Optimierte biologische Aktivität allo- und tumorreaktiver $CD8^+$ T-Lymphozyten im humanisierten Mausmodell durch IL-15-Superagonisten

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Andreas Mades

geb. am 31.08.1984 in Bingen am Rhein

Mainz, 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2015

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis IV

Tabellenverzeichnis V

1 Zusammenfassung 1

2 Einleitung 2

2.1 Einführung in das Immunsystem 2
2.1.1 Entwicklung und Reifung von T-Zellen 2
2.1.2 Aufbau und Funktion des Haupthistokompatibilitätskomplexes 3
2.1.2.1 MHC-Klasse-I 4
2.1.2.2 MHC-Klasse-II 5
2.1.3 Antigenerkennung durch den T-Zell-Rezeptor 5
2.1.4 T-Zellaktivierung und Effektormechanismen 6
2.1.5 T-Zell-Differenzierung 8
2.2 Biologie von Interleukin-15 10
2.2.1 Struktur und Funktion von IL-15 10
2.2.2 Aufbau und Signaltransduktion des IL-15-Rezeptors 12
2.2.3 IL-15-Superagonisten 13
2.3 Therapiemethoden gegen maligne Neoplasien 14
2.3.1 Krebsentstehung und Risikofaktoren 14
2.3.2 Klassische Behandlungsmethoden und Immuntherapie 15
2.3.3 Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern 16
2.3.4 Zelluläre Immuntherapie 16
2.3.4.1 Transplantation hämatopoetischer Stammzellen 17
2.3.4.2 Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung 18
2.3.4.3 Reprogrammierung von T-Zellen durch exogene TCRs 18
2.3.4.4 Chimäre Antigenrezeptoren 19
2.3.5 Zytokine in der Immuntherapie 20
2.3.5.1 IFN-α 20
2.3.5.2 Interleukin-2 21
2.3.5.3 Interleukin-7 21
2.3.5.4 Interleukin-15 21
2.4 Präklinische Mausmodelle in der Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien 22
2.5 Zielsetzung 23

3 Material und Methoden 25

3.1 Bezugsquellen von Geräten und Reagenzien 25
3.1.1 Laborgeräte 25
3.1.2 Chemikalien 26
3.1.3 Verbrauchsmaterial 27
3.1.4 Enzyme, Kits und Reagenzien für die Molekularbiologie 28
3.1.5 Medien, Zytokine und Antibiotika für die Zellkultur 28
3.1.6 Software 29
3.1.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie 29
3.1.8 Antikörper für IFN-γ-ELISpot 29

3.1.9 Antikörper für Westernblot 29
3.1.10 Oligonukleotide 30
3.2 DNA-Aufreinigung und Analyse 30
3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion 30
3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese 31
3.2.3 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen 32
3.2.4 Klenow-Reaktion 32
3.2.5 Dephosphorylierung endständiger Phosphatgruppen 32
3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten 33
3.2.7 Herstellung chemokompetenter *E. coli* 33
3.2.8 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* 34
3.2.9 DNA-Amplifikation und Isolation 35
3.3 Proteinanalyse und rekombinante Proteinexpression 35
3.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese 35
3.3.2 Westernblot 36
3.3.3 Rekombinante Herstellung von IL-15 37
3.3.3.1 Expression in *E. coli* 38
3.3.3.2 Aufreinigung und Rückfaltung von IL-15 und IL-15N72D aus Einschlusskörperchen 38
3.4 Herstellung von superagonistischen IL-15-Fusionsproteinen 39
3.4.1 IL-15-ELISA 40
3.4.2 Proteinbestimmung im BCA-Assay 40
3.4.3 Bioaktivitätsbestimmung von IL-15 und IL-15-Superagonisten 40
3.4.3.1 ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsassay 41
3.4.3.2 CellTiter 96-Assay 41
3.5 Zellkultur und zelluläre Analysen 41
3.5.1 Kultivierung, Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung von Zelllinien 41
3.5.1.1 HEK 293, HEK 293T und Expi293F 42
3.5.1.2 CHO 42
3.5.1.3 CTLL-2 43
3.5.1.4 M-07e 43
3.5.1.5 K562 und K562-A2 43
3.5.1.6 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen 44
3.5.2 Durchflusszytometrie 44
3.5.3 IFN-γ-ELISpot 45
3.5.4 PBMC-Aufreinigung aus Buffy-Coats 47
3.5.5 Isolierung von $CD8^{+}$ T-Zellen durch MACS 47
3.5.6 Generierung maturierter DCs aus Monozyten 48
3.5.7 RNA-Elektroporation in DCs 48
3.5.8 Bestrahlung von Zellen 49
3.5.9 Generierung antigenspezifischer T-Zellen 49
3.5.9.1 Generierung alloreaktiver T-Zellen gegen HLA-A*0201 49
3.5.9.2 Generierung AML-reaktiver T-Zellen 50
3.5.9.3 Generierung EBV-reaktiver T-Zellen mit T_{SCM}-Phänotyp 50
3.6 Arbeiten mit Versuchstieren 50
3.6.1 Ganzkörperbestrahlung 51
3.6.2 Blutentnahme an der Schwanzvene 51
3.6.3 Injektion von Zellsuspensionen und Zytokinlösungen 51
3.6.3.1 Intravenöse Injektion 51
3.6.3.2 Intraperitoneale Injektion 51

3.6.3.3 Subkutane Injektion 52
3.6.4 Chirurgische Organentnahme und Herstellung von Einzelzellsuspensionen 52
4 Ergebnisse 53
4.1 Rekombinante Herstellung von IL-15 und IL-15N72D 53
4.1.1 Design der Expressionsvektoren 53
4.1.2 Aufreinigung und Unterscheidung einzelner Chargen 54
4.1.3 Bestimmung von Ertrag und Reinheit 55
4.1.4 Bestimmung der Bioaktivität im CTLL-2-Proliferationsassay 56
4.2 Vergleich der Bioaktivitäten von IL-15 und IL-15N72D 57
4.2.1 *In vitro*-Proliferationsassay mit CTLL-2- und AML-reaktiven T-Zellen 57
4.2.2 Proliferation alloreaktiver $CD8^+$ T-Zellen im NSG-Mausmodell 58
4.3 Einfluss von IL-15 auf die Persistenz von antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen im NSG-Modell 60
4.3.1 Persistenz allo- und AML-reaktiver T-Zellen in NSG-Mäusen 60
4.3.2 Persistenz EBV-reaktiver T_{SCM} in NSG-Mäusen 61
4.4 Einfluss von IL-15 auf die Funktionalität alloreaktiver T-Zellen im NSG-HLA-A2/HHD-Modell 64
4.4.1 HLA-A2-Expression im peripheren Blut von NSG-HLA-A2/HHD-Mäusen 64
4.4.2 T-Zell-Engraftment und GvHD-Induktion 65
4.4.3 Phänotypische T-Zellanalyse 66
4.4.4 IFN-γ-Sekretion kultivierter und *ex vivo* isolierter $CD8^+$ T-Zellen 67
4.5 Herstellung und funktionelle Charakterisierung der IL-15-Fusionsproteine ILR-Ø, ILR-Fc und $ILR13^+$-Fc 68
4.5.1 Aufbau und Abfolge der Domänen 68
4.5.1.1 Herstellung von pEF4-ILR-Fc 69
4.5.1.2 Herstellung von pEF4-ILR-Ø 70
4.5.1.3 Herstellung von pEF4-$ILR13^+$-Fc 70
4.5.2 Ausbeute und Reinheit 71
4.5.2.1 Ertragssteigerung durch Kotransfektion mit SV40-LTA 71
4.5.2.2 Reinheit 72
4.5.3 Dimerisierungsverhalten 73
4.5.4 Bioaktivität im Proliferationsassay mit CTLL-2- und M-07e-Zellen 74
4.5.5 Bestimmung der Halbwertszeiten in murinem Serum 75
4.5.6 Einfluss von IL-15 und $ILR13^+$-Fc auf die Expression von NKG2D und PD-1 humaner $CD8^+$ T-Zellen 76
4.6 Einfluss von ILR-Fc auf T- und B-Zellen immunkompetenter Mäuse 77
4.6.1 B6-OT-1-Mäuse 77
4.6.2 BALB/c-Mäuse 79
4.7 Dosisabhängige Expansion von $CD8^+$ T-Zellen durch IL-15-Superagonisten in B6-OT-1-Mäusen 81
4.8 Einfluss von IL-15-Superagonisten auf humane T-Zellen im NSG-Modell 83
4.8.1 Wirkung von ILR-Fc in humanisierten Mäusen 83
4.8.2 Wirkung von IL-15-Superagonisten auf humane PBMCs im NSG-Modell 84
4.9 Einsatz von $ILR13^+$-Fc in therapeutischen Tumormodellen 87
4.9.1 AML-Xenograft-Leukämiemodell in NSG-Mäusen 87
4.9.2 Solides Ovarialkarzinom-Modell in NSG-Mäusen 89
5 Diskussion 93

5.1 Herstellung von IL-15 und IL15N72D 93
5.2 Herstellung superagonistischer IL-15-Fusionsproteine 95
5.3 Biologische Effekte von IL-15 und IL-15N72D 96
5.3.1 Optimierung von T-Zell-Effektorfunktionen durch IL-15 98
5.4 Mechanismen zur Erhöhung der Bioaktivität von IL-15-Superagonisten 100
5.4.1 Steigerung der Affinität zum IL-15Rβγ 100
5.4.2 Steigerung der IL-15-Halbwertszeit *in vivo* 103
5.5 Effekte von IL-15-Superagonisten auf murine und humane Leukozyten *in vivo* 104
5.6 IL-15-Superagonisten in präklinischen Tumormodellen 106
5.7 Klinische Einsatzmöglichkeiten von IL-15 und IL-15-Superagonisten 108

