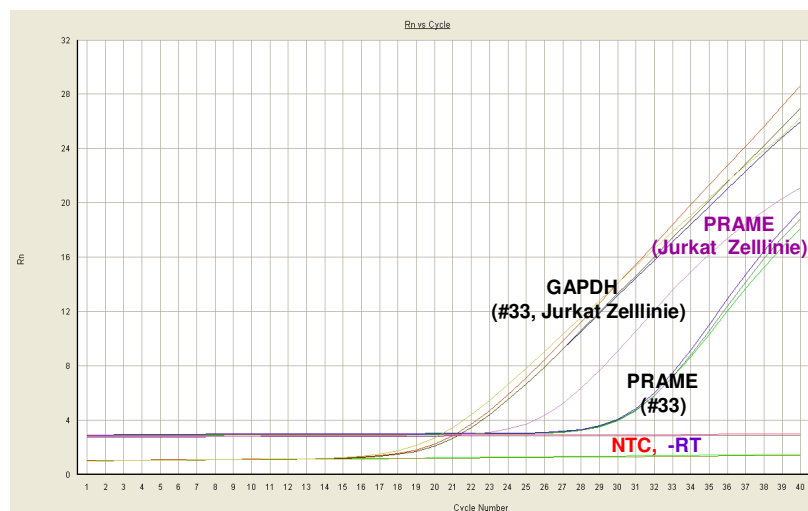
4.1. Genexpressionsanalysen von PRAME, WT1 und PR3 in AML-Patienten

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Expression der Leukämie-assoziierten Antigene (PRAME, WT1 und PR3) in Blut- (PB) und Knochenmarksproben (BM) von Patienten mit AML untersucht und die Ergebnisse in verschiedenen Subgruppen ausgewertet. Zur Analyse der durch TaqManTM-PCR generierten Genexpressionsdaten wurden Patientencharakteristika (z. B. Alter, Geschlecht, FAB-Typ, Zytogenetik; siehe Tabelle 10) erfasst. Sämtliche Analysen wurden auch in den jeweiligen Subgruppen ausgewertet, mögliche multiple Überexpressionen untersucht sowie Prognoseeinschätzungen durchgeführt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse in unterschiedlichen Krankheitsstadien und demzufolge mit deutlich unterschiedlichen Blastenzahlen (Mittelwert: 54 %, Bereich: 0 – 97 %) zu ermöglichen wurden die Proben auf 100 % Blasten rechnerisch adjustiert und parallel zu den unadjustierten Daten im Diagramm angegeben.

Von allen Proben konnte RNA in adäquater Qualität und Quantität erzielt und in cDNA transkribiert werden. Die Reinheit der RNA (260 nm/280 nm) lag im Mittelwert bei 1,94, dabei lagen 20 Proben über 2,0. Mit Hilfe der TaqManTM-PCR und nach erfolgter Normierung, mittels endogener Kontrollen (GAPDH) wurden die Patientenproben mit dem Mittelwert von 10 PB- oder 10 BM-Proben gesunder Probanden verglichen ($RQ = 2^{-\Delta\Delta ct}$). Eine Genüberexpression wurde als $RQ > 1$ definiert. Das LAA-Expressionsniveau der gesunden Spender war nach 40 Amplifikationsrunden gering oder nicht detektierbar. Dabei lag der PRAME ct (Schwellenwert, „threshold cycle“) von BM zwischen 38 – 40, von PB zwischen 37 – 40. Für WT1 lag der ct von BM zwischen 29 – 36, für PB zwischen 35 – 40 und der PR3 ct von BM zwischen 21 – 23 und für PB bei 27 – 39.

Die analysierten Zelllinien Raji, Ramos, HL60, Jurkat, K562 und Kasumi-1 exprimieren PRAME, WT1, und PR3. Bei den Zelllinien Raji und Ramos konnte keine Genexpression für PR3 detektiert werden (Daten nicht dargestellt). Da die Jurkat Zelllinie positiv für alle drei LAAs ist, wurde sie für alle Messungen als positive Kontrolle mitgeführt. Abbildung 6 zeigt die Rohdaten einer TaqManTM-PCR, exemplarisch an einem Patienten (#33) und der Jurkat Zelllinie für die Amplifikate PRAME und GAPDH. Es wurden für alle Messungen keine Kontaminationen detektiert (NTC, „no template control“ und –RT, Detektion genomischer DNA waren negativ). Die Standardabweichung der Patientenproben, gemessen in Triplikaten, lag zwischen 0,0 – 1,9 und spiegelt die Qualität der Aufreinigung, cDNA-Synthese und TaqManTM-PCR wider. Die endogenen Kontrollen (GAPDH, „house keeping gene“) der Patientenproben und der Jurkat Zelllinie, wurden nahezu identisch detektiert.

Abbildung 6: Rohdaten der TaqManTM-PCR, exemplarisch an Patient #33 und der Jurkat Zelllinie. Dargestellt ist die Messung für PRAME und GAPDH mit NTC, –RT. Die Messung der Patientenproben erfolgte in Triplikaten, die der Jurkat Zelllinie in Einfachmessung (NTC, „no template control“, -RT ohne Reverse Transkriptase zur Detektion genomischer DNA).



4.1.1. Patientencharakteristika zu Genexpressionsanalysen

Von 73 AML-Patienten wurden 90 Proben analysiert. Diese hier verwendeten 90 PB- und BM-Proben wurden in unterschiedlichen Krankheitsstadien (47x bei Erstdiagnose, 25x in persistierender Erkrankung, 6x in CR, 12x im Rezidiv) und zwischen 1985 und 2008 abgenommen und asserviert. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 57 Jahren (von 14 bis 82 Jahre), das Verhältnis von Frauen zu Männern war 1,6:1. Die Diagnose und Klassifikation erfolgte durch FAB-Klassifikation, zytogenetische Analysen und Risikoklassifikation nach definierten Standardprotokollen und Kriterien (Mrozek, Heinonen et al. 1997; Schoch and Haferlach 2002; Dohner, Estey et al. 2010). Patientencharakteristika sind in Tabelle 10 gegeben.

Tabelle 10: Patientencharakteristika zu Genexpressionsanalysen der LAAs. Dargestellt sind die nach FAB klassifizierten AML-Subtypen, das Stadium der Erkrankung, Alter, Geschlecht, Zellkompartiment, zytogenetisches Risiko und die morphologisch detektierten Blasten in %. Patientenproben, deren Abnahme in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung, in unterschiedlichen Zellkompartimenten oder nach dem FLAMSA-Protokoll behandelt wurden, kann den entsprechenden Kapiteln entnommen werden.

Pat. #	FAB-Subtyp	Alter	Sex	Stadium (+ X-Monate)	Blasten %	Zellkomp.		zg. Marker	zg. Risiko
						PB	BM		
#1	pM0	29	w	Dgn	78		*	46, XX	intermediär
#2	pM0	78	w	Dgn	99	*		46, XX	intermediär
#3	pM0	66	w	Rez	70	*			
#4	pM0	40	w	Pers	29	*			
	pM0	40	w	Pers	30		*		
	pM0	40	w	Pers (+6)	91	*			
#5	pM1	69	w	Dgn	90	*		46, XX, del(20)(q11q13)	intermediär
#6	pM1	70	w	Dgn	95	*			
#7	pM1	64	m	Dgn	95		*		
	pM1	64	m	Dgn	90		*		
#8	pM1	71	w	Dgn	88		*	46, XX	intermediär
#9	pM1	75	m	Dgn	95		*	46, XY	intermediär
#10	pM1	67	w	Dgn	68	*		46, XX, del(5)(q13q31)	ungünstig
	pM1	68	w	Pers (+11)	65	*			
#11	pM1	38	w	Dgn	95	*		46, XX	intermediär
#12	pM1	58	w	Rez	44	*			
#13	pM1	80	w	Dgn	90	*		46, XX	intermediär
#14	pM1	39	w	Dgn	77	*		46, XX	intermediär
#15	pM1	58	m	Rez	23		*		
	pM1	58	m	Rez	66		*		
#16	pM2	58	w	Dgn	66		*	46, XX	intermediär
#17	pM2	67	m	Pers	5	*			
#18	pM2	44	w	Dgn	54		*		
	pM2	44	w	Pers (+1)	26		*		
	pM2	44	w	Pers (+6)	6		*		
#19	pM2	76	m	Dgn	66		*	46, XY	intermediär
#20	pM2	39	m	Dgn	77	*		46, XY, t(8;21)(q22;q22)	günstig
#21	pM2	49	w	CR	0	*			
#22	pM2	41	w	Pers	71	*			
#23	pM3	71	w	Pers (+3)	67		*		
	pM3	71	w	Pers (+2)	42		*		
	pM3	71	w	Pers (+1)	51		*		
	pM3	71	w	Pers (+1)	1	*			
	pM3	71	w	Pers	62		*		
#24	pM3	66	m	Dgn	90	*		46, XY, t(15;17)(q22;q21)	günstig

#25	pM3	50	w	Dgn	90		*	46, XX, t(5;10)(q13;q36); t(15;17)(q22;q21)	günstig
#26	pM3	60	m	Pers	14		*		
#27	pM3	62	m	Rez	78		*		
#28	pM3	61	m	Pers	9		*		
#29	pM4	64	m	Dgn	95		*		
#30	pM4	68	w	Dgn	95	*		46, XX	intermediär
#31	pM4	56	w	Dgn	93		*		
#32	pM4	57	m	Dgn	65		*		
#33	pM4	64	w	Dgn	49		*		
#34	pM4	64	m	Dgn	90		*	47,XY,+11, inv(11)(p15q13)	intermediär
#35	pM4	51	m	Rez	37	*			
#36	pM4	24	m	Pers	9	*			
#37	pM4	34	w	Dgn	88	*			
#38	pM4	58	w	Rez	59	*			
#39	pM4eo	14	m	Dgn	70	*		46, XY, inv(16)(p13q22)	günstig
#40	pM5	72	W	Dgn	90	*			
#41	pM5	43	w	Dgn	94		*	46, XX	intermediär
#42	pM5	67	w	Dgn	86		*		
#43	pM5	60	w	Dgn	97		*	46, XX, t(9;11)(p21;q23)	ungünstig
#44	pM5	35	w	Dgn	95	*		46, XX, t(9;11)(p22;q23)	ungünstig
#45	pM5	24	w	Dgn	94	*			
	pM5	25	w	CR (+3)	4		*		
#46	pM5	52	w	Dgn	59	*			
	pM5	52	w	Pers (+1)	14	*			
	pM5	52	w	Dgn	86		*		
	pM5	52	w	Pers (+1)	5		*		
#47	pM5	33	w	Pers	19		*		
#48	pM5	33	w	Dgn	67	*			
#49	pM6	42	m	Pers	2	*			
#50	pAML	75	w	Dgn	27	*			
#51	sAML	67	m	Dgn	23	*		46, XY	intermediär
#52	sAML	69	w	Rez	50		*		
#53	sAML	74	m	Dgn	51		*		
#54	sAML	71	w	Dgn	65		*	46, XX	intermediär
#55	sAML	64	m	Dgn	75	*		46, XY, 45 XY, -7	ungünstig
#56	sAML	83	w	Dgn	36		*	50,XX, +1,+4, del(5)(q12q33), +9,+11	ungünstig
#57	sAML	66	m	CR	4		*		
#58	sAML	66	m	CR	1		*		
#59	sAML	66	m	CR	4		*		
#60	sAML	65	m	Pers	36		*		
#61	sAML	67	m	Rez	23		*		
#62	sAML	62	w	Dgn	55		*	46, XX	intermediär
#63	sAML	77	w	Dgn	88		*		
#64	sAML	50	w	Dgn	47		*		
	sAML	51	w	CR (+2)	1		*		
#65	sAML	54	w	Dgn	22	*		41,XX, der(6p-), -7, der(7p+), -11, -17, -20	ungünstig
#66	sAML	67	m	Pers	52	*			
#67	sAML	65	w	Pers	3	*			
#68	sAML	37	m	Rez	70	*			
#69	sAML	64	m	Rez	60	*			
#70	sAML	49	m	Dgn	59	*		46, XY	intermediär
	sAML	49	m	Dgn	36		*	46, XY	intermediär
#71	sAML	46	m	Pers	3	*			
#72	sAML	51	w	Rez	82	*			
#73	sAML	66	w	Pers	63	*			

Pat.# Patientnummer, Dgn Diagnosestellung, Sex biologisches Geschlecht (w weiblich, m männlich), Stadium (+ X-Monate) Stadium der Erkrankung, + X-Monate zusätzliche Probennahme nach z. B. 3 Monaten nach Erstabnahme, Blasten % morphologische Blasten in %, Zellkomp. Zellkompartiment, zg. Risiko zytogenetische Risikogruppe (günstige, intermediäre, ungünstige), Pers persistierende Erkrankung, Rez Rezidiv, CR komplette Remission, pM0 primäre AML FAB M0, sAML sekundäre AML, Alter in Jahren, PB periphere mononukleäre Blutzellen, BM periphere mononukleäre Knochenmarkzellen.

4.1.2. Expressionsspiegel der LAAs in unterschiedlichen AML-Subtypen bei Erstdiagnose

Mit Hilfe der RT-PCR konnte in 87 % der AML-Proben für PRAME, in 81 % für WT1 und in 55 % für PR3 eine RNA-Überexpression bei Erstdiagnose (n = 47), detektiert werden. Bezogen auf 100 % Blasten („adjustiert“), lag die Überexpression für PRAME bei 91 %, für WT1 bei 81 % und für PR3 bei 57 % (siehe Tabelle 11). Eine RNA-Überexpression im Vergleich zu gesunden Spendern konnte in allen FAB-Subtypen für die analysierten LAAs (Ausnahme pM0 für PR3) gezeigt werden.

Tabelle 11: LAA-Überexpression bei Erstdiagnose. Die LAA-Überexpression der analysierten Gene lag für WT1 bei 81 %, für PRAME bei 87 % und für PR3 bei 55 %. Die RNA-Überexpression bezogen auf 100 % morphologischer Blasten lag dabei bei 81 % für WT1, für PRAME bei 91 % und für PR3 bei 57 %.

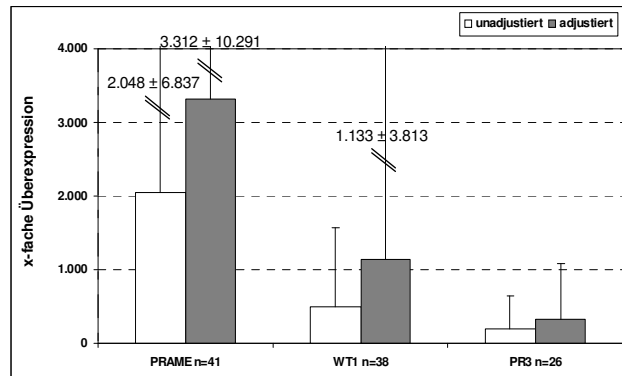
FAB-Subtype	PRAME		WT1		PR3	
	unadjustiert n/n	adjustiert n/n	unadjustiert n/n	adjustiert n/n	unadjustiert n/n	adjustiert n/n
pM0 (n = 2)	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2
pM1 (n = 10)	8/10	9/10	9/10	9/10	6/10	6/10
pM2 (n = 4)	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	2/4
pM3 (n = 2)	2/2	2/2	1/2	1/2	1/2	1/2
pM4 (n = 7)	5/7	5/7	6/7	6/7	3/7	3/7
pM4eo (n = 1)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
pM5 (n = 9)	9/9	9/9	4/9	4/9	6/9	6/9
pAML (n = 1)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
Σ pAML (n = 36)	32/36	33/36	28/36	28/36	20/36	20/36
sAML (n = 11)	9/11	10/11	10/11	10/11	6/11	7/11
Σ (n = 47)	41/47 (87 %)	43/47 (91 %)	38/47 (81 %)	38/47 (81 %)	26/47 (55 %)	27/47 (57 %)

n Anzahl, Σ Summe, pM0 primäre AML FAB M0, sAML sekundäre AML, % Prozent, adjustiert auf 100 % morphologisch detektierte Blasten bezogen.

Definiert man den Schwellenwert einer Überexpression mit $RQ \geq 10$, konnte eine Überexpression bei allen analysierten Fälle bei Erstdiagnose (n = 47), in 55 % für PRAME, in 62 % für WT1 und in 32 % für PR3 in den unadjustierten Werten detektiert werden. Bezogen auf 100 % Blasten und $RQ \geq 10$ lag die Überexpression für PRAME bei 55 %, für WT1 bei 64 %, und für PR3 bei 34 % (Daten nicht dargestellt).

Werden nur die Fälle mit LAA-Überexpression betrachtet zeigte PRAME die höchste RNA-Überexpression mit einem Mittelwert (MW) von 2.048-facher RNA-Überexpression, gefolgt von WT1 mit 486-facher und PR3 mit 196-facher Überexpression. Bezogen auf 100 % Blasten lag hier der MW der RNA-Überexpression für PRAME bei 3.312-facher, für WT1 bei 1.430-facher und für PR3 bei 566-facher Überexpression vor und ist in Abbildung 7 dargestellt.

Abbildung 7: RNA-Expressionspiegel der LAAs. Dargestellt sind die MW mit Standardabweichung aller AML-Proben mit Überexpression bei Erstdiagnose. Die höchste Überexpression wurde detektiert in PRAME, mit einer durchschnittlichen Überexpression der unadjustierten Werte von 2.048 und einer Standardabweichung von ± 6.837 (adjustiert auf 100 % Blasten lag die Überexpression bei 3.312 ± 1.0291 , n Anzahl der Fälle).



In den nächsten Abschnitten wurden zur weiteren, detaillierten Analyse nur Patientenproben mit Überexpression bei Erstdiagnose betrachtet.

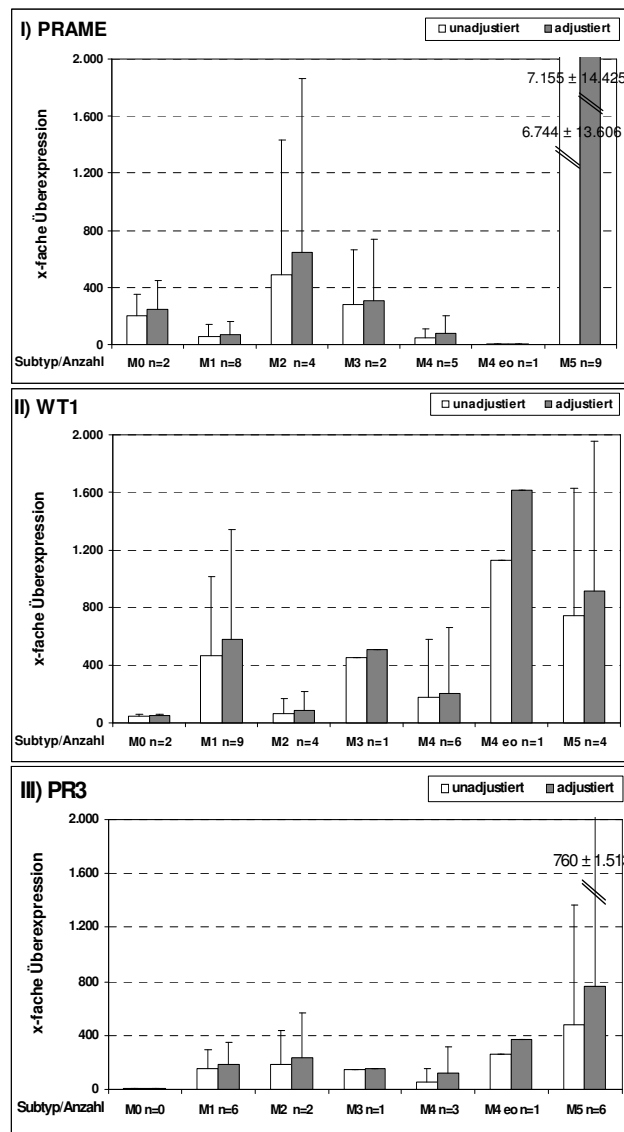
In allen FAB-Subtypen waren die analysierten Gene PRAME, WT1 und PR3 überexprimiert nachweisbar (Ausnahme PR3 für den FAB-Subtyp M0; Abbildung 8-I-III).

Für PRAME konnte die höchste durchschnittliche Überexpression im FAB-Subtyp M5 mit einer 6.744-fachen Überexpression detektiert werden. Adjustiert auf 100 % Blasten lag die durchschnittliche Überexpression bei 7.155-facher Überexpression vor (siehe Abbildung 8-I). Die geringste Überexpression eines Falles lag im FAB-Subtyp M4eo mit 6-facher und adjustiert auf 100 % Blasten mit 9-facher RNA-Überexpression vor.

Die höchste Überexpression in einem Patienten für WT1 lag im FAB-Subtyp M4eo mit einer 1.789-fachen Überexpression vor. Der Mittelwert der Patienten mit Subtyp M5 lag bei 1.127-fachen Überexpression und lag damit unter der Überexpression eines Patienten mit Subtyp M4eo vor. Die höchste durchschnittliche Überexpression adjustiert auf 100 % Blasten, konnte ebenfalls bei AML M5 nachgewiesen werden, mit einer 918-fachen Überexpression. Die höchste Überexpression eines Patienten konnte im FAB-Subtyp M4eo mit 1.610-facher Überexpression detektiert werden, die geringste durchschnittliche Überexpression bei FAB-Subtyp M0 mit einer 48-fachen Überexpression an WT1 nachgewiesen werden. Der adjustierte Wert lag bei 53-facher Überexpression (siehe Abbildung 8-II).

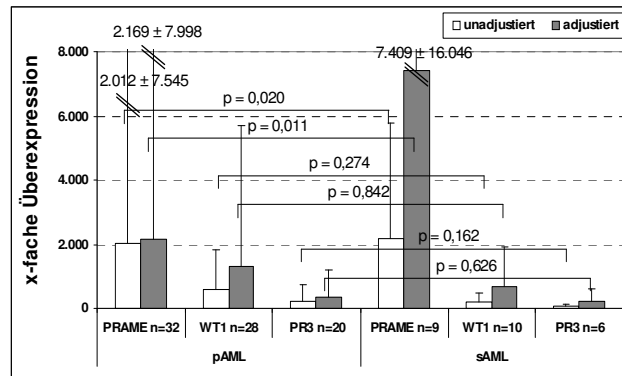
Die höchste durchschnittliche RNA-Überexpression für PR3 konnte für FAB-Subtyp M5 mit 482-facher und adjustiert auf 100 % Blasten mit einer durchschnittlichen 760-fachen Überexpression nachgewiesen werden. Die geringste durchschnittliche Überexpression lag bei AML M4 mit 59-facher Überexpression und adjustiert auf 100 % Blasten bei 119-facher Überexpression vor. Keine Überexpression für PR3 lag im FAB-Subtyp M0 vor (siehe Abbildung 8-III).

Abbildung 8: RNA-Expressionspiegel aller Fälle mit durchschnittlicher Überexpression bei Erstdiagnose unterteilt nach FAB-Subtyp. Im Diagramm sind die Mittelwerte mit Standardabweichung gegeben. **I) PRAME:** Die höchste Überexpression lag im Subtyp M5 vor. **II) WT1:** Die höchste durchschnittliche Überexpression lag im Subtyp M5 vor, mit jedoch der höchsten Überexpression eines Falles im FAB-Subtyp M4eo. **III) PR3:** Die höchste durchschnittliche Überexpression lag im FAB-Subtyp M5 und keine Überexpression lag im Subtyp M0 vor (n Anzahl der Fälle).



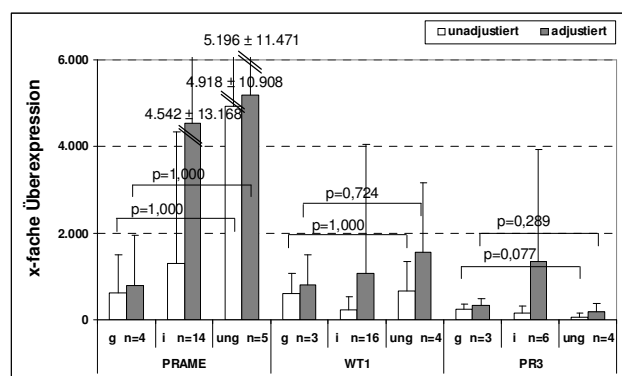
Der Vergleich von pAML zu sAML zeigte vergleichbare Expressionsraten für WT1 und PR3, mit höherer RNA-Expression bei pAML. Eine signifikant niedrigere Expressionsrate von PRAME konnte bei pAML im Vergleich zu sAML detektiert werden (2.012-fache vs. 2.178-fache Überexpression, Mann-Whitney Test, $p = 0,020$). Dies bestätigt sich auch auf die auf 100 % Blasten adjustierten Werte (2.160-fachen vs. 7.409-fachen Überexpression, $p = 0,011$, Abbildung 9).

Abbildung 9: Vergleich der RNA-Expressionsspiegel der LAAs in Fällen mit Überexpression bei Erstdiagnose bei pAML vs. sAML. Signifikant niedrigere Expression von PRAME bei pAML vs. sAML konnte für unadjustierte sowie auf 100 % Blasten adjustierte Werte detektiert werden. Unterschiede in der durchschnittlichen Expressionsraten war nur für PRAME nachweisbar, mit $p = 0,020$ für die unjustierten Daten im Vergleich zu $p = 0,011$ für die auf 100 % Blasten adjustierten Werte. Angegeben sind die MW mit Standardabweichung und statistischer Signifikanz (n Anzahl der Fälle).



Eine höhere Expression von PRAME und WT1 konnte bei zytogenetisch „ungünstigen“ im Vergleich zu zytogenetisch „günstigen“ Fällen gezeigt werden: die durchschnittliche Überexpression für PRAME lag bei 4.918-facher und bei 677-facher Überexpression für WT1 in den zytogenetisch „ungünstigen“ Risikogruppen (siehe Abbildung 10). Für die auf 100 % Blasten adjustierten Daten, lag die durchschnittliche Überexpression für PRAME bei 5.196-facher und für WT1 bei einer 1.566-fachen Überexpression vor. Für PR3 lag eine höhere durchschnittliche Überexpression für die zytogenetisch prognostisch „günstige“ im Vergleich zur „ungünstigen“ Risikogruppe der unadjustierten sowie adjustierten Daten vor; wobei die Unterschiede der analysierten LAAs nicht signifikant waren.

Abbildung 10: Vergleich der RNA-Expressionsspiegel der LAAs in Fällen mit Überexpression bei Erstdiagnose unterteilt in unterschiedliche zytogenetische Risikogruppen. Niedrigere (nicht signifikante) Expression von PRAME und WT1 und höhere Expression in zytogenetisch „ungünstiger“ Risikogruppe. Angegeben sind die MW mit Standardabweichung und statistischer Signifikanz (g günstige, i intermediäre, ung ungünstige Risikogruppe, n Anzahl der Fälle).



4.1.3. Simultane/parallele Überexpression von LAAs bei Erstdiagnose

Bei der Auswertung der AML-Patientenproben bei Erstdiagnose ($n = 47$), konnten wir beobachten, dass unterschiedliche LAAs parallel/simultan überexprimiert werden. In 49 % und adjustiert auf 100 % Blasten in 53 % der Fälle konnte eine RNA-Überexpression von mindestens zwei LAAs nachgewiesen werden. Die höchste simultane Überexpression lag in der Kombination von (PRAME + WT1) mit 70 % und adjustiert in 79 % der Fälle vor. In 45 % der unadjustierten und 53 % der adjustierten Fälle, konnte eine relative Überexpression in allen 3 LAAs ermittelt werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Detektion von multiplen LAAs bei AML-Patienten bei Erstdiagnose. Dargestellt sind Fälle, bei denen gleichzeitige Überexpression in LAAs in mehreren Fällen vorlag, bei $n = 47$ untersuchten Fällen. Der höchste Prozentsatz an simultaner Überexpression konnte in der Kombination von (PRAME + WT1) detektiert werden.

LAAs	unadjustiert	adjustiert
	n (%)	n (%)
PRAME + WT1	33 (70)	37 (79)
PRAME + PR3	23 (49)	26 (55)
WT1 + PR3	24 (51)	25 (53)
PRAME + WT1 + PR3	21 (45)	25 (53)

n Anzahl der Fälle, % Prozent der Fälle.

Ein Vergleich der multiplen LAA-Überexpression bei pAML vs. sAML zeigte dabei einen höheren Prozentsatz an multiplen Überexpressionen bei sAML für die Kombination (PRAME + WT1) und (WT1 + PR3) sowie eine geringeren Prozentsatz für die Kombination von (PRAME + PR3) oder von (PRAME + WT1 + PR3). Für die an 100 % Blasten adjustierten Daten, lag ein höherer Prozentsatz an simultaner RNA-Überexpression aller Kombinationen bei der sAML vor (Tabelle 13).

Tabelle 13: Vergleich der multiplen LAA-Überexpression in AML-Patienten bei Erstdiagnose in pAML ($n = 36$) vs. sAML ($n = 11$). Dargestellt sind Fälle, in denen gleichzeitig multiple Überexpressionen der analysierten Gene detektiert wurden; mit höherer multipler Überexpressionsrate in der Kombination von (PRAME + WT1), (WT1 + PR3) und geringerer in der Kombination von (PRAME + PR3) in Fällen der sAML.

Subtyp	LAAs	unadjustiert	adjustiert
		n/ Σ n (%)	n/ Σ n (%)
pAML	PRAME + WT1	25/36 (69)	27/36 (75)
sAML	PRAME + WT1	8/11 (73)	10/11 (91)
pAML	PRAME + PR3	19/36 (53)	19/36 (53)
sAML	PRAME + PR3	4/11 (36)	7/11 (64)
pAML	WT1 + PR3	18/36 (50)	18/36 (50)
sAML	WT1 + PR3	6/11 (55)	7/11 (64)
pAML	PRAME + WT1+ PR3	17/36 (47)	18/36 (50)
sAML	PRAME + WT1+ PR3	4/11 (36)	7/11 (64)

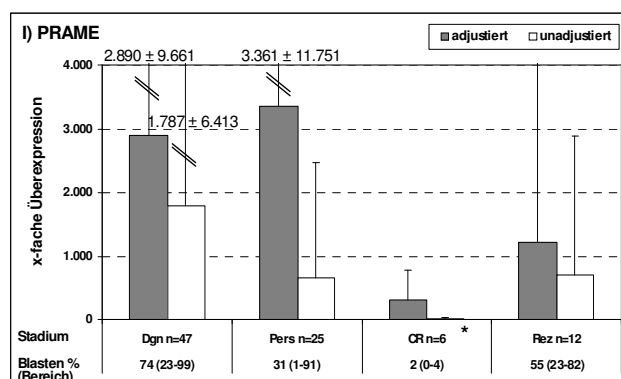
n Anzahl der Fälle, Σ Gesamtzahl der Fälle, % Prozent der Fälle)

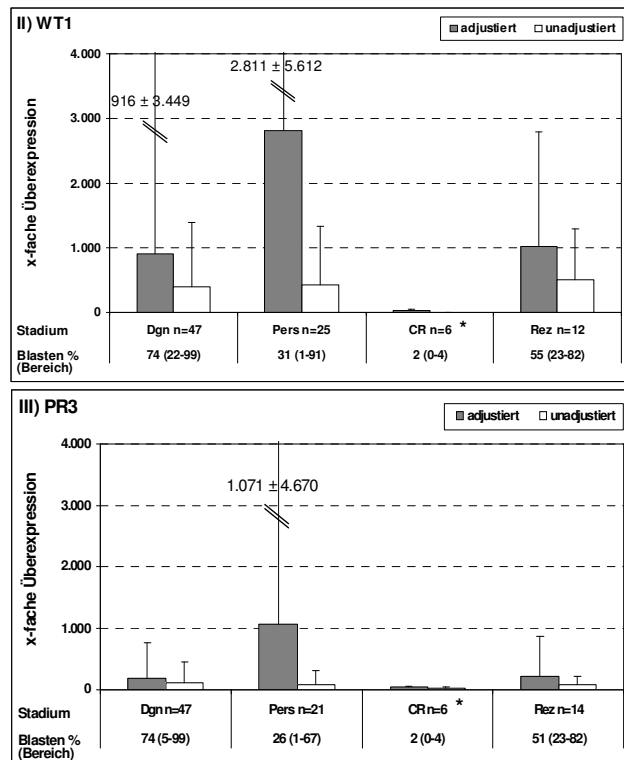
4.1.4. Expressionsspiegel der LAAs in unterschiedlichen Krankheitsstadien

Wir korrelierten die Expressionsstärke der LAAs mit Krankheitsstadien, die durch unterschiedliche Blastenanteile gekennzeichnet sind. Da die Blastenanzahl in verschiedenen Stadien der Erkrankung sehr stark variiert, werden in den nächsten Abschnitten die adjustierten Werte und die dazugehörigen unadjustierten Werte aller Proben, und nicht nur der Proben mit Überexpression, betrachtet.

Die höchste durchschnittliche RNA-Überexpressionsrate der Proben konnte bei Erstdiagnose für die LAAs PRAME und PR3 detektiert werden. Ausnahme war hier die durchschnittliche Expression von WT1 mit der höchsten Expressionsrate im Stadium des Rezidivs und vergleichbaren Expressionsraten bei Erstdiagnose und in der persistierenden Erkrankung. Für PRAME und PR3 lagen die nächsthöchsten durchschnittlichen Expressionsraten im Stadium mit persistierender Erkrankung vor, gefolgt von Patientenproben im Rezidiv. Patientenproben im Stadium des Rezidivs zeigten ein ähnliches Expressionsprofil, wie Patienten in der persistierender Erkrankung (siehe Abbildung 11-I-III). Für PRAME (MW: 1.787-fache Überexpression) konnte die höchste Überexpressionsrate im Vergleich zu WT1 (MW: 393-fache Überexpression) und zu PR3 (MW: 109-fache Überexpression) der unadjustierten Werte nachgewiesen werden. Wurden die Expressionswerte auf 100 % Blasten adjustiert, konnte interessanterweise für alle drei analysierten LAAs die höchste durchschnittliche RNA-Überexpressionsrate in Patienten mit persistierender Erkrankung nachgewiesen werden. Überraschenderweise zeigten Patientenproben im Rezidiv eine reduzierte durchschnittliche RNA-Expressionsrate der adjustierten Werte.

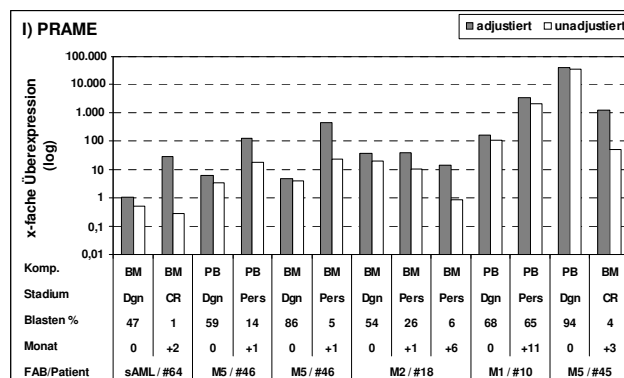
Abbildung 11: Vergleich der RNA-Expressionsspiegel der LAAs I) PRAME, II) WT1 und III) PR3) in unterschiedlichen Krankheitsstadien. Zur Auswertung wurden Proben mit und ohne RNA-Überexpression herangezogen; dargestellt sind die MW mit Standardabweichung. Die höchste RNA-Überexpression konnte für alle LAAs in Stadium der persistierenden Erkrankung und die geringste im Stadium der CR der adjustierten Werte detektiert werden. Zu beachten ist, dass es sich bei den Patientenproben in CR um ausschließlich BM-Proben handelte (Stadium Krankheitsstadium, Dgn Erstdiagnose, Pers persistierende Erkrankung, CR komplette Remission, Blasten % morphologisch detektierte Blasten in %, Bereich Schwankungsbereich der morphologisch detektierten Blasten in % und Mittelwert, n Anzahl der Fälle, * Blasten wurden nur in BM detektiert).

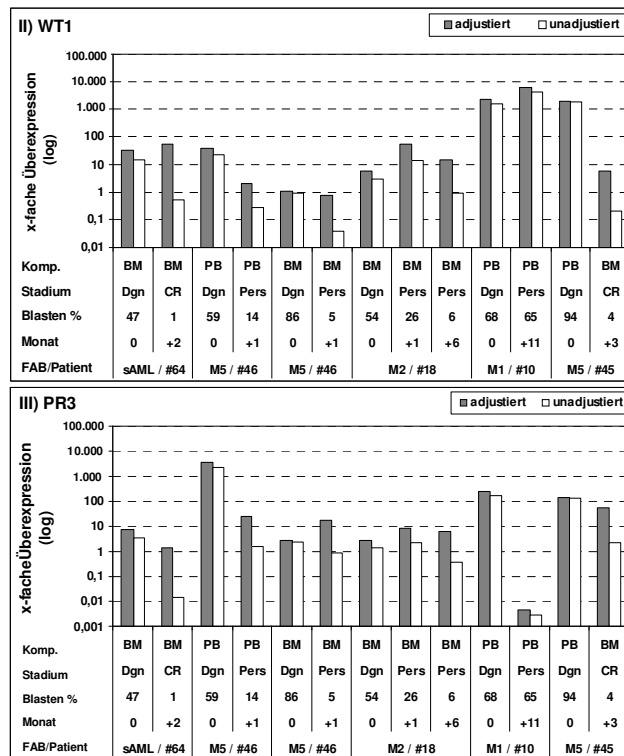




Bei 6 Patienten standen uns mehrere Proben im Krankheitsverlauf zur Verfügung. Wiederum zeigten die Fälle die höchste LAA-Überexpression im Stadium der persistierenden Erkrankung oder bei Erstdiagnose der adjustierten und unadjustierten Proben. Bei der Einzelfallbetrachtung von Patienten im Stadium der CR fällt auf, dass die zu erwartende Expression nicht null war. In Patient #45 lag eine deutliche RNA-Überexpression für PRAME, WT1 und PR3 der adjustierten und zum Teil auch in den unadjustierten Werten vor (siehe Abbildung 12-I-III).

Abbildung 12: LAA-Expressionsprofile im Krankheitsverlauf von 6 AML-Patienten I) PRAME, II) WT1 und III) PR3. Die höchste RNA-Überexpression lag im Stadium der persistierenden Erkrankung oder bei Erstdiagnose der adjustierten und unadjustierten Werte vor (PB periphere Blutzellen, BM Knochenmarkzellen, Blasten % morphologisch detektierte Blasten in %, Stadium Krankheitsstadium, Dgn Erstdiagnose, Pers persistierende Erkrankung, CR komplette Remission, Komp. Zellkompartiment, Monat + X-Monate der zweiten Blutabnahme, FAB FAB-Subtyp, sAML sekundäre AML, # Patientennummer).



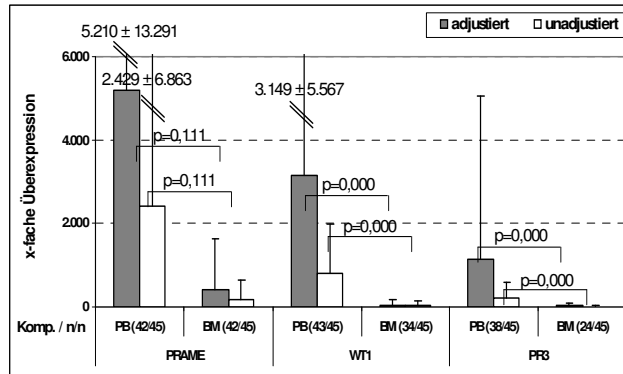


4.1.5. Expressionsspiegel in unterschiedlichen Zellkompartimenten

Im nächsten Abschnitt wurden die LAA-Expressionsspiegel in unterschiedlichen Zellkompartimenten (PB oder BM) der 90 AML-Proben in unterschiedlichen Stadien genauer betrachtet.

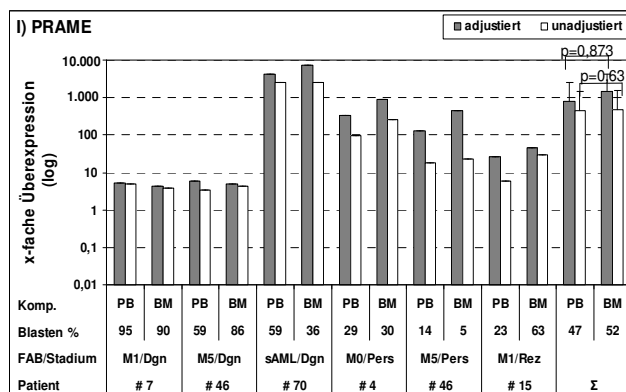
Erste Analysen zeigten eine vergleichsweise höhere durchschnittliche Überexpressionsrate für PRAME, WT1 und PR3 in PB im Vergleich zu BM. Genauere Analysen der Expressionsmuster in unterschiedlichen Zellkompartimenten zeigten eine (statistisch signifikant) höhere Überexpression von PB- im Vergleich zu BM-Proben von WT1 ($p < 0,001$) und PR3 ($p < 0,001$), jedoch nicht für PRAME ($p = 0,111$) für die adjustierten und nicht adjustierten RNA-Expressionswerte. Die Auswertung aller Fälle mit Überexpression bestätigten die bisherigen Ergebnisse (Abbildung 13). Definiert man den Schwellenwert der Überexpression als 10-fache Überexpression ($RQ \geq 10$) im Vergleich zum MW der gesunden Spender kann für die drei analysierten LAAs ein statistisch signifikanter Unterschied im PB- und BM-Kompartiment der adjustierten und nicht adjustierten Werte ermittelt werden (Ausnahme ist PR3 bei adjustierten Expressionswerten; Daten nicht dargestellt).

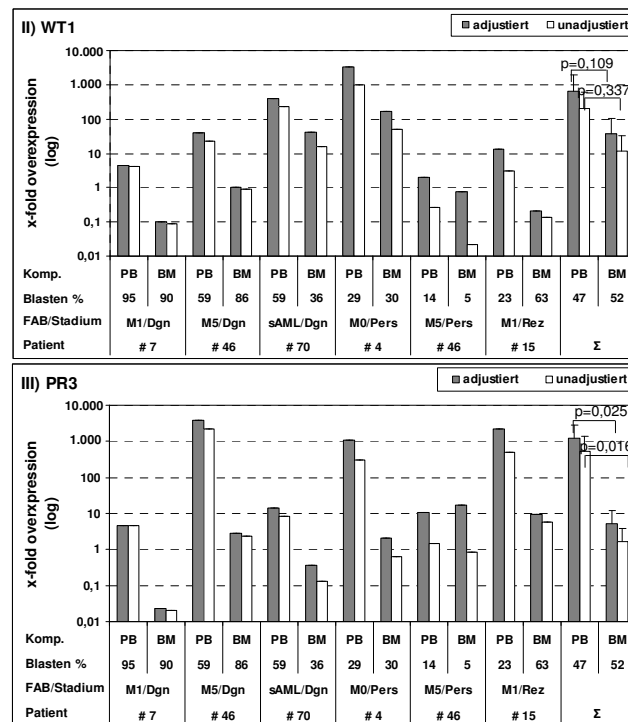
Abbildung 13: Vergleich der RNA-Expressionspiegel in PB- oder BM- Patientenproben in allen Proben mit Überexpression. Signifikante höhere RNA-Expressionsraten konnten in PB- vs. BM-Proben detektiert werden. Dargestellt sind die MW mit Standardabweichung und statistischer Signifikanz (Komp. Zellkompartiment, n/n Anzahl der Fälle mit Überexpression/Gesamtanzahl an Fällen).



In der Einzelfallanalyse (n = 6) von PB- vs. BM-Patientenproben mit identischem Abnahmezeitpunkt konnte eine (signifikant) höhere Expression in PB-Patientenproben für PR3 (p = 0,016/p = 0,025) aber nicht für PRAME (p = 0,631/p = 0,873) und WT1 (p = 0,337/p = 0,109) der unadjustierten und adjustierten Werte detektiert werden. Jedoch liegt eine deutlich höhere RNA-Überexpression in PB-Patientenproben für WT1 vor. Es lag annähernd eine einheitliche PRAME RNA-Überexpression in PB vs. BM der adjustierten und unadjustierten Daten vor (Patient: #7, #46, #70). Die höchste RNA-Überexpression eines Falles (#70) konnte für PRAME in BM-Proben (adjustierten und nicht adjustierten Daten) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14-I-III).

Abbildung 14: Einzelfallanalyse der RNA-Expression der analysierten LAAs in PB- oder BM-Proben. Dargestellt sind die einzelnen Patientenproben und der Mittelwert der Einzelfallanalysen mit Standardabweichung und statistischer Signifikanz. Dabei konnte eine (signifikant) höhere RNA-Expression für PR3 in PB-Patientenproben ermittelt werden (PB periphere Blutzellen, BM Knochenmarkszellen, Blasten % morphologisch detektierte Blasten in %, Stadium Krankheitsstadium, Dgn Erstdiagnose, Pers persistierende Erkrankung, CR komplette Remission, Komp. Zellkompartiment, FAB FAB-Subtyp, # Patientnummer, Σ Mittelwert der Fälle n = 6).





4.1.6. Prognostische Signifikanz

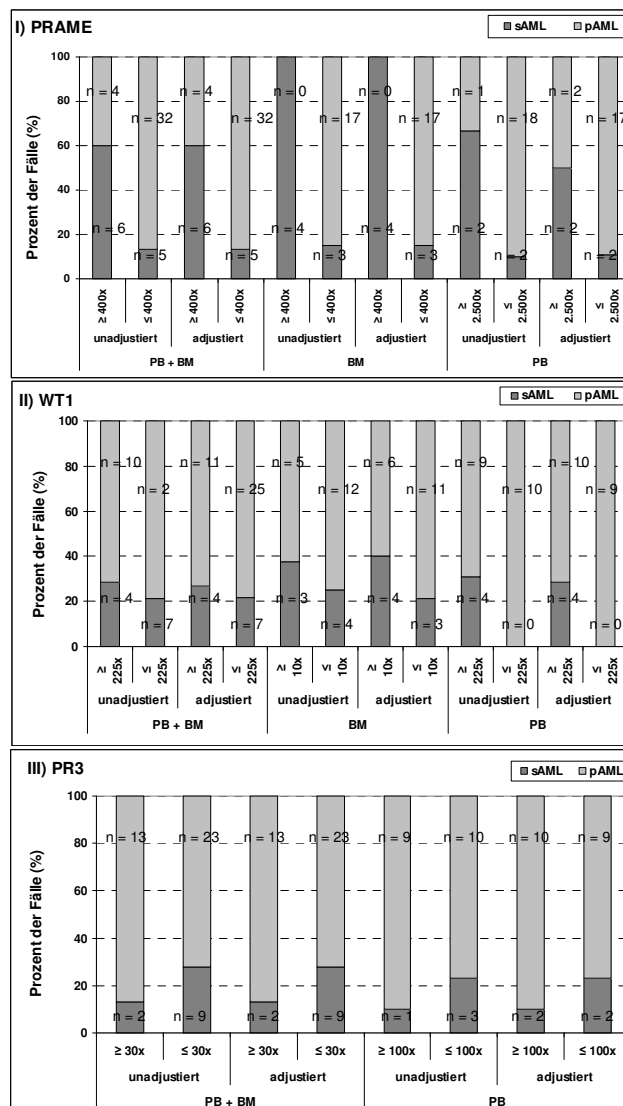
Wir analysierten LAA-Expressionspiegel in definierten Risikogruppen und konnten ein zytogenetisch „günstiges“ Risiko bzw. das klinische Bild einer pAML mit einem (signifikant) geringeren Expressionsmuster für PRAME korrelieren. Bei WT1 korrelierte eine höhere durchschnittliche Expression mit pAML sowie einer tendenziell geringeren Expression in der zytogenetisch „ungünstigen“ Risikogruppe. Des Weiteren konnte eine tendenziell höhere Expression von PR3 mit der zytogenetisch „günstigen“ Risikogruppe und der pAML korreliert werden (siehe Abbildung 9/10).

Detaillierte Schwellenwertanalysen zeigten für PRAME, dass 100 % bzw. 67 % der Fälle mit einer mehr als 400-/2.500-fachen Überexpression in BM- oder PB-Proben eine sAML, aber nur 15 % bzw. 13 % mit einer geringeren als 400-/2.500-fachen Überexpression eine pAML hatten. Die Ergebnisse für die adjustierten und unadjustierten Daten waren hier vergleichbar (siehe Abbildung 15-I). Bei einer WT1-Überexpression von mehr als 10-/225-fachen Überexpression in BM- oder PB-Proben zeigten etwa 40 % bzw. 30 % der Fälle eine sAML, mit einer geringeren als 10-/225-fachen Überexpression in etwa 25 % bzw. 0 % eine pAML. Die Ergebnisse der adjustierten und unadjustierten Daten waren vergleichbar (Abbildung 15-II). Wegen der niedrigen Expression von PR3 im BM konnte kein prädiktiver Schwellenwert in BM definiert werden. Um die BM-Proben auswerten zu können wurden sie mit den PB-Proben (PB + BM) vereint. In PB-Patientenproben für unadjustierte und adjustierte mit einer 100-fachen von PR3 definiert werden. Etwa 90 % der Fälle mit einer höheren 100-fachen

Überexpression waren pAML, mit geringerer als 100-fachen Überexpression eine sAML. Für die vereinten PB + BM-Patientenproben und einer 30-fachen Überexpression sind die Daten vergleichbar (siehe Abbildung 15-III).

Zusammenfassend ist möglicherweise eine geringe Expressionen von PRAME und WT1 und eine hohe Expression von PR3 mit einer günstigeren Prognose assoziiert.

Abbildung 15: Prädiktive Schwellenwerte aller Fälle (n = 47) bei Erstdiagnose für I) PRAME, II) WT1 und III) PR3 in pAML vs. sAML. Dargestellt sind LAA-Expressionsergebnisse in PB sowie BM, wobei prädiktive Schwellenwerte mit adjustierten und unadjustierten Werten in pAML oder sAML gezeigt sind. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurden für alle LAAs die Ergebnisse aller Proben (PB + BM) angegeben. Zusammenfassend scheinen hohe RNA-Expressionen von PRAME und WT und eine geringe RNA-Expression von PR3 mit der „ungünstigeren“ sAML assoziiert zu sein (PB periphere Blutzellen, BM Knochenmarkzellen, n Anzahl der Fälle).



Im Weiteren wurde das LAA-Expressionsprofil mit dem Ansprechen auf Therapie nach Behandlung mit dem FLAMSA-Protokoll korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, die erfolgreich mit dem FLAMSA-Protokoll (n = 3) behandelt wurden, durch tendenziell hohe durchschnittliche PR3 (adjustierte/unadjustierte Daten, 525-/56-fache Überexpression) und durch geringe PRAME (adjustierte/unadjustierte Daten, 1.135-/307-fache Überexpression) Expression charakterisiert waren. Patienten, die nicht erfolgreich

behandelt wurden (n = 9) zeigten im Vergleich dazu eine durchschnittliche PR3 Expression der adjustierten bzw. unadjustierten Werte mit 197- bzw. 80-facher und eine durchschnittliche PRAME Expression der adjustierten bzw. unadjustierten Daten mit 2.443- bzw. 1.588-facher Überexpression (siehe Tabelle 14). Für WT1 lag kein einheitlicher Trend der adjustierten und unadjustierten Mittelwerte der beiden Gruppen vor. Hier lag eine höhere unadjustierte bzw. geringere adjustierte durchschnittliche Überexpression in der Patientengruppe die nicht auf die Therapie angesprochen haben vor im Vergleich zur Patientengruppe die erfolgreich therapiert wurden.

Tabelle 14: RNA-Expressionswerte (x-fache Überexpression) der Patienten, die mit dem FLAMSA-Protokoll therapiert wurden, unterteilt in Therapie-Ansprecher A) und Therapie-Nicht-Ansprecher B). Aufgelistet sind die adjustierten und unadjustierten Expressionswerte der Patienten sowie die Mittelwerte aus Therapie-Ansprecher bzw. Therapie-Nicht-Ansprecher. Für die RNA-Expression von PRAME konnte eine geringere bzw. von PR3 eine höhere durchschnittliche Überexpression der erfolgreich therapierten Patienten ermittelt werden.

A) Patienten, die erfolgreich mit dem FLAMSA-Protokoll therapiert wurden (Ansprecher).

Pat. #	Stadium	Therapie- erfolg	PRAME adjustiert	PRAME unadjustiert	WT1 adjustiert	WT1 unadjustiert	PR3 adjustiert	PR3 unadjustiert
#67	Pers, refraktär	Ja, CR für 1,5 Jahre	512	15	20.335	610	950	28
#22	Pers, refraktär	Ja, CR für 3 Jahre	1.041	739	1.162	825	133	94
#36	Pers, refraktär	Ja, CR für 2 Jahre	1.852	167	3	nd	493	44
MW			1.135	307	7.167	478	525	56

B) Patienten, die nicht auf die Therapie mit FLAMSA-Protokoll ansprachen (Nicht-Ansprecher).

Pat. #	Stadium	Therapie- erfolg	PRAME adjustiert	PRAME unadjustiert	WT1 adjustiert	WT1 unadjustiert	PR3 adjustiert	PR3 unadjustiert
#4	Pers, Rez nach SCT, refraktär,	Nein	2.677	2.436	423	385	nd	nd
#4	Pers, Rez nach SCT, refraktär	Nein	322	93	3.363	976	1.070	310
#73	Pers nach 2. Rez, refraktär	Nein	13.734	8.653	3.460	2.180	36	23
#68	Rez nach SCT, refraktär	Nein	136	95	165	115	23	16
#72	Rez nach SCT, refraktär	Nein	4	3	1.719	1.410	nd	nd
#12	Rez nach 2. SCT, refraktär	Nein	1.528	672	1.418	624	244	107
#10	Pers nach SCT, refraktär	Nein	3.424	2.225	6.240	4.056	nd	nd
#69	Rez	Nein	2	1	37	22	152	91
MW			2.728	1.772	2.103	1.221	191	68

Pat. # Patientenummer, Pers persistierende Erkrankung, CR komplette Remission, Rez Rezidiv, nd nicht nachweisbar, MW Mittelwert, adjustiert auf 100 % morphologisch detektierte Blasten, SCT Stammzelltransplantation.

4.2. LAA/HA1-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Aktivität zur Bekämpfung der AML

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die zelluläre CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunreaktion gegen leukämische Blasten bei der AML untersucht.

4.2.1. Patientencharakteristika zu Untersuchungen der (LAA/HA1-spezifischen) CD4⁺- und CD8⁺-vermittelnden Immunantwort

Patientencharakteristika, der von uns verwendeten Proben der CD4⁺ und CD8⁺ Experimente mit patientenbezogenen Daten (Diagnose, Stadium der Erkrankung, Blastenzahl in %), sind in Tabelle 15 zusammenfassend dargestellt.

Die Reinheit der positiv und negativ selektierten CD3⁺, CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen war immer mehr als 95 %.

Tabelle 15: Patientencharakteristika zu Untersuchungen der HLA-I/HLA-II und der LAA/HA1-peptid-/proteinspezifischen CD4⁺- und CD8⁺-vermittelten Immunantwort. Dargestellt sind die Patienten mit Diagnose, Stadium der Erkrankung, Blasten in %, isolierte Zellen und die erfolgte Analyse.

Patienten (#)	Diagnose	Stadium der Erkrankung bei Probenakquise	Blasten in PB bei Probenakquise (%)	Zellen	Erfolgte Analysen
#466	MDS, sAML-M6	Pers vor SCT	20	MNCs	HLA-I/HLA-II Experimente
#538	AML-M0	Rez nach SCT	90	MNCs	HLA-I/HLA-II Experimente; Spectratyping
#545	AML-M1	Pers	85	MNCs	HLA-I/HLA-II Experimente
#561	AML-M2	Dgn	55	MNCs	HLA-I/HLA-II Experimente
#1.147	AML-M2	CR nach SCT und nach 5. DLI	0	MNCs	MHC-Multimer-Analyse, ICS
#1.148	AML-M2	CR nach 3. SCT	0	MNCs	MHC-Multimer-Analyse, ICS
#1.149	AML-M4	CR nach SCT und nach 3. DLI	0	MNCs	MHC-Multimer-Analyse, ICS
#1.150	MDS-RAEB II	CR nach SCT und 3. DLI	0	MNCs	MHC-Multimer-Analyse, ICS
#1.151	AML-M4	CR nach SCT	5	MNCs	MHC-Multimer-Analyse, ICS
#1.152	AML-M5	CR nach SCT	0	CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , MNCs	MHC-Multimer-Analyse, ICS, Spectratyping
#1.153	MDS-CMML	Pers nach SCT und nach 2. DLI	8	CD4 ⁺ , MNCs	MHC-Multimer-Analyse, ICS, IFN- γ ELISPOT, LAA Analysen, CD4 ⁺ Experimente

#1.154	MDS-RAEB II	CR nach SCT und nach 2. DLI	0	CD4 ⁺ , MNCs	ICS, IFN- γ ELISPOT, LAA, CD4 ⁺ Experimente
#1.155a und 1.155b	MPS-atyp. CML	CR nach SCT und nach 2. DLI	0	CD4 ⁺ , MNCs	ICS, IFN- γ ELISPOT, GM-CSF ELISA, LAA Analysen, CD4 ⁺ Experimente
#1.156	Biphen. ALLL/AML	CR nach SCT	0	CD4 ⁺	IFN- γ ELISPOT, CD4 ⁺ Experimente
#1.157	AML-M4	CR nach SCT	0	CD4 ⁺	IFN- γ ELISPOT, CD4 ⁺ Experimente
#1.158 ('E1')	AML-M4	CR vor SCT	0	MNCs	LAA Analysen, Fluorolyse Assay, CD4 ⁺ T-Zellprofil
#1.158 ('E2')	AML-M4	CR nach 1. SCT und nach 1. DLI	0	CD4 ⁺	Fluorolyse Assay, CD4 ⁺ T-Zellprofil
#1.158 ('E3') ('E10', nach P5) ('E11', nach P16) ('E12', nach P17, Zellsort. P14) ('E13,14,15' Klone, nach Zellsort. und P14) ('E16,17,18,19' Klone, nach Zellsort. und P14)	AML-M4	CR nach 1. SCT und 1. DLI	0	CD4 ⁺	ICS, IFN- γ ELISPOT, GM-CSF ELISA, Fluorolyse Assay, Chromfreisetzungstest, CD4 ⁺ T-Zellprofil
#1.158 ('E4')	AML-M4	Rez nach 1. SCT und nach 2. DLI	nd	CD4 ⁺	Fluorolyse Assay, CD4 ⁺ T-Zellprofil
#1.158 ('E5')	AML-M4	CR nach 2. SCT und nach 4. DLI	0	CD4 ⁺	Fluorolyse Assay, CD4 ⁺ T-Zellprofil
#1.158 ('E6')	AML-M4	CR nach 2. SCT und nach 4. DLI	0	CD4 ⁺	Fluorolyse Assay, CD4 ⁺ T-Zellprofil
#1.158 ('E7,8,9')	AML-M4	CR nach 2. SCT und nach 4. DLI	0	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , MNCs	LAA Analyse, Fluorolyse Assay, CD4 ⁺ T-Zellprofil
#1.158 ('Blasten Zielzelle')	AML-M4	Rez nach 1. SCT und nach 2. DLI	34	CD3 depletierte Blasten	Fluorolyse Assay, CD4 ⁺ T-Zellprofil

SCT Stammzelltransplantation, DLI Spenderlymphozyten-Infusion, Dgn Erstdiagnose, CR Komplette Remission, Rez Rezidiv, Pers persistierende Erkrankung, MDS myelodysplastische Syndrome, RAEB Refraktäre Anämie mit Blastenexzess, AML-M3 akute myeloische Leukämie FAB M3, CMML Chronische Myelomonozytäre Leukämie; LAA Leukämie-assoziierte Antigene, LAA Analysen Expressionsanalysen mit RQ = $2^{\Delta\Delta Ct}$ Methode, ICS intrazelluläre Zytokinfärbung, CD4⁺ Experiment CD4⁺ Experimente mit Proben nach Isolation, Stimulation und Charakterisierung von LAA/HA1-proteinstimulierten CD4⁺ T-Zellen, # Patientenummer, Zellsort. durchflusszytometrischer Zellsortierung der proliferierenden CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen.