6 Literaturverzeichnis 110

7 Anhang 125

7.1 Plasmidkarten 125
7.2 Abkürzungsverzeichnis 127

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Haupthistokompatibilitätskomplexe I und II 4
Abbildung 2: Aufbau des T-Zell-Rezeptors und Interaktion mit dem MHC 6
Abbildung 3: Expressionsmuster der Differenzierungsmarker von T-Zellen 9
Abbildung 4: Strukturmodell von IL-15 im Komplex mit seinem α-Rezeptor 11
Abbildung 5: Vergleich des IL-2- und IL-15-Rezeptorkomplexes 13
Abbildung 6: Aminosäure-Alignment von IL-15 und IL-15N72D 54
Abbildung 7: Ertrag, Reinheit und Bioaktivität von IL-15 und IL-15N72D 56
Abbildung 8: Bioaktivität von IL-15 und IL-15N72D *in vitro* 58
Abbildung 9: Versuchsablauf zur Proliferation alloreaktiver T-Zellen im NSG-Modell 59
Abbildung 10: Wirkung von IL-15 und IL-15N72D auf $CD8^+$ T-Zellen *in vivo* 59
Abbildung 11: Versuchsablauf zur Persistenz allo- und AML-reaktiver T-Zellen in NSG-Mäusen 60
Abbildung 12: T-Zell-Frequenzen in NSG-Milzen nach adoptivem Tranfer mit und ohne IL-15 61
Abbildung 13: Versuchsablauf zur Persistenz EBV-reaktiver T_{SCM} in NSG-Mäusen 62
Abbildung 14: Phänotypische Analyse von kultivierten T-Zellen mit und ohne TWS119 63
Abbildung 15: Frequenzen TWS119-behandelter und unbehandelter $CD8^+$ T-Zellen *in vivo* unter Einfluss von IL-15 63
Abbildung 16: Nachweis der HLA-A2 Expression in NSG-HLA-A2/HHD-Mäusen 64
Abbildung 17: Versuchsablauf zu T-Zell-Engraftment und GvHD-Induktion 65
Abbildung 18: Entwicklung der Frequenzen HLA-A2-reaktiver T-Zellen im peripheren Blut von NSG-HLA-A2/HHD-Mäusen unter Einfluss von IL-15 66
Abbildung 19: Phänotypische Analyse *ex vivo* isolierter, HLA-A2-reaktiver T-Zellen 67
Abbildung 20: IFN-γ-ELISpot von kultivierten und *ex vivo* isolierten, HLA-A2-reaktiven $CD8^+$ T-Zellen 68
Abbildung 21: Zusammensetzung der Proteindomänen von ILR-Ø, ILR-Fc und ILR-13^+-Fc 69
Abbildung 22: Aminosäuresequenzen von ILR-Fc, ILR-Ø und ILR13^+-Fc 71
Abbildung 23: Ertrag von ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^+-Fc 72
Abbildung 24: Proteinstrukturen der IL-15-Superagonisten 73
Abbildung 25: Dimerisierung der IL-15-Superagonisten, SDS-PAGE/Westernblot 74
Abbildung 26: Bioaktivität von ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^+-Fc auf CTLL-2 und M-07e 75
Abbildung 27: Halbwertszeiten von IL15, ILR, ILR-Ø und ILR13^+-Fc in Mausserum 76

Abbildung 28: Expression von NKG2D und PD1 77
Abbildung 29: Auswirkungen von ILR-Fc auf T- und B-Zellen in B6-OT-1-Mäusen 78
Abbildung 30: Photographische Dokumentation der Splenomegalie in BALB/c Mäusen 80
Abbildung 31: Auswirkungen von ILR-Fc auf die endogenen T- und B-Zellfrequenzen im BALB/c-Modell 81
Abbildung 32: Splenomegalie nach Injektion superagonistischer IL-15-Fusionsproteine 82
Abbildung 33: Dosisabhängige Verschiebung der Frequenzen von T- und B-Zellen in B6-OT-1-Mäusen nach Injektion von IL-15-Superagonisten 83
Abbildung 34: Einfluss von ILR-Fc auf die T-Zellfrequenzen humanisierter NSG-Mäuse 84
Abbildung 35: T-Zellfrequenzen in NSG-Mäusen nach PBMC-Transfer und Injektionen von IL-15, ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc 86
Abbildung 36: Versuchsablauf zum AML-Xenograft-Leukämiemodell 88
Abbildung 37: ILR-Fc in einem therapeutischen AML Modell in NSG-Mäusen 89
Abbildung 38: Versuchsablauf zum soliden Ovarialkarzinommodell 90
Abbildung 39: Einfluss von ILR13^{+}-Fc auf das Wachstum solider OV-90-Tumore nach Transfer CLDN-CAR-transduzierter T-Zellen 91
Abbildung 40: Modell zur Wirkung von der IL15Rα-Sushi-Domäne auf den IL-15-Rezeptor 102
Abbildung 41: Plasmidkarte von pET19b-IL-15/IL-15N72D und pEF4-ILR-Fc 125
Abbildung 42: Plasmidkarte von pEF4-ILR-Fc und pEF4-ILR13^{+}-Fc 126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema für die PCR 31
Tabelle 2: PCR-Protokoll für Q5 Polymerase 31
Tabelle 3: Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese 31
Tabelle 4: Lösungen für die Herstellung chemokompetenter *E. coli* 34
Tabelle 5: Medien und Lösungen für die Bakterienkultur 34
Tabelle 6: Lösungen für die SDS-PAGE 35
Tabelle 7: Pipettierschema für SDS-PAGE-Gele 36
Tabelle 8: Lösungen für den Westernblot 37
Tabelle 9: Lösungen für die rekombinante Herstellung von IL-15 37
Tabelle 10: Zusammensetzung der Medien für die Zellkultur 44
Tabelle 11: Lösungen für IFN-γ-ELISpot 46
Tabelle 12: Kulturmedien für die DC-Generierung 48
Tabelle 13: Kulturmedien für die T-Zellkultur 49

1 Zusammenfassung

Interleukin 15 (IL-15) gilt als eines der vielversprechendsten zukünftigen Medikamente für die Krebstherapie. Es fördert die Proliferation, Persistenz und Funktion von $CD8^+$ T-Zellen und vermittelt zahlreiche Effekte, die es als überlegene Alternative für das derzeit in der Klinik verwendete IL-2 erscheinen lassen. Für den Einsatz von IL-15 in der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Protokoll zur Herstellung von rekombinantem IL-15 in *E. coli* etabliert. Das hergestellte Protein hatte eine zu kommerziellen Produkten vergleichbare Bioaktivität und begünstigte die Persistenz und Aktivität antigenspezifischer, humaner $CD8^+$ T-Zellen nach adoptivem Transfer in NSG-Mäuse, wobei unter anderem ein verstärkter Effekt auf T-Zellen mit T_{SCM}-Phänotyp beobachtet wurde. Um die Bioaktivität von IL-15 zu steigern, wurden superagonistische IL-15-Fusionsproteine entworfen und im Expi293-System hergestellt. Dabei wurde IL-15 kovalent mit der Sushi-Domäne der IL-15Rα-Kette und einer IgG1-Fc-Domäne verbunden, was zu einer gesteigerten Affinität der IL-15-Fusionsproteine zum physiologischen, niederaffinen IL-15Rβγ und zu einer stark erhöhten *in vivo*-Halbwertszeit in Mausserum führte. Die gesteigerte Affinität der IL-15-Superagonisten wurde durch die IL-15Rα-Sushi-Domäne vermittelt. Eine um 13 Aminosäuren verlängerte Sushi-Domäne zeigte im Vergleich zur normalen Form eine nochmals gesteigerte Affinität. Die längere Halbwertszeit wurde von der Sushi- und der IgG1-Fc-Domäne vermittelt. Die IgG1-Fc-Domäne verstärkte die Wirkung der Fusionsproteine zusätzlich über einen Mechanismus, der wahrscheinlich mit der Transpräsentation durch Fc-Rezeptoren zusammenhängt. Die gesteigerte Bioaktivität der IL-15-Superagonisten wurde im Tiermodell mit humanen und murinen T-Zellen bestätigt und $ILR13^+$-Fc wurde als das Fusionsprotein mit der höchsten Bioaktivität identifiziert. Im Vergleich zu anderen IL-15-Superagonisten vereint es alle derzeit bekannten Eigenschaften zur Bioaktivitätssteigerung in einem einzigen Protein. In therapeutischen Versuchen mit adoptivem Transfer tumorreaktiver T-Zellen konnte der Antitumoreffekt durch $ILR13^+$-Fc maßgeblich verstärkt werden. Als Modellsysteme wurden NSG-Mäuse mit humanen AML-Blasten oder einem soliden Ovarialkarzinom verwendet. Dabei wurden sowohl antigenspezifische als auch unspezifische Effekte beobachtet. Die unspezifischen Effekte wurden wahrscheinlich durch eine $ILR13^+$-Fc-vermittelte Überexpression von NKG2D, einem Rezeptor der angeborenen Immunantwort, auf den adoptiv transferierten T-Zellen vermittelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass IL-15 und die IL-15-Superagonisten die Proliferation und Reaktivität von $CD8^+$ T-Zellen im Rahmen der Immuntherapie fördern können. Aufgrund der hohen Bioaktivität und potenzierten Wirksamkeit könnten vor allem die IL-15-Superagonisten in Zukunft bei der Entwicklung effizienter Therapiemethoden eingesetzt werden und dadurch einen wichtigen Beitrag zu Behandlung von Krebs leisten.

2 Einleitung

2.1 Einführung in das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein hochkomplexes, biologisches System zur Abwehr von Krankheitserregern. Neben mechanischen und physiologischen Barrieren, wie zum Beispiel Epithelien und niedrige pH-Werte, die das Eindringen von Pathogenen in den Körper erschweren, besteht es aus spezialisierten Zellen und Proteinen, die aktiv werden, sobald Krankheitserreger in den Körper eindringen. In Vertebraten kann zwischen einem angeborenen und einem adaptiven Immunsystem unterschieden werden, wobei das angeborene Immunsystem evolutionsbiologisch früher entstand und auch in niedrigeren Taxa zu finden ist. Das angeborene Immunsystem unterscheidet nur grob zwischen verschiedenen Typen von Krankheitserregern und reagiert mit einer schnellen Immunantwort. Das adaptive Immunsystem reagiert hingegen langsamer, ist dafür aber in der Lage, eine hochspezifische Immunantwort auszulösen und ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. T-Zellen, die maligne Zellen direkt lysieren können sowie die Antikörper-produzierenden B-Zellen, sind bedeutende Bestandteile der adaptiven Immunantwort. Sie reagieren auf eine Vielzahl von Krankheits-assoziierten Strukturen, die als Antigene bezeichnet werden. Die Erkennung dieser Antigene erfolgt durch spezielle Rezeptoren, die als B- bzw. T-Zellrezeptoren bezeichnet werden. Der T-Zell-Rezeptor (engl.: *T cell receptor*, TCR) erkennt definierte Epitope im Kontext des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl.: *major histocompatibility complex*, MHC) und löst als Folge eine spezifische Immunantwort aus. Der Aufbau von TCR und MHC sowie die Prozesse der T-Zellreifung, Antigenpräsentation und Erkennung werden in den folgenden Abschnitten näher betrachtet.