4.2.2. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind an der Vermittlung von antileukämischen Immunreaktionen beteiligt

In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Helga Schmetzer wurden folgende Ergebnisse generiert und mir freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Abschnitt 4.2.2.). Material und Methodik hierzu, kann der Publikation Steger et al. (Steger, Milosevic et al. 2013) entnommen werden.

Für die Untersuchung der Rolle der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf ihre antileukämische Aktivität wurde ein auf DC-basiertes Stimulationsmodell verwendet. Dazu wurden DCs leukämischer Abstammung aus blastenhaltigen MNCs von Patienten generiert (Grabrucker, Liepert et al. 2010; Kremser, Dreyssig et al. 2010). Diese leukämischen DCs

leukämischer Abstammung präsentieren theoretisch das gesamte patiententypische Ag-Repertoire der leukämischen Zellen.

Schließlich wurden CD3⁺ T-Zellen von vier Patienten mit blastenhaltigen MNCs („MNCs“) oder mit generierten leukämischen DCs („DC“) oder mit unstimulierten T-Zellen in gemischter Lymphozytenkultur inkubiert und stimuliert. Anschließend wurden im Fluorolyse Assay die stimulierten CD3⁺ T-Zellen in Hinblick auf ihre antileukämische Aktivität in An- oder Abwesenheit von HLA Klasse-I oder -II blockierenden AK analysiert.

In Patient **#545** der *unstimulierten* autologen T-Zellen konnte eine antileukämische blastenlysierende Aktivität von 60 % nachgewiesen und durch anti-HLA Klasse-I gerichtete AK inhibiert werden, was in einer 15 %igen blastenlysierenden Aktivität resultierte. Bei Kombination von anti-HLA Klasse-I und anti-HLA Klasse-II AK wurde eine 10 %ige blastenlysierende Aktivität detektiert. In diesem Fall konnte gezeigt werden, dass blockierende AK, die sich direkt gegen HLA Klasse-II richten, keinen Einfluss auf das antileukämische Potential von „DC“-stimulierten T-Zellen aufweisen, womit die CD8⁺-vermittelte antileukämische T-Zellantwort der (unstimulierten) CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 16). Bei Patient **#561** konnten wir zeigen, dass die antileukämische, lytische Aktivität der „DC“-stimulierten, autologen T-Zellen (5 % blastenlysierende Aktivität) direkt durch anti-HLA Klasse-I (Anstieg der Blasten auf 65 %) und durch anti-HLA Klasse-II (Blastenanstieg um 35 %) gerichtete AK und ebenso durch die Kombination von anti-HLA Klasse-I und anti-HLA Klasse-II AK (14 % Blastenanstieg) inhibiert wurde. Dies deutet auf die antileukämische Aktivität von CD4⁺ und CD8⁺ „DC“-stimulierten T-Zellen hin. Ähnliche Ergebnisse konnten mit allogenen T-Zellen von Patient **#538** gezeigt werden: ein deutlicher Anstieg der Blasten auf 110 % unter anti-HLA Klasse-II blockierenden Konditionen deutet auf eine prädominante CD4⁺-vermittelte antileukämische Reaktivität hin. In Patient **#466** war die antileukämische blastenlysierende Aktivität der „MNC“-stimulierten allogenen T-Zellen (23 % blastenlysierender Aktivität) nach Inkubation mit anti-HLA Klasse-I (5 % blastenlysierender Aktivität) und ebenso mit anti-HLA Klasse-II gerichteten (10 % blastenlysierende Aktivität) AK reduziert.

Diese Ergebnisse deuten auf eine ausgeprägte CD4⁺- und partielle CD8⁺-vermittelte antileukämische T-Zellantwort der „MNC“-stimulierten allogenen T-Zellen hin.

Zusammenfassend konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass an der Vermittlung der antileukämischen Immunantwort sowohl CD4⁺ T-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen beteiligt sind. Jeder einzelne Kooperationspartner kann dabei antileukämische, lytische Aktivität aufweisen. Diese Informationen lieferten den ersten Nachweis für die zelluläre Beteiligung der CD4⁺ T-Zellen zur Eliminierung leukämischer Zellen.

Tabelle 16: Inhibierung der antileukämischen blastenlysierenden Aktivität von unstimulierten, ‚MNC‘ oder ‚DC‘ stimulierten T-Zellen nach Blockierung der HLA Klasse-I und/oder HLA Klasse-II vermittelten T-Zellreaktion. Es ist der Abfall (-) oder der Anstieg (+) der Blastenanteile in % nach Wechselwirkung mit (blockierenden/nicht-blockierenden) Effektorzellen dargestellt. Beispielsweise konnte in Patient #545 der unstimulierten autologen T-Zellen eine 60 %ige blastenlysierende Aktivität nachgewiesen werden. Die Koinkubation mit anti-HLA Klasse-I AK führte zu einer verringerten und mit anti-HLA Klasse-II zu einer gesteigerten und deutet auf CD8⁺ T-Zellantwort hin.

Patienten (#)	T-Zell Stimulation durch			T-Zellreaktion blockiert durch AK gegen									Prädominanter antileukämischer Effekt (HLA Klasse-I und/oder -II)
				HLA Klasse-I (A, B, C)			HLA Klasse-II (DR)			HLA Klasse-I (A, B, C) + HLA Klasse-II (DR)			
	‚u‘	‚MNC‘	‚DC‘	‚u‘	‚MNC‘	‚DC‘	‚u‘	‚MNC‘	‚DC‘	‚u‘	‚MNC‘	‚DC‘	
#545	-60			-15			-75			-10			Klasse-I
#561			-5			+65			+31			+14	Klasse-I (+ -II)
#538			-2			+45			+110			+35	Klasse-II (+ -I)
#466		-23			-5			-10					Klasse-I + -II

‚u‘ unstimuliert, ‚MNC‘ mononukleäre Zellen, ‚DC‘ dendritische Zellen, HLA humane Leukozyten Antigene mit Isotyp A, B, C für Klasse-I und DR als Beispiel für Klasse-II.

4.2.3. Detektion von LAA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus AML-Patienten nach SCT und DLI

Im nächsten Schritt wurden LAA-spezifische CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe der MHC-Multimer-Technologie bei Patienten nach SCT quantifiziert und deren Anzahl mit dem Remissionsstatus korreliert, sowie exemplarisch mit Spekatyping die klonale Einschränkung des T-Zell-Rezeptor (TCR) Repertoires dieser Zellen als Hinweis auf klonale Stimulation dargestellt. Die Ergebnisse dieses Abschnittes (4.2.3.) wurden von cand. Dr. rer. nat. Georg Doessing in Kooperation mit den Arbeitsgruppen (AG) Prof. Dr. med. Dirk Busch (TUM) und cand. Dr. rer. nat. Susanne Reuther, AG Prof. Dr. med. Arndt Borkhardt (Universitätsklinikum Düsseldorf) und Dr. med. Friedhelm Schuster (Universitätsklinikum Düsseldorf) erstellt und mir zur Präsentation an dieser Stelle überlassen.

Die Patientencharakteristika können Tabelle 15, detaillierte Angaben zu Material, Methoden dazu, kann Steger et al. entnommen werden (Steger, Milosevic et al. 2013).

Mit Hilfe der MHC-Multimer-Technologie wurden CD8⁺ T-Zellen analysiert und PRAME-, WT1- oder PR1-peptidspezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis von spezifischen CD8⁺ T-Zellen konnte für jedes MHC-Multimer im Vergleich zu den Kontrollen (z. B. irrelevantes MHC-Multimer, gesunde Probanden) erbracht werden (Daten nicht dargestellt, siehe (Steger, Milosevic et al. 2013)). Des Weiteren konnte bei allen sieben AML-Patienten nach erfolgreicher SCT und/oder DLI, LAA-spezifische CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (Schwellenwert wurde mit 0,11 % der LAA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu zehn gesunden Probanden festgelegt) detektiert werden. In vier von fünf Fällen

konnten zwei unterschiedliche Typen an LAA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen gemessen (#1.149, #1.150, #1.152, #1.153) und mit einer lang andauernden CR (> 2 Jahre) assoziiert werden. Patient #1.148 verstarb einen Monat nach Probenakquise an einem mikrobiellen Infekt. Patient #1.151 mit zwei unterschiedlichen LAA-spezifischen T-Zellen erlitt ein Rezidiv nach 5 Monaten und Patient #1.147 mit nur einem LAA-spezifischen T-Zelltyp, rezidierte nach einem Jahr. In Patient #1.153 konnten PRAME-spezifische T-Zellen nach SCT im Stadium eines inkompletten Chimärismus (95 % männliche, 5 % weibliche Zellen) detektiert werden. Weitere 7 Monate später konnte eine PRAME-Überexpression in PB, ebenfalls im Stadium eines inkompletten Chimärismus (66 % männliche, 35 % weibliche Zellen) detektiert werden und belegt damit die Korrelation von LAA-Überexpression und der Ausbildung von LAA-spezifischen T-Zellen (siehe Abbildung 16-I).

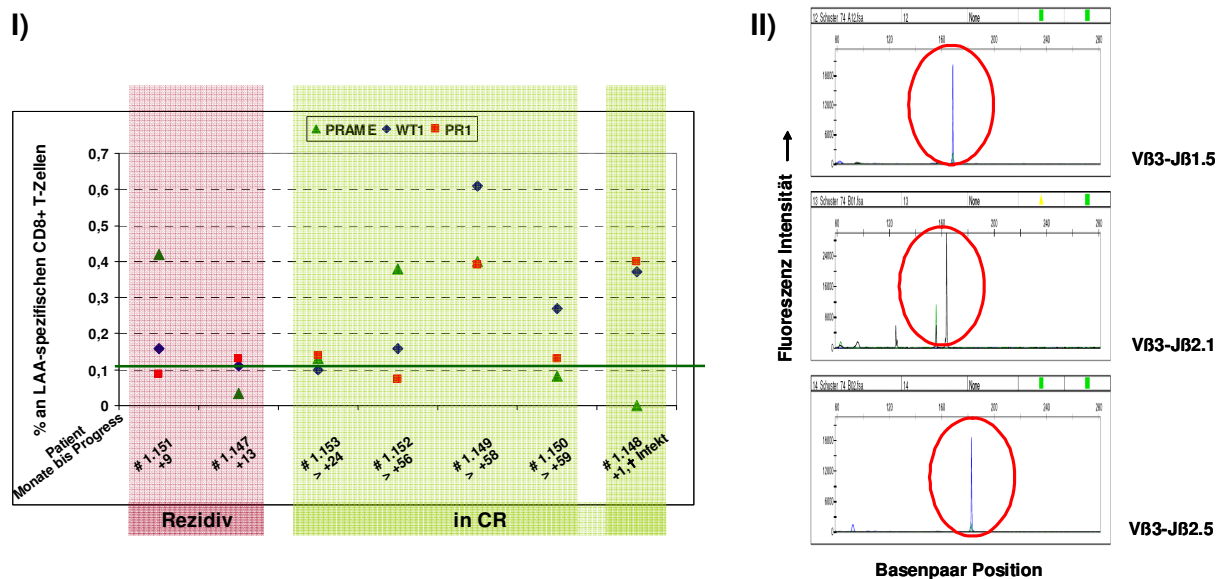
Mittels CDR3-Spectratyping konnten wir in der CD4⁺ sowie der CD8⁺ T-Zellfraktion in Patient #538 nach ‚DC‘-Stimulation *in vitro* das identische restringierte V β -Muster im TCR-Repertoire identifiziert werden wie *in vivo* 3 Monate nach SCT. Damit konnte belegt werden, dass mit Hilfe des ‚DC‘-Stimulationsprotokolls die identischen CD8⁺ T-Zellen stimuliert werden können, wie *in vivo*. In Patient #1.152 konnte mittels Spectratyping PRAME-spezifische T-Zellen selektiert und ein stark eingeschränktes V β -TCR-Repertoire im V β 3-J β 1.5, V β 3-J β 2.1 und V β 3-J β 2.5 Locus nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16-II).

Zusätzlich wurden nach LAA-Peptidstimulation, die CD8⁺ T-Zellen auf ihre IFN- γ oder IL-2 Sekretion mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert, wobei in 8 von 9 Fällen keine Zytokinsekretion als Hinweis auf spezifische Funktionalität nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise konnte in Patient #1.153 mit PRAME-überexprimierenden Blasten im Stadium der persistierenden Erkrankung nach Rezidiv und SCT eine IFN- γ Sekretion in der CD4⁺ T-Zellfraktion nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass LAA-spezifische, HLA-A02-restringierte CD8⁺ T-Zellen mittels MHC-Multimer-Technologie, bei allen Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach erfolgreicher SCT nachgewiesen werden konnten. Die parallele/simultane Detektion von zwei unterschiedlichen LAA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen korrelierte dabei mit einer länger andauernden Remission. Die nachgewiesene Sekretion von IFN- γ nach LAA-Peptidstimulation der CD4⁺ T-Zellenfraktion lieferte zusätzlich zu den Ergebnissen in 4.2.2. den Hinweis auf die Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen.

Somit konnten wir zusammenfassend feststellen, dass neben (zytotoxischen), antileukämisch reaktiven CD8⁺ T-Zellen auch CD4⁺ T-Zellen (und nicht nur ihre löslichen Produkte) aktiv an antileukämischen Reaktionen beteiligt sind.

Abbildung 16: Dargestellt sind die anti-LAA-Peptid reaktiven CD8⁺ T-Zellen nach MHC-Multimer-Färbung und Spekratyping in PB von AML-Patienten nach allogener SCT und/oder DLI. I) Es konnte gezeigt werden, dass (multiple) reaktive LAA-spezifische CD8⁺ T-Zellen mit der Dauer einer Remission korrelieren. II) Angereicherte MHC-Multimer positive (PRAME) CD8⁺ T-Zellen in PB von Patient #1.152 zeigten im Spekratyping ein stark eingeschränktes V β -TCR-Repertoire.



4.2.4. Experimente zur Funktion der CD4⁺ T-Zellen

Im Zusammenhang mit der AML-Forschung lag der Hauptfokus bislang auf Untersuchungen von CD8⁺ T-Zellen. Wenig ist bekannt über die Funktion der CD4⁺ T-Zellen bei der AML gegen LAA-spezifische CD4⁺ T-Zell-Epitope. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System entwickelt, CD4 depletierte MNCs (non-CD4⁺ T-Zellfraktion) oder mini-LCLs mit LAA/HA1 Vollängen-Proteinen zu beladen und diese beladenen APCs zur Stimulation und Anreicherung von LAA/HA1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus AML-Patienten nach SCT einzusetzen und schließlich ihr T-Zellprofil, ebenso wie ihre blastenlysierende Aktivität zu untersuchen.

Dazu wurde PRAME-, WT1-, PR3- und HA1-cDNA in ein Expressionsvektorsystem kloniert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA amplifiziert und die DNA isoliert. Mit dieser wurden HEK293T Zellen transfiziert. Das isolierte und aufgereinigte Protein wurde sodann über WB nachgewiesen. Eine definierte Konzentration dieser Proteine wurde schließlich eingesetzt, um LAA/HA1-spezifische CD4⁺ T-Zellen von AML-Patienten zu generieren, zu expandieren und zu charakterisieren. Im Verlauf dieser Arbeit wurde zur optimierten Isolation, Expansion und Charakterisierung von LAA/HA1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ein Flussdiagramm erarbeitet.

4.2.4.1 Etablierung eines LAA/HA1-proteinspezifischen CD4⁺ T-Zell Expansionsmodell

4.2.4.1.1 Klonierung, Generierung und Aufreinigung von PRAME-, WT1-, PR3- und HA1-Proteinen in HEK293T Zellen

Für die Stimulation von CD4⁺ T-Zellen wurde mit Vollängen-Proteinen gearbeitet. Dazu wurden 3 kommerziell erhältliche Vektorsysteme WT1, PR3 und HA1 (siehe 2.6.) in ein eukaryotisches, modifiziertes pCMV-X-His6 Expressionsvektorsystem subkloniert. Alternativ dazu wurde aus einem PRAME-überexprimierenden Patienten die cDNA amplifiziert und ebenfalls in ein modifiziertes pCMV-X-His6 Expressionsvektorsystem kloniert.

PRAME-, WT1-, PR3- und HA1-cDNA konnte mit Hilfe von Standardmethoden in das Expressionsvektorsystem kloniert werden. Der Erfolg der Klonierung wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen und durch Sequenzierung überprüft. Anschließend mit der NCBI-Datenbank verglichen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Folgende mRNA Sequenzen wurden eingesetzt: PRAME (ref NM:206956.1, Gene ID:23532), WT1 (ref NM:001198551.1, Gene ID:7490), PR3 (ref NM:002777.3, Gene ID:5657) und HA1 (ref NM:01229.2, Gene ID:23526). Die Vektorkarten mit kodierender Sequenz (CDS; „coding sequence“) und translaterter Proteinsequenz können dem Anhang-I entnommen werden.

Mit Hilfe der modifizierten PEI-Methode wurden HEK293T Zellen mit aufgereinigter Plasmid-DNA transfiziert und im Anschluss über Ni-Beads aufgereinigt. Nach Aufreinigung wurde die Anwesenheit der Proteine mit Hilfe eines WB's überprüft und anhand des mitgeführten Größenstandards identifiziert. Dabei lag PRAME bei etwa 60 kDa, WT1 bei etwa 37 kDa, PR3 bei etwa 30 kDa und HA1 bei etwa 125 kDa. Für die Beladung der APCs standen die Proteine in ausreichender Menge zur Verfügung. Die aufgereinigte Proteinkonzentration lag im MW für PRAME bei 110 µg/ml (42 – 232 µg/ml), für WT1 bei 109 µg/ml (28 – 166 µg/ml), für PR3 bei 109 µg/ml (31 – 282 µg/ml) und für HA1 bei 198 µg/ml (121 – 287 µg/ml). Um LAA-/HA1-spezifische Immunreaktionen von unspezifischer Immunreaktion, z. B. im IFN-γ ELISPOT unterscheiden zu können, wurden aufgereinigte Proteine von nicht transfizierten HEK293T Zellen oder von GFP-transfizierten HEK293T Zellen aufgereinigt und zur APC-Beladung verwendet. Die Proteinkonzentration der eingesetzten Kontrollen lag im MW bei den nicht transfizierten HEK293T Zellen bei 81 µg/ml (35 – 140 µg/ml) und für GFP bei 612 µg/ml (463 – 908 µg/ml). Eingesetzt wurde für die Beladung der APCs (mini-LCLs oder CD4 depletierte MNCs) max. 1 µg/ml pro Protein.

4.2.4.1.2. Generierung von mini-LCLs aus AML-Patienten

Um für die Versuche eine unbegrenzte Menge an APCs zur Verfügung zu haben, wurden mini-LCLs generiert. Stabile immortalisierte mini-LCLs konnten dabei nur bei einem (#1.155b) von 6 AML-Patienten nach 2 – 3 Monaten generiert werden, jedoch bei allen zwei gesunden Probanden.

4.2.4.1.3. Flussdiagramm

Um ein Stimulationssystem zur *in vitro* Reaktivierung von Ag-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, basierend auf LAA/HA1-Proteinbeladung von APCs, etablieren zu können wurden zwei verschiedene APC-Typen; CD4 depletierte MNCs oder mini-LCLs, verwendet. Da nicht für alle Patienten mini-LCLs generiert werden konnten, CD4 depletierte MNCs, aber bei allen Patienten als APCs (sie enthalten B-Zellen, Monozyten und DCs) sofort zu Verfügung standen, konnten in 5 von 6 Fällen (#1.154, #1.155a, #1.156, #1.157, #1.158) proliferierende CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit diesen LAA/HA1-proteinbeladenen APCs angereichert werden. Für die Präparation, Stimulation und Charakterisierung der („untouched“) CD4⁺ T-Zellen wurde folgendes methodisches Flussdiagramm, siehe Abbildung 17, erarbeitet. Die durchgeführten Experimente der Patienten sind in Abbildung 18 zusammengefasst.

Abbildung 17: Schematische Darstellung der Isolation, Separation und Stimulation der („untouched“) LAA/HA1-proteinstimulierten CD4⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden aus PB von AML-Patienten nach SCT isoliert und mit bestrahlten LAA/HA1-proteinbeladenen CD4 depletierten MNCs oder mini-LCLs alle 10 – 14 Tage stimuliert (6 – 17 Stimulationen mit 20 U IL-2). Die stimulierten CD4⁺ T-Zellen wurden mittels ELISPOT, ELISA, ICS auf deren Sekretion von IFN- γ oder GM-CSF vor und nach „Einzelzellklonierung“ oder Zellsortierung (CD40L⁺, CFSE_{low}) überprüft. Vereinzelt wurden Zellklone im ⁵¹Chromefreisetzungstest getestet.

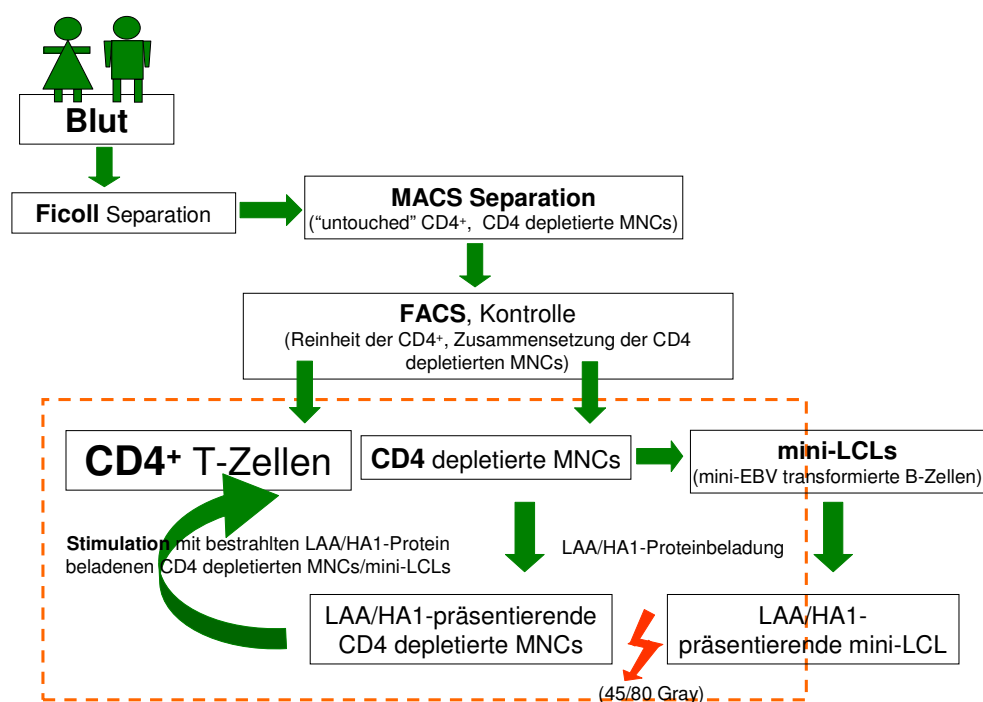
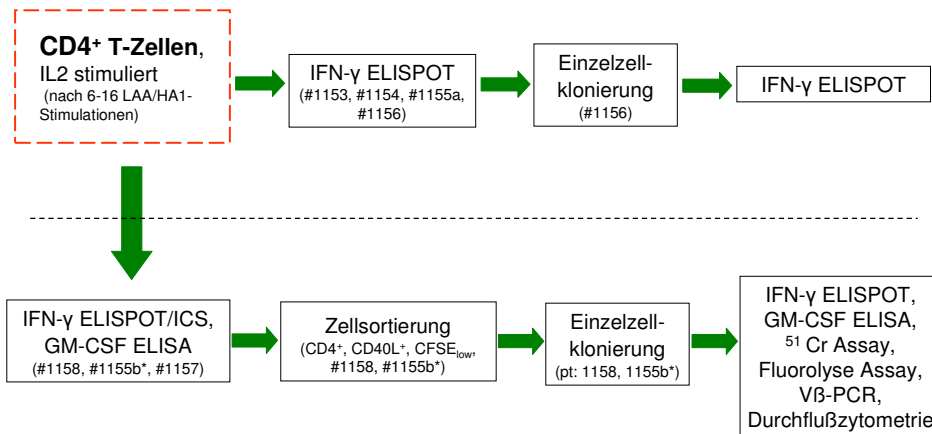


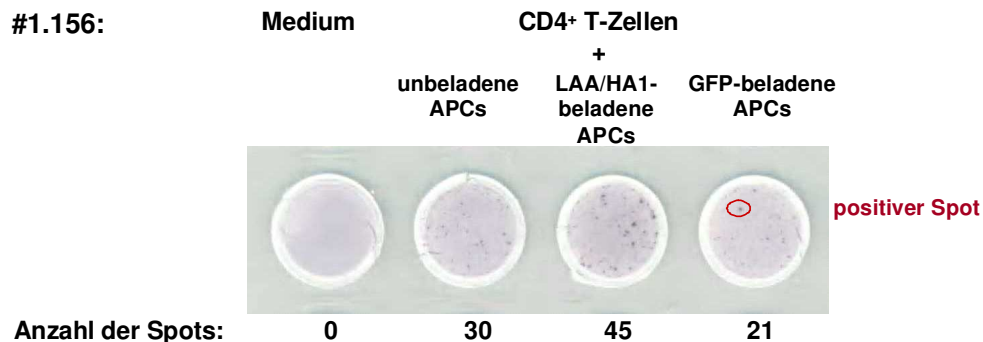
Abbildung 18: Flussdiagramm der durchgeführten Experimente. Nach 6 – 17 Restimulationen wurden die CD4⁺ T-Zellen im IFN- γ ELISPOT getestet und in die „Einzelzellklonierung“ eingesetzt. Alternativ dazu wurden Proben im IFN- γ ELISPOT/ICS, GM-CSF ELISA und die T-Zellklone nach Zellsortierung zusätzlich im ⁵¹Chromfreisetzungstest oder im Fluorolyse Assay getestet. Von möglichen LAA/HA1-spezifischen, reaktiven CD4⁺ T-Zellklonen wurde die V β -Kette des TCR analysiert. Des Weiteren wurden die verwendeten CD4⁺ T-Zellen von Patient #1.158 durchflusszytometrisch charakterisiert (* mini-LCL stimuliert, ⁵¹Cr Assay ⁵¹Chromfreisetzungstest, ICS intrazelluläre Zytokinfärbung).



4.2.4.2. Nachweis von Zytokinen (IFN- γ ELISPOT, -ICS, GM-CSF ELISA) nach LAA/HA1-Proteinstimulation

Trotz Anreicherung von LAA/HA1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus AML-Patienten nach SCT handelt es sich um eine vergleichsweise kleine Population mit geringer zu erwartender Zytokinproduktion und geringen Unterschieden zu den Kontrollen. Zytokinprofile (detektiert durch ELISPOT, ICS oder ELISA) von LAA/HA1-proteinstimulierten und -angereicherten CD4⁺ T-Zellen in unterschiedlichen Passagen sowie nach „Einzelzellklonierung“ mit und ohne Zellsortierung der proliferierenden (CFSE_{low}) und CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen zeigten keine reguläre und permanente Produktion an IFN- γ oder GM-CSF (Daten nicht dargestellt). Eine Abnahme der Sekretion und Freisetzung an Zytokinen konnte über die Dauer der Stimulation in Patient #1.158 beobachtet werden. Jedoch konnte in einigen Zellfraktionen oder Zellklonen eine spezifische Produktion an Zytokinen nach etwa sieben LAA/HA1-Proteinstimulationen detektiert werden. Abbildung 19 zeigt am Beispiel eines IFN- γ ELISPOT und Patient #1.156 nach sieben LAA/HA1-Proteinstimulationen die Detektion von LAA/HA1-spezifischer Sekretion im Vergleich zu den Kontrollen, berechnet aus der Differenz von spezifischen (45) zu unspezifischen (30 oder 21) Signalen von Zellen mit IFN- γ Sekretion.

Abbildung 19: IFN- γ ELISPOT am Beispiel von Patient #1.156. Die meisten ausgezählten „Spots“ lagen in den CD4⁺ T-Zellen, die mit LAA/HA1-beladenen APCs stimuliert wurden (45 Spots) und lagen über der unspezifischen Reaktion nach Stimulation mit unbeladenen APCs (30 Spots) oder nach Stimulation mit GFP-beladenen APCs (21 Spots) vor. Möglicherweise handelt es sich hier um LAA/HA1-spezifische CD4⁺ T-Zellen.



4.2.4.3. Funktionalitätsanalysen

4.2.4.3.1. ⁵¹Chromfreisetzungstest

In einem ersten Funktionalitätstest sollten spezifische T-Zellklone auf ihre Effektorzellfunktion gegen LAA/HA1-beladene Monozyten-haltige MNCs getestet werden.

In Patient #1.158 zeigten CD4⁺ T-Zellklone nach Zellsortierung und Anreicherung in mehreren GM-CSF ELISAs nach LAA/HA1-Proteinstimulationen eine spezifische Sekretion. Daraufhin wurden vier dieser T-Zellklone im Chromfreisetzungstest als Effektorzellen und CD4 depletierte MNCs jeweils mit PRAME-, WT-, PR3- oder HA1-Protein beladen und als Zielzellen (E:T Ratio = 10:1) eingesetzt. Es konnte keine erhöhte Chromfreisetzung (4 h Inkubation) nach Kokultivierung mit den beladenen APCs nachgewiesen werden (siehe Tabelle 17, 'E16 – E19').

4.2.4.3.2. Fluorolyse Assay

Eine weitere eingesetzte Methode zur Überprüfung der Funktionalität erfolgte mit Hilfe des Fluorolyse Assays, der eine längere Inkubationszeit von Effektor- und Zielzellen, im Vergleich zum Chromfreisetzungstest, erlaubt. Dazu wurden Zellen von Patient #1.158 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (MNCs vor und nach SCT, CD3⁺ und CD4⁺ T-Zellen nach SCT, angereicherte CD4⁺ T-Zellen und CFSE sortierte und/oder „klonierte“ CD4⁺ T-Zellen) als Effektorzellen sowie Blasten zum Zeitpunkt des ersten Rezidivs, Fibroblasten und hämatopoetische Zellen (MNCs, CD3⁺, CD4⁺ T-Zellen) – zu anderen Zeitpunkten vor und nach SCT präpariert – als Zielzellen eingesetzt (siehe Tabelle 15/17, #1.158).

Es konnte gezeigt werden, dass nach 24 h Inkubation die meisten CD4⁺ T-Zellen eine blastenlysierende CD4⁺ T-Zellfraktion enthielten. Ausnahmen waren MNCs vor SCT ('E1'), CD4⁺ T-Zellen nach 16 Stimulationsrunden ('E11') und zwei CD4⁺ T-Zellklone ('E13, E15'), die weder spezifisch die leukämischen Blasten, noch Fibroblasten oder nicht-blastenhaltige Zellen lysieren konnten. Die höchste lytische Aktivität konnte nach 24 h in der angereicherten, proliferierenden und CD4⁺CD40L⁺ sortierten T-Zellenfraktion, gefolgt von einem der drei getesteten CD4⁺ T-Zellklone detektiert werden. Bedauerlicherweise verstarb der Patient 2 Jahre nach SCT in hämatologischer CR an einem myokardialen Chlorom, trotz nachweisbarer antileukämischer CD4-vermittelter Reaktivität/Immunität. Nach 4 h Inkubation mit Zielzellen zeigte sich keine lytische Aktivität der CD4⁺ T-Zellen gegenüber Blasten oder den mitgeführten Kontrollen.

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse des Fluorolyse Assays nach 24 h Inkubation der Effektor mit den Zielzellen zusammengefasst dargestellt, die „4 h Ergebnisse“ sind in Klammern darunter aufgeführt.

Betrachtet man die lytische Aktivität (nach 24 h Inkubation) der direkt aus dem Patienten präparierten (*in vivo*) CD4⁺ T-Zellen während des Therapieverlaufs, so kann ein deutlicher Anstieg der lytischen Aktivität bis nach der 4. DLI beobachtet werden. Im Kontext des Rezidivs (Myokardiales Chlorom) sank die lytische Aktivität (Abbildung 20-I).

Abbildung 20-II zeigt den Verlauf der lytischen Aktivität der *in vitro* angereicherten LAA/HA1-proteinstimulierten CD4⁺ T-Zellen. Dabei kann am Beispiel von Patient #1.158 eine deutliche Zunahme der lytischen Aktivität (Messung nach 24 h Inkubation mit Blasten, Fibroblasten oder nicht-blastenhaltigen Zellen) zwischen den proliferierenden CD4⁺CD40L⁺ sortierten T-Zellen und den unsortierten T-Zellen nachgewiesen werden. Es konnte ebenfalls dokumentiert werden, dass die Gesamtheit („Pool“) der sortierten Zellen ein höheres blastenlysierendes Potential aufwies als einzelne potentielle Ag-spezifische T-Zellklone.

Tabelle 17: Antileukämische Funktionalität (detektiert durch Fluorolyse oder Chromfreisetzungstest) von unterschiedlichen CD4⁺ Effektor-T-Zellen vor oder nach LAA/HA1-Proteinstimulation, Anreicherung oder Zellsortierung in Patient #1.158. Dargestellt ist das Stadium der Erkrankung, Effektorzellen und zytotoxische, blastenlysierende Funktionalität nach 24 h und in Klammern nach 4 h Inkubation von Effektor- und Zielzellen. Die höchste zytotoxische Funktionalität konnte für 'E12' nach 24 h Inkubation ermittelt werden.

Patient #1.158	Stadium der Erkrankung	Ursprung der Effektorzellen	Anteil der Zielzellen lysiert durch Effektorzellen (%)	Patient #1.158	Stadium der Erkrankung	Ursprung der Effektorzellen	Anteil der Zielzellen lysiert durch Effektorzellen (%)
'E1'	CR vor SCT	MNCs	0 ^b , 0 ^f , 0 ^{Ta} (0 ^b , 0 ^f , 0 ^{Ta})	'E9'	CR nach 2. SCT und 4. DLI I	CD4 ⁺	9 ^b , 0 ^f , 0 ^{Ta} (0 ^b , nd ^f , 0 ^{Ta})
'E2'	CR nach 1. SCT und 3 Wochen nach 1.DLI	CD4 ⁺	51 ^b (0 ^b)	'E10'	CR nach 1. SCT und 5 Wochen nach 1. DLI	CD4 ⁺ (nach P5)	9 ^b (0 ^b)
'E3'	CR nach 1. SCT und 5 Wochen nach 1.DLI	CD4 ⁺	42 ^b (0 ^b)	'E11'		CD4 ⁺ (nach P16)	0 ^b (0 ^b)

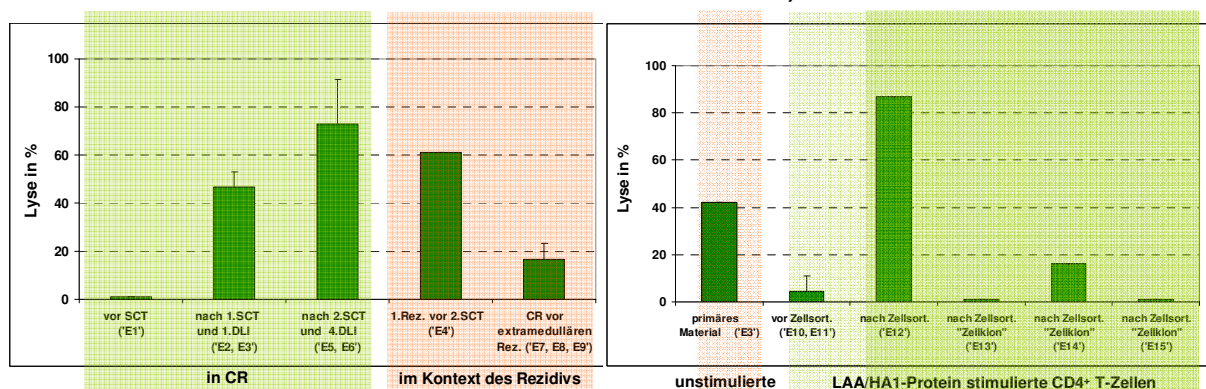
'E4'	Rez. nach 1. SCT und 2. DLI	CD4 ⁺	61 ^b (0 ^b)	'E12'	CR nach 1. SCT und 5 Wochen nach 1. DLI	CD4 ⁺ (nach P17 und Zellsort. P14)	87 ^b , 0 ^f , 0 ^{Tb} (0 ^b , 0 ^f , 0 ^{Tb})
'E5'	CR nach 2. SCT und 4. DLI	CD4 ⁺	60 ^b , 0 ^T (0 ^b , 0 ^{Tb}) ^b	'E13'		0 ^b (0 ^b)	
'E6'		CD4 ⁺	86 ^b , 0 ^f , 0 ^{Tb} (0 ^b , 0 ^f , 0 ^{Tb})	'E14'		16 ^b (0 ^b)	
'E7'	CR nach 2. SCT und 4. DLI	MNCs	22 ^b , 0 ^f , 0 ^{Ta} (0 ^b , nd ^f , 0 ^{Ta})	'E15'		0 ^b (0 ^b)	
'E8'		CD3 ⁺	19 ^b , 0 ^f , 0 ^{Ta} (0 ^b , nd ^f , 0 ^{Ta})	'E16 - 19'		CD4 ⁺ T-Zellklone (nach Zellsort. P14)	(0 [*])

E Effektorzellen präpariert zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Erkrankung oder nach Stimulation mit CD4 depletierten LAA/HA1-proteinbeladenen MNCs (siehe Tabelle 15); P Passage nach X Stimulationen mit CD4 depletierten LAA/HA1-proteinbeladenen MNCs; * Chromfreisetzungstest, LAA/HA1-proteinbeladene, depletierte CD4⁺ T-Zellen verwendet als Zielzellen; Fluorolyse Assay Zielzellen: Blasten (b), Fibroblasten (f), T-Zellen vor (Tb) und/oder T-Zellen nach (Ta) SCT detektiert nach 4h (in Klammern dargestellt) oder nach 24h; Zellsort. durchflusszytometrischer Zellsortierung der proliferierenden CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen.

Abbildung 20: Antileukämische lytische Aktivität der „in vivo“ entnommenen oder der „in vitro“ LAA/HA1-proteinstimulierten CD4⁺ T-Zellen, gezeigt durch einen Fluorolyse Assay. Die Messung erfolgte nach 24 h Inkubation von Effektor- mit Zielzellen. **I)** Dargestellt ist die antileukämische blastenlytische Aktivität im Verlauf der Therapie von Patient #1.158. Dabei ist ein deutlicher Anstieg der blastenlytischen Aktivität in CR und ein Abfall der Aktivität im Kontext des Rezidivs erkennbar. **II)** Dargestellt ist der Vergleich von unstimulierten und LAA/HA1-proteinstimulierten CD4⁺ T-Zellen vor und nach durchflusszytometrischer Zellsortierung, mit deutlicher Steigerung der antileukämischen lytischen Aktivität nach Sortierung und Identifikation eines blastenlytischen T-Zellklons ('E14'). (SCT Stammzelltransplantation, DLI Spenderlymphozyten-Infusion, Rez. Rezidiv, CR komplette Remission, 'E' Effektorzelle, Zellsort. durchflusszytometrische Zellsortierung von CD40L⁺CFSE_{low} CD4⁺ T-Zellen).

I) „in vivo“
(direkt aus dem Patienten isolierte Zellen)

II) „in vitro“
(nach LAA/HA1-Stimulation und vor/nach Sortierung erhaltene Zellen)



4.2.4.4. T-Zellprofil der unstimulierten und LAA/HA1-proteinstimulierten CD4⁺ T-Zellen

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Ermittlung und Beschreibung des T-Zellprofils im Kontext des klinischen Verlaufs der Erkrankung und ihrer Funktionalität vor und nach LAA/HA1-Proteinstimulation. Am Beispiel von Patient #1.158 ist der klinische Verlauf der Erkrankung graphisch dargestellt (Abbildung 21).

Abbildung 21: Klinischer Verlauf der Erkrankung von Patient #1.158. Graphisch dargestellt ist der zeitliche Krankheitsverlauf mit Angaben zu Stadium, Therapie und Zeitpunkten der Probenentnahme (CR komplette Remission, DLI Spenderlymphozyten-Infusion, allo PB-SCT allogene periphere Blutstammzelltransplantation, GM-CSF Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor, GvHD I Transplantat gegen Empfänger Erkrankung Grad I, DA Daunorubizin, HD/LD-Ara-C hohe/geringe Dosis an Cytosinarabinosid, FLAMSA-Therapie mit Fludarabin, Ara-C und Amsacrin, † Exitus letalis, E Effektorzellen).

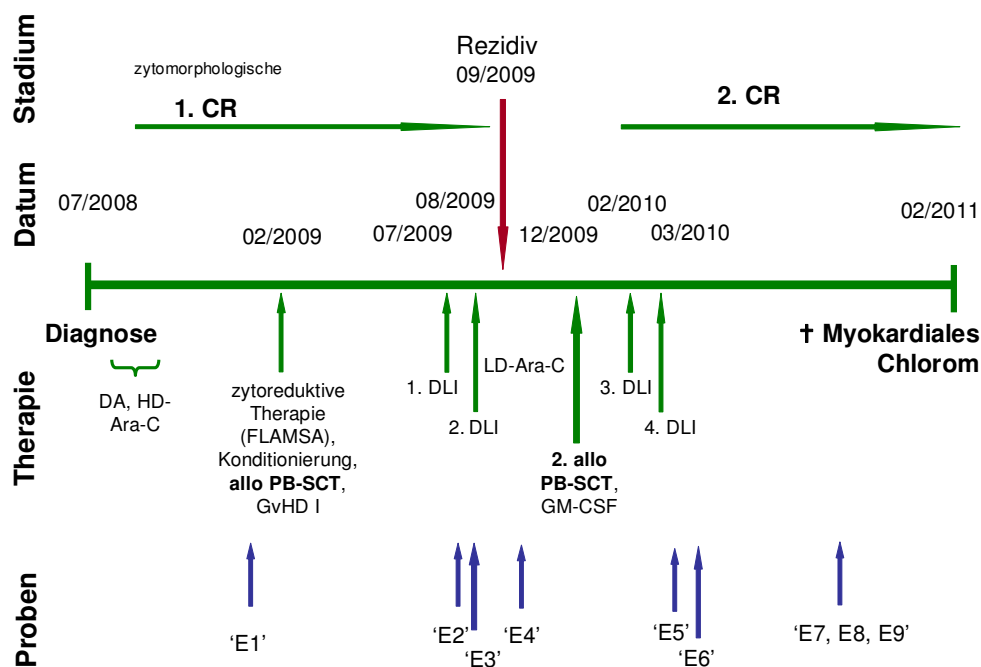
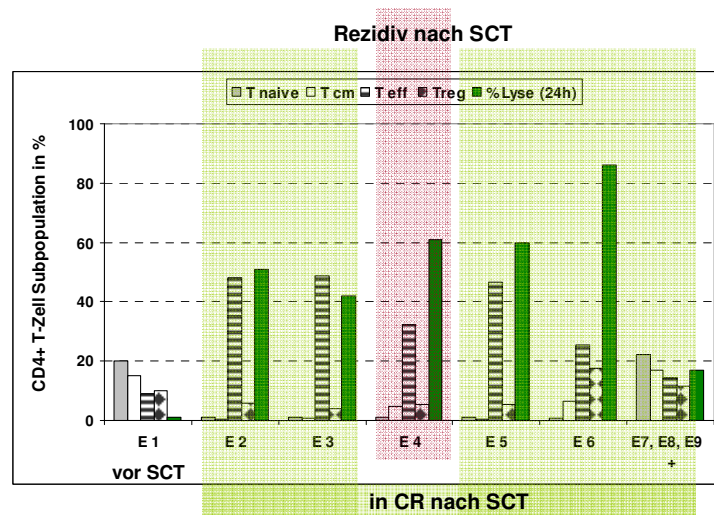


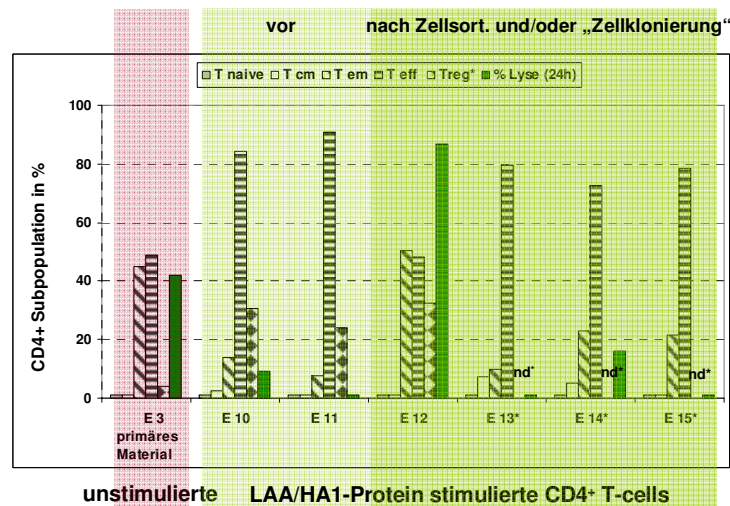
Abbildung 22 zeigt das CD4⁺ T-Zellprofil der direkt aus dem Patienten #1.158 im Verlauf der Erkrankung isolierten T-Zellen. Es zeigte sich ein Verlust des naiven T-Zellstatus (CD45RO⁻CCR7⁺), geringe regulatorische CD4⁺ T-Zellen (T_{reg}, CD25⁺CD127^{low}) und gleichzeitig hohe Anteile an Effektor-T-Zellen (T_{eff}, CD45RO⁺CCR7⁻CD27⁺), was mit einer hohen antileukämischen lytischen Aktivität ('E2 – E9') korrelierte. Der Prozentsatz an zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T_{cm}, CD45RO⁺CCR7⁺) nahm zu, die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{em}, CD45RO⁺, CCR7⁻, CD27⁺) blieben während der Erkrankung auf einem hohen Niveau und variierten nur graduell (zwischen 40 – 60 %, Daten nicht dargestellt). Interessanterweise zeigte sich kurz vor der Manifestation eines extramedullären Rezidivs ein hoher Anteil an Zellen mit T_{naive}⁻, T_{cm}⁻ und T_{reg}-Phänotyp und zum selben Zeitpunkt ein reduzierter Anteil an T_{eff}-Zellen, was mit einer verringerter antileukämischer lytischer Aktivität korrelierte.

Abbildung 22: Zelluläres CD4⁺ T-Zellprofil in Patient #1.158. Dargestellt ist das T-Zellprofil im Verlauf der Erkrankung, gezeigt an den Anteilen naiver-, zentraler Gedächtnis-, Effektor- und regulatorischen T-Zellen im Kontext der antileukämischen Funktionalität. Hohe Anteile an CD4⁺ Effektorzellen bei gleichzeitig geringem Anteil an regulatorischen CD4⁺ T-Zellen korrelierten mit CR nach SCT. Im Kontext des Rezidivs korrelierte ein Abfall der Effektor-T-Zellen mit einer Abnahme an naiven T-Zellen (E Effektorzellen, T naive naive T-Zellen, T cm zentrale Gedächtniszellen, T eff Effektor-T-Zellen, T reg regulatorische T-Zellen, % Lyse Prozent der antileukämischen lytischen Aktivität detektiert im Fluorolyse Assay, + Mittelwert von 'E7 – E9', SCT Stammzelltransplantation, CR komplette Remission, 'E1 – E9' siehe Tabelle 15).



In Abbildung 23 sind die geringen Prozentsätze an T_{naive}- und T_{cm}-Zellen der CD4⁺ T-Zellen ('E3') im primären Ausgangsmaterial als auch in der LAA/HA1-stimulierten T-Zellfraktion ('E10 – E15') und gleichzeitig der gesteigerte Prozentsatz an CD4⁺ T_{eff}-Zellen in den stimulierten CD4⁺ T-Zellen dargestellt (Ausnahme: Effektorzelle 'E12'). Die höchste antileukämische lytische Aktivität der proliferierenden CD4⁺CD40L⁺ sortierten T-Zellen, konnte in 'E12' nachgewiesen werden. Bei den regulatorischen T-Zellen konnte ebenfalls eine Zunahme während der Stimulation beobachtet werden. Aufgrund der geringen Zellzahl erfolgte für die „T-Zellkone“ ('E13 – E15') keine Messung der regulatorischen CD4⁺ T-Zellen. Eine Zunahme an T_{reg}-, T_{em}-Zellen korrelierte mit der Abnahme an T_{eff}-Zellen bei nahezu konstanten T_{cm}-Zellen und naiven T-Zellen in der proliferierenden CD4⁺CD40L⁺ sortierten T-Zellfraktion (Vergleich von 'E11' mit 'E12').

Abbildung 23: Zelluläres Profil der LAA/HA1-proteinstimulierten und unstimulierten (Ausgangsmaterial/primäres Material, 'E3') CD4⁺ T-Zellen in Patient #1.158. Dargestellt sind naive-, zentrale Gedächtnis-, Effektor-Gedächtnis-, regulatorische und zytotoxische CD4⁺ T-Zellen. Dabei ist eine Zunahme der Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen nach Stimulation dargestellt (E Effektorzellen siehe Tabelle 15, nd* keine Messung der regulatorischen CD4⁺ T-Zellen in 'E13 – E15', 'E13 – E15' T-Zellklone nach LAA/HA1-Proteinstimulation, Zellsortierung und „Einzelzellklonierung“, Zellsort. durchflusszytometrischer Zellsortierung der proliferierenden CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen, T naive naive T-Zellen, T cm zentrale Gedächtniszellen, T em Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, T eff Effektor-T-Zellen, T reg regulatorische T-Zellen, % Lyse Prozent der antileukämischen lytischen Aktivität detektiert im Fluorolyse Assay).



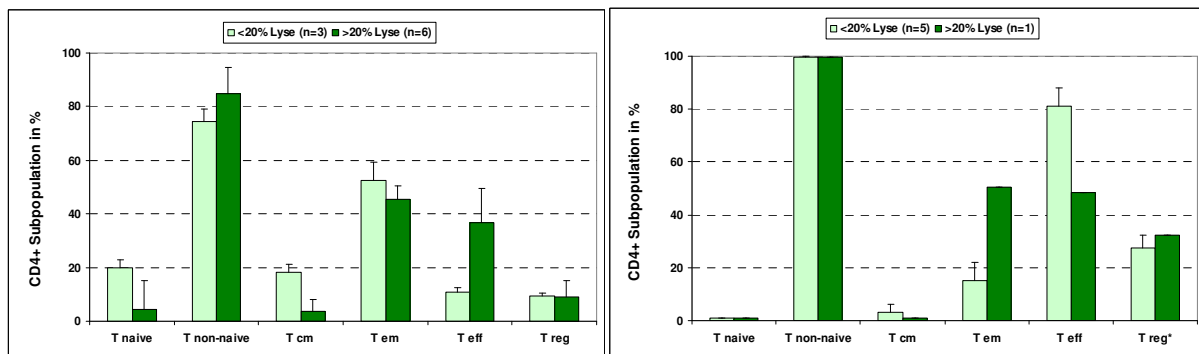
In Abbildung 24 ist das CD4⁺ T-Zellprofil (MW und Standardabweichung) der Proben von Patient #1.158 mit < 20 % Lyse im Vergleich zu Proben mit > 20 % Lyse der *in vivo*, direkt aus dem Patienten entnommene Proben (Abbildung 24-I) oder der *in vitro* Daten nach LAA/HA1-Proteinstimulation (Abbildung 24-II) dargestellt.

Dabei konnte eine Abnahme des naiven- und eine Zunahme des nicht-naiven T-Zellstatus mit einer Zunahme an Effektor-T-Zellen in den Patientenproben mit mehr als 20 % Lyse korreliert werden. Der Prozentsatz an regulatorischen CD4⁺ T-Zellen blieb dabei konstant. Bei den *in vitro*, nach LAA/HA1-Proteinstimulation generierten Daten, konnten nahezu keine naiven T-Zellen detektiert werden. Der Anstieg von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{em}) korrelierte mit der Abnahme an zentralen Gedächtnis- (T_{cm}) und Effektor-T-Zellen (T_{eff}). Der Vergleich von direkt aus dem Patienten zu *in vitro* generierten Daten zeigte einen deutlichen Anstieg der nicht-naiven T-Zellen und zentralen Gedächtnis-T-Zellen nach LAA/HA1-Proteinstimulation *in vitro*, wohingegen bei den aus *in vivo* Proben generierten Daten ein deutlicher Anstieg der Effektorfunktion in der T-Zellfraktion mit mehr als 20 % Lyse ermittelt werden konnte.

Abbildung 24: Vergleich des CD4⁺ T-Zellprofil bei Fällen mit < 20 % Lyse im Vergleich zu > 20 % Lyse. Dargestellt sind die MW mit Standardabweichung der naiven-, non-naiven-, zentralen Gedächtnis-, Effektor-Gedächtnis-, Effektor- und regulatorischen CD4⁺ T-Zellen in T-Zellfraktionen direkt aus dem Patient isoliert mit I) „in vivo“ oder II) „in vitro“. Nach LAA/HA1-Proteinstimulation konnte ein deutlicher Anstieg der Effektor-Gedächtniszellen detektiert werden, in der T-Zellfraktion > 20 % Lyse. Im Vergleich dazu erfolgte eine Verschiebung hin zu Effektor-T-Zellen bei den „in vivo“ entnommenen Zellen (< 20 % / > 20 % blastenlysender Aktivität analysiert im Fluorolyse Assay, T naive naive T-Zellen, T cm zentrale Gedächtnis-T-Zellen, T em Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, T eff Effektor-T-Zellen, T reg regulatorische T-Zellen, T reg* ohne 'E13 – E15' keine Messung der regulatorischen CD4⁺ T-Zellen in 'E13 – E15', 'E13 – E15' T-Zellklone nach LAA/HA1-Proteinstimulation, Zellsortierung und „Einzelzellklonierung“, E Effektorzellen siehe Tabelle 15).

I) „in vivo“
(direkt aus dem Patienten isolierte Zellen)

II) „in vitro“
(nach LAA/HA1-Stimulation und vor/nach Sortierung erhaltene Zellen)



Zusammenfassend konnte zum Nachweis von LAA-spezifischen T-Zellen bei AML-Patienten gezeigt werden:

- 1) Volllängen-Proteine (PRAME, WT1, PR3, HA1) konnten nach Klonierung von m-RNA und Transfektion in ausreichender Menge hergestellt und zur Stimulation verwendet werden.
- 2) Zwei Stimulationsmodelle mit unterschiedlichen APCs wurden vergleichend untersucht: mini-LCLs und CD4 depletierte MNCs. Da es sich bei der Generierung von mini-LCL um eine zeitintensive Methode handelt und diese nur in einem AML-Patienten erfolgreich generiert werden konnten, wurden für alle weiteren Versuche CD4 depletierte MNCs als APC verwendet. CD4 depletierte MNCs konnten nach Probennahme sofort und für alle Patienten anwendbar eingesetzt werden.
- 3) Ein methodisches Flussdiagramm zum Nachweis und zur Charakterisierung von LAA/HA1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, unter Verwendung eines Protein-basierten Stimulationsmodells, konnte erarbeitet werden.
- 4) Spezifische Zytokinfreisetzung (IFN- γ , GM-CSF) konnte in einigen wenigen Fällen nach etwa sieben LAA/HA1-Proteinstimulationen in den Überständen der CD4⁺ T-Zellfraktionen oder Zellklonen nachgewiesen werden und nahm über die Dauer der Kultivierung ab. Sie erlauben daher keine Rückschlüsse über spezifische antileukämische Funktionen.

- 5) Endgültiger Beweis für die antileukämische Aktivität der CD4⁺ T-Zellen nach LAA/HA1-Proteinstimulation lieferte der Fluorolyse Assay (nach 24 h Inkubation von Effektorzellen mit Targetzellen) jedoch nicht der ⁵¹Chromfreisetzungstest (mit 4 h Inkubation), gezeigt an einem Patient #1.158. Die zytotoxische Effektivität konnte durch Zellsortierung und somit der Anreicherung der proliferierenden CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen gesteigert werden. Die antileukämische Aktivität beschränkte sich dabei auf leukämische Blasten.
 - 6) LAA/HA1-Proteinstimulation, gezeigt an Patient #1.158 führte zu einer Zunahme der CD4⁺ T_{eff}-Zellen. Durch Zellsortierung der proliferierenden CD4⁺CD40L⁺ T-Zellen wurden T_{em}-Zellen selektioniert, was mit einem geringeren T_{eff}-Zellanteil korrelierte. LAA/HA1-proteinstimulierte CD4⁺ T-Zellen, gezeigt an Patient #1.158 mit mehr als 20 % Lyse, zeigten einen deutlichen Anstieg an T_{em}-Zellen, was mit der Abnahme an T_{cm}- und T_{eff}-Zellen verbunden war.
 - 7) Für die direkt aus dem Patienten (Patient #1.158) isolierten Zellen („*in vivo*“) konnte für die CD4⁺ T-Zellfraktion eine geringe antileukämische Funktion vor SCT nachgewiesen werden, mit deutlichem Anstieg der Aktivität im Therapieverlauf und Abfall der zytotoxischen Funktion im Kontext des Rezidivs. Dabei beschränkte sich die zytotoxische Funktion auf leukämische Blasten und war nicht gegen Fibroblasten oder andere hämatopoetische Zellen gerichtet.
Das dazugehörige CD4⁺ T-Zellprofil war charakterisiert durch einen Verlust an T_{naive}-Zellen und geringen Mengen an T_{reg}-Zellen sowie durch hohe Anteile an T_{eff}-Zellen und korrelierte mit der antileukämischen Funktion: Zellen mit mehr als 20 % Lyse waren gekennzeichnet durch geringere Anteile an T_{naive}- und gleichzeitig vermehrte T_{non-naive}-Zellen sowie einer Verschiebung der T_{cm}- und T_{em}- hin zu T_{eff}-Zellen.
-

5. Diskussion

T-Lymphozyten sind von zentraler Bedeutung für die Immunantwort gegen leukämische Zellen. Beispielsweise kann durch die Gabe von Spender-Lymphozyten die Remission bei Patienten im Rezidiv nach erfolgter allogener SCT wiederhergestellt werden (Kolb, Mittermüller et al. 1990). In den letzten Jahren wurden verschiedene TAAs identifiziert, die sich als mögliche Kandidaten für eine gezielte/gerichtete Immuntherapie („targeted therapy“) gegen einzelne Targets einsetzen lassen. Mögliche Kandidaten sind der Proliferations- und Apoptosefaktor PRAME, der Transkriptionsfaktor WT1, der Differenzierungsfaktor PR3 und das mHag HA1. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese LAAs schwach und nur in bestimmten Zelltypen gesunder Erwachsener exprimiert werden. In soliden Tumoren oder Leukämien liegen sie jedoch häufig stark überexprimiert vor (Ohnami, Yasukawa et al. 2000; Steinbach, Hermann et al. 2002; Paydas, Tanriverdi et al. 2007; Greiner, Bullinger et al. 2008). Bisherige Studien zeigten, dass LAAs (z. B. PRAME, WT1, PR3, Survivin, RHAMM) die T-Zell-Proliferation und eine spezifische CTL-Antwort induzieren können. Greiner und Kollegen konnten diese LAA-reaktiven T-Lymphozyten aus Patienten nach SCT bei HLA-A02-restringierten Patientenproben isolieren (Greiner, Bullinger et al. 2008). Da das mHag HA1 ausschließlich auf hämatopoetischen Zellen hoch exprimiert wird und nicht in anderen Zellen oder Geweben, eignet es sich sehr gut als Targetgen für Leukämien (Spierings, Wieles et al. 2004; Bleakley and Riddell 2011). Bisherige Studien konnten zeigen, dass nach allogener SCT eine lang anhaltende Remission gegenüber LAA- oder mHag-überexprimierenden leukämischen Blasten durch spezifische T-Zellen gegen diese Antigene erreicht werden kann. Beispielsweise kann mit Hilfe von anti-LAA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, **spezifisch** LAA-überexprimierende Blasten lysiert werden (Rezvani, Yong et al. 2008; Schmitt, Schmitt et al. 2008). Die klinische Signifikanz der *in vivo* generierten Daten und die Anzahl der benötigten LAA-spezifischen CTLs (z. B. nach Vakzination) nach adoptiver Therapie mit LAA-spezifischen HLA-A02-restringierten T-Zellen, ist für den weiteren Verlauf der Erkrankung jedoch unklar (Greiner, Dohner et al. 2006; Morita, Heike et al. 2006). Ebenso unklar ist die Rolle der CD4⁺ T-Zellen im Kontext der AML. Möglicherweise übernehmen spezifische (zytotoxische) CD4⁺ T-Zellen eine vermittelnde Rolle in der antileukämischen Immunreaktion (May, Dao et al. 2007). Aus klinischen Beobachtungen ist bekannt, dass durch die Gabe von CD8⁺ depletierten Spenderlymphozyten, die Häufigkeit und der Schweregrad von GvHD reduziert werden kann. Der GvL-Effekt bleibt dabei voll erhalten (Giralt, Hester et al. 1995; Meyer, Britten et al. 2007).