2.1.1 Entwicklung und Reifung von T-Zellen

T-Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Die unreifen Zellen siedeln sich im Thymuscortex an und migrieren während eines mehrstufigen Reifungsprozesses durch die Medulla des Thymus. Sie exprimieren in ihrer frühsten Entwicklungsphase weder den CD3-Komplex noch einen TCR. Die Korezeptoren CD4 und CD8 sind ebenfalls nicht auf der Zelloberfläche präsent, weshalb die T-Zellen in diesem Entwicklungsstadium als doppelt negativ bezeichnet werden. Sie durchlaufen danach die Phasen der somatischen Rekombination, die sogenannte V(D)J-Rekombination. Bei diesem Prozess, der für die hohe Variabilität der TCRs innerhalb des T-Zellpools verantwortlich ist, werden die stark segmentierten TCR-Gensegmente zu einem funktionellen Gen zusammengesetzt.
Aus der zufälligen Kombination der V-, D- und J-Segmente (engl.: *variable, diversity and joining segments*), gepaart mit der ebenfalls zufälligen Insertionen von Nukleotiden und alternativem Spleißen, ergibt sich eine theoretische Anzahl von über 10^{20} verschiedenen

T-Zell-Rezeptoren [1, 2]. Schätzungen taxieren die Anzahl aller T-Zellen eines erwachsenen Menschen auf etwa 10^{12}, die Anzahl funktioneller und unterschiedlicher TCRs zu einem bestimmten Zeitpunkt wird auf etwa 10^8 geschätzt. Somit wird ein bestimmter TCR im Mittel von 10^4 T-Zellen exprimiert, die allesamt Nachkommen einer einzigen TRC-tragenden Vorläuferzelle sind [3, 4]. Nach erfolgreicher somatischer Rekombination exprimiert ein Großteil der T-Zellen einen TCR bestehend aus einer α- und einer β-Untereinheit. Die Zellen werden in diesem Stadium als doppelt positiv bezeichnet, da sie sowohl CD4 als auch CD8 exprimieren. Ein geringer Anteil der T-Zellen trägt statt eines α:β-TCRs einen γ:δ-TCR. Diese T-Zellpopulation findet sich später vermehrt in den Schleimhäuten des Darms und ist bei der Antigenerkennung nicht zwingend auf den MHC angewiesen [5]. Im weiteren Verlauf der Reifung durchlaufen die T-Zellen die positive und negative Selektion. Sie werden dabei auf ihre Affinität zum MHC und Autoreaktivität getestet. Ist die Affinität zum MHC zu gering, erhält die T-Zelle keine Überlebenssignale durch den TCR, was zur Einleitung der Apoptose führt (positive Selektion). Erkennt die T-Zelle hingegen hochaffin MHC-Komplexe, die körpereigene Peptide präsentieren, so ist sie autoreaktiv und wird ebenfalls durch Induktion der Apoptose eliminiert (negative Selektion). T-Zellen, die beide Selektionsprozesse überleben, entwickeln sich zu einfach positiven T-Zellen, die entweder CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche tragen.[6]. Sie werden über den Blutstrom sowie Milz und Lymphknoten in das Lymphsystem eingeschleust. Dort schließt sich eine weitere Reifungsphase an, nach deren Abschluss sie den Status naiver T-Zelle (T_N) erreicht haben [7].

2.1.2 Aufbau und Funktion des Haupthistokompatibilitätskomplexes

Die Antigenerkennung durch den TCR erfordert die Präsentation prozessierter Antigene im MHC, der beim Menschen historisch bedingt auch als HLA bezeichnet wird (engl.: *human leukocyte antigen*). Dadurch sind T-Zellen, im Gegensatz zu den Immunglobulinen, auch in der Lage, immunogene Epitope zu erkennen, die in Form des nativen Antigens sterisch unzugänglich sind. Es gibt zwei MHC-Klassen: MHC-Klasse-I wird ubiquitär von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. MHC-Klasse-II wird primär von professionellen, antigenpräsentierenden Zellen (engl.: *antigen presenting cells*, APCs), also Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert, kann aber als Reaktion auf inflammatorische Zytokine wie Interferon-γ (IFN-γ) auch auf Zelltypen nicht-hämatopoetischen Ursprungs induziert werden [8]. Beide MHC-Klassen weisen eine ähnliche räumliche Struktur auf, unterscheiden sich jedoch in ihrem Aufbau. MHC-Klasse-I besteht aus einer α-Kette, untergliedert in die α_1-, α_2- und α_3-Domänen, sowie dem nicht-kovalent assoziierten β_2-Mikroglobulin (β_2M). Die membranproximale α_3-Domäne und β_2M haben strukturelle Ähnlichkeit zu den konstanten Domänen der Immunoglobuline und stabilisieren den Komplex. Die α_1- und α_2-Domänen bilden eine membrandistale Grube aus, die Peptide mit einer Länge von 8-10 AA bindet und präsentiert [9].

MHC-Klasse-II besteht aus einer α- und einer β-Kette, die in Domänen α_1, α_2, β_1 und β_2 unterteilt sind. Die Peptidbindestelle wird zwischen α_1 und β_1 ausgebildet. Im Gegensatz zu β_2M besitzt α_2 eine Transmembrandomäne und ist kovalent mit α_1 verbunden [10]. In Abbildung 1 wird der Aufbau beider MHC-Klassen verglichen.

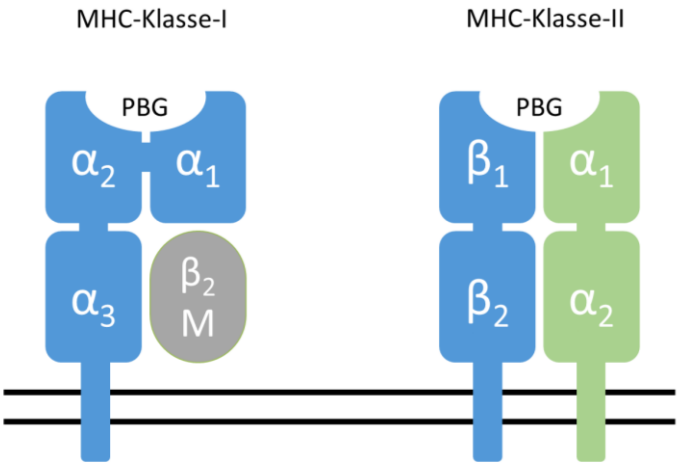


Abbildung 1: Aufbau der Haupthistokompatibilitätskomplexe I und II. MHC-Klasse-I besteht aus einer α-Kette, die in 3 Domänen (α_{1-3}) unterteilt ist und β_2-Mikroglobulin (β_2M). MHC-Klasse-II besteht aus einer α- und einer β-Kette, die jeweils in zwei Domänen unterteilt sind (α_{1-2} und β_{1-2}). PBG = Peptidbindegrube (engl.: *peptide binding groove*).

2.1.2.1 MHC-Klasse-I

MHC-Klasse-I wird von $CD8^+$ T-Zellen erkannt und präsentiert 8-10 AA lange Oligopeptide zytosolischer Herkunft. Diese Peptide entstehen durch proteasomalen Abbau von Proteinen, die aktiv über TAP1:TAP2-Komplexe (engl.: *transporters associated with antigen processing 1 and 2*) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert werden. Der Zusammenbau des MHCs und die Bindung der Peptide finden im ER statt. Ohne gebundenes Peptid ist der MHC instabil und wird von Chaperonen wie Calreticulin, ERp57 und Tapasin am Export Richtung Zelloberfläche gehindert [11, 12]. Durch die Aminopeptidase ERAAP (engl.: *endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing*) können Peptide vor der Bindung an den MHC am Amino-Ende zugeschnitten werden, da das Proteasom auch Peptide generiert, die länger als 8-10 AA sind [13]. Die vom Proteasom degradierten Proteine umfassen sowohl zelleigene Proteine, als auch Proteine, die von Viren oder Bakterien stammen. Die auf der Zelloberfläche präsentierten Peptide spiegeln also zu jedem Zeitpunkt den aktuellen Status der Zelle wider. Infektionen oder Mutationen führen somit zur Präsentation immunogener Peptide im MHC und letztlich zur Lyse der betroffenen Zelle durch $CD8^+$ T-Zellen [14].

2.1.2.2 MHC-Klasse-II

Antigene, die sich in Vesikeln oder im extrazellulären Raum befinden, werden durch MHC-Klasse-II präsentiert und von $CD4^+$ T-Zellen erkannt. Die extrazellulären Antigene werden durch rezeptorvermittelte Endozytose, Phagozytose oder Makropinozytose in Endosomen aufgenommen, deren pH-Wert zeitabhängig abfällt. Die Endosomen fusionieren daraufhin mit Lysosomen, die Proteasen enthalten, welche durch den niedrigen pH-Wert aktiviert werden. Diese Proteasen, auch Cathepsine genannt, prozessieren die Antigene für die Präsentation im MHC-Klasse-II [15, 16]. Um eine vorzeitige Bindung von Peptiden nicht-vesikulären Ursprungs im ER zu verhindern, ist MHC-Klasse-II zunächst mit der invarianten Kette Ii (engl.: *invariant chain*, CD74) assoziiert. Die invariante Kette ist ein homotrimeres Membranprotein dessen Monomere jeweils ein MHC-Klasse-II-Molekül binden und seine Peptidbindestelle blockieren [17, 18]. Der Komplex wird dann gezielt in Endosomen mit niedrigem pH-Wert geleitet, wo Ii durch saure Proteasen abgespalten wird, so dass nur das kurze CLIP-Peptid (engl.: *class II associated invariant chain peptide*) in der Bindungsgrube des MHC-Klasse-II zurückbleibt. Dadurch wird der Komplex zwar aufgelöst, die Bindungsgrube ist jedoch weiterhin blockiert. CLIP wird erst von HLA-DM, einem spezialisierten MHC-Klasse-II-Molekül gelöst, woraufhin die Bindung eines Peptids möglich ist. Die Bindungstasche des MHC-Klasse-II ist seitlich offen und erlaubt dadurch die Aufnahme von Peptiden mit einer Länge von 13-25 AA [19]. MHC-Klasse-II präsentiert auf diese Weise auch Antigene von extrazellulären Krankheitserregern, die in Verbindung mit MHC-Klasse-I nicht auftreten.

2.1.3 Antigenerkennung durch den T-Zell-Rezeptor

Der T-Zell-Rezeptor von α:β-T-Zellen besteht aus einer α- und einer β-Kette, zwei Transmembranproteinen, die jeweils in eine variable und eine konstante Region unterteilt sind. Durch die Interaktion beider Ketten innerhalb der variablen Regionen bildet sich auf der extrazellulären Seite der Zellmembran eine Bindestelle aus, die für die Antigenerkennung verantwortlich ist. Zur Stabilisierung der Rezeptorstruktur werden beide TCR-Ketten durch den CD3-Komplex, bestehend aus einer γ- und δ- sowie zwei ε-Untereinheiten und CD3ζ unterstützt (Abbildung 2) [20]. Der CD3-Komplex und CD3ζ sind notwendig für die Signaltransduktion durch den TCR, da sich in ihren zytoplasmatischen Domänen die für die Signalleitung zuständigen ITAMs (engl.:*immunoreceptor tyrosine based activation motifs*) befinden. Als weitere wichtige Komponenten sind CD4 und CD8 an der TCR:MHC-Interaktion beteiligt. Sie binden direkt an nicht-polymorphe Domänen im MHC und aktivieren dadurch die zytoplasmatisch assoziierte Lck-Kinase (engl.: *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*), die Tyrosin-Reste in den ITAMs phosphoryliert [21, 22]. CD4 bindet dabei an MHC-Komplexe der Klasse II, während CD8 an MHC-Komplexe der Klasse I bindet. Die initiale Phosphorylierung

der ITAMs hat die Aktivierung einer Vielzahl von nachgeschalteten Signaltransmittern zur Folge, die das Verhalten der Zelle nach Antigenkontakt regulieren.