5.1. Genexpressionsanalysen bekannter LAAs (PRAME, WT1, PR3)

Zunächst sollte die Expression von LAAs in PB- und BM-Proben von AML-Patienten untersucht werden, um dadurch mögliche Zielantigene für eine Immuntherapie zu identifizieren und die Expressionsprofile vor dem Hintergrund klinischer Konstellationen bei der Tumorgenese zu charakterisieren.

5.1.1. Unterschiedliche Strategien zur Definition von LAA-Überexpression in verschiedenen AML-Subtypen und deren Einfluss auf die Prognose

Bei den analysierten LAAs handelt es sich um stark regulierte Differenzierungs- oder Transkriptionsfaktoren, die im Gesunden an der Regulierung der Zell-Differenzierung, -Proliferation und Apoptose beteiligt sind. Des Weiteren sind LAAs in die Tumorgenese involviert (Call, Glaser et al. 1990; Dengler, Munstermann et al. 1995; Molldrem, Dermime et al. 1996; Scharnhorst, van der Eb et al. 2001; Wu, Gordon et al. 2002; Svensson, Eriksson et al. 2005; Tajeddine, Gala et al. 2005; Spanaki, Perdikogianni et al. 2007; Yang, Han et al. 2007; Morrison, Viney et al. 2008).

Verschiedene Studien wurden mit sehr unterschiedlichen Aussagen bezüglich der Überexpressionsrate von PRAME (Steinbach, Hermann et al. 2002; Greiner, Ringhoffer et al. 2004; Paydas, Tanriverdi et al. 2005; Tajeddine, Millard et al. 2006; Spanaki, Perdikogianni et al. 2007), WT1 (Greiner, Ringhoffer et al. 2004; Lapillonne, Renneville et al. 2006; Candoni, Tiribelli et al. 2009) und PR3 (Greiner, Ringhoffer et al. 2004) publiziert. Dabei variierten die Angaben zur RNA-Überexpression stark (30 – 80 % Überexpression bei Erstdiagnose). Diese stark variierenden Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen können durch unterschiedliche methodische Strategien, wie z. B. unterschiedliche Primerwahl, absolute oder relative Quantifizierung, unterschiedliche interne Kontrollen oder unterschiedliche Definitionen von Schwellenwerten, zur Charakterisierung der Überexpression erklärt werden. Spanaki et al. definierten die PRAME-Überexpression mit Hilfe der RQ-RT-PCR in akuten Leukämien bezogen auf die GAPDH-Expression der K562 Leukämiezelllinie (Spanaki, Perdikogianni et al. 2007). Jacobson et al. definierten die WT1-Überexpression mit einem Schwellenwert > 1 bezogen auf 1 μg der K562 RNA, detektiert mit der zweistufigen RT-PCR (Jacobsohn, Tse et al. 2009). Ostergaard et al. verwendeten beispielsweise $\beta 2\text{M}$ (β -2-Mikroglobulin) und ABL (Abelson) als interne Kontrollgene (Ostergaard, Olesen et al. 2004). Steinbach et al. definierten den Schwellenwert für eine PRAME-Überexpression ab einer 10-fachen Überexpression im Vergleich zu gesundem BM

(Steinbach, Hermann et al. 2002). Zusammenfassend ist ein Vergleich unserer Daten mit den publizierten Daten aufgrund der unterschiedlichen Strategiewahl und der Definitionen der Überexpressionen in den verschiedenen Arbeitsgruppen schwierig. Eine standardisierte Strategie zur Definition von Überexpression mit einheitlicher Primerwahl und Methodik würde die Vergleichbarkeit deutlich erhöhen.

In dieser Arbeit wurde die RQ-RT-PCR mit GAPDH als interne RNA-Kontrolle eingesetzt. RNA-Überexpression wurde mit dem Schwellenwert von $RQ > 1$ definiert. Bezogen auf unsere Methode konnte eine RNA-Überexpression in 87 % der Fälle für PRAME, in 81 % für WT1 und in 55 % für PR3 bei Erstdiagnose nachgewiesen werden und bestätigen die Literaturangaben. Spanaki et al. beschreibt die Überexpression für PRAME in 53 % von ALL- und AML-Patienten (Spanaki, Perdikogianni et al. 2007), Lapillonne et al. (Lapillonne, Renneville et al. 2006) gibt eine Überexpression für WT1 in 78 % bei kindlicher AML bei Erstdiagnose an. Hingegen geben Greiner et al. (Greiner, Ringhoffer et al. 2004) eine Überexpression in 64 % für PRAME, in 67 % für WT1 und in 67 % für PR3 in AML-Patienten bei Erstdiagnose an.

Zur besseren Vergleichbarkeit von Proben mit variablen Blastenzahlen standardisierten wir unsere Daten durch Adjustierung der Expressionswerte auf 100 % Blasten. Vorteil ist, dass diese adjustierten PCR-Ergebnisse die Korrelation von LAA-Überexpression und Tumorlast ermöglichen und gleichzeitig eine differenzierte Betrachtung von Fällen mit geringer Blastenzahl und hoher LAA-Überexpression im Vergleich zu Fällen mit hoher Blastenzahl aber geringer LAA-Überexpression erlauben. Nach Anwendung dieser verfeinerten (adjustierten) Methode, konnte eine Überexpressionsrate für PRAME in 94 %, für WT1 in 81 % und für PR3 in 57 % der Fälle ermittelt werden.

Ein weiterer Aspekt meiner Arbeit war, die parallele/simultane Expression von zwei oder mehr LAAs zu analysieren. In etwa 50 % der Fälle lag eine Überexpression in zwei oder drei LAAs vor und bestätigten die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Greiner, Ringhoffer et al. 2000). Möglicherweise werden multiple LAAs von einer *einzelnen* leukämischen Zelle (Einzelzellereignis) präsentiert und überexprimiert. Alternativ ist eine LAA-Überexpression verteilt auf die *Gesamtheit* der Blasten (Population) denkbar. Letztere könnte die unterschiedliche Chemosensitivität der Blasten, verursacht durch verschiedene Blastenpopulationen, die während der Erkrankung auftreten können erklären. Diese decken sich mit Beobachtungen zur AML als mögliche oligoklonale Erkrankung anderer und unserer Arbeitsgruppe (Schmetzer and Gerhartz 1993).

Unterteilt man die Fälle nach prognostischen Kriterien in pAML und sAML, konnte eine höhere Überexpression für WT1 und PR3 und eine signifikant geringere Überexpression für PRAME in der pAML der adjustierten und unadjustierten Daten nachgewiesen werden.

In Hinblick auf Prognose konnte ich zeigen, dass prognostisch „ungünstige“ Subtypen wie FAB-Subtyp M5, sAML oder zytogenetisch „ungünstige“ Risikogruppen durch eine (signifikant) höhere Überexpression von PRAME charakterisiert sind. Die adjustierten Daten verdeutlichen diesen Effekt noch und unterstreichen das Potenzial dieser Methode. Diese Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Steinbach, Hermann et al. 2002; Greiner, Schmitt et al. 2006), die eine höhere Expression von PRAME in Bezug auf das Langzeitüberleben mit einer günstigen Prognose assoziieren. Steinbach et al. beschreibt im Gegensatz dazu bei der AML in Kindern, dass signifikant hohe Raten an PRAME-Überexpression mit einem besseren krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert sind (Steinbach, Hermann et al. 2002). Andere Arbeitsgruppen konnten keine signifikante Korrelation von Überexpressionen mit FAB-Subtyp, sAML oder zytogenetischer Risikogruppe nachweisen (Paydas, Tanriverdi et al. 2005; Spanaki, Perdikiogianni et al. 2007). Beispielsweise publizierten Greiner und Kollegen die Expressionsraten in definierten Karyotypen. So konnten in Fällen mit prognostisch günstigen Karyotyp wie z.B. t(8;21) und t(15;17) sowie in den prognostisch ungünstigen Risikogruppen del(7q)-7 höhere Expressionsraten für PRAME im Vergleich zu geringen Expressionsraten der Fälle mit prognostisch ungünstigen komplexen Karyotyp oder prognostisch günstigen Karyotyp inv(16) detektiert werden. Für PR3 konnten hohe relative Expressionsraten für Fälle mit t(8;21) und inv(16) und geringe für die Karyotypen t(9;11) und del(7q)-7 detektiert werden (Greiner, Schmitt et al. 2006). Eine Therapie-relevante Prognoseeinschätzung anhand von zytogenetischen Risikogruppen scheint daher schwierig.

Des Weiteren konnte Greiner et al. beobachten, dass Patienten mit Überexpression von einem LAA wie z. B. G250/CA9, PRAME oder RHAMM/HMMR eine günstigere Prognose im Vergleich zu Fällen mit multipler (geringer) Überexpression aufweisen (Greiner, Ringhoffer et al. 2000; Greiner, Schmitt et al. 2006). In unserer Studie fanden wir eine höhere Rate an multipler Überexpression (jedoch nicht für die Koexpression von PRAME und WT1 bzw. von WT1 und PR3) in pAML im Vergleich zur sAML. Diese Korrelation mit prognostischer Subgruppe (pAML vs. sAML) könnte durch unterschiedliche Chemosensitivitäten von Zellklonen mit unterschiedlicher LAA-Koexpression erklärt werden.

Patienten, die auf die FLAMSA-Therapie angesprochen hatten, weisen eine geringere durchschnittliche Überexpression an PRAME im Vergleich zu Patienten auf, die nicht auf die Therapie angesprochen hatten. Detailliertere Analysen der unterschiedlichen LAA-Expressionstypen zeigten, dass Fälle mit hoher PRAME-Überexpression mit prognostisch „ungünstiger“ sAML assoziiert sind. Steinbach et al. beschreibt im Gegensatz dazu bei der AML in Kindern, dass signifikant hohe Raten an PRAME-Überexpression, mit einer hohen Rate an krankheitsfreiem Überleben und Gesamtüberleben assoziiert waren (Steinbach, Hermann et al. 2002).

Es fanden sich keine eindeutigen Korrelationen von WT1-Überexpressionen mit der Prognose. So lag eine höhere Expression in der prognostisch „ungünstigen“ sAML, jedoch eine tendenziell geringere in der zytogenetisch „ungünstigen“ Risikogruppe vor. Patienten die erfolgreich nach dem FLAMSA-Protokoll therapiert wurden zeigten in den unadjustierten Daten eine geringere durchschnittliche Expression und im Vergleich dazu eine höhere durchschnittliche Expression in den adjustierten Daten - und bestätigen die zuvor getroffenen widersprüchliche Aussage. Literaturdaten repräsentieren ähnliche widersprüchliche Ergebnisse: Lapillonne et al. konnte hohe Expressionsdaten für WT1 mit einem günstigen Karyotyp bei kindlicher AML assoziieren. Im Gegensatz dazu korreliert Bergmann et al. hohe Expressionen von WT1 mit einem ungünstigen klinischen Endergebnis und Ostergaard et al. konnten keine Korrelation seiner Fälle bei Erstdiagnose und zytogenetischen Risikogruppen evaluieren (Bergmann, Miething et al. 1997; Ostergaard, Olesen et al. 2004; Lapillonne, Renneville et al. 2006).

Für PR3 fanden wir hohe Expressionsraten assoziiert mit einer „günstigen“ zytogenetischen Risikogruppe, zudem hatten Fälle mit hoher Expression eine höhere Wahrscheinlichkeit der Gruppe der pAML anzugehören. Diese Ergebnisse konnten durch Yong et al. bestätigt werden, die ebenfalls eine Korrelation von hohen PR3-Expressionsspiegeln in CML-Patienten in zytogenetisch „günstiger“ und geringere Expressionslevels in der zytogenetisch „ungünstigen“ Risikogruppe nachweisen konnten (Yong, Rezvani et al. 2007). Bei Patienten, die auf die Therapie nach dem FLAMSA-Protokoll angesprochen hatten, konnte zudem eine höhere Expressionsrate für PR3 nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist eine endgültige Klärung der Prognoseeinschätzung anhand der RNA-Überexpression einzelner LAAs schwierig, da die analysierten LAAs wahrscheinlich nur einen Teil der tatsächlich exprimierten Ag bei der AML widerspiegeln. Auch sind die analysierten Patientenzahlen der Gruppen zu gering. Berücksichtigt werden muss auch das individuelle RNA-Expressionsprofil jedes Einzelnen, das aber bei Diagnosestellung häufig nicht bekannt ist. Möglicherweise kann es bei der Expression unterschiedlicher Ag zu Interferenzen kommen. Trotz dieser multifaktoriellen Aspekte kann die Genexpression Hinweise zur Prognoseeinschätzung, zumindest in manchen Konstellationen, liefern.

5.1.2. LAA-Überexpression zur Detektion von MRD oder Oligoklonalität im Krankheitsverlauf der AML

Die Aussagekraft der analysierten LAAs als Marker oder Maß für eine minimale Resterkrankung (MRD, „minimal residual disease“) bzw. als prognostischer Marker wird sehr kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen beschreiben WT1 als einen effizienten MRD-Marker für die meisten AML-Patienten. Andere Gruppen beschreiben WT1 als einen Marker,

der strikt mit der Blastenzahl korreliert, aber nicht als ein geeigneter Marker angesehen wird, um MRD zu detektieren (Cilloni and Saglio 2004; Ostergaard, Olesen et al. 2004; Chen, Hsiao et al. 2007; Candoni, Tiribelli et al. 2009; Cilloni, Renneville et al. 2009).

In dieser Arbeit konnten verschiedene LAA-Überexpressionen in Patientenproben in unterschiedlichen Krankheitsstadien detektiert werden. Im Bezug auf die unadjustierten Daten lagen für PRAME und PR3 die höchsten Mittelwerte an LAA-Überexpressionen bei Erstdiagnose, gefolgt von Patientenproben mit persistierender Erkrankung und im Rezidiv vor. Das geringste Expressionsniveau wurde in CR nachgewiesen. Im Allgemeinen konnten in dieser Studie die Literaturdaten bestätigt werden, wie z. B. verminderte Expression von PRAME und WT1 in CR und die gesteigerte Expression im Rezidiv (Siehl, Thiel et al. 2002; Paydas, Tanriverdi et al. 2005; Paydas, Tanriverdi et al. 2007). Bezogen auf 100 % Blasten konnten die höchsten Expressionsraten in Fällen mit persistierender Erkrankung nachgewiesen werden. Dies könnte in unseren Fällen auf eine gesteigerte Transkriptionsaktivität der LAAs hindeuten, möglicherweise beeinflusst durch Chemotherapie oder durch die Selektion definierter (therapieresistenter) Klone mit hoher LAA-Transkriptionsrate, möglicherweise verursacht durch klonale Verschiebung der polyklonalen leukämischen Zellen zu einem oligoklonalen Status, basierend auf einem Einzelzellereignis. Bezogen auf 100 % Blasten konnte bei der Einzelfallanalyse in einigen BM-Proben eine höhere Überexpression der LAA-Gene in CR nachgewiesen werden. PB-Proben wurden für diese Analyse nicht betrachtet, da per Definition im PB in CR keine Blasten detektiert werden dürfen. Möglicherweise beinhalten diese LAA-überexprimierende BM-Proben, die Rezidiv-induzierende Zellen. Basierend auf diesen Beobachtungen schlagen wir eine Adjustierung der in CR erzielten Werte vor, um eine verfeinerte Auswertung der Tumorlast zu ermöglichen. Jedoch sind sicher noch mehr Expressionsdaten im gesamten Krankheitsverlauf zur Korrelation und eine bessere Beurteilung von LAA-Expressionen im Kontext von MRD Monitoring nötig. Möglicherweise trägt dieser differenzierte Ansatz dazu bei, den Einfluss von Vakzinierungsstrategien mit unterschiedlichen einzelnen LAAs oder in Kombination auf Verlauf und Prognose der AML besser abschätzen zu lassen.

5.1.3. LAA-Überexpression in unterschiedlichen Zellkompartimenten

Entscheidend für die Wirksamkeit von Immuntherapeutika gegen LAA-überexprimierende Blasten, ist u. a. deren Expression und Präsentation auf der Tumorzelle.

Eine interessante Beobachtung war die unterschiedliche Expressionsrate der LAAs in PB und BM. Dabei konnte eine signifikant höhere Expression in PB für WT1 und PR3 und, bezogen auf $RQ \geq 10$, in allen drei LAAs nachgewiesen werden. Die Einzelfallanalyse von PB- und BM-Patientenproben mit identischem Abnahmezeitpunkt bestätigten die Ergebnisse

für PR3. Möglicherweise liegt eine asymmetrische Verteilung von LAA-exprimierenden Blasten in PB oder BM vor. Als mögliche Konsequenz daraus könnten Immuntherapeutika, die ein Zielantigen adressieren, das in PB oder BM unterschiedlich exprimiert vorliegt, eine potentiell unterschiedliche Wirksamkeit aufweisen.

Unterschiedliche WT1-Expressionsspiegel konnten bereits in PB- und BM-Proben gesunder Probanden beschrieben werden, jedoch nicht in AML-Patienten (Ostergaard, Olesen et al. 2004). Die Gruppe von Cilloni et al. konnte keine signifikanten Unterschiede in den WT1-Expressionsspiegeln der beiden Zellkompartimente nachweisen und bestätigen Ostergaard und Kollegen (Cilloni, Renneville et al. 2009). Allerdings sind differenzierende Untersuchungen der LAA-Expression in PB- und BM-Proben selten diskutiert.

5.1.4. Immuntherapie und LAA

Zusammenfassend detektierten wir vergleichbare Überexpressionsraten der LAAs wie andere Arbeitsgruppen. Zusätzlich bietet die von uns entwickelte Auswertemethode mit adjustierten, an die Blastenzahl angepassten LAA-Expressionsprofilen eine verfeinerte Analyse. Denkbar ist eine Verschiebung der Klonalität der leukämischen Zellen während der Therapie von polyklonalem hin zu oligoklonalen Status. Dies könnte zu einer veränderten Immunantwort oder veränderten Sensitivität der Blasten gegenüber Chemo- oder Immuntherapeutika führen. Des Weiteren konnten wir zur Prognoseeinschätzung von Patienten mit PRAME- oder PR3- (aber nicht für WT1-) Überexpression beitragen. Eine LAA-Überexpression bei mehr als 45 % der Proben bei Erstdiagnose in den unadjustierten Daten und mehr als 55 % in den adjustierten Daten konnten mit Literaturangaben zur simultanen Überexpression von LAAs bestätigt werden. Greiner et al. beschreibt eine simultane Expression in zwei oder mehr Ag in 80 % der AML-Patienten (Greiner, Ringhoffer et al. 2000). Diese Beobachtungen und im Besonderen unsere Ergebnisse im Hinblick auf die unterschiedliche Expression in PB oder BM, sprechen für eine verfeinerte LAA-gerichtete Immuntherapie, die effizient die Targets in PB oder BM eliminiert. Da die Targets unterschiedliche LAAs exprimieren, könnte der Einsatz bivalenter oder polyvalenter Vakzine die Effektivität erhöhen und das Risiko des Unterlaufens der Immunantwort durch Tumorflicht minimieren. Erste Ergebnisse von klinischen Studien mit mono- oder bivalenten Vakzinen liegen vor. Rezvani et al. konnten mit Hilfe der Tetramer-Analyse und IFN- γ Sekretion (ICS) die spezifische CD8⁺ T-Zellantwort nach kombinierter Vakzinierung von PR1- und WT1-Peptiden in Montanide Adjuvants mit GM-CSF nachweisen. Dabei konnten in 8 von 8 Patienten (AML, CML, MDS) auf ein Ag und in 4 Patienten gegen beide Ag spezifische Immunreaktionen nachgewiesen sowie eine reduzierte RNA-Expression im PB beobachtet werden, wohingegen bei fehlender CD8⁺ Immunantwort die RNA-Expression in PB anstieg.

Die spezifische CD8⁺ Immunantwort ist dabei Ag-spezifisch und nicht durch unspezifische inflammatorische Immunreaktionen verursacht (Rezvani, Yong et al. 2008). Weitere Arbeitsgruppen, die eine größere Patientenkohorte nach PR1-Vakzinierung untersucht haben, konnten zeigen, dass PR1-Peptid-Vakzinierung mit einem besseren klinischen Ansprechen und längerem krankheitsfreiem Überleben assoziiert war (Schmitt, Casalegno-Garduno et al. 2009; Rezvani 2011). In der Arbeitsgruppe von Uttenthal et al. nach WT1-Vakzinierung konnte jedoch keine Korrelation von Peptiddosis, zelluläre Immunantwort, RNA-Expression und klinischem Endergebnis erzielt werden. Weiter unklar ist, warum einige Patienten nach Peptid-Vakzinierung nur einen geringen Benefit erzielen konnten. Mögliche Ursache könnten z. B. verminderte Ag-Präsentation, eine unzureichende Rekrutierung von immunmodulierenden CD4⁺ T-Zellen und infolgedessen eine unzureichende, auf CD8⁺ T-Zellen begrenzte Immunantwort sein. Weitere Studien sind nötig, die ersten Phase-III Studien an größeren Patientengruppen rekrutieren, um einerseits die Vakzinierungsstrategien zu optimieren und um die bisherigen Ergebnisse zu evaluieren (Greiner, Schmitt et al. 2010; Alatrash and Molldrem 2011; Rezvani 2011; Rezvani, Yong et al. 2011; Uttenthal, Martinez-Davila et al. 2013). Beispielsweise konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Depletion an regulatorischen T-Zellen vor Vakzinierung zu einer verstärkten T-Zellantwort führen kann (Rezvani 2011).

Die Verwendung von immunogenen CD4⁺ T-Zell-Epitopen bietet eine zusätzliche Möglichkeit, die CD8⁺ T-Zellantwort gezielt zu unterstützen und aufrechtzuerhalten. Bereits in Phase-I/II Studien wurden Adjuvantien bei der Vakzinierung eingesetzt, die die Immunantwort zusätzlich verstärken, jedoch unspezifisch wirken. Bedacht werden muss, dass die meisten eingesetzten Peptide HLA-A02- oder HLA-A24-restringiert sind und somit derartige Immuntherapien nur bei etwa 50 % der Europäer eingesetzt werden können.

Zusammenfassend sollten standardisierte Methoden zur Definition von Überexpression mit standardisierten Kontrollgenen („house keeping genes“) etabliert werden, um vergleichbare Daten zu produzieren und die Tumorlast besonders in der Remission abzuschätzen. Eine europäische Leukämie-Netzstudie hat für WT1 eine Standardisierung durchgeführt. Dabei wurden verschiedene publizierte WT1-Assays evaluiert und der Beste für Risikoeinschätzung oder zur Überwachung der Therapieerfolge ermittelt (Beillard, Pallisgaard et al. 2003; Cilloni, Renneville et al. 2009). Für PRAME und PR3 sollten ebenfalls einheitliche, standardisierte Verfahren evaluiert werden. Wir schlagen vor, die Daten auf 100 % Blasten zu adjustieren und die Expressionsspiegel in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung und in unterschiedlichen Zellkompartimenten zu untersuchen.

5.2 CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kooperieren bei der Vermittlung einer antileukämischer Immunantwort

In verschiedenen Ansätzen mit unstimulierten T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen), nach Stimulation mit blastenhaltigen MNCs („MNC“) oder mit aus Blasten generierten leukämischen DCs („DC“) in einer MLC (gemischten Lymphozytenkultur), untersuchten wir die lytische Aktivität von CD4⁺ sowie von CD8⁺ T-Zellen gegenüber leukämischen Zellen. In einigen Fällen konnte die antileukämische Aktivität nach Blockierung der Aktivität von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen durch anti-HLA Klasse-I und -II gezeigt werden, womit der Nachweis erbracht wurde, dass sowohl die CD4⁺ als auch die CD8⁺ T-Zellfraktion antileukämische Funktion besitzt. Jedoch kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht zwischen löslichen und zellulären antileukämischen Mechanismen der vermittelnden CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen differenziert werden.

Mittlerweile wurden die ersten immunogenen CD4⁺ T-Zell-Epitope identifiziert. Beispielsweise konnten Guo et al. zytotoxische leukämische, WT1-spezifische Immunantwort in einer CD4⁺ T-Zelllinie nach Stimulation mit jeweils unterschiedlichen 20-mer WT1-Peptiden nachweisen. Gleichzeitig setzten diese WT1-spezifischen zytotoxischen CD4⁺ T-Zellen T_H1-Zytokine frei, was besonders in Hinblick auf Aktivierung der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen von Bedeutung ist (Guo, Niiya et al. 2005). Ebenso identifizierten Kabayashi und Kollegen zwei immunogene WT1-peptidspezifische CD4⁺ T-Zell-Epitope (WT1₁₂₄₋₁₃₈, WT1₂₄₇₋₂₆₁) (Kobayashi, Nagato et al. 2006).

5.3. Antileukämische Strategie mit immunogenen Zielantigenen

Die Rolle von spezifischen TAA- bzw. LAA-, männlich-assoziierten Ag oder mHag als potentielle immunologische Zielantigene zur Blasteneliminierung, ist inzwischen umfangreich untersucht und wird kontrovers diskutiert (Mutis and Goulmy 2002; Falkenburg, van de Corput et al. 2003; Greiner, Schmitt et al. 2006; Steger, Buhmann et al. 2008; Ofran, Kim et al. 2010; Bund, Buhmann et al. 2011; Vincent, Roy et al. 2011):

In haploidentischen Konstellationen konnte eine günstigere Prognose von männlichen Patienten mit weiblichen Stammzellspendern beobachtet werden, was durch weibliche alloimmune T-Zellreaktionen gegen Y-chromosomal kodierte (mHag) Zielantigene erklärt werden kann (Stern, Brand et al. 2008; Ofran, Kim et al. 2010; Bund, Buhmann et al. 2011). Im Gegensatz dazu deuten die Ergebnisse einer Analyse einer größeren Patientenkohorte auf einen negativen prognostischen Effekt bei männlichen Empfängern mit weiblichen Transplantaten hin, was insgesamt auf sehr komplexe immunologische Immunreaktionen im Kontext der SCT schließen lässt (Stern, Ruggeri et al. 2008).

Außerdem wurden in den letzten Jahren verschiedene mHag identifiziert (z. B. HA1, HA2), die hauptsächlich auf hämatologischen Zellen exprimiert vorliegen und sich dadurch als immunologische Zielantigene (für CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Zellen) besonders eignen. Sie können GvL- ohne GvH-Reaktionen vermitteln, da nur hämatopoetische (Empfänger) Zielzellen, aber keine (Spender) Gewebezellen adressiert werden (Falkenburg, Marijt et al. 2002; Mutis and Goulmy 2002; Falkenburg, van de Corput et al. 2003; Spierings, Hendriks et al. 2007). Einige Gruppen konnten zeigen, dass rezidivierende HA1- und/oder HA2-positive AML-Patienten nach allogener SCT und nach Therapie mit DLI ihres HA1- und/oder HA2-negativen Spenders eine stabile CR nach 5 – 7 Wochen etablieren konnten, was wahrscheinlich durch den Polymorphismus in den Geweben von Empfänger und Spender verursacht wird. Parallel dazu konnten HA1- und/oder HA2-spezifische CD8⁺ T-Zellen durch (HLA-A02) MHC-Multimer-Technologie nachgewiesen werden (Marijt, Heemskerk et al. 2003).

Verschiedene LAAs liegen in AML-Patienten überexprimiert und nur schwach exprimiert in gesunden Probanden vor. Deshalb eignen sie sich als immunologische Tumor-Zielantigene (Steger, Buhmann et al. 2008). Delluc und Kollegen konnte zeigen, dass nach LAA-Peptidstimulation von mDCs sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen IFN- γ freisetzten, was mit der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen und der Generierung von spezifischen CD8⁺ T-Zellen einherging (Delluc, Tourneur et al. 2005).

Mit Hilfe der MHC-Multimer-Technologie konnte in allen 7 von uns untersuchten (HLA-A02 positiven) Fällen LAA-spezifische CD8⁺ T-Zellen in AML-Patienten nach SCT, jedoch in unterschiedlicher Frequenz detektiert werden. Dabei konnten wir zeigen, dass das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen LAA-spezifischen CD8⁺ T-Zelltypen mit länger andauernden CR korrelierten (siehe Abschnitt 4.2.3.), was möglicherweise durch die Anwesenheit von unterschiedlichen reaktiven Zellklonen erklärt werden kann. Theoretisch können diese entweder reaktiv gegen *verschiedene* Epitope auf *einer* leukämischen Zelle oder gegen *oligoklonale* Erkrankungen mit koexistierenden *unterschiedlichen* LAA-exprimierenden leukämischen Zellklonen sein (Schmetzer and Gerhartz 1993; Schmetzer, Poleck et al. 1997). Eine endgültige Beurteilung und Wertung unserer Ergebnisse ist aufgrund der geringen Fallzahlen nicht möglich.

Andere Arbeitsgruppen konnten nach SCT häufig WT1-spezifische CD8⁺ T-Zellen (39 von 97 Proben), aber nur selten PRAME-spezifische- (10 von 97 Proben) oder PR1-spezifische- (1 von 97 Proben) CD8⁺ T-Zellen identifizieren (Morita, Heike et al. 2006). Deshalb schlagen die Autoren WT1 als Zielantigen für das „Monitoren“ von Leukämie-spezifischen CTLs vor. Weitere Arbeitsgruppen verwendeten die MHC-Multimer-Technologie, um WT1-spezifische CD8⁺ T-Zellen nach WT1-Peptid-Vakzinierung in AML-Patienten nachzuweisen. Dabei konnten sie zeigen, dass ein Anstieg eines prädominanten CD8⁺ T-Zellklons in beiden

Zellkompartimenten (PB und BM) detektiert werden konnte, jedoch 6 Monate nach erreichter CR der spezifische Zellklon im BM abnahm. Im Rezidiv erfolgte ein zweiter Anstieg des Zellklons im PB, jedoch nicht im BM, möglicherweise verursacht durch eine verminderte antileukämische T-Zellfunktion im BM (Ochsenreither, Fusi et al. 2011).

Im Zusammenhang mit Literaturdaten und im Kontext eigener Ergebnisse schlagen wir Verlaufsuntersuchungen von PRAME- in Kombination mit WT1- und PR1-spezifischen (CD8⁺) T-Zellen nach SCT und/oder Immuntherapie vor. Dies kann nach adoptiver Therapie mit transferierten (PRAME-, WT1- oder PR1-)spezifischen CD8⁺ T-Zellen ebenso wie nach Standard-SCT erfolgen, um die Zu- und Abnahme von spezifischen T-Zellpopulationen während der Erkrankung und besonders im Hinblick auf die Erhaltung von CR, am besten in beiden Zellkompartimenten (PB und BM), zu evaluieren.

5.4. Zytokinfreisetzung zur Beurteilung spezifischer T-Zell-Aktivität – Korezeptor unabhängige Bindung von MHC-I-restringiertem TCR auf CD4⁺ T-Zellen

Nach Peptidstimulation können spezifische T-Zellen aktiviert und zur Sekretion von Zytokinen angeregt und über verschiedene immunologische Assays (z. B. ELISA, ICS, ELISPOT) nachgewiesen werden (Morita, Heike et al. 2006; Kim, Cho et al. 2010; Ochsenreither, Fusi et al. 2011).

In unseren Versuchen konnte nach *in vitro* Stimulation kein IFN- γ oder IL-2 in CD8⁺ T-Zellen durch ICS in 8 von 9 Patienten detektiert werden. Möglicherweise lag es an fehlender methodischer Sensitivität, als weitere Ursachen kann eine untypische Zytokinfreisetzung bzw. eine direkte Induktion von zytotoxischen Effekten diskutiert werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein Phänomen, das bei zellulärer *in vitro* Expansion auftritt, nicht jedoch bei intrazellulärer Färbung von Zellen *ex vivo*.

Interessanterweise konnte eine deutliche IFN- γ -Produktion in der CD4⁺ T-Zellfraktion von Patient #1.153 im Stadium des persistierenden Rezidivs nach SCT detektiert werden – mit PRAME-überexprimierenden leukämischen Blasten trotz MHC-I-Restriktion des Peptids. Dies könnte durch CD8⁺ Korezeptor-unabhängige Bindung des MHC-I-restringierten TCR an CD4⁺ T-Zellen erklärt werden. Dieses Phänomen wurde kürzlich in der Gruppe von Prof. Dr. D. Busch in einigen seltenen Fällen beobachtet (persönliche Mitteilung Georg Dössinger).

Aufgrund dieser Daten empfehlen wir die Untersuchung mehrerer Zytokine, (z. B. IL17a, IL17f, IL-21, IL-22, TGF- β (Zhu and Paul 2008; Zhu and Paul 2010), um ein verfeinertes Zytokinprofil zu etablieren und es mit funktionalen und/oder klinischen Daten zu korrelieren. Des Weiteren sollten die CD4⁺ und CD8⁺ Bindungscharakteristika genauer analysiert werden.

5.5. Etablierung des CD4⁺ Stimulationsmodells

Grundlage des von uns verwendeten Stimulationsmodells waren Arbeiten von Milosevic, Adhikary und Moosmann (Moosmann, Khan et al. 2002; Milosevic, Behrends et al. 2006; Adhikary, Behrends et al. 2007). Bei den verwendeten Epitopen handelt es sich um virale- oder bakterielle-Ag oder um virus-ähnliche Partikel, die nach Beladung auf mini-LCLs oder peripheren MNCs starke immunogene Immunantworten auslösen können. In unserem Versuchsansatz wurden in Analogie LAA oder mHag eingesetzt, bei denen mit einer deutlich geringeren Immunantwort als z. B. gegen virale Ag zu rechnen ist.

Zur LAA/HA1 Ag-Präsentation mit unbekanntem CD4⁺ T-Zell-Epitopen wurde auf zelleigene Mechanismen zur Prozessierung der Ag mit Internalisierung der extrazellulären Proteine (Endozytose/Phagozytose), Spaltung im endosomalen/lysosomalen System und anschließender MHC-II-Präsentation an der Zelloberfläche vertraut – dem idealen Prozessierungsmechanismus für Ag. Schwierigkeiten, die es zu überwinden galt, waren einerseits die Menge an eingesetzten Proteinen zur Beladung und andererseits der Nachweis an Ag-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Grundsätzlich muss diskutiert werden, ob eine effiziente Ag-Präsentation durch Erhöhung der Proteinkonzentration erreicht werden könnte. Jedoch kann die Konzentrationsbestimmung der Proteine zur optimalen Beladung der APCs bei unbekanntem CD4⁺ T-Zell-Epitopen nicht überprüft werden – im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen, bei denen bei bekannten Epitopen die geeigneten Konzentrationen der Peptide für Stimulationen mittels T2-Bindungsassays ermittelt werden können. Ein Nachweis, ob LAA/HA1-spezifische CD4⁺ T-Zellen angereichert werden konnten, kann daher zuletzt durch Nachweis der antileukämischen Funktionalität von CTLs erbracht werden. Bei erfolgreicher CD4⁺ „Einzelzellklonierung“ und der Identifizierung eines LAA/HA1-spezifischen Zellklons (z. B. 'E14') könnte zudem über Vβ-PCR die Sequenz und das TCR-Ag-Bindungsmotiv ermittelt werden. Weitere Möglichkeit zur Identifizierung von CD4⁺ T-Zell-Epitopen kann, falls die restringierten MHC-II Allele bekannt sind, mittels Bioinformatik-Tools basierend auf mathematischen computergestützten Algorithmen (BIMAS, SYFPEITHI) erfolgen (Rammensee, Bachmann et al. 1999; Kobayashi and Celis 2008; Charoentong, Angelova et al. 2012). Ein weiteres Problem bei der Generierung von mini-LCL aus AML-Patienten nach SCT war die geringe Transfektionseffizienz: Nur bei 1 von 6 Patienten konnten stabile mini-LCLs generiert werden. Dies konnte von Wang bestätigt werden. Der Autor beschrieb EBV-transfizierte B-Zellen als effiziente APCs, jedoch mit geringer Transfektionsfähigkeit und bestätigte unser Ergebnis (Wang 2003). Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Stimulationsmodell mit mononukleären, Monozyten-haltigen Zellen (MNCs) erprobt werden.

5.5.1. LAA/HA1-Proteine für die spezifische Stimulation von CD4⁺ T-Zellen

In unserem Versuchsansatz untersuchten wir die antileukämische Funktion von „untouched“ CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit autologen, LAA/HA1-proteinbeladenen APCs. Wir etablierten ein LAA/HA1-Protein-basiertes Stimulationssystem mit 2 unterschiedlichen APCs: mini-EBV-transduzierte lymphoblastoide B-Zelllinie (mini-LCLs) und CD4 depletierten MNCs. In unserem Ansatz verwendeten wir Vollängen-Proteine (und nicht Peptide) für die Stimulation, da es bislang wenige im Kontext von MHC-Klasse-II identifizierte Peptide und resultierende CD4⁺ T-Zellantworten nach Peptidstimulation gibt. Beispielsweise konnten May und Kollegen HLA-DRB1-restringierte WT1-Peptide identifizieren und CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten in WT1-exprimierenden Tumorzellen nachweisen (May, Dao et al. 2007).

Wir konnten zeigen, dass die Verwendung der CD4 depletierten MNC-Fraktion mit den beinhaltenden B-Zellen, Monozyten und DCs besser als mini-LCLs, mit ihrer B-lineären APC-Funktion, geeignet war. CD4 depletierte MNCs als APCs weisen zudem den Vorteil auf, dass sie sofort verfügbar sind und in der Zusammensetzung eher die *in vivo* Situation simulieren als das artifizielle mini-LCL System. Nachteil ist, dass mehr Patientenblut benötigt wird, was aufgrund der individuell oftmals schweren Krankheitsverläufe häufig nicht zur Verfügung steht. Im Vergleich dazu stehen nach erfolgreicher Etablierung mini-LCL in unbegrenzter Menge zur Verfügung, ohne dass die viralen mini-EBV-Ag eine unspezifische Immunreaktion der stimulierten T-Zellen gegen nicht-leukämische Ag auslösen können.

Nach wiederholter Stimulation der CD4⁺ T-Zellen mit LAA/HA1-proteinbeladenen APCs, konnten proliferierende, zytokinproduzierende-/sekretierende (IFN- γ oder GM-CSF) CD4⁺ T-Zellen angereichert werden. Die Menge an freigesetzten Zytokinen nahm dabei über die Dauer der Stimulationen ab, möglicherweise verursacht durch eine „Gewöhnung“ der Effektorzellen an den Stimulus oder aber einer untypischen Zytokinfreisetzung. Bedacht werden muss, dass es sich trotz Anreicherung um eine relativ kleine LAA/HA1-spezifische Zellpopulation handelt und möglicherweise die spezifische Zytokindetektion unter der methodischen Sensitivitätsgrenze lag, was analog auch bei den CD8⁺ T-Zellen ein *in vitro* Phänomen sein könnte. Des Weiteren liefert die Zytokinfreisetzung der LAA/HA1-angereicherten CD4⁺ T-Zellfraktion keinen Beweis für eine antileukämische zytotoxische Funktionalität, sondern nur einen Hinweis. Weitere Analysen mit verfeinerten Zytokinprofilen sind nötig.

Bedenkt man die Rolle der CD4⁺ T-Zellen als Helfer- und als regulatorische Zellen bei Immunreaktionen (Wang 2001; Zhu and Paul 2008), wie z. B. der Aufrechterhaltung einer spezifischen (AK-) Immunantwort bei Leukämiepatienten und beispielsweise durch

verschiedene über MHC-II-Moleküle auf CD4⁺ T-Zellen prädominant exprimierte mHag, ist eine Überwachung dieser Zellen nach SCT mit selektiver GvL und geringer oder limitierter GvHD von entscheidender Bedeutung (Gaiger, Reese et al. 2000; Griffioen, van der Meijden et al. 2008; Ryu, Jung et al. 2009; Stumpf, van der Meijden et al. 2009).

5.5.2. CD40-CD40L Interaktion als „frühes prägendes Ereignis“ für T-Zellen

Für eine optimale, effektive Immunantwort werden neben der Präsentation des Ag über den MHC-Komplex auf der APC, Antigenerkennung durch den TCR und direktem Zell-Zell-Kontakt noch verschiedene (ko-)stimulatorische Signale benötigt. Eine entscheidende Rolle übernimmt dabei CD40-CD40L bei Kostimulation und Aktivierung von T-Zellen (Grewal and Flavell 1996). Beispielsweise kann durch direkten Zellkontakt von CD40-Rezeptor-exprimierenden DCs die Aktivierung des CD40L initiiert werden. Des Weiteren kann eine fehlende CD40-CD40L Interaktion zu einer fehlerhaften Immunreaktion führen. Es ist bekannt, dass es sich bei der CD40-CD40L Interaktion um ein frühes zelluläres Aktivierungssignal handelt, das wiederum weitere Signalwege und kostimulatorische Moleküle beeinflusst (z. B. CD28/CTLA-4 Expression nach Kontakt von CD80/CD86-exprimierenden APCs). Dabei ist unklar, ob die stark regulierte Expression von CD40L auf T-Zellen nach Kontakt von CD40-exprimierenden APCs die Aktivierung von „unerwünschten“ autoimmunreaktiven T-Zellen auslösen können bzw. ob im Umkehrschluss eine CD40-CD40L gerichtete Antitumor-Antwort etabliert werden kann (Grewal and Flavell 1997).

In unserem Versuchsansatz wurden die angereicherten LAA/HA1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen vor „Einzelzellklonierung“ selektiert, indem die proliferierende, CD40L-koexprimierende CD4⁺ T-Zellfraktion isoliert wurde. Diese repräsentierte die frühe spezifische Zellfraktion, charakterisiert durch einen Anstieg an LAA/HA1-spezifischen zytotoxischen CD4⁺ T-Zellen, und einer Verschiebung des Effektor-Phänotyps, hin zu einem Anstieg an regulatorischen und einem Effektor-Gedächtnis-Phänotyp (Vergleich von 'E11' und 'E12', siehe Abbildung 20-II, 23). Neuere Untersuchungen zeigen, dass durch direkte Aktivierung des CD40-Rezeptors auf CD40-exprimierenden Tumorzellen ein Antitumor-Effekt ausgelöst werden kann (Elgueta, Benson et al. 2009) und bestätigen unsere Ergebnisse. Die deutliche Zunahme an zytotoxischen CD4⁺ T-Zellen nach Zellsortierung kann möglicherweise auf die Ausbildung eines T_{reg}-vermittelten GvL-Effekts und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses hindeuten.

Verschiedene auf Grundlage der CD40-CD40L Interaktion beruhenden Therapieansätze laufen (Elgueta, Benson et al. 2009). Beispielsweise konnte im Tiermodell durch die Blockierung von CD40L ein verlängertes Überleben von transplantierten Organen erzielt

werden. Die Interaktion von CD40-CD40L scheint nicht nur eine entscheidende Rolle beim T-Zell „priming“, sondern auch bei der Toleranz-Induktion zu haben (van Kooten and Banchereau 2000; Elgueta, Benson et al. 2009).

Um ein detailliertes Bild der CD40-CD40L assoziierten T-Zelleffekte, insbesondere in Hinblick auf mögliche GvL- (optimiertes T-Zell „priming“) und GvHD-Reaktionen (T_{reg}) zu erhalten, schlagen wir zusätzlich noch eine phänotypische Charakterisierung der CD40L⁻ CD4⁺ T-Zellfraktion vor.

5.6. Spezifische CD4⁺ T-Zellen mit antileukämischer zytotoxischer Funktion

In unserem Versuchsansatz konnten wir leukämieaktive CD4⁺ T-Zellen nach wiederholter Stimulation der CD4⁺ T-Zellfraktion mit autologen LAA/HA1-beladenen APCs in einem Patienten nach DLI *in vitro* nachweisen (#1.158). Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die CD40L-exprimierenden, proliferierenden CD4⁺ T-Zellen angereichert werden konnten. Obwohl die angereicherten CD4⁺ T-Zellen nur eine geringe Zytokinfreisetzung von IFN- γ , IL-2 oder GM-CSF und vergleichend zu CD4⁺ T-Zellklonen, MNCs oder CD3⁺ Zellen aufwiesen, wies diese Zellfraktion einen höchst effektiven antileukämischen zytotoxischen Effekt auf, ohne dabei autologe Fibroblasten oder T-Zellen (zu unterschiedlichen Zeitpunkten asserviert) zu lysieren. Wir verwendeten für den Nachweis zytotoxischer blastenlysender Zellen einen nicht-radioaktiven Fluorolyse Assay. Deutlicher methodischer Vorteil liegt in der längeren Inkubationszeit (bis zu 24 h) von Target mit Effektorzellen im Vergleich zum ⁵¹Chromfreisetzungstest, mit dem wir keine zytotoxischen Aktivitäten detektieren konnten. Bedacht werden muss beim Vergleich der beiden Methoden, dass für den Fluorolyse Assay blastenhaltige MNCs als Zielzellen eingesetzt wurden und für den ⁵¹Chromfreisetzungstest beladene APCs. Möglicherweise waren Blasten im Vergleich zu APCs die besseren Zielzellen für die T-Zellen; eventuell war aber auch die für den ⁵¹Chromfreisetzungstest gewählte 4-stündige Inkubationszeit von Effektor- mit Zielzellen zu kurz.

CD4⁺ T-Zellen unterteilt in ihre Subgruppen wie T_H1 -, T_H2 -, T_H17 - und iT_{reg} - sind Teil des zellulären Immunsystems mit regulierender und helfender/unterstützender Funktion der adaptiven Immunantwort (Zhu and Paul 2008). Die direkte Rolle bestimmter CD4⁺ T-Zell-Subgruppen zytotoxische Funktionen zu vermitteln, z. B. bei Virus-infizierten- oder bei Tumorzellen (z. B. B-Zell-Lymphom), konnte bereits nachgewiesen werden (Brown 2010). Darüber hinaus konnte die zytotoxische CD4⁺ T-Zell-Aktivität direkt gegen HLA Klasse-II-restringierte mHag in Patienten mit CML nach SCT nachgewiesen werden, wobei diese CD4⁺ T-Zellen mHag auf hämatopoetischen, nicht aber (nach Zytokin-Behandlung) auf Fibroblasten des Patienten erkannten (Stumpf, van der Meijden et al. 2009).

Die klinische Bedeutung von alloreaktiven gegen mHags gerichtete CD4⁺ T-Zellen in der Vermittlung der Tumormunität liegt in der spezifischen Erkennung und unterschiedlichen Lokalisation von mHags. Beispielsweise wird HA1 (HLA-A02-restringiert) oder HA2 nur von hämatopoetischen Zellen exprimiert, wohingegen HA3 oder UTY ubiquitär exprimiert vorliegt. Dadurch können nach allogener SCT gezielt GvL-Effekte infolge reaktiver Spenderlymphozyten induziert werden, ohne GvH-Effekte zu vermitteln (Bleakley and Riddell 2004; Bleakley and Riddell 2011). Stevanovic und Kollegen konnten in einem *in vivo* NOD/SCID-Mausmodell nachweisen, dass CD4⁺ T-Zellen direkt als Effektorzellen fungieren können und gleichzeitig Zytokine freisetzen, die die leukämische Zelle so modulieren, dass sie einen „APC Phänotyp“ erlangen und dadurch besser als Targets erkannt werden (Stevanovic, Griffioen et al. 2011). Möglicherweise erklärt das den starken GvL- bei gleichzeitig geringen GvH-Effekten von CD4⁺ T-Zellen.

Wir können *in vivo* Daten hinzufügen, die wir mit Zellen eines Patienten nach DLI mit GvHD und GvL-Effekt direkt aus dem Patienten gewonnen hatten: Eine Zunahme der antileukämischen Funktion der CD4⁺ T-Zellen im Laufe des klinischen Verlaufs war mit einer maximalen zytotoxischen Funktionalität nach der 4. DLI zu beobachten. Die „killing“ Funktion beschränkte sich dabei nur gegen die leukämischen Zellen, nicht aber gegen nicht-maligne Fibroblasten oder nicht-leukämische hämatopoetische Zellen (siehe Tabelle 17, Abbildung 20-I, 24-I).

5.7. CD4⁺ T-Zell-Subtypanalyse als differenzierte Charakterisierung der Funktionalität

Für die Etablierung und Generierung von Effektor-T-Gedächtniszellen (T_{em}) sind sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen wichtig. Um eine ausreichende Proliferation zu induzieren wird eine bidirektionale Interaktion zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen benötigt (Xydia, Ge et al. 2010).

Interessanterweise fand sich bei Analyse der *ex vivo* generierten Daten der verschiedenen, aktivierten Zellen ein Effektor- und Effektor-Gedächtnis-Phänotyp. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass zentrale T-Gedächtniszellen angelegt wurden. Sie sind möglicherweise für einen lang andauernden Gedächtniseffekt von T-Zellen mit antileukämischer Funktionalität nach erfolgreicher SCT in AML-Patienten verantwortlich (siehe Abbildung 22, 24-I). Der Anteil an regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) korrelierte indirekt mit der antileukämischen Funktion dieser Zellen und unterstreicht die Rolle der T_{reg} bei der Herunterregulierung der Tumorantwort. Nur die sortierten CD4⁺ T-Zellen in 'E12' zeigten eine hohe antileukämische lytische Aktivität trotz eines hohen Anteils an CD4⁺ T-Zellen mit regulatorischem Phänotyp.

Dies deutet möglicherweise auf eine untergeordnete Rolle von T_{reg} in der Herunterregulierung der antileukämischen Aktivität zu diesem Zeitpunkt hin.

Unsere Daten – exemplarisch dargestellt an einem einzelnen Patienten – lassen vermuten, dass eine effektive antileukämische zytotoxische T-Zellantwort nach DLI-basierter Rezidivtherapie wiederhergestellt werden kann, möglicherweise vermittelt durch reaktive T-Gedächtniszellen. In unserem Patienten konnte nach Therapie eine stabile CR wiederhergestellt werden. Leider entwickelte der Patient später ein myokardiales Chlorom und verstarb.

5.8 Fazit der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell-Untersuchungen

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten mit Hilfe der DLI rezidierte Leukämiepatienten nach SCT die GvL-Effekte vermittelnde T-Zellantwort reetablieren und in Folge dessen eine komplette Remission wiederherstellen (Kolb, Schattenberg et al. 1995; Schmid, Labopin et al. 2007; Schmid, Labopin et al. 2012).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen an der antileukämischen Immunantwort beteiligt sind. Um ihre Rolle besser analysieren zu können, wurden entweder die $CD4^+$ T-Zellen mit LAA/HA1-proteinbeladenen APCs *ex vivo* stimuliert oder LAA-peptidspezifische $CD8^+$ T-Zellen direkt aus dem Patienten isoliert.

Hinsichtlich der $CD8^+$ T-Zellen konnten wir zeigen, dass in allen Patienten nach SCT LAA-spezifische $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen wurden. In 5 von 7 Patienten konnten sogar mehr als zwei unterschiedliche LAA-spezifische T-Zelltypen detektiert werden. Lang andauernde Remissionen konnten entweder mit einem hohen Anteil an LAA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen oder bei Anwesenheit von zwei unterschiedlichen Typen an LAA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen korreliert werden (siehe Abbildung 16-I). Darüber hinaus konnten wir bei einem Patienten exemplarisch zeigen, dass LAA-spezifische $CD8^+$ T-Zellen in ihrem TCR-Repertoire ($V\beta$ -TCR) stark eingeschränkt waren (siehe Abbildung 16-II).

Hinsichtlich der $CD4^+$ T-Zellen entwickelten wir ein optimiertes Kultivierungs- und Stimulationssystem, beruhend auf LAA/HA1-Proteinstimulation. Darüber hinaus konnten wir ein Klonierungssystem („Einzelzellklonierung“) für $CD4^+$ T-Zellen etablieren, bei denen $CD4$ depletierte MNCs am besten als APCs einsetzbar waren. Bei genauerer Analyse konnten wir zeigen, dass $CD4^+$ T-Zellen durchaus zytotoxische antileukämische Aktivität besitzen. Die $CD4^+$ Subtypen nach LAA/HA1-Proteinstimulation waren durch verschiedene antileukämische Funktionalität charakterisiert – was möglicherweise auch durch die Plastizität der $CD4^+$ T-Zellen erklärbar ist.

Aufgrund dieser Daten schlagen wir ein klinisches Monitoring spezifischer T-Zellen, insbesondere im Kontext einer Immuntherapie, vor. Wir empfehlen die Überwachung der

Genexpression von LAAs (PRAME, WT1, PR3) sowie der LAA-spezifischen T-Zellen nach SCT um die Qualität einer Remission zu evaluieren, die Zu- oder Abnahme von LAA-exprimierenden Blasten sowie von spezifischen T-Zellen im Verlauf der Remission zu analysieren (Steger, Buhmann et al. 2008; Kim, Cho et al. 2010). Des Weiteren sollten Immuntherapien mit adoptiv applizierten allogenen (PRAME-, WT1- oder PR1-)spezifischen CD8⁺ T-Zellen, präpariert mit MHC-Multimer-Technologie, diskutiert werden. Darüber hinaus muss das Auftreten seltener Ereignisse, wie z. B. CD8⁺ Korezeptor unabhängige Bindungen von MHC-I-restringierten TCR auf CD4⁺ T-Zellen, weiter beobachtet werden. Weitere Studien an einer größeren Patientenkohorte werden benötigt, um bisherige Ergebnisse zu bestätigen.

Des Weiteren schlagen wir die Analyse von mehr Zytokinen (z. B. IL-17a und f, IL-21, IL-22, TGF-β) (Zhu and Paul 2010) vor, um verfeinerte Zytokinprofile im Kontext von Funktionalität zu erstellen.

Mit unseren Ergebnissen konnten wir die klinische Relevanz der CD4⁺ T-Zellen als Vermittler der Tumormunität verdeutlichen, besonders in Hinblick auf die Erkennung von mHag auf hämatopoetischen Zellen und spezifischer Lyse leukämischer Blasten (GvL-Effekt) ohne Lyse von nicht-malignen Fibroblasten oder nicht-leukämischen hämatopoetischen Zellen im Patienten (GvH-Effekt).

Zusammenfassend konnten wir nachweisen, dass CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen antileukämische zytotoxische Funktion vermitteln und die angereicherten CD4⁺ T-Zell-Subtypen nach LAA/HA1-Proteinstimulation sich als mögliches immuntherapeutisches Instrument eignen, um GvL- ohne GvH-Reaktion zu vermitteln.

Weitere Studien sollten folgen, um den optimalen Zeitpunkt zu ermitteln, um die geringste benötigte Menge an entweder CD8⁺/CD4⁺ Subtypen zur Aufrechterhaltung einer Remission oder für die Präparation von (ausreichenden) Mengen LAA-spezifischer CD8⁺/CD4⁺ T-Zellen, die für einen adoptiven Transfer benötigt werden, abzuschätzen.

Darüber hinaus sollten weitere Studien durchgeführt werden, um zelluläre und lösliche Mechanismen, die für ein Rezidiv oder umgekehrt für die Immunantwort in AML-Patienten nach SCT verantwortlich sind, zu analysieren. Insbesondere sollten verfeinerte funktionelle Tests zum Einsatz kommen, um die Rolle von immunreaktiven T-Zellen im klinischen Kontext erschließen zu können und ob sich daraus therapeutisch relevante Erkenntnisse ergeben. Zusammenfassend konnten wir interessante neue Daten über LAA-Expressionsprofile von AML-Blasten sowie LAA-spezifische CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellsubtypen erarbeiten, die möglicherweise in alloreaktive GvL-Antworten involviert sind, ohne dabei GvH-Effekte zu vermitteln.