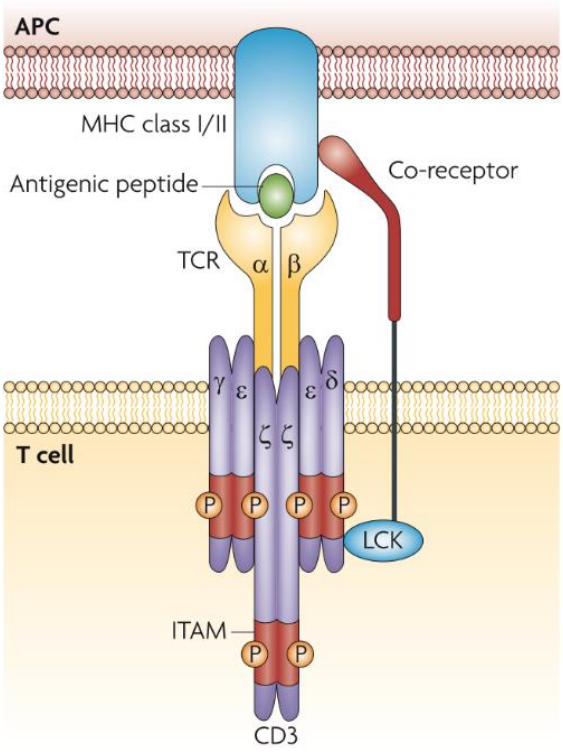


Abbildung 2: Aufbau des T-Zell-Rezeptors und Interaktion mit dem MHC. Die α- und β-Ketten des T-Zellrezeptors paaren mit dem intrazellulären CD3-Komplex, bestehend aus γ-, δ-, und je zwei ε- und ζ-Ketten. Die Korezeptoren CD4 und CD8 stabilisieren den Gesamtkomplex, CD4 bindet dabei spezifisch an MHC-Klasse-II und CD8 an MHC-Klasse-I. Durch Kontakt mit dem Antigen:MHC-Komplex erfolgt die Aktivierung der Lck-Kinase, die durch Phosphorylierung der ITAMs die Signaltransduktion einleitet. Abbildung aus Gascoigne et al. 2008 [23].

2.1.4 T-Zellaktivierung und Effektormechanismen

Die Antigenerkennung durch den TCR ist isoliert nicht ausreichend für eine effiziente T-Zellaktivierung. Neben der TCR:MHC-Interaktion werden unter Normalbedingungen zwei weitere Signale benötigt. Diese werden zum einen von kostimulatorischen Molekülen und zum anderen von Zytokinen vermittelt. Kostimulatorische Moleküle werden von professionellen APCs, wie DCs oder Makrophagen auf der Zelloberfläche exprimiert. Zu den wichtigsten kostimulatorischen Signalwegen gehören die Aktivierung von CD28 durch CD80 oder CD86 (B7.1 und B7.2) sowie die Bindung von CD40 an CD40L [24]. Weitere kostimulatorisch wirksame Oberflächenmoleküle sind LFA-3 und CD54, deren Liganden auf T-Zellseite CD2 und LFA-1 sind [25]. Die Aktivierung dieser Signalkaskaden zusammen mit der Bildung des TCR:CD3-Komplexes führt zu T-Zellproliferation und Differenzierung. Einen genau entgegengesetzten Effekt haben koinhibitorische Moleküle wie PD-1 (engl.: *programmed cell death protein 1*) und CTLA-4 (engl.: *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). CTLA-4 ist

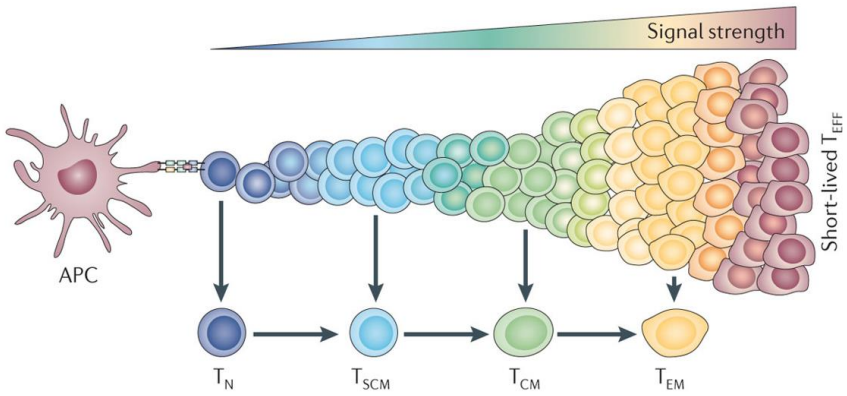
ein CD28-Antagonist der ebenfalls von CD80/86 aktiviert wird. Die Aktivierung des TCR:CD3-Komplexes zusammen mit CTLA-4 hat einen Proliferationsstopp und die Deaktivierung der Effektorfunktionen zur Folge [26]. Die Aktivierung von PD-1 durch PD-L1 inhibiert Effektorfunktionen zytotoxischer T-Zellen und wirkt als Differenzierungssignal für T_{REG} [27].
Das dritte Signal zur optimalen Aktivierung der $CD8^+$ T-Zellen stammt von Zytokinen. Die wichtigsten Zytokine für die Aktivierung naiver T-Zellen sind IL-12 und Typ-I-Interferone wie IFN-α [28]. Sie werden von APCs gebildet und fördern die Proliferation und Effektorfunktionen aktivierter T-Zellen. Die Abwesenheit von IL-12 bei der initialen T-Zellaktivierung kann zur Ausbildung einer Antigentoleranz führen [29].
Zytotoxische T-Zellen erreichen die Lyse ihrer Zielzellen über lytische Granula oder die Interaktion von Fas (CD95) mit dem Fas-Liganden (FasL). Lytische Granula sind sekretorische Vesikel, die Perforin und Granzyme enthalten [30, 31]. Perforin durchdringt die Zellmembran der Zielzelle und bildet dort Poren aus, durch die Granzyme in die Zelle gelangen können. Ein Teil der Granzyme kann auch über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zielzelle eindringen, wobei Perforin dennoch für den Austritt aus den Endosomen benötigt wird, da die Granzyme ansonsten in den Endosomen verbleiben und keine Apoptose auslösen. Eine hohe Dosis Perforin führt außerdem zum Verlust der Membranintegrität und kann so die Nekrose der Zielzelle bewirken. Unter physiologischen Bedingungen werden dadurch etwa 10 % der Zellen nekrotisch [32-34]. Die ebenfalls in den lytischen Vesikeln vertretenen Granzyme bilden eine Familie strukturell verwandter Serinproteasen und lösen nach Eintritt in die Zielzelle proapoptotische Signalkaskaden aus. In *Homo sapiens* sind die Granzyme A, B, H, K und M bekannt. Zählt man die Varianten aus Spezies wie *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* dazu umfasst die Familie insgesamt 11 Mitglieder. Im Menschen wird die Apoptose hauptsächlich durch Granzym A und B ausgelöst [35]. Granzym A ist dabei das Protein, das in den lytischen Granula am häufigsten vorkommt. Es spaltet intrazelluläre Proteine spezifisch nach den basischen Aminosäuren Lysin oder Arginin und ist zudem in der Lage, Einzelstrangbrüche in der DNA zu induzieren, die Kernmembran zu zerstören sowie die Integrität der Mitochondrien und der Zellmembran zu schwächen [36, 37]. Granzym B ist weniger spezifisch und spaltet die Proteine C-terminal nach sauren Aminosäuren. Besonders häufig wird dabei nach Asparaginsäure geschnitten. Granzym B induziert die DNA-Degradation durch Aktivierung von CAD (engl.: *caspase activated DNase*) und aktiviert mehrere Mitglieder aus der Familie der Caspasen [38, 39]. Caspasen sind ebenfalls Proteasen, die C-terminal nach Asparaginsäure schneiden und stellen die wichtigsten Signalgeber der Apoptose dar [40].
Die Caspasen können, wie oben bereits angemerkt, auch durch Fas/FasL aktiviert werden. FasL wird von T-Zellen kurze Zeit nach ihrer Aktivierung durch den TCR exprimiert und induziert nach Interaktion mit dem Fas-Rezeptor, der von der Zielzelle exprimiert wird, die Bil-

dung sogenannter DISC-Komplexe (engl.: *death-inducing signaling complex*). Die Internalisierung dieser DISC-Komplexe bewirkt dann die Spaltung von Effektor-Caspasen, was letztlich ebenfalls in der Initiierung der Apoptose resultiert [41, 42].

2.1.5 T-Zell-Differenzierung

Naive T-Zellen reagieren auf Antigenkontakt mit starker Proliferation und die dadurch entstehenden Tochterzellen differenzieren größtenteils zu Effektorzellen, die in das periphere Gewebe eindringen und dort infizierte Zielzellen lysieren. Über 95% der Zellen sterben unmittelbar nach Klärung der Infektion ab, der Rest bildet eine langlebige Gedächtnispopulation (T_{MEM}) aus, die bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger schneller reagieren kann [43, 44]. Die Beobachtung ungleich verteilter Signaltransduktionskomponenten und Transkriptionsfaktoren innerhalb sich teilender Gedächtnis-T-Zellen legt nahe, dass die Entstehung zweier phänotypisch unterschiedlicher T-Zellpopulationen aus einer phänotypisch einheitlichen Vorläuferpopulation durch asymmetrische Zellteilung realisiert wird [45]. Die kürzlich beschriebenen Stammzell-Gedächtnis-T-Zellen (engl.: *stem cell memory*, T_{SCM}) stellen dabei die bisher am wenigsten differenzierten, antigenerfahrenen T-Zellen dar. Sie besitzen Stammzell-ähnliche Eigenschaften und alle anderen Subpopulationen können aus ihnen hervorgehen [46].

Die verschiedenen Differenzierungsstadien der T-Zellen lassen sich anhand ihrer Oberflächenmarker unterscheiden. Ein wichtiges Markerprotein ist dabei die Tyrosinphosphatase CD45. Sie kommt in zwei Spleißvarianten unterschiedlicher Größe vor, die durch spezifische Antikörper unterschieden werden können [47]. CD45RA wird von naiven T-Zellen exprimiert, nach Antigenkontakt herunterreguliert und tritt bei terminal differenzierten Effektor T-Zellen (engl.: *effector T cells*, T_{Eff}) wieder in Erscheinung. CD45RO kennzeichnet Gedächtnispopulationen und findet sich nicht auf naiven und terminal differenzierten T-Zellen [48]. CD62L, ebenfalls ein bedeutender Differenzierungsmarker, hat die Funktion eines Homingrezeptors und ermöglicht den T-Zellen den Eintritt in die Lymphknoten. CD62L findet sich auf naiven T-Zellen und bis auf wenige Ausnahmen auf T_{MEM}. Diese Ausnahmen umfassen T_{MEM} die in Haut und Schleimhäuten residieren [49]. Ein weiterer prominenter Marker ist der CC-Chemokin-Rezeptor CCR7. Er wird von sogenannten zentralen Gedächtnis-T-Zellen (engl.: *central memory T cells*, T_{CM}) exprimiert und fehlt auf Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (engl.: *effector memory T cells*, T_{EM}) [50]. CD27 und CD28 sind zwei kostimulatorische Rezeptoren, deren Expressionsmuster ebenfalls Auskunft über den T-Zell-Phänotyp geben kann. Beide werden meist auf T_{CM} und T_{EM}, nicht aber auf T_{EFF} exprimiert. Abbildung 3 enthält eine Übersicht über die bereits genannten und einige weitere Differenzierungsmarker und ihre Expression in den T-Zell-Subpopulationen.



	T_N	T_{SCM}	T_{CM}	T_{EM}
CCR7	+++	+++	++	-
CD62L	+++	+++	++	-
CD27	+++	+++	++	+/-
CD28	++	+++	+++	+/-
CD45RA	+	+	-	+/-
CD45RO	-	-	+	+
CD122	-	++	+++	+++
CD95	-	++	+++	+++
KLRG1	-	-	+/-	++

Abbildung 3: Expressionsmuster der Differenzierungsmarker von T-Zellen. Die Grafik zeigt wichtige Oberflächenmarker, deren Expressionsmuster sich während der T-Zelldifferenzierung verändern. Ausgehend vom naiven Phänotyp T_N über die Gedächtnis-Phänotypen T_{SCM} und T_{CM} bis hin zum Effektor-Gedächtnis-Phänotyp T_{EM} wird die Expressionsstärke der Marker mit + und – angegeben. Nicht messbare Expression wird durch „-“ gekennzeichnet, starke Expression durch „+++“. Abbildung modifiziert nach Gattinoni et al. 2012 [51].

Nach der Differenzierung im Thymus werden die T-Zellen in die sekundär lymphatischen Organe ausgeschwemmt. Sie besitzen typischerweise einen naiven Phänotyp mit niedriger Expression von CD44 und hoher Expression der Homing-Rezeptoren CD62L und CCR7. Diese Zellen benötigen weiterhin Überlebenssignale, die durch die schwache Bindung des TCR zu MHC-Selbstpeptid-Komplexen und Interleukin-7 vermittelt werden [52, 53]. Das TCR-Signal bleibt dabei stets unter dem Schwellenwert, der zur T-Zell-Aktivierung benötigt wird. Wird es durch Blockierung oder Knockout von TCR oder MHC unterbrochen, sterben die naiven T-Zellen innerhalb kurzer Zeit ab [54, 55]. Dagegen bewirkt der adoptive T-Zelltransfer in einen lymphopenischen Wirt eine T-Zellproliferation aufgrund der erhöhten Verfügbarkeit von MHC-Selbstpeptid-Komplexen und Zytokinen [56]. T-Zellen mit höherer Affinität zu MHC-Selbstpeptid-Komplexen proliferieren dabei stärker als solche mit schwacher Affinität [57]. T_{MEM} sind anders als die naiven und Effektorpopulationen nicht auf ein TCR-Signal angewiesen, ihre homöostatische Proliferation ist hingegen stark IL-7- und IL-15-abhängig [58]. Ähnlich wie bei T_N, verhindern beide Zytokine bei T_{MEM} das Eintreten der Apoptose durch mitogene Signale und die verstärkte Expression antiapoptotisch wirkender

Proteine wie BCL-2 und MCL-1 [59]. Die Funktionen von IL-7 und IL-15 sind dabei teilweise redundant und bisher nicht eindeutig differenzierbar. Außerdem können auch weitere γ_c-Zytokine wie IL-2 und IL-21 ähnliche Effekte haben [60].

2.2 Biologie von Interleukin-15

Zytokine sind sekretierte oder membranständige Proteine, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen beeinflussen. Die untergeordnete Gruppe der Interleukine reguliert die Aktivität von Leukozyten und ist somit eine bedeutende Komponente des Immunsystems. Interleukine können die Immunantwort sowohl aktivieren als auch inhibieren. IL-15 gehört, wie auch das nah verwandte IL-2, zur Familie der gemeinsamen γ-Ketten Zytokine (engl.: *common gamma chain cytokines*) und wirkt aktivierend auf $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen. Die Eigenschaften und Funktionen von IL-15 und dem IL-15-Rezeptor werden in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben.

2.2.1 Struktur und Funktion von IL-15

IL-15 ist ein 14-15 kDa schweres Glykoprotein, das strukturell und funktionell eine starke Ähnlichkeit zu IL-2 aufweist. Die erste Beschreibung von IL-15 erfolgte 1994 aufgrund seiner Eigenschaft, die IL-2-abhängige Zelllinie CTLL-2 in Anwesenheit eines IL-2-spezifischen, inhibierenden Antikörpers zu stimulieren. Das 34 kb überspannende IL-15-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 4q25-35 lokalisiert und ist in 8 Introns und 9 Exons unterteilt [61]. Es können zwei Isoformen des IL-15-Präkursors anhand unterschiedlicher Signalpeptide unterschieden werden. Die maturierten Proteine beider Isoformen sind identisch und bestehen aus 114 Aminosäuren (engl.: *amino acids*, AA). Die verschiedenen Signalpeptide bewirken lediglich eine unterschiedliche Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle. Während das 48 AA lange Signalpeptid (engl.: *long signal peptide*, LSP) den sekretorischen Weg über endoplasmatisches Retikulum und Golgi Apparat vorgibt, wird IL-15 vom 21 AA langen, sogenannten kurzen Signalpeptid, (engl.: *short signal peptide*, SSP) in Richtung Zellkern geleitet. Die Funktion des SSP-IL-15 im Zellkern konnte bisher nicht aufgeklärt werden, es wird jedoch vermutet, dass es an der Transkriptionsregulation von IL-15 beteiligt ist [62].
Maturiertes IL-15 besitzt eine 4-α-Helix-Struktur und wird von zwei intramolekularen Disulfidbrücken zwischen Cystein (Cys) 42 und Cys 88 sowie zwischen Cys 35 und Cys 85 stabilisiert [63]. Abbildung 4 zeigt ein 3D-Modell von IL-15 im Komplex mit der Alphakette des IL-15 Rezeptors (IL-15Rα) [64]. Die IL-15 mRNA wird von einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert, darunter Fibroblasten, Keratinozyten, Epithelzellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (engl.: *dendritic cells*, DCs). Trotz dieser weiten Verbreitung der IL-15-mRNA wird das maturierte Protein fast ausschließlich in Monozyten, Makrophagen und DCs exprimiert, was auf starke post-transkriptionelle Regulierungsmechanismen hinweist [65].

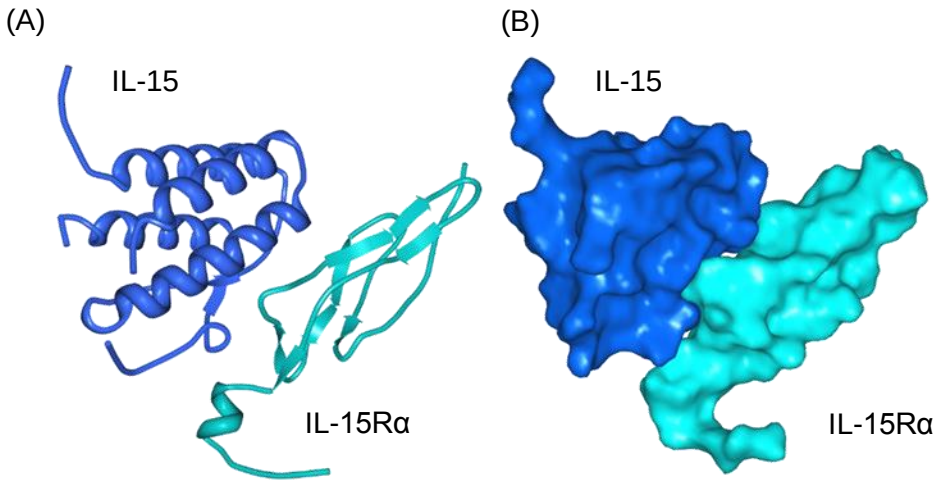


Abbildung 4: Strukturmodell von IL-15 im Komplex mit seinem α-Rezeptor. (A) Darstellung im Bänder-Modell. (B) Darstellung im volumetrischen Oberflächen-Modell (RCSB PDB # 2Z3Q).

IL-15 vermittelt proliferations- und überlebensfördernde Signale an aktivierte B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen, begünstigt im Gegensatz zu IL-2 aber nicht die immunsupprimierenden regulatorischen T-Zellen (T_{REG}). Auch die von IL-2 bekannte Induktion des aktivierungsinduzierten Zelltods (engl.: *activation induced cell death,* AICD) wird durch IL-15 nicht ausgelöst [66-68]. Es verstärkt hingegen die Expression der anti-apoptotischen Proteine BCL-2, BCL-XL und MCL-1, während die proapoptotischen Proteine BAX, BID, BIM, NOXA, PUMA sowie die Caspasen 3 und 9 herabreguliert werden [69-71]. Zusätzlich ist IL-15 wesentlich an der Differenzierung von T-Zellen zu zentralen Gedächtniszellen (engl.: *central memory T cells*, T_{CM}) mit einem entsprechenden Phänotyp beteiligt, während IL-2 eher einen Effektor (T_{EFF}) oder Effektor-Gedächtnis-Phänotyp (T_{EM}) propagiert [72]. Eine durch IL-15 induzierte verstärkte Telomerase-Expression wirkt dem Verfall der Telomere bei der Zellteilung entgegen und verlängert die Lebensspanne von T_{CM}- und T_{EM}-Populationen [73]. Diese überlebensfördernden und differenzierungshemmenden Eigenschaften machen IL-15 besonders interessant für den Einsatz im Kontext der zellulären Immuntherapie (siehe auch Abschnitt 2.3.5.4). In einer Publikation der NIH (engl.: *National Institutes of Health*) wurde IL-15 aus diesen Gründen auf Platz 1 der vielversprechendsten zukünftigen Krebsmedikamente gelistet [74]. So ist IL-15 beispielsweise in der Lage tumortolerant gewordene $CD8^+$ T-Zellen zu reaktivieren [75], zytotoxische Effekte natürlicher Killerzellen (engl.: *natural killer cells*, NK-Zellen) zu potenzieren [76] und die Anzahl und Effektorfunktionen humaner, antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen nach adoptivem Transfer in Mausmodellen zu erhöhen [77]. Zahlreiche Publikationen belegen außerdem die Wirksamkeit von IL-15 in Gen- und Kombinationstherapien [78].