Literaturverzeichnis

- Adhikary, D., U. Behrends, et al. (2007). "Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy." PLoS One **2**(7): e583.
- Alatrash, G. and J. J. Molldrem (2010). "Immunotherapy of AML." Cancer Treat Res **145**: 237-55.
- Alatrash, G. and J. J. Molldrem (2011). "Vaccines as consolidation therapy for myeloid leukemia." Expert Rev Hematol **4**(1): 37-50.
- Alberts B., Johnson A., et al. (2004). Molekularbiologie der Zelle.
- Appelbaum, F. R. (2003). "The current status of hematopoietic cell transplantation." Annu Rev Med **54**: 491-512.
- Asou, H., S. Tashiro, et al. (1991). "Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation." Blood **77**(9): 2031-6.
- Auerbach, A. D. (2009). "Fanconi anemia and its diagnosis." Mutat Res **668**(1-2): 4-10.
- Aul, C., N. Gattermann, et al. (1992). "Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system." Leukemia **6**(1): 52-9.
- Barnes, D. W. and J. F. Loutit (1957). "Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II." Br J Haematol **3**(3): 241-52.
- Barrett, A. J. (2008). "Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect." Br J Haematol **142**(6): 877-88.
- Barrett, A. J. and K. Le Blanc (2010). "Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia." Clin Exp Immunol **161**(2): 223-32.
- Barrett, A. J. and K. Rezvani (2007). "Translational mini-review series on vaccines: Peptide vaccines for myeloid leukaemias." Clin Exp Immunol **148**(2): 189-98.
- Beillard, E., N. Pallisgaard, et al. (2003). "Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program." Leukemia **17**(12): 2474-86.
- Benjamin, D., I. T. Magrath, et al. (1982). "Immunoglobulin secretion by cell lines derived from African and American undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type." J Immunol **129**(3): 1336-42.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, et al. (1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group." Br J Haematol **33**(4): 451-8.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, et al. (1985). "Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group." Ann Intern Med **103**(4): 620-5.
- Bennett, J. M., M. L. Young, et al. (1997). "Long-term survival in acute myeloid leukemia: the Eastern Cooperative Oncology Group experience." Cancer **80**(11 Suppl): 2205-9.
- Bergmann, L., C. Miething, et al. (1997). "High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome." Blood **90**(3): 1217-25.
- Blaise, D., M. Attal, et al. (2000). "Randomized study of recombinant interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation for acute leukemia in first complete remission." Eur Cytokine Netw **11**(1): 91-8.
- Bleakley, M. and S. R. Riddell (2004). "Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect." Nat Rev Cancer **4**(5): 371-80.
- Bleakley, M. and S. R. Riddell (2011). "Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia." Immunol Cell Biol **89**(3): 396-407.
- Broere, F., S. G. Apasov, et al. (2011). T cell subsets and T cell-mediated immunity, Springer Basel AG 2011.
-

- Brown, D. M. (2010). "Cytolytic CD4 cells: Direct mediators in infectious disease and malignancy." *Cell Immunol* **262**(2): 89-95.
- Buchner, T., W. E. Berdel, et al. (2009). "Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group." *J Clin Oncol* **27**(1): 61-9.
- Buhmann, R., M. Stanglmaier, et al. (2013). "Immunotherapy with FBTA05 (Bi20), a trifunctional bispecific anti-CD3 x anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion (DLI) in relapsed or refractory B-cell lymphoma after allogeneic stem cell transplantation: study protocol of an investigator-driven, open-label, non-randomized, uncontrolled, dose-escalating Phase I/II-trial." *J Transl Med* **11**: 160.**
- Bund, D., R. Buhmann, et al. (2011). "Canine-DCs using different serum-free methods as an approach to provide an animal-model for immunotherapeutic strategies." *Cell Immunol* **263**(1): 88-98.**
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." *Prog Exp Tumor Res* **13**: 1-27.
- Buyse, M., P. Squifflet, et al. (2011). "Individual patient data meta-analysis of randomized trials evaluating IL-2 monotherapy as remission maintenance therapy in acute myeloid leukemia." *Blood* **117**(26): 7007-13.
- Call, K. M., T. Glaser, et al. (1990). "Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus." *Cell* **60**(3): 509-20.
- Cammenga, J. (2005). "Gatekeeper pathways and cellular background in the pathogenesis and therapy of AML." *Leukemia* **19**(10): 1719-28.
- Campoli, M. and S. Ferrone (2008). "HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance." *Oncogene* **27**(45): 5869-85.
- Candoni, A., M. Tiribelli, et al. (2009). "Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia." *Eur J Haematol* **82**(1): 61-8.
- Champlin, R. E. and R. P. Gale (1984). "Role of bone marrow transplantation in the treatment of hematologic malignancies and solid tumors: critical review of syngeneic, autologous, and allogeneic transplants." *Cancer Treat Rep* **68**(1): 145-61.
- Chaplin, D. D. (2010). "Overview of the immune response." *J Allergy Clin Immunol* **125**(2 Suppl 2): S3-23.
- Charoentong, P., M. Angelova, et al. (2012). "Bioinformatics for cancer immunology and immunotherapy." *Cancer Immunol Immunother* **61**(11): 1885-903.
- Chen, J. S., C. C. Hsiao, et al. (2007). "Comparison of minimal residual disease (MRD) estimated by flow cytometry and by real-time quantitative PCR of Wilms tumor gene 1 (WT1) transcript expression in children with acute lymphoblastic leukemia." *Leuk Res* **31**(10): 1351-7.
- Cheson, B. D., J. M. Bennett, et al. (2003). "Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia." *J Clin Oncol* **21**(24): 4642-9.
- Cilloni, D., A. Renneville, et al. (2009). "Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study." *J Clin Oncol* **27**(31): 5195-201.
- Cilloni, D. and G. Saglio (2004). "WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome." *Acta Haematol* **112**(1-2): 79-84.
- Csernok, E., J. U. Holle, et al. (2008). "Proteinase 3, protease-activated receptor-2 and interleukin-32: linking innate and autoimmunity in Wegener's granulomatosis." *Clin Exp Rheumatol* **26**(3 Suppl 49): S112-7.
- de Labarthe, A., C. Pautas, et al. (2005). "Allogeneic stem cell transplantation in second rather than first complete remission in selected patients with good-risk acute myeloid leukemia." *Bone Marrow Transplant* **35**(8): 767-73.
-

- Delluc, S., L. Tourneur, et al. (2005). "Autologous peptides eluted from acute myeloid leukemia cells can be used to generate specific antileukemic CD4 helper and CD8 cytotoxic T lymphocyte responses in vitro." *Haematologica* **90**(8): 1050-62.
- Dengler, R., U. Munstermann, et al. (1995). "Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells." *Br J Haematol* **89**(2): 250-7.
- Dobrzanski, M. J., J. B. Reome, et al. (2000). "Type 1 and type 2 CD8+ effector T cell subpopulations promote long-term tumor immunity and protection to progressively growing tumor." *J Immunol* **164**(2): 916-25.
- Dohner, H., E. H. Estey, et al. (2010). "Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet." *Blood* **115**(3): 453-74.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-8.
- Elgueta, R., M. J. Benson, et al. (2009). "Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system." *Immunol Rev* **229**(1): 152-72.
- Epping, M. T., L. Wang, et al. (2005). "The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling." *Cell* **122**(6): 835-47.
- Estrov, Z. (2010). "The leukemia stem cell." *Cancer Treat Res* **145**: 1-17.
- Falkenburg, J. H., W. A. Marijt, et al. (2002). "Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions." *Curr Opin Hematol* **9**(6): 497-502.
- Falkenburg, J. H., L. van de Corput, et al. (2003). "Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation." *Exp Hematol* **31**(9): 743-51.
- Ferrara, J. L., J. E. Levine, et al. (2009). "Graft-versus-host disease." *Lancet* **373**(9674): 1550-61.
- Fowler, D. H. and R. E. Gress (2000). "Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma." *Leuk Lymphoma* **38**(3-4): 221-34.
- Gaiger, A., V. Reese, et al. (2000). Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. **96**: 1480-9.
- Gallagher, R., S. Collins, et al. (1979). "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia." *Blood* **54**(3): 713-33.
- Giralt, S., J. Hester, et al. (1995). "CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation." *Blood* **86**(11): 4337-43.
- Godley, L. A. and R. A. Larson (2008). "Therapy-related myeloid leukemia." *Semin Oncol* **35**(4): 418-29.
- Goulmy, E. (2006). "Minor histocompatibility antigens: from transplantation problems to therapy of cancer." *Hum Immunol* **67**(6): 433-8.
- Grabrucker, C., A. Liepert, et al. (2010). "The quality and quantity of leukemia-derived dendritic cells from patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome are a predictive factor for the lytic potential of dendritic cells-primed leukemia-specific T cells." *J Immunother* **33**(5): 523-37.**
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Gratwohl, A., J. Hermans, et al. (2001). "Female donors influence transplant-related mortality and relapse incidence in male recipients of sibling blood and marrow transplants." *Hematol J* **2**(6): 363-70.
- Greenberg, P., C. Cox, et al. (1997). "International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes." *Blood* **89**(6): 2079-88.
- Greiner, J., L. Bullinger, et al. (2008). "Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells." *Clin Cancer Res* **14**(22): 7161-6.
- Greiner, J., H. Dohner, et al. (2006). "Cancer vaccines for patients with acute myeloid leukemia--definition of leukemia-associated antigens and current clinical protocols targeting these antigens." *Haematologica* **91**(12): 1653-61.
-

- Greiner, J., M. Ringhoffer, et al. (2000). "Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia." Exp Hematol **28**(12): 1413-22.
- Greiner, J., M. Ringhoffer, et al. (2004). "mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies." Int J Cancer **108**(5): 704-11.
- Greiner, J., A. Schmitt, et al. (2010). "High-dose RHAMM-R3 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and multiple myeloma." Haematologica **95**(7): 1191-7.
- Greiner, J., M. Schmitt, et al. (2006). "Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches." Blood **108**(13): 4109-17.
- Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1996). "The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation." Immunol Rev **153**: 85-106.
- Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1997). "The CD40 ligand. At the center of the immune universe?" Immunol Res **16**(1): 59-70.
- Griffioen, M., J. H. Kessler, et al. (2006). "Detection and functional analysis of CD8+ T cells specific for PRAME: a target for T-cell therapy." Clin Cancer Res **12**(10): 3130-6.
- Griffioen, M., E. D. van der Meijden, et al. (2008). "Identification of phosphatidylinositol 4-kinase type II beta as HLA class II-restricted target in graft versus leukemia reactivity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3837-42.
- Guinn, B. A., A. Mohamedali, et al. (2007). "Leukemia associated antigens: their dual role as biomarkers and immunotherapeutic targets for acute myeloid leukemia." Biomark Insights **2**: 69-79.
- Guinn, B. A., A. Mohamedali, et al. (2007). "Immunotherapy of myeloid leukaemia." Cancer Immunol Immunother **56**(7): 943-57.
- Guo, Y., H. Niiya, et al. (2005). "Direct recognition and lysis of leukemia cells by WT1-specific CD4+ T lymphocytes in an HLA class II-restricted manner." Blood **106**(4): 1415-8.
- Haber, D. A., A. J. Buckler, et al. (1990). "An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor." Cell **61**(7): 1257-69.
- Haferlach, C., M. Zenger, et al. (2011). "Cytogenetic Clonal Evolution in MDS Is Associated with Shifts towards Unfavorable Karyotypes According to IPSS and Shorter Overall Survival: A Study on 988 MDS Patients Studied Sequentially by Chromosome Banding Analysis." Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) **118**(Abstract): 968.
- Haferlach, T., W. Kern, et al. (2004). "A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group." Haematologica **89**(4): 408-18.
- Halverson, D. C., G. N. Schwartz, et al. (1997). "In vitro generation of allospecific human CD8+ T cells of Tc1 and Tc2 phenotype." Blood **90**(5): 2089-96.
- Hiddemann, W., J. Braess, et al. (2009). "Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrom, MANUAL." W. Zuckschwerdt Verlag (3. Auflage): 1-239.
- Holler, E. (2000). Immuntherapie.
- Holler, E. (2002). "Cytokines, viruses, and graft-versus-host disease." Curr Opin Hematol **9**(6): 479-84.
- Horowitz, M. M., R. P. Gale, et al. (1990). "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation." Blood **75**(3): 555-62.
- Ichimaru, M., T. Ishimaru, et al. (1978). "Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia." J Radiat Res (Tokyo) **19**(3): 262-82.
- Ikeda, H., B. Lethe, et al. (1997). "Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor." Immunity **6**(2): 199-208.
- Ishimaru, T., M. Otake, et al. (1979). "Dose-response relationship of neutrons and gamma rays to leukemia incidence among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki by type of leukemia, 1950--1971." Radiat Res **77**(2): 377-94.
-

- Ivanov, V. K., A. F. Tsyb, et al. (2012). "Leukemia incidence in the Russian cohort of Chernobyl emergency workers." Radiat Environ Biophys.
- Jabbour, E. J., E. Estey, et al. (2006). "Adult acute myeloid leukemia." Mayo Clin Proc **81**(2): 247-60.
- Jacobsohn, D. A., W. T. Tse, et al. (2009). "High WT1 gene expression before haematopoietic stem cell transplant in children with acute myeloid leukaemia predicts poor event-free survival." Br J Haematol **146**(6): 669-74.
- Janeway C.A., Travers P., et al. (2002). Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Kamradt, T. and K. Ferrari-Kuhne (2011). "[Adaptive immunity]." Dtsch Med Wochenschr **136**(33): 1678-83.
- Kempkes, B., D. Pich, et al. (1995). "Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA." J Virol **69**(1): 231-8.
- 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.
- Kim, Y. J., S. G. Cho, et al. (2010). "Potential role of adoptively transferred allogeneic WT1-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes for the sustained remission of refractory AML." Bone Marrow Transplant **45**(3): 597-9.
- Klein, G. (1966). "Tumor antigens." Annu Rev Microbiol **20**: 223-52.
- Kobayashi, H. and E. Celis (2008). "Peptide epitope identification for tumor-reactive CD4 T cells." Curr Opin Immunol **20**(2): 221-7.
- Kobayashi, H., T. Nagato, et al. (2006). "Defining MHC class II T helper epitopes for WT1 tumor antigen." Cancer Immunol Immunother **55**(7): 850-60.
- Koeffler, H. P. and D. W. Golde (1980). "Human myeloid leukemia cell lines: a review." Blood **56**(3): 344-50.
- Kolb, H. J.** (2000). " Myelodysplastische Syndrome." Thieme Verlag (2. Auflage) **8**(Internistische Onkologie): 380-387.
- Kolb, H. J.** (2008). "Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes." Blood **112**(12): 4371-83.
- Kolb, H. J., J. Mittermuller, et al.** (1990). "Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients." Blood **76**(12): 2462-5.
- Kolb, H. J., A. Schattenberg, et al.** (1995). "Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients." Blood **86**(5): 2041-50.
- Kolb, H. J., C. Schmid, et al.** (2004). "Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras." Blood **103**(3): 767-76.
- Kremser, A., J. Dreyssig, et al.** (2010). "Dendritic cells (DCs) can be successfully generated from leukemic blasts in individual patients with AML or MDS: an evaluation of different methods." J Immunother **33**(2): 185-99.
- Krug, U., T. Buchner, et al. (2011). "The treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia." Dtsch Arztebl Int **108**(51-52): 863-70.
- Kuball, J., K. de Boer, et al. (2011). "Pitfalls of vaccinations with WT1-, Proteinase3- and MUC1-derived peptides in combination with MontanideISA51 and CpG7909." Cancer Immunol Immunother **60**(2): 161-71.
- Lapillonne, H., A. Renneville, et al. (2006). "High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia." J Clin Oncol **24**(10): 1507-15.
- Malkovsky, M. and P. M. Sondel (1987). "Interleukin 2 and its receptor: structure, function and therapeutic potential." Blood Rev **1**(4): 254-66.
- Marijt, W. A., M. H. Heemskerk, et al. (2003). "Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2742-7.
- Marmont, A. M., M. M. Horowitz, et al. (1991). "T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia." Blood **78**(8): 2120-30.
-

- Martinez, O. M. and F. R. de Gruijl (2008). "Molecular and immunologic mechanisms of cancer pathogenesis in solid organ transplant recipients." Am J Transplant **8**(11): 2205-11.
- May, R. J., T. Dao, et al. (2007). "Peptide epitopes from the Wilms' tumor 1 oncoprotein stimulate CD4+ and CD8+ T cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells." Clin Cancer Res **13**(15 Pt 1): 4547-55.
- Meyer, R. G., C. M. Britten, et al. (2007). "Prophylactic transfer of CD8-depleted donor lymphocytes after T-cell-depleted reduced-intensity transplantation." Blood **109**(1): 374-82.
- Milosevic, S., U. Behrends, et al. (2006). "Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-Barr virus by a novel bacterial expression cloning approach." J Virol **80**(21): 10357-64.
- Molldrem, J., S. Dermime, et al. (1996). "Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells." Blood **88**(7): 2450-7.
- Moosmann, A., N. Khan, et al. (2002). "B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells." Blood **100**(5): 1755-64.
- Morita, Y., Y. Heike, et al. (2006). "Monitoring of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Int J Cancer **119**(6): 1360-7.
- Morrison, A. A., R. L. Viney, et al. (2008). "The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein." Biochim Biophys Acta **1785**(1): 55-62.
- Morrison, D. J., M. A. English, et al. (2005). "WT1 induces apoptosis through transcriptional regulation of the proapoptotic Bcl-2 family member Bak." Cancer Res **65**(18): 8174-82.
- Mrozek, K., K. Heinonen, et al. (1997). "Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia." Semin Oncol **24**(1): 17-31.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Muranski, P. and N. P. Restifo (2009). "Adoptive immunotherapy of cancer using CD4(+) T cells." Curr Opin Immunol **21**(2): 200-8.
- Mutis, T. and E. Goulmy (2002). "Hematopoietic system-specific antigens as targets for cellular immunotherapy of hematological malignancies." Semin Hematol **39**(1): 23-31.
- Nakanishi, M., K. Tanaka, et al. (1999). "Chromosomal instability in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome patients among atomic bomb survivors." J Radiat Res (Tokyo) **40**(2): 159-67.
- Natelson, E. A. (2007). "Benzene-induced acute myeloid leukemia: a clinician's perspective." Am J Hematol **82**(9): 826-30.
- Neefjes, J., M. L. Jongsma, et al. (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." Nat Rev Immunol **11**(12): 823-36.
- Ochsenreither, S., A. Fusi, et al. (2011). ""Wilms Tumor Protein 1" (WT1) peptide vaccination-induced complete remission in a patient with acute myeloid leukemia is accompanied by the emergence of a predominant T-cell clone both in blood and bone marrow." J Immunother **34**(1): 85-91.
- Ofran, Y., H. T. Kim, et al. (2010). "Diverse patterns of T-cell response against multiple newly identified human Y chromosome-encoded minor histocompatibility epitopes." Clin Cancer Res **16**(5): 1642-51.
- Ohnami, H., M. Yasukawa, et al. (2000). "HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide." Blood **95**(1): 286-93.
- Ostergaard, M., L. H. Olesen, et al. (2004). "WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study." Br J Haematol **125**(5): 590-600.
- Paydas, S., K. Tanriverdi, et al. (2005). "PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: clinical importance and future prospects." Am J Hematol **79**(4): 257-61.
- Paydas, S., K. Tanriverdi, et al. (2007). "PRAME mRNA levels in cases with chronic leukemia: Clinical importance and review of the literature." Leuk Res **31**(3): 365-9.
-

- Peiper, S. C., R. A. Ashmun, et al. (1988). "Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a human gene encoding the CD33 myeloid differentiation antigen." Blood **72**(1): 314-21.
- Penn, I. (1988). "Posttransplant malignancies*." World Journal of Urology **8**(2): 125-128.
- Poppe, B., H. Van Limbergen, et al. (2001). "Chromosomal aberrations in Bloom syndrome patients with myeloid malignancies." Cancer Genet Cytogenet **128**(1): 39-42.
- Powles, R. L., L. A. Balchin, et al. (1971). "Recognition of leukaemia cells as foreign before and after autoimmunization." Br Med J **1**(5747): 486-9.
- Pulvertaft, J. V. (1964). "Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma)." Lancet **1**(7327): 238-40.
- Rai, K. R., J. F. Holland, et al. (1981). "Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by cancer and leukemia group B." Blood **58**(6): 1203-12.
- Rammensee, H., J. Bachmann, et al. (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics **50**(3-4): 213-9.
- Rezvani, K. (2011). "Peptide vaccine therapy for leukemia." Int J Hematol **93**(3): 274-80.
- Rezvani, K. (2011). "Posttransplantation vaccination: concepts today and on the horizon." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2011**: 299-304.
- Rezvani, K., A. S. Yong, et al. (2011). "Repeated PR1 and WT1 peptide vaccination in Montanide-adjuvant fails to induce sustained high-avidity, epitope-specific CD8+ T cells in myeloid malignancies." Haematologica **96**(3): 432-40.
- Rezvani, K., A. S. Yong, et al. (2008). "Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies." Blood **111**(1): 236-42.
- Romero, A. I., F. B. Thoren, et al. (2009). "Post-consolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in AML." Scand J Immunol **70**(3): 194-205.
- Ruggeri, L., M. Capanni, et al. (2002). "Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants." Science **295**(5562): 2097-100.
- Ryu, S. J., K. M. Jung, et al. (2009). "Cognate CD4 help is essential for the reactivation and expansion of CD8 memory T cells directed against the hematopoietic cell-specific dominant minor histocompatibility antigen, H60." Blood **113**(18): 4273-80.
- Sallusto, F., J. Geginat, et al. (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." Annu Rev Immunol **22**: 745-63.
- Salter, R. D., D. N. Howell, et al. (1985). "Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids." Immunogenetics **21**(3): 235-46.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Scharnhorst, V., A. J. van der Eb, et al. (2001). "WT1 proteins: functions in growth and differentiation." Gene **273**(2): 141-61.
- Schmetzer**, H. M. and H. H. Gerhartz (1993). "Acute myeloid leukemia (AML) can be oligoclonal." Leukemia **7**(12): 1965-70.
- Schmetzer**, H. M., B. Poleck, et al. (1997). "Clonality analysis as a tool to study the biology and response to therapy in myelodysplastic syndromes." Leukemia **11**(5): 660-6.
- Schmid**, C. (2009). "Stammzelltransplantation (SZT) im Therapiekonzept der AML." W. Zuckschwerdt Verlag (3. Auflage): 49-55.
- Schmid**, C., M. Labopin, et al. (2007). "Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party." J Clin Oncol **25**(31): 4938-45.
- Schmid**, C., M. Labopin, et al. (2012). "Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation." Blood **119**(6): 1599-606.
- Schmitt, M., R. Casalegno-Garduno, et al. (2009). "Peptide vaccines for patients with acute myeloid leukemia." Expert Rev Vaccines **8**(10): 1415-25.
-

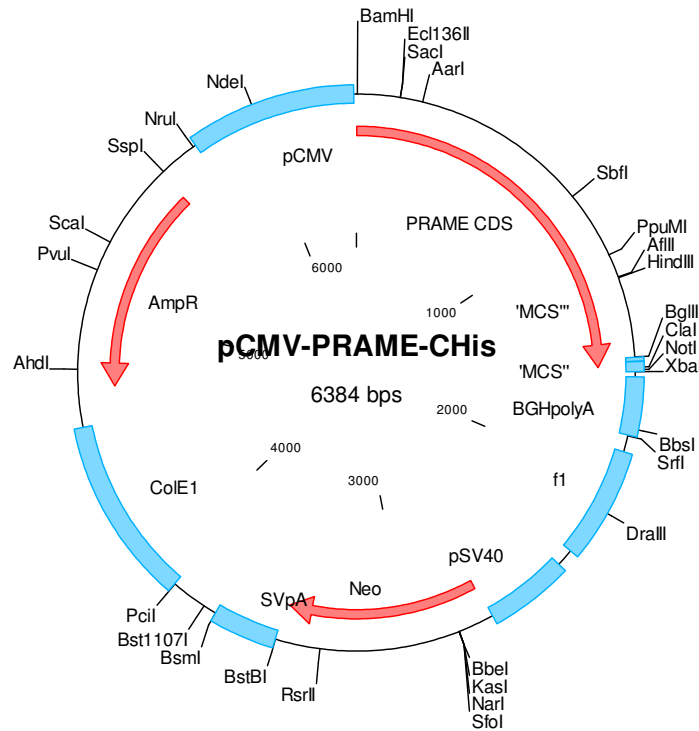
- Schmitt, M., A. Schmitt, et al. (2008). "RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses." Blood **111**(3): 1357-65.
- Schneider, U., H. U. Schwenk, et al. (1977). "Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma." Int J Cancer **19**(5): 621-6.
- Schoch, C. and T. Haferlach (2002). "Cytogenetics in acute myeloid leukemia." Curr Oncol Rep **4**(5): 390-7.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, et al. (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." Science **331**(6024): 1565-70.
- Schuster**, F. R., R. Buhmann, et al. (2008). "Improved effector function of leukemia-specific T-lymphocyte clones trained with AML-derived dendritic cells." Cancer Genomics Proteomics **5**(5): 275-86.
- Schwarting, A., D. Hagen, et al. (2000). "Proteinase-3 mRNA expressed by glomerular epithelial cells correlates with crescent formation in Wegener's granulomatosis." Kidney Int **57**(6): 2412-22.
- Shlomchik, W. D. (2007). "Graft-versus-host disease." Nat Rev Immunol **7**(5): 340-52.
- Siegel, R., D. Naishadham, et al. (2012). "Cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin **62**(1): 10-29.
- Siehl, J. M., E. Thiel, et al. (2002). "Quantitative real-time RT-PCR detects elevated Wilms tumor gene (WT1) expression in autologous blood stem cell preparations (PBSCs) from acute myeloid leukemia (AML) patients indicating contamination with leukemic blasts." Bone Marrow Transplant **29**(5): 379-81.
- Smits, E. L., C. Lee, et al. (2011). "Clinical evaluation of cellular immunotherapy in acute myeloid leukaemia." Cancer Immunol Immunother **60**(6): 757-69.
- Solenthaler, M. and A. Tobler (2004). "[Myelodysplastic syndromes--an overview for the practitioner]." Ther Umsch **61**(2): 117-24.
- Spanaki, A., C. Perdikogianni, et al. (2007). "Quantitative assessment of PRAME expression in diagnosis of childhood acute leukemia." Leuk Res **31**(5): 639-42.
- Spierings, E., M. Hendriks, et al. (2007). "Phenotype frequencies of autosomal minor histocompatibility antigens display significant differences among populations." PLoS Genet **3**(6): e103.
- Spierings, E., B. Wieles, et al. (2004). "Minor histocompatibility antigens--big in tumour therapy." Trends Immunol **25**(2): 56-60.
- Sprent, J. and C. D. Surh (2002). "T cell memory." Annu Rev Immunol **20**: 551-79.
- Steger**, B., R. Buhmann, et al. (2008). "Characterisation of three TAAs as possible target for immunotherapy." Onkologie **31**(Suppl. 4): 67.
- Steger**, B., S. Milosevic, et al. (2013). "CD4 and CD8T-cell reactions against leukemia-associated- or minor-histocompatibility-antigens in AML-patients after allogeneic SCT." Immunobiology.
- Steger** B., H. Schmetzer, L. Floro, T. Kroell, J. Tischer, H-J. Kolb, R. Buhmann. "Clinical relevance of mRNA overexpression of the leukaemia associated antigens (LAA) WT1, PRAME and PR1 in patients (pts) with Acute Myeloid Leukaemia (AML): an analysis of (co)expressions in different cellular compartments, subtypes or stages" (Manuskript kurz vor Einreichung).
- Steinbach, D., J. Hermann, et al. (2002). "Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia." Cancer Genet Cytogenet **133**(2): 118-23.
- Stern, M., R. Brand, et al. (2008). "Female-versus-male alloreactivity as a model for minor histocompatibility antigens in hematopoietic stem cell transplantation." Am J Transplant **8**(10): 2149-57.
- Stern, M., L. Ruggeri, et al. (2008). "Survival after T cell-depleted haploidentical stem cell transplantation is improved using the mother as donor." Blood **112**(7): 2990-5.
- Stevanovic, S., M. Griffioen, et al. (2011). "Human allo-reactive CD4+ T cells as strong mediators of anti-tumor immunity in NOD/scid mice engrafted with human acute lymphoblastic leukemia." Leukemia **26**(2): 312-22.
-

- Stumpf, A. N., E. D. van der Meijden, et al. (2009). "Identification of 4 new HLA-DR-restricted minor histocompatibility antigens as hematopoietic targets in antitumor immunity." Blood **114**(17): 3684-92.
- Sugiyama, H. (2010). "WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy." Jpn J Clin Oncol **40**(5): 377-87.
- Svensson, E., H. Eriksson, et al. (2005). "DNA-binding dependent and independent functions of WT1 protein during human hematopoiesis." Exp Cell Res **308**(1): 211-21.
- Tait, B. D., R. Maddison, et al. (2001). "Clinical relevance of the minor histocompatibility antigen HA-1 in allogeneic bone marrow transplantation between HLA identical siblings." Transplant Proc **33**(1-2): 1760-1.
- Tajeddine, N., J. L. Gala, et al. (2005). "Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo." Cancer Res **65**(16): 7348-55.
- Tajeddine, N., I. Millard, et al. (2006). "Real-time RT-PCR quantification of PRAME gene expression for monitoring minimal residual disease in acute myeloblastic leukaemia." Clin Chem Lab Med **44**(5): 548-55.
- Tallman, M. S., D. G. Gilliland, et al. (2005). "Drug therapy for acute myeloid leukemia." Blood **106**(4): 1154-63.
- Trojan, A., M. Witzens, et al. (2001). "Generation of cytotoxic T lymphocytes against native and altered peptides of human leukocyte antigen-A*0201 restricted epitopes from the human epithelial cell adhesion molecule." Cancer Res **61**(12): 4761-5.
- Uttenthal, B., I. Martinez-Davila, et al. (2013). "Wilms' Tumour 1 (WT1) peptide vaccination in patients with acute myeloid leukaemia induces short-lived WT1-specific immune responses." Br J Haematol **164**(3): 366-75.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." J Leukoc Biol **67**(1): 2-17.
- van Luijn, M. M., M. E. Chamuleau, et al. (2012). "Tumor immune escape in acute myeloid leukemia: Class II-associated invariant chain peptide expression as result of deficient antigen presentation." Oncoimmunology **1**(2): 211-213.
- van Rhee, F. and H. J. Kolb (1995). "Donor leukocyte transfusions for leukemic relapse." Curr Opin Hematol **2**(6): 423-30.
- Van Tendeloo, V. F., A. Van de Velde, et al. (2009). "Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(31): 13824-9.
- Vardiman, J. W., N. L. Harris, et al. (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms." Blood **100**(7): 2292-302.
- Vardiman, J. W., J. Thiele, et al. (2009). "The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes." Blood **114**(5): 937-51.
- Velez-Ruelas, M. A., G. Martinez-Jaramillo, et al. (2006). "Hematopoietic changes during progression from Fanconi anemia into acute myeloid leukemia: case report and brief review of the literature." Hematology **11**(5): 331-4.
- Vesely, M. D., M. H. Kershaw, et al. (2011). "Natural innate and adaptive immunity to cancer." Annu Rev Immunol **29**: 235-71.
- Vignali, D. A., L. W. Collison, et al. (2008). "How regulatory T cells work." Nat Rev Immunol **8**(7): 523-32.
- Vincent, K., D. C. Roy, et al. (2011). "Next-generation leukemia immunotherapy." Blood **118**(11): 2951-9.
- Vivier, E., D. H. Raulet, et al. (2011). "Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells." Science **331**(6013): 44-9.
- Wang, R.-F. (2001). "The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4⁺ T cells in antitumor immunity." Trends Immunol **Vol. 22**(No. 5): 269-276.
- Wang, R.-F. (2003). "Identification of MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4⁺ T cells." Methods **29**(3): 227-35.
- Weiden, P. L., N. Flournoy, et al. (1979). "Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts." N Engl J Med **300**(19): 1068-73.
-

- Wilhelm, M. and K. Wilms (2000). "Akute Leukämien." Thieme Verlag (2. Auflage) **8**(Internistische Onkologie): 362-366.
- Wu, C. H., J. Gordon, et al. (2002). "Proteinase-3, a serine protease which mediates doxorubicin-induced apoptosis in the HL-60 leukemia cell line, is downregulated in its doxorubicin-resistant variant." Oncogene **21**(33): 5160-74.
- Xydia, M., Y. Ge, et al. (2010). "CD40L co-stimulation from CD8+ to CD4+ effector memory T cells supports CD4+ expansion." Immunol Cell Biol **89**(6): 670-80.
- Yaguchi, T., H. Sumimoto, et al. (2011). "The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies." Int J Hematol **93**(3): 294-300.
- Yang, L., Y. Han, et al. (2007). "A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story." Leukemia **21**(7): 1603.
- Yin, C. C., L. J. Medeiros, et al. (2010). "Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms--comments on the 2008 WHO classification." Int J Lab Hematol **32**(5): 461-76.
- Yong, A. S., K. Rezvani, et al. (2007). "High PR3 or ELA2 expression by CD34+ cells in advanced-phase chronic myeloid leukemia is associated with improved outcome following allogeneic stem cell transplantation and may improve PR1 peptide-driven graft-versus-leukemia effects." Blood **110**(2): 770-5.
- Zhou, D., R. Srivastava, et al. (2006). "High throughput analysis of TCR-beta rearrangement and gene expression in single T cells." Lab Invest **86**(3): 314-21.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." Blood **112**(5): 1557-69.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2010). "Heterogeneity and plasticity of T helper cells." Cell Res **20**(1): 4-12.
- Zirlik, K. M., D. Zahrieh, et al. (2006). "Cytotoxic T cells generated against heteroclitic peptides kill primary tumor cells independent of the binding affinity of the native tumor antigen peptide." Blood **108**(12): 3865-70.