2.2.2 Aufbau und Signaltransduktion des IL-15-Rezeptors

Der heterotrimere, hochaffine IL-15-Rezeptor setzt sich aus jeweils einer α-, β- und γ-Kette zusammen. IL-15 gehört, wie auch IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, und IL-21, zur Familie der gemeinsamen γ-Ketten-Zytokine (engl.: *common gamma chain cytokines*), deren Mitglieder die gemeinsame γ-Rezeptor-Untereinheit γ_c verwenden. Neben der γ_c teilen sich IL-2 und IL-15 auch eine gemeinsame β-Kette, so dass der Unterschied zwischen ihren hochaffinen αβγ-Rezeptoren alleine durch individuelle α-Ketten entsteht [79]. Die Affinität von IL-15 zu seinem αβγ-Rezeptor (IL-15Rαβγ) ist mit einer Dissoziationskonstante von $K_d \sim 10^{-11}$ M ähnlich hoch wie die von IL-2 zu seinem αβγ-Rezeptor. Beide Zytokine bewirken außerdem eine abgeschwächte Signaltransduktion durch den gemeinsamen βγ-Rezeptor mit $K_d \sim 10^{-9}$ M. Im Gegensatz dazu ist die Affinität von IL-15 zum IL-15Rα mit $K_d \sim 10^{-11}$ M wesentlich höher als die von IL-2 zum IL-2Rα mit $K_d \sim 10^{-8}$ M. [80, 81]. IL-15 löst in Lymphozyten eine Signalkaskade aus, die durch die initiale Aktivierung von JAK1/JAK3 (Januskinasen) und STAT3/STAT5 (engl.: *signal transducer and activator of transcription*) gekennzeichnet ist. JAK1 ist mit IL-15Rβ assoziiert und JAK3 mit γ_c. Ihre Dimerisierung bewirkt eine durch Phosphorylierung initiierte Aktivierung von STAT3/STAT5 [82]. In Lymphozyten werden darüber hinaus SYK, PLCγ1, LCK und SHC aktiviert, was zu einer Signaltransduktion über PI3K/Akt und den MAP-Kinase-Weg führt, die letztlich die Expression der Transkriptionsfaktoren NF-κB, c-Myc und c-Fos/Jun sowie des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2 induzieren [83].
Während die Komponenten des IL-2Rαβγ allesamt auf T- und NK-Zellen vorliegen und mit löslichem IL-2 interagieren, befindet sich der IL-15Rα auf der Zelloberfläche von Monozyten, Makrophagen und DCs. Er wird somit nicht von den Zellen, die das IL-15-Signal empfangen, sondern zusammen mit IL-15 von den signalgebenden Zellen exprimiert. IL-15 assoziiert nach seiner Translation bereits im endoplasmatischen Retikulum mit dem IL-15Rα und bleibt auch bis zur Sekretion gebunden. Dadurch wird es in der Regel durch IL-15Rα auf der Zelloberfläche präsentiert [80, 84, 85]. Auf diese Weise wird IL-15 nur in geringen Mengen ins Plasma freigesetzt und vorwiegend während der Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen antigenpräsentierender Zelle (engl.: *antigen presenting cell*, APC) und T- oder NK-Zelle transpräsentiert. [86]. Abbildung 5 verdeutlicht den Aufbau der beschriebenen Rezeptorkomplexe sowie die Transpräsentation von IL-15. Neben der vorherrschenden Transpräsentation kommt IL-15 in murinem und humanem Serum aber auch gebunden an eine lösliche Form des IL-15Rα vor [85].

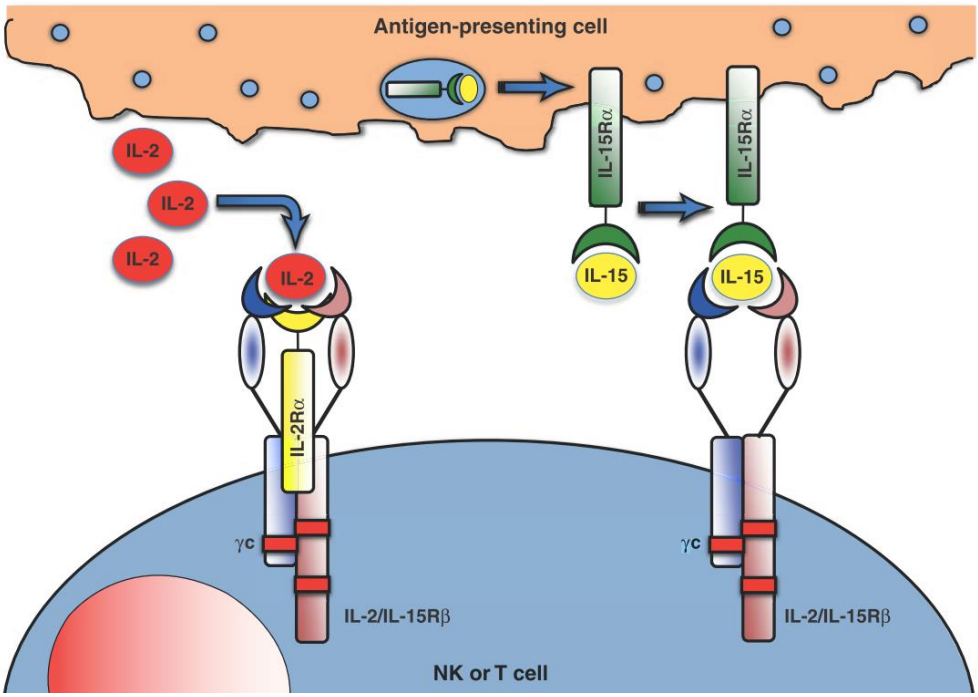


Abbildung 5: Vergleich des IL-2- und IL-15-Rezeptorkomplexes. IL-15 besitzt einen dreiteiligen Rezeptor, dessen β- und γ-Untereinheiten auch im ebenfalls dreiteiligen IL-2 Rezeptor Verwendung finden. Im Gegensatz zum IL-2Rα ist der IL-15Rα nicht auf demselben Zelltyp exprimiert wie der Rest der Rezeptorkomponenten, was zur Folge hat, dass IL-15 physiologisch meist *in trans* präsentiert wird. Abbildung aus Steel et al. 2012 [65].

2.2.3 IL-15-Superagonisten

Um die Wirkung von IL-15 auf T- und NK-Zellen zu potenzieren, wurden in den letzten Jahren mehrere IL-15-Mutanten und Fusionsproteine mit erhöhter Bioaktivität entwickelt. IL-15N72D ist eine IL-15-Punktmutante mit einem Aminosäureaustausch von Asparagin zu Asparaginsäure an AA-Position 72. Dadurch wird die Affinität zur IL-15Rβ-Kette verstärkt, was *in vitro* eine 4-5-fach erhöhte Bioaktivität auf Zellen mit dem humanen, niederaffinen IL-15Rαβγ bewirkt, während keine erhöhte Affinität für den murinen IL-15Rαβγ berichtet wurde [87]. Mortier et al. beschreiben die Fusion von IL-15 an die IL-15Rα-Sushi-Domäne, dem IL-15-bindenden Teil der IL-15Rα-Kette, durch ein flexibles Glycin-Cystein-Linkerpeptid (GC-Linker). Die so generierten IL-15-Fusionsproteine RLI und ILR bewirken auch ohne Transpräsentation eine Signaltransduktion, die der des hochaffinen IL-15Rαβγ ähnlich ist [88]. Alt-803 ist ein weiterer IL-15-Superagonist, der ebenfalls die IL-15Rα-Sushi-Domäne besitzt. Sie wurde bei diesem Konstrukt zusätzlich an eine IgG1-Fc-Domäne gekoppelt, was zur Dimerisierung des Proteins führt, so dass ein Immunoglobulin-ähnliches Konstrukt mit zwei IL-15-Bindestellen entsteht. Durch Koexpression dieses Konstrukts mit IL-15 in CHO-Zellen konnte ein Homodimer isoliert werden, bei dem beide IL-15Rα-Sushi-Domänen von IL-15 besetzt sind. Alt-803 hat eine ähnlich hohe Bioaktivität wie RLI/ILR mit stark erhöhter

Halbwertszeit in Mausserum [89]. Neben den beschriebenen IL-15-Superagonisten gibt es Ansätze zur antigenspezifischen Anreicherung von IL-15 in der Tumormikroumgebung. Dabei wurde IL-15 beispielsweise an einen p53-spezifischen scTCR oder an die variable Domäne eines FAP-spezifischen (engl.: *fibroblast activation protein*) Antikörpers gekoppelt [87, 90]. Aufbau und Funktion der superagonistischen IL-15-Fusionsproteine, die in der vorliegenden Arbeit entworfen und hergestellt wurden, werden im Ergebnisteil dieser Arbeit ab Abschnitt 4.5.1 besprochen.

2.3 Therapiemethoden gegen maligne Neoplasien

Krebs ist eine Sammelbezeichnung für Krankheiten, die sich durch bösartige Gewebeneubildungen auszeichnen. Diese Gewebeneubildungen, die auch als Neoplasien oder Tumore bezeichnet werden, können aus einer Vielzahl von Gewebetypen hervorgehen. Gemeinsam ist allen Tumorarten ein Verlust über die Zellzykluskontrolle. Tumorzellen können sich unkontrolliert vermehren und behindern dadurch die Funktion von Organen und Geweben. Viele Tumore bilden außerdem Metastasen aus, die entstehen, wenn Zellen des ursprünglichen Tumors in andere Gewebe einwandern und dort Tochter-Geschwulste ausbilden. Die folgenden Abschnitte behandeln den aktuellen Wissensstand über die Krebsentstehung sowie klassische und moderne Therapieformen.

2.3.1 Krebsentstehung und Risikofaktoren

Krebs ist eine multifaktorielle Krankheit. Die Ursachen der Krebsentstehung sind vielfältig und die genauen Mechanismen weitestgehend ungeklärt. Sicher ist, dass es zu einer Schädigung des Erbgutes kommt, welche die Zellzyklusregulation beeinträchtigt. Bekannte Risikofaktoren sind unter anderem ionisierende Strahlung, Kanzerogene, Rauchen, Übergewicht, bestimmte Viren und genetische Faktoren. Das Risiko einiger Krebsarten, darunter Mamma- und Prostatakarzinome, scheint über die Ernährung beeinflusst werden zu können [91-93].
Ionisierende Strahlung kann direkt destruktiv auf die DNA einwirken und erzeugt außerdem Radikale, die schädliche Folgereaktionen in der Zelle auslösen. Studien in Gebieten mit durch Radioaktivität stark erhöhter Strahlenbelastung belegen einen klaren Zusammenhang zwischen Strahlendosis und Krebsrisiko [94]. Ebenfalls besteht ein Zusammenhang zwischen UVB-Strahlung und der Entstehung von Hautkrebs [95]. Ein weithin bekanntes Beispiel für karzinogene Substanzen ist Asbest, das die Entstehung von Lungenkrebs begünstigt [96]. Sein Einsatz ist in Deutschland seit 1993 verboten. Auch Tabakrauch enthält eine Vielzahl krebserregender Stoffe. Erste Berichte über den Zusammenhang von Tabakrauch und Lungenkrebs erschienen bereits 1953 [97]. Heute gilt Rauchen als Hauptrisikofaktor für Lungenkrebs und ist in 80-90 % aller klinisch dokumentieren Fälle involviert [98, 99]. Krebsarten, deren Entstehung durch Übergewicht begünstigt wird, sind zum Beispiel Darmkrebs,

Nierenzellkarzinome sowie Speiseröhren- und Prostatakrebs. Zu den krebserregenden Viren zählen das Epstein-Barr-Virus (EBV), die Hepatitis-B und C-Viren (HBV, HCV), das humane Immundefizienz-Virus (HIV), einige Stämme der humanen Papillomviren (HPV, darunter vor allem die Hochrisikostämme HPV 16 und 18) sowie das humane Herpesvirus 8 (HHV 8) [100-104]. Für die Entdeckung der Bedeutung von HPV-Infektionen bei der Entstehung von Zervixkarzinomen und die damit verbundene Entwicklung eines Impfstoffes wurde Harald zu Hausen 2008 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet. Ein bekanntes Beispiel für einen erblichen Risikofaktor sind Mutationen in den Genen der Tumorsuppressoren BRCA1 und BRCA2, die ein stark erhöhtes Brustkrebsrisiko verursachen [105, 106]. Alle oben genannten Faktoren tragen zu einem signifikant erhöhten Krebsrisiko bei, allerdings kann im Normalfall kein alleiniger Auslöser der Krankheit benannt werden.

2.3.2 Klassische Behandlungsmethoden und Immuntherapie

Ebenso vielfältig wie die Ursachen und Formen von Krebserkrankungen sind auch die Therapiemethoden. Die klassischen Behandlungsmethoden umfassen chirurgische Resektion, Chemo- und Strahlentherapie. Dabei wird das Tumorgewebe operativ entfernt oder durch den Einsatz zytotoxischer bzw. zytostatischer Medikamente sowie hochenergetischer Bestrahlung zerstört. Als moderne Behandlungsmethode gewinnt die Immuntherapie zunehmend an Bedeutung [107]. Dabei wird das Immunsystem so manipuliert, dass es das Tumorgewebe als fremd erkennt und daraufhin eine Immunantwort eingeleitet wird. Nach der Theorie der Immunüberwachung ist das Immunsystem eines gesunden Menschen in den meisten Fällen in der Lage, entartete Zellen zu erkennen und ein Auswachsen des Tumors zu verhindern [106]. Das Immunsystem reagiert bei diesem Prozess auf tumorspezifische (engl.: *tumor specific antigens*, TSAs) oder tumorassoziierte Antigene (engl.: *tumor associated antigens*, TAAs). TSAs sind mutierte Proteine, die ausschließlich von Tumorzellen exprimiert werden. Diese werden durch das Immunsystem erkannt und führen zur Lyse der betroffenen Tumorzellen. TAAs werden auch von gesunden Zellen exprimiert, sind aber im Tumor entweder stark überexprimiert oder kommen sonst nur in der Keimbahn oder Embryonalentwicklung vor [108-110]. Durch diese ungewöhnliche Expression können sie ebenfalls eine Immunantwort auslösen. Verschiedene Tumore zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster von TSA/TAAs, auch innerhalb einer bestimmten Tumorart. Für viele Tumorarten sind bislang allerdings keine TSA/TAAs bekannt. Für eine optimale Behandlung muss die TSA/TAA-Expression im Tumorgewebe patientenspezifisch ermittelt, und die Immuntherapie entsprechend ausgerichtet werden. Auch weitere Faktoren wie der Haplotyp des Patienten und eventuelle Vorbehandlungen müssen bei einigen Therapieformen berücksichtigt werden. Aus diesen Gründen spricht man auch von individualisierter Immuntherapie bzw. personalisierter Medizin.

2.3.3 Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern

Eine Form der Immuntherapie ist die Medikation mit monoklonalen Antikörpern (engl.: *monoclonal antibodies*, mAbs), die sich durch die Uniformität ihrer variablen Regionen und der dadurch bedingten Spezifität für ein singuläres Epitop auszeichnen. Grundlage ihrer Herstellung ist die Hybridomtechnik, für die Georges Köhler 1984 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet wurde [111]. mAbs können die Immunantwort durch unterschiedliche Mechanismen verstärken. Durch Bindung an TSA/TAAs auf der Zelloberfläche von Tumorzellen werden das Komplementsystem und die Fc-Rezeptor-vermittelte Zelllyse aktiviert, welche beispielsweise für die Wirkung des CD20-spezifischen mAbs Rituximab verantwortlich sind. Rituximab wird bei der Behandlung von B-Zelllymphomen eingesetzt und induziert die Depletion CD20-positiver B-Zellen [112-114]. Auch der HER2-spezifische (engl.: *human epidermal growth factor receptor 2*) mAB Trastuzumab aktiviert Komplementsystem und Fc-Rezeptor-vermittelte Zelllyse. Gleichzeitig ist er ein Beispiel für mAbs, die in wichtige Signalwege des Tumorwachstums eingreifen. Er blockiert HER2, einen Rezeptor für Wachstumsfaktoren, der bei etwa 20 % aller invasiven Mammakarzinome überexprimiert wird [115-118]. Ein weiterer Mechanismus ist die Störung der Tumormikroumgebung (engl.: *tumor microenvironment*). Viele Tumore exprimieren VEGFs (engl.: *vascular endothelial growth factor*), eine Familie von Signalmolekülen der Angiogenese. Durch die Neubildung der Kapillaren wird das Tumorgewebe mit Sauerstoff und Nähstoffen versorgt. Der mAB Bevacizumab wird eingesetzt um die Angiogenese in der Tumorumgebung zu verhindern. Er bindet VEGF-A und verhindert die Erkennung durch den VEGF-Rezeptor [119-121]. Weitere Zielstrukturen monoklonarer Antikörper sind inhibitorische Rezeptoren auf den Effektorzellen des Immunsystems (siehe Abschnitt 2.1.4), welche durch mAbs blockiert werden, wodurch die Weiterleitung immunsuppressiver Signale verhindert wird. Beispiele hierfür sind der CTLA-4-spezifische mAB Ipilimumab sowie der PD-1-spezifische mAB Pembrolizumab, die bei der Behandlung fortgeschrittener Melanome eingesetzt werden [122-125]. Häufig werden mAbs mit weiteren Behandlungsmethoden kombiniert, um synergistische Effekte zu erzielen [112].

2.3.4 Zelluläre Immuntherapie

Bei der zellulären Immuntherapie werden Leukozyten in Form von sogenannten Donor Lymphozyten Infusionen (DLI) oder im Kontext einer allogenen HSCT transferiert, um einen therapeutischen Effekt gegen residuale Leukämie- bzw. Tumorblasten oder virale Infektionen zu erzielen. Die Effektorzellen sind in den meisten Fällen zytotoxische T-Zellen, seltener geht der therapeutische Effekt von NK-Zellen aus [126]. Beim autologen T-Zelltransfer stammen die transferierten Zellen vom Patienten selbst. Voraussetzung für eine wirkungsvolle Therapie mit dieser Methode ist die Anwesenheit tumorreaktiver T-Zellen im Patienten, die sich in einigen Fällen direkt aus einer Biopsie des Tumors oder aus dem peripheren Blut isolieren

lassen. Diese tumorinfiltrierenden T-Zellen (engl.: *tumor infiltrating lymphocytes*, TILs) können innerhalb weniger Wochen *ex vivo*, durch wiederholte Stimulation der isolierten T-Zellen mit Tumorzellen oder Tumorantigen-exprimierenden APCs, stark expandiert werden. Die T-Zellen können dem Patienten anschließend reinfundiert werden und die bereits vorhandene Immunreaktion gegen den Tumor verstärken. Dieses Verfahren wird häufig zur Behandlung metastasierender Melanome eingesetzt [127-129].

2.3.4.1 Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

Bei der Behandlung von Leukämien hat sich der adoptive Transfer hämatopoetischer Stammzellen (engl.: *hematopoietic stem cell transfer*, HSCT) allogenen Ursprungs bewährt. Diese Methode wurde zunächst nach myeloablativer Strahlen- oder Chemotherapie angewandt, um das Knochenmark nach Aplasie mit gesunden HSCs zu regenerieren. Die therapeutische Wirkung entsteht dabei zunächst durch die starke, chemo- und/oder radiotherapeutische Reduktion der Leukämielast im Knochenmark. Darüber hinaus tragen die mit dem Transfer der HSCs infundierten Spenderlymphozyten dazu bei, den therapeutischen Effekt deutlich zu verstärken. Die im Transplantat enthaltenen T-Zellen stellen dabei wesentliche Mediatoren der antitumoralen Immunantwort dar, weil sie residuale Leukämieblasten erkennen und abtöten können [130]. Diese als Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (engl.: *graft versus leukemia*, GvL) bezeichnete Reaktivität ist bei der allogenen Transplantation stärker ausgeprägt als im autologen Setting [131, 132]. Die Ursache hierfür liegt in der Erkennung von Minor-Histokompatibilitätsantigenen (engl.: *minor histocompatibility antigens*, mHags). Im Normalfall wird der Spender so gewählt, dass seine MHC-Klasse-I- und II-Allele identisch zum Empfänger sind. Doch auch im vollständig HLA-identischen Setting kommt es durch mHags zu Immunreaktionen zwischen Transplantat und Empfänger. Auslöser sind Polymorphismen innerhalb der Aminosäuresequenz zellulärer Proteine. Diese geringen Sequenzabweichungen, welche die Proteinfunktion meist nicht beeinträchtigen, führen zur MHC-Präsentation von Epitopen, die von Spender-T-Zellen als fremd erkannt werden und dadurch Effektorfunktionen induzieren [133]. DLIs werden häufig eingesetzt, um den GvL-Effekt nach allogener HSCT gezielt zu verstärken. Dabei werden Lymphozyten des ursprünglichen Stammzellspenders infundiert. Sie stellen eine gängige Praxis bei der Behandlung akuter Leukämien im Stadium der minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) [134, 135] dar. Allerdings ist die Anwendung von DLIs häufig mit dem Risiko einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktivität assoziiert, die zur Entstehung der Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl.: *graft versus host disease*, GvHD) führt.

2.3.4.2 Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung

Wie oben bereits erwähnt, vermitteln allogene T-Zellen nicht nur den GvL-Effekt, sondern führen auch zur GvHD. Dabei werden mHags im gesunden Wirtsgewebe erkannt und aktivieren alloreaktive T-Zellen. Die häufigsten Zielorgane der GvHD sind Haut, Leber, Lunge, Darm und Schleimhäute. Die GvHD kann einen akuten oder einen chronischen Verlauf nehmen. Bei der akuten GvHD treten die Krankheitssymptome wie Hautausschlag, Blasenbildung, Unterleibsschmerzen und Übelkeit bis zu 100 Tage nach der Transplantation ein, bei später eintretenden oder länger anhaltenden Symptomen spricht man von einer chronischen GvHD [136, 137]. Der Schweregrad der GvHD ist in 4 Stufen unterteilt, die unter anderem von der Fläche des Ausschlags und der Billirubinkonzentration im Blut abhängen [138]. Nach allogener Transplantation histokompatibler, hämatopoetischer Stammzellen tritt eine akute GvHD vom Grad II-IV in 30-60 % aller Fälle auf, die Inzidenz der chronischen GvHD liegt bei 35-50 %. Die chronische GvHD kann als Folge einer akuten GvHD oder ohne Ausprägung vorheriger Symptome eintreten. Beide Formen der GvHD sind mit starken Komplikationen sowie hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten verbunden [139, 140]. Transplantationen mit nicht vollständig identischen Haplotypen verursachen mit höherer Wahrscheinlichkeit eine GvHD als Transplantationen im vollständig HLA-identen Setting, können jedoch auch den GvL-Effekt verstärken [141, 142].

2.3.4.3 Reprogrammierung von T-Zellen durch exogene TCRs

Durch die genetische Reprogrammierung von T-Zellen können diese gegen beliebige Antigene gerichtet werden. Dabei können verschiedene gentechnische Methoden angewandt werden, welche die Redirektion bewirken. Im einfachsten Fall wird den T-Zellen cDNA oder RNA für die Expression eines neuen TCRs durch Elektroporation oder ähnliche Transfektionsmethoden transferiert, woraufhin dieser transient exprimiert wird [143-145]. Bessere Transduktionsraten und eine langfristige Expression des exogenen TCRs werden durch viralen Gentransfer mit retro- bzw. lentiviralen Vektoren erreicht [146, 147]. Die Wirksamkeit TCR-transduzierter T-Zellen wurde bereits in mehreren klinischen Studien belegt [148, 149]. In einer Studie mit Melanompatienten und hochaffinen Melan-A- oder gp100-spezifischen TCRs wurde bei 30 %, bzw. 19 % der Patienten eine Regression des Melanoms festgestellt [150]. Eine weitere Studie mit gleichem Setting zeigte eine komplette Remission in 2 von 11 Patienten [151]. In einer Studie unter 11 Patienten mit multiplem Myelom und T-Zellen gegen das Antigen NY-ESO-1 konnte in 3 Patienten eine komplette Remission und in 7 Patienten eine Tumorregression festgestellt werden [152].

Für die korrekte Expression des exogenen TCRs müssen sowohl α- als auch β-Kette transduziert werden. Da auch die beiden Ketten des endogenen TCRs weiterhin exprimiert werden, kann es zu Fehlpaarungen kommen, bei der sich eine Kette des exogenen TCRs mit

einer Kette des endogenen TCRs verbindet. Diese fehlgepaarten TCRs besitzen eine gänzlich neue Antigenspezifität und können unerwünschte Autoimmunitätsreaktionen und GvHD-Symptome auslösen [153, 154]. Eine zusätzliche Disulfidbrücke im konstanten Teil des TCRs kann dazu beitragen das Auftreten von Fehlpaarungen zu reduzieren [155]. Auch die Transduktion von Einzelketten-TCRs (*single-chain TCRs*, scTCRs) wirkt der Fehlpaarung entgegen. Hier sind α- und β-Kette des scTCRs kovalent über ein Linkerpeptid verbunden. Die Expression und Affinität der scTCRs ist im Vergleich zum ursprünglichen TCR oft leicht reduziert, seine Funktionalität bleibt allerdings erhalten [156-158]. Weitere Methoden, die zum Ausschluss der Fehlpaarungen führen, sind das *Silencing* der endogenen TCR-Ketten über RNA-Interferenz, ihr *Knockout* im Genom durch Zinkfingernukleasen sowie die Transduktion von αβ-TCRs in γδ-T-Zellen [159-161].
Durch die Transduktion exogener TCRs können T-Zellen sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre TSA/TAAs im Kontext von MHC-Klasse-I erkennen. Dabei ist zu beachten, dass die Erkennung des TSA/TAAs durch den TCR einer MHC-Restriktion unterliegt. Das bedeutet, dass die exogenen TCRs zum Haplotyp des Patienten passen müssen, um die Erkennung des TSA/TAA zu ermöglichen. Häufig sind die bekannten TSA/TAAs HLA-A2-restringiert, da dieses Allel in der kaukasischen Bevölkerung mit hoher Frequenz vorkommt [162]. Somit können viele TCRs auch bei nachgewiesener Expression eines TSA/TAAs nicht nicht für Patienten mit abweichendem Haplotyp verwendet werden.

2.3.4.4 Chimäre Antigenrezeptoren

Chimäre Antigenrezeptoren (engl.: *chimeric antigen receptors*, CARs) können alternativ zu TCRs für die Redirektion von T-Zellen genutzt werden und bestehen aus der variablen Domäne eines Immunoglobulins, einer flexiblen Gelenkregion (engl.: *hinge*), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Signaldomäne. Die Antigenerkennung erfolgt durch die Immunoglobulindomäne. In CARs der ersten Generation besteht die Signaldomäne einzig aus der CD3ζ-Kette des TCRs (siehe Abschnitt 2.1.3). In CARs der zweiten und dritten Generation wurde die Signaldomäne um kostimulatorische Domänen aus CD27, CD28, CD134 (OX40) oder CD137 (4-1BB) erweitert, um die T-Zellaktivierung nach Antigenkontakt zu verstärken [163, 164]. Die Gelenkregion, die sich zwischen Signaldomäne und der antigenerkennenden Region des CARs befindet, beeinflusst die Positionierung des CARs auf der Zelloberfläche und ist wichtig für die Flexibilität der variablen Domänen bei der Bindung des Antigens. Die Beschaffenheit der Transmembranregion hat Einfluss auf die Oberflächenexpression des CARs [165, 166]. Durch CARs werden in T-Zellen die gleichen Effektormechanismen wie durch TCRs aktiviert, sie benötigen allerdings zur Antigenerkennung weder Prozessierung noch Präsentation der Antigene im MHC [167, 168]. Dadurch können sie zwar unabhängig vom Haplotyp des Patienten eingesetzt werden, allerdings muss das TSA/TAA auf

der Oberfläche der Tumorzellen zugänglich sein. Intrazelluläre und maskierte Oberflächenantigene können durch CARs nicht erkannt werden [169]. In klinischen Studien mit CD19- und CD20-spezifischen CARs konnten therapeutische Effekte gegen B-Zell-Leukämien nachgewiesen werden. Dabei wurde studienübergreifend in 80 % der behandelten Patienten eine Tumorregression beobachtet [170]. Die Behandlung bewirkte außerdem eine langanhaltende B-Zell-Aplasie sowie in einigen Fällen einen starken Anstieg inflammatorischer Zytokine im Blut [171]. Weitere klinische Studien mit CARs der zweiten und dritten Generation gegen eine Vielzahl von Tumorantigenen, darunter Mesothelin, HER2 (engl.: *human growth factor receptor 2*), EGFR (engl.: *epidermal growth factor receptor*) und FAP (engl.: *fibroblast activation protein*), werden zurzeit durchgeführt [172]. Erste Ergebnisse aus der Studie mit Mesothelin-spezifischen CARs demonstrieren die Tumorregression sowie die Reaktivierung der intrinsichen Antitumorantwort des Immunsystems [173].

2.3.5 Zytokine in der Immuntherapie

Zytokine können in der Immuntherapie eingesetzt werden, um die Immunantwort zu modifizieren. Meist werden sie als Adjuvantien verwendet, um die Effektivität transferierter Effektorzellen zu erhöhen. Es sind 7 Zytokinrezeptorfamilen bekannt, von denen vor allem die Zytokine, die an Typ-1- und 2-Rezeptoren binden für die Immuntherapie interessant sind [174]. Im klinischen Einsatz sind zurzeit IL-2 und IFN-α für die Krebstherapie zugelassen. Sie werden bei der Behandlung von Melanomen und Nierenzellkarzinomen eingesetzt. In den folgenden Abschnitten ist der aktuelle Stand der klinischen und präklinischen Studien zur Behandlung mit IFN-α, IL-2, IL-7 und IL-15 zusammengefasst.

2.3.5.1 IFN-α

Interferone können von einer Vielzahl von Zelltypen gebildet werden. Sie induzieren eine verstärkte Expression von MHC-Klasse-I, initiieren die Reifung von DCs und aktivieren zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen [174]. IFN-α ist für die Behandlung von Melanomen und einigen hämatopoetischen Neoplasien zugelassen. Dabei wurde studienübergreifend eine geringere Zahl von Rezidiven und damit verbunden eine höhere Lebenserwartung für Patienten mit IFN-α als Adjuvans beobachtet [175]. Der therapeutische Effekt war in vielen Fällen mit dem Auftreten von Autoreaktivität assoziiert [176]. Die Nebenwirkungen der IFN-α-Behandlung sind dosisabhängig. In über 80 % der Patienten wurden Fieber, Erschöpfung, Reizung des Gastrointestinaltrakts sowie Kopfschmerzen und erhöhte Leberwerte festgestellt [177, 178].

2.3.5.2 Interleukin-2

IL-2 wurde in klinischen Studien zunächst als Adjuvans bei gleichzeitiger Vakzinierung oder adoptivem Transfer von NK-Zellen und T-Zellen getestet. Ein therapeutischer Effekt konnte jedoch nur in wenigen dieser Studien beobachtet werden [179, 180]. Durchgesetzt hat sich die Bolusinfusion von hohen Dosen IL-2 als Monotherapie vor allem bei Patienten mit metastasierendem Melanom und Nierenzellkarzinom [181]. In diversen klinischen Studien wurden mehrmals täglich Infusionen mit 6-7,2 x 10^5 IU/kg IL-2 über einen Zeitraum von zweimal fünf Tagen infundiert. Dadurch konnte in 37 von 255 Patienten eine Immunantwort gegen den Tumor induziert werden, darunter 17 Patienten, bei denen eine komplette Remission beobachtet wurde [182, 183]. Eine häufig auftretende Nebenwirkung der IL-2-Infusionen ist jedoch das Kapillarlecksyndrom (engl.: *capillary leak syndrome,* CLS), dass mit arterieller Hypotonie, Tachykardie (Herzrasen) und der Ausbildung peripherer Ödeme assoziiert ist [184-186]. Während in den ersten Studien zwei Patienten durch septischen Schock als Folge einer grampositiven Infektion starben, waren die Nebenwirkungen in späteren Studien kontrollierbar und es kam zu keinen weiteren Todesfällen [187-189].

2.3.5.3 Interleukin-7

IL-7 gehört zur Familie der γ_c-Zytokine und fördert unter anderem die homöostatische Proliferation von T-