Anhang-I

A) PRAME Vektorkarte



PRAME CDS (Orientierung: 5' → 3')

```

ATGGATCCAATGGAACGAAGGCGTTTTGTGGGGTTCCATT CAGAGCCGATACATCAGCATGAGTGTGTGGACA
AGCCCACGGAGACTTGTGGAGCTGGCAGGGCAGAGCCTGCTGAAGGATGAGGCCCTGGCCATTGCCGCC
TGGAGTTGCTGCCCAGGGAGCTCTTCCC GCCACTCTTCATGGCAGCCTTTGACGGGAGACACAGCCAGACC
CTGAAGGCAATGGTGCAGGCCTGGCCCTTCACTGCCTCCCTCTGGGAGTGCTGATGAAGGGACAACATCT
TCACCTGGAGACCTTCAAAGCTGTGCTTGATGGACTTGATGTGCTCCTTGCCCAGGAGGTTCCGCCCCAGGA
GGTGAAACTTCAAGTGCTGGATTTACGGAAGA ACTCTCATCAGGACTTCTGGACTGTATGGTCTGGAAACA
GGGCCAGTCTGTACTCATTTCAGAGCCAGAGGCAGCTCAGCCCATGACAAAGAAGCGAAAAGTAGATGGT
TTGAGCACAGAGGCAGAGCAGCCCTTCATTCCAGTAGAGGTGCTCGTAGACCTGTTCCCTCAAGGAAGGTGC
CTGTGATGAATTGTTCTCCTACCTCATTGAGAAAGTGAAGCGAAAGAAAAATGTACTACGCCTGTGCTGTAAG
AAGCTGAAGATTTTTGCAATGCCCATGCAGGATATCAAGATGATCCTGAAAATGGTGCAGCTGGACTCTATTG
AAGATTTGGAAGTGACTTGACCTGGAAGCTACCCACCTTGGCGAAATTTCTCCTTACCTGGGCCAGATGAT
TAATCTGCGTAGACTCCTCCTCTCCACATCCATGCATCTTCTACATTTCCCGGAGAAGGAAGAGCAGTAT
ATCGCCAGTTACCTCTCAGTTCCTCAGTCTGCAGTGCCTGCAGGCTCTCTATGTGGACTCTTTATTTTTCC
TTAGAGCCGCCTGGATCAGTTGCTCAGGCACGTGATGAACCCCTTGAAACCCTCTCAATAACTA ACTGCC

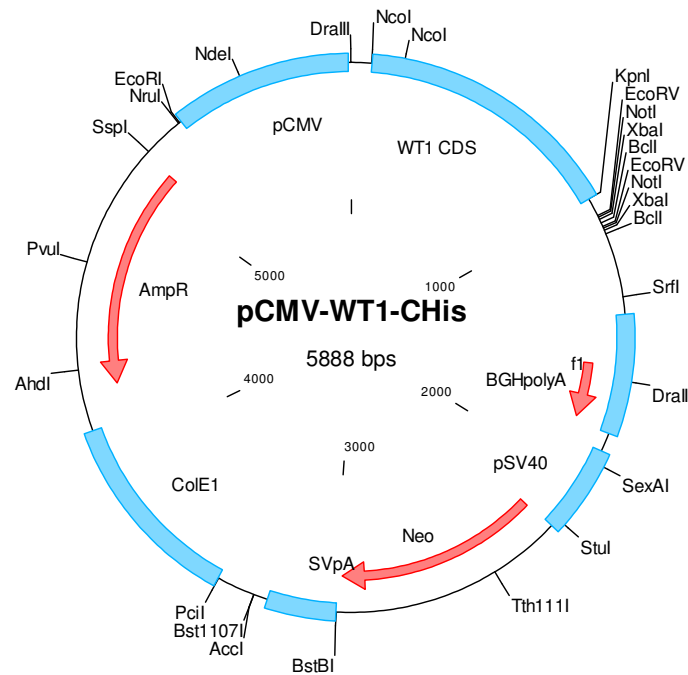
```

GGCTTTTCGGAAGGGGATGTGATGCATCTGTCCCAGAGTCCCAGCGTCAGTCAGCTAAGTGTCCCTGAGTCTA
AGTGGGGTTCATGCTGACCGATGTAAGTCCCGAGCCCCTCCAAGCTCTGCTGGAGAGAGCCTCTGCCACCCT
CCAGGACCTGGTCTTTGATGAGTGTGGGATCACGGATGATCAGCTCCTTGCCCTCCTGCCTTCCCTGAGCCA
CTGCTCCCAGCTTACAACCTTAAGCTTCTACGGGAATTCCATCTCCATATCTGCCTTGACAGAGTCTCCTGCAG
CACCTCATCGGGCTGAGCAATCTGACCCACGTGCTGTATCCTGTCCCCTGGAGAGTTATGAGGACATCCAT
GGTACCCTCCACCTGGAGAGGCTTGCCTATCTGCATGCCAGGCTCAGGGAGTTGCTGTGTGAGTTGGGGCG
GCCAGCATGGTCTGGCTTAGTGCCAACCCCTGTCTCACTGTGGGGACAGAACCTTCTATGACCCGGAGC
CCATCCTGTGCCCTGTTTCATGCCTAACCAGATCTGCAGCTGGTACCACCATCATCATCACCATTAA

PRAME-translatierte Proteinsequenz

Met D P Met E R R R L W G S I Q S R Y I S Met S V W T S P R R L V E L A G Q S L L K D E A L A I A A L E L L
P R E L F P P L F Met A A F D G R H S Q T L K A Met V Q A W P F T C L P L G V L Met K G Q H L H L E T F K
A V L D G L D V L L A Q E V R P R R W K L Q V L D L R K N S H Q D F W T V W S G N R A S L Y S F P E P E
A A Q P Met T K K R K V D G L S T E A E Q P F I P V E V L V D L F L K E G A C D E L F S Y L I E K V K R K K
N V L R L C C K K L K I F A Met P Met Q D I K Met I L K Met V Q L D S I E D L E V T C T W K L P T L A K F S P
Y L G Q Met I N L R R L L L S H I H A S S Y I S P E K E E Q Y I A Q F T S Q F L S L Q C L Q A L Y V D S L F F
L R G R L D Q L L R H V M Met N P L E T L S I T N C R L S E G D V Met H L S Q S P S V S Q L S V L S L S G V
Met L T D V S P E P L Q A L L E R A S A T L Q D L V F D E C G I T D D Q L L A L L P S L S H C S Q L T T L S
F Y G N S I S I S A L Q S L L Q H L I G L S N L T H V L Y P V P L E S Y E D I H G T L H L E R L A Y L H A R L
R E L L C E L G R P S Met V W L S A N P C P H C G D R T F Y D P E P I L C P C F Met P N Q I C S W Y H H H
H H H Stop

B) WT1 Vektorkarte



WT1 CDS (Orientierung: 5' → 3')

```

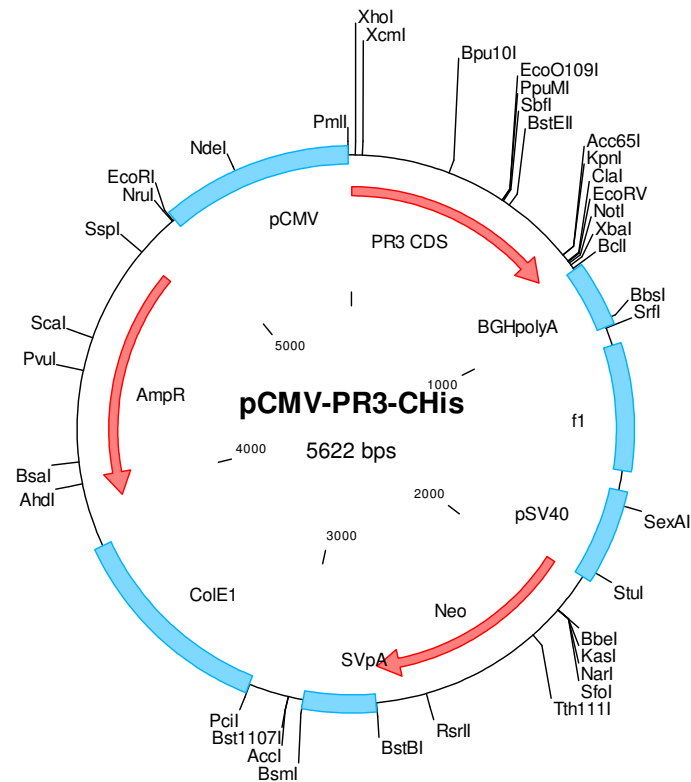
ATGGAGAAGGGTTACAGCACGGTCACCTTCGACGGGACGCCAGCTACGGTCACACGCCCTCGCACCATG
CGGCGCAGTTCCCAACCACTCATTCAAGCATGAGGATCCCATGGGCCAGCAGGGCTCGCTGGGTGAGCA
GCAGTACTCGGTGCCGCCCGGTCTATGGCTGCCACACCCACCGACAGCTGCACCGGCAGCCAGGCT
TTGCTGCTGAGGACGCCCTACAGCAGTGACAATTTATACCAAATGACATCCCAGCTTGAATGCATGACCTGG
AATCAGATGAACTTAGGAGCCACCTTAAAGGGAGTTGCTGCTGGGAGCTCCAGCTCAGTGAAATGGACAGAA
GGGCAGAGCAACCACAGCACAGGGTACGAGAGCGATAACCACACAACGCCCATCCTCTGCGGAGCCCAATA
CAGAATGCACACGCACGGTGTCTTCAGAGGCATTGAGGATGTGCGGCGTGTGCCTGGAGTAGCCCCGACTC
TTGTACGGTCGGCATCTGAGACCAGTGAGAAACGCCCTTCATGTGTGCTTACCCAGGCTGCAATAAGAGAT
ATTTAAGCTGTCCCACTTACAGATGCACAGCAGGAAGCACACTGGTGAGAAACCATACCAGTGTGACTTCA
AGGACTGTGAACGAAGGTTTTCTCGTTCAGACCAGCTCAAAGACACCAAAGGAGACATACAGGTGTGAAAC
CATTCCAGTGTAACCTTGTGTCAGCGAAAGTTCTCCCGGTCCGACCACCTGAAGACCCACACCAGGACTCATA
CAGGTGAAAAGCCCTTACAGCTGTGCGGTGGCCAAGTTGTCAGAAAAAGTTTGCCCGGTGAGATGAATTAGTCC
GCCATCACAAACATGCATCAGAGAAACATGACCAAACCTCCAGCTGGCGCTTAGGTACCCCGAGCAGGGCCCC
GCAGATGACCCAGGAGAAGGGCACCATCATCATCACCATTAA

```

WT1-translatierte Proteinsequenz

Met E K G Y S T V T F D G T P S Y G H T P S H H A A Q F P N H S F K H E D P Met G Q Q G S L G E Q Q Y S
V P P P V Y G C H T P T D S C T G S Q A L L L R T P Y S S D N L Y Q Met T S Q L E C Met T W N Q Met N L
G A T L K G V A A G S S S S V K W T E G Q S N H S T G Y E S D N H T T P I L C G A Q Y R Met H T H G V F
R G I Q D V R R V P G V A P T L V R S A S E T S E K R P F Met C A Y P G C N K R Y F K L S H L Q Met H S R
K H T G E K P Y Q C D F K D C E R R F S R S D Q L K R H Q R R H T G V K P F Q C K T C Q R K F S R S D H
L K T H T R T H T G E K P F S C R W P S C Q K K F A R S D E L V R H H N Met H Q R N Met T K L Q L A L R
Y P E Q G P A D D P G E G H H H H H H Stop

C) PR3 Vektorkarte



PR3 CDS (Orientierung: 5' → 3')

```

ATGGATCCGAGCTCGAGAATGGCTCACCGGCCCCCCAGCCCTGCCCTGGCGTCCGTGCTGCTGGCCTTGC
TGCTGAGCGGTGCTGCCGAGCTGCGGAGATCGTGGGCGGGCAGCAGGCGCAGCCACACTCCCGGCCCT
ACATGGCCTCCCTGCAGATGCGGGGGAACCCGGGCAGCCACTTCTGCGGAGGCACCTTGATCCACCCCAG
CTTCGTGCTGACGGCCGCGCACTGCCTGCGGGACATACCCCAGCGCCTGGTGAACGTGGTGTCTCGGAGCC
CACAACGTGCGGACGCAGGAGCCCACCCAGCAGCACTTCTCGGTGGCTCAGGTGTTTCTGAACAACCTACGA
CGCGGAGAACAACCTGAACGACGTTCTCCTCATCCAGCTGAGCAGCCCAGCCAACCTCAGTGCCTCCGTCCG
CCACAGTCCAGCTGCCACAGCAGGACCAGCCAGTGCCCCACGGCACCCAGTGCCTGGCCATGGGCTGGGG
CCGCGTGGGTGCCACGACCCCCCAGCCCAGGTCCTGCAGGAGCTCAATGTCACCGTGGTACCTTCTTCT
GCCGGCCACATAACATTTGCATTTTCGTCCCTGCCGCAAGGCCGGCATCTGCTTCGGAGACTCAGGTGGC
CCCCTGATCTGTGATGGCATCATCCAAGGAATAGACTCCTTCGTGATCTGGGGATGTGCCACCCGCCTTTTC
CCTGACTTCTTACGCGGGTAGCCCTCTACGTGGACTGGATCCGTTCCACGCTGCGCCGTGTGGAGGCCAA
GGGCCGCCCTGGTACCACCATCATCATCACCATAA

```

PR3-translatierte Proteinsequenz

Met DPSSRMet AHRPPSPALASVLLALLLSGAARAAEIVGGHEAQPHSRPYMet AS
LQMet RGNPGSHFCGGTLIHPSFVLTA AHCLRDIPQRLVNVVLGAHNVRTQEPT
QQHFSVAQVFLNNYDAENKLN DVLLIQLSSPANLSASVATVQLPQQDQPVPHG
TQCLAMet GWGRVGAHDPPAQVLQELNVTVVTFFCRPHNICTFVPRRKAGICFG
DSGGPLICDGIIQGIDSFVIWGCATRLFPDFTRVALYVDWIRSTLRRVEAKGR
PWYHHHHHH Stop

AAGAGGCGGAGTCCAACCTGCGCAAGGCCAAGCAGGGTTACGTGCAGCGCTGCGAGGACCACGACAAGGC
TCGCTTCTCGTGGCCAAGGCGGAGGAGGAGCAGGCTGGCAGCGCGCCGGGAGCAGGCAGCACGGCCAC
CAAGACCCTGGACAAGCGGCGGCGGCTGGAGGAGGAGGCCAAGAACAAGGCGGAGGAAGCTATGGCCAC
CTACCGCACCTGCGTGGCCGACGCGAAGACGCAGAAGCAGGAGCTGGAGGATACCAAGGTGACGGCGCTG
CGGCAGATCCAGGAGGTCATCCGGCAGAGCGACCAACCATCAAGTCGGCCACGATCTCCTACTACCAGAT
GATGCATATGCAGACGGCGCCGCTGCCCGTGCACCTCCAGATGCTGTGTGAGAGCAGCAAGCTGTATGACC
CAGGCCAGCAGTACGCTCCACGTGCGCCAGCTGCAGCGGGACCAGGAGCCCGATGTGCACTACGACTT
TGAGCCCCACGTCTCCGCCAACGCCTGGTCCCCGTCATGCGTGCCCGGAAGAGCAGCTTCAACGTGAGT
GATGTGGCGCGGCCGGAGGCTGCCGGGAGCCCCCAGAAGAAGGCGGGTGCCTGAGGGCACACCTGCC
AAGGACCACAGGGCCGGGCGAGGACACCAGGTTACAAGTCATGGCCGCTCTCGATCTCAGACTCGGACA
GTGGGCTGGACCCCGGCCCTGGCGCAGGGGACTTTAAGAAGTTCGAGCGGACGTCATCCAGTGGTACCAT
GTCGTCCACGGAGGAGCTGGTGGACCCAGACGGTGGAGCCGGGGCTTCAGCCTTGTAGCAGGCTGACCTC
AACGGCATGACCCCGAGCTGCCGGTGGCCGTGCCAGTGGACCGTTCCGCCACGAGGGGCTGTCCAAGG
CGGCCCGTACTCACCGGCTCCGGAAGCTCCGCACGCCCGCCAAGTGCCGCGAGTGCAACAGCTACGTCTA
CTTCCAGGGTGTGAGTGTGAAGAGTGTGCCTGGCCTGCCACAAGAAATGTCTGGAGACGCTGGCCATAC
AGTGCGGGCACAAGAAGCTGCAAGGCCGCTGCAGCTGTTCCGCCAGGACTTCAGCCACGCGGCCCGCAG
CGCCCCGACGGCGTGCCCTTCATCGTCAAGAAGTGCCTGCGAGATCGAGCGGCGGGCGCTGCGCACC
AAGGGCATCTACCGGGTCAATGGGGTAAAGACACGCGTGGAGAAGCTGTGCCAGGCCTTCGAGAACGGCA
AGGAGCTGGTTCGAGCTGTGCGAGGCCTCGCCCCACGACATCAGCAACGTCTCAAGCTCTACCTGCGTCAG
CTTCCCGAGCCGCTCATCTCCTTCCGCCTCTACCACGAGCTCGTAGGGCTGGCCAAGGACAGCCTGAAGGC
AGAGGCCGAGGCCAAGGCGGGCTCCCGGGGCGGCGAGGACGGCTCGGAGAGCGAGGCAGTGGCGGTGG
CCCTGGCAGGTCGGCTGCGGGAGCTCCTGCGGGACCTGCCGCCTGAGAACCGGGCCTCGCTGCAGTACCT
GCTGCGTCACCTACGCAGGATCGTGGAGGTGGAGCAGGACAACAAGATGACCCCCGGGAACCTGGGCATC
GTGTTCCGGGCCACGCTGCTTCGGCCACGGCCACCGAGGCCACCGTGTCCCTCTCCTCCCTGGTGGATTA
TCCCCATCAGGCCCGGTCATCGAGACTCTCATCGTCCACTACGGCCTGGTCTTCGAGGAGGAGCCGGAGG
AGACCCCCGGGGCCAGGACGAGTCATCCAACCAGCGAGCTGAGGTAGTCCAGGTGCCGTACCTGGA
GGCGGGCGAGGCGGTGGTCTACCCGCTGCAGGAGGCGGCGGCGGACGGGTGCAGAGAATCCCGAGTTGT
GTCCAACGATTTCGACTCGGACCTAGAGGAGGCCCTCCGAGCTGCTGTCCCTCATCGGAGGCCAGTGCCCTG
GGCCACCTCAGCTTCTGGAGCAGCAGAGCGAGGCCAGCCTAGAGGTGGCTTCTGGCAGCCACAGCG
GCAGTGAGGAGCAGCTGGAGGCCACAGCCCGGAGGACGGGGACGGGGACGAGGACGGCCCGGCCAG
CAGCTCTCAGGATTCAACACCAACCAGTCCAACAACGTGCTGCAGGCCCACTGCCCCCATGAGGCTCCG
TGGCGGGCGGATGACACTGGGCTCCTGCAGGGAAAGGCAGCCGGAATTCGTGCAGATCTGCAGCTGGTAC
CACCATCACCATCACCATTAA

HA1-translatierte Proteinsequenz

Met D P Met F S R K K R E L Met K T P S I S K K N R A G S P S P Q P S G E L P R K D G A D A V F P G P S L
E P P A G S S G V K A T G T L K R P T S L S R H A S A A G F P L S G A A S W T L G R S H R S P L T A A S P
G E L P T E G A G P D V V E D I S H L L A D V A R F A E G L E K L K E C V L R D D L L E A R R P R A H E C
L G E A L R V Met H Q I I S K Y P L L N T V E T L T A A G T L I A K V K A F H Y E S N N D L E K Q E F E K A L
E T I A V A F S S T V S E F L Met G E V D S S T L L A V P P G D S S Q S Met E S L Y G P G S E G T P P S L E
D C D A G C L P A E E V D V L L Q R C E G G V D A A L L Y A K N Met A K Y Met K D L I S Y L E K R T T L E
Met E F A K G L Q K I A H N C R Q S V Met Q E P H Met P L L S I Y S L A L E Q D L E F G H S Met V Q A V G
T L Q T Q T F Met Q P L T L R R L E H E K R R K E I K E A W H R A Q R K L Q E A E S N L R K A K Q G Y V Q

RCEDHDKARFLVAKAEQQAGSAPGAGSTATKTLDKRRRLEEEAKNKAEAA Met
ATYRTC VADAKTQKQELEDTKVTALRQIQEVIRQSDQTIKSATISYYQ Met Met H
Met QTAPLPVHFQ Met LCESSKLYDPGQQYASHVRQLQRDQEPDVHYDFEPHVS
ANAWSPV Met RARKSSFNVSDVARPEAAGSPPEEGGCTEGTPAKDHRAGRGH
QVHKSWPLSISDSDSGLDPGPGAGDFKKFERTSSSGT Met SSTEELVDPDGA
GASAFEQADLNG Met TPELPVAVPSGPFRRHEGLSKAARTHRLRKLRTPAKCREC
NSYVYFQGAEECECCLACHKKCLETLAIQCGHKKLQGRLQLFGQDFSHAARSA
PDGVPPFIVKKCVCEIERRALRTKGIYRVNGVKTRVEKLCQAFENGKELVELSQA
SPHDISNVLKLKLYLRQLPEPLISFRLYHELVLAKDSLKAEAEAKAASRGRQDGS
ESEAVAVALAGRLRELLRDLPPENRASLQYLLRHLRRIVEVEQDNK Met TPGNL
GIVFGPTLLRPRPTEATVSLSSLVDYPHQARVIETLIVHYGLVFEEPEETPGG
QDESSNQRAEVVVQVPYLEAGEAVVYPLQEAADGCRESRVVSNDSDSL E
ASELLSSSEASALGHLSFLEQQQSEASLEVASGSHSGSEEQLEATAREDDGD
EDGPAQQLSGFNTNQSNVQLQAPLPP Met RLRGGR Met TLGSCRERQPEFVQIC
SWYHHHHHH Stop

Publikationen und Kongressbeiträge

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Publikationen und Kongressbeiträge erstellt:

Originalartikel:

- (1) Steger B, Milosevic S, Doessinger G, Reuther S, Liepert A, Braeu M, Schick J, Vogt V, Schuster F, Kroell T, Busch DH, Borkhardt A, Kolb HJ, Tischer J, Buhmann R, Schmetzer H. „CD4+ and CD8+T-cell reactions against leukemia-associated- or minor-histocompatibility-antigens in AML-patients after allogeneic SCT“. Immunobiology. 2013 Oct 27. pii: S0171-2985(13)00191-5. doi: 10.1016/j.imbio.2013.10.008. [Epub ahead of print]
- (2) Steger B, Schmetzer H, Floro L, Kroell T, Tischer J, Kolb H-J, Buhmann R. “Clinical relevance of mRNA overexpression of the leukaemia associated antigens (LAA) WT1, PRAME and PR1 in patients (pts) with Acute Myeloid Leukaemia (AML): an analysis of (co)expressions in different cellular compartments, subtypes or stages” (Manuskript kurz vor Einreichung).
- (3) Steger B, Buhmann R, Grabrucker C, Liepert A, Kremser A, Dreyssig J, Kroell T, Schmid C, Tischer J, Schuster F, Kaiser S, Schweiger C, Köhne H, Kolb H-J, Schmetzer H. “Dendritic cells can act as amplifiers of leukaemia-lysis or leukaemia-stimulation: a contribution to a refined functional analysis of partners involved in the mediation of anti-leukemic reactions” (in Vorbereitung).

Buchbeitrag:

- (1) Taner Demirer, “New advances in Stem Cell Transplantation”, in Tech (2012)
“The T-cells’ Role in Antileukemic Reactions -Perspectives for Future Therapies” H. Schmetzer and C. Schmid
Part 1: “Basic Aspects of Stem Cell Transplantation” Chapter 4, p 59-82
3.1 T-cell addressing known (leukemia-) specific antigens
3.1.2 LAA-specific CD8+ T-cells (Group leaders: Busch, Borkhardt, Kolb;
Scientists: Doessinger, Steger, Schuster)
3.1.3 LAA-specific CD4+ T-cells (Group leader: Buhmann, Milosevic, Kolb,
Schmetzer; Scientists: Steger)

Kongressbeiträge:

- (1) B. Steger, S. Milosevic, G. Doessinger, S. Reuther, A. Liepert, M. Zerwes, J. Schick, V. Vogt, F. Schuster, T. Kroell, D. Busch, A. Borkhardt, H.J. Kolb, J. Tischer, R. Buhmann, H. Schmetzer. „CD4+ and CD8+ T-cell reactions against leukaemia-associated or minor histocompatibility antigens in AML patients after allogeneic SCT“. Bone Marrow Transplantation 47, supp1, abstr. 884. Poster (2012).

- (2) B. Steger, L. Floro, T. Kroell, J. Tischer, H.J. Kolb, R. Buhmann, H. Schmetzer. „Clinical relevance of mRNA overexpressions of the leukaemia-associated antigens WT1, PRAME und PR1 in patients with acute myeloid leukaemia: an analysis of (co)expressions in different cellular compartments, subtypes or stages“. Bone Marrow Transplantation 47, supp1, abstr. 885. Poster (2012)
 - (3) B. Steger, S. Milosevic, G. Doessinger, S. Reuther, A. Liepert, M. Zerwes, J. Schick, V. Vogt, F. Svchuster, T. Kroell, D. Busch, A. Borkhardt, H.J. Kolb, J. Tischer, R. Buhmann, H. Schmetzer. “CD4+ and CD8+ T-cell reactions against leukaemia-associated or minor histocompatibility antigens in AML patients after allogeneic SCT”. 14. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Herrsching, p55: Poster (2012).
 - (4) H. Schmetzer, L. Floro, T. Kroell, J. Tischer, HJ Kolb, R. Buhmann, B. Steger. „Clinical Relevance of m-RNA overexpressions of leukaemia associated antigens (LAA) WT1, PRAME and PR1 in patients (pts) with acute myeloid leukaemia (AML): an analysis of (co)expressions in different cellular compartments, subtypes or stages“. 14. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Herrsching, p51: Poster (2012).
 - (5) H. Schmetzer, B. Steger, D. Bund, A. Gallo, G. Doessinger, J. Schick, V. Vogt, C. Grabrucker, A. Liepert, M. Freudenreich, S. Milosevic, J. Tischer, S. Reuther, F. Schuster, D. Busch, J. Adamski, A. Borkhardt, HJ. Kolb, C. Schmid, R. Buhmann. „The T-cells’ role in anti-leukemic reactions and perspectives for future therapies of acute myeloid leukemia (AML)“. 13. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Herrsching, p55: Poster (2011).
 - (6) Helga Schmetzer, Friedhelm R. Schuster, Raymund Buhmann, Markus Freudenreich, Georg Doessinger, Anja Liepert, Christine Grabrucker, Brigitte Steger, Susanne Reuther, Andreas Kremser, Julia Loibl, Dorothea Fischbacher, Christoph Schmid, Tanja Kroell, Dirk Busch, Arndt Borkhardt, Hans-Jochem Kolb. „Immunotherapy of Acute MYELOID LEUKEMIA: ANTI-LEUKEMIC EFFECTS by Unprimed and Primed, Selected or Unselected Effector T-CELLS“. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2009 114: Abstract 5122 (2009).
 - (7) Brigitte Steger, Raymund Buhmann, Helga Schmetzer, H-J. Kolb. „Characterisation of three tumor associated antigens as a possible target for immunotherapy“. 11. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Herrsching, p66: Poster (2009).
 - (8) Steger B., Buhmann R., Schmetzer H., Kolb H-J. „Characterisation of three TAAs as a possible target for immunotherapy“. Onkologie 2008;31:(Suppl. 4)67. Poster (2008)
-

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNGSteger, Brigitte

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchungen zur antigenspezifischen CD4⁺ Immunantwort bei der akuten myeloischen Leukämie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum_____
Unterschrift Doktorandin/Doktorand

DANKSAGUNG

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei allen, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben, recht herzlich bedanken! Sollte ich namentlich jemanden vergessen haben, ihr seid in meinem Herzen.

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Helga Schmetzer für die Übernahme des Projektes und der Vertretung dieser Arbeit vor der medizinischen Fakultät der LMU München. Ohne Ihre Unterstützung, aufmunternden Worte und vor allem ihrer fachlichen Anregungen wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Sie ist auch in vielen privaten Belangen ein Vorbild. DANKE, dass du durchgehalten und mich unterstützt hast!

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. H.-J. Kolb für die Möglichkeit dieser Arbeit und der Mitarbeit am SFB TR36.

Dank geht an Dr. R. Buhmann für seine Ideen zur Entwicklung des CD4⁺ Projektes.

Dr. Slavoljub Milosevic gilt mein großer Dank für die Unterstützung bei der Umsetzung des CD4⁺ Projektes, insbesondere bei Fragen zu Klonierungen und zu molekularbiologischen Themen.

Im Rahmen dieses Projektes möchte ich mich noch bei den Kooperationspartnern des SFB TR36, Herrn Prof. Dr. D. Busch (TU München), Herrn Prof. Dr. A. Borkhardt (Universitätsklinikum Düsseldorf), Herrn Dr. F. Schuster (Universitätsklinikum Düsseldorf), Herrn cand. Dr. G. Dössinger (TU München) sowie Frau cand. Dr. S. Reuther (Universitätsklinikum Düsseldorf) bedanken.

Vielen Dank an Dr. Andreas Moosmann für die Unterstützung bei der Generierung von mini-LCLs. Vielen Dank an Barbara Mosetter für die Unterstützung am Chromfreisetzungstest. Vielen Dank an Tanja Kröll für die Unterstützung bei Fluorolyse Assay und das offene Ohr bei Rückfragen.

Einen ganz herzlichen Dank noch an Dr. Elfriede Nössner für die fachlichen Anregungen im SFB TR36 Graduierten Kolleg.

Bedanken möchte ich mich noch bei Dr. Marion Bräu für die fachlichen sowie die aufmunternden Gespräche.

Mein Dank geht auch noch an Dr. D. Bund und Dr. H. Adler für die Unterstützung in fachlichen Fragen.

Bedanken möchte ich mich noch bei Frau OÄ Dr. J. Tischer für die Aufklärung der Patienten im Rahmen der Studie und bei dem Pflegepersonal der KMT-Ambulanz. Ein besonderer Dank geht noch an alle Patienten, die sich bereit erklärten, Blut zu spenden und somit diese Arbeit erst ermöglichten.

Allen Mitarbeiter der KKG-HZT, IMI und LMU danke ich für die freundschaftliche sowie professionelle Atmosphäre.

Ein besonderer Dank geht noch an Elke, alle Freunde und Bekannte, die sich manchmal unfreiwillig mit meinem Thema auseinandersetzen mussten und mich vor allem seelisch unterstützt haben.

Am Ende möchte ich mich noch bei meinem Mann bedanken, für die liebevolle Unterstützung. Du warst mir ein wichtiger Rückhalt, hattest stets ein offenes Ohr für meine Sorgen, ohne Dich wäre es nicht möglich gewesen.

...DANKE!
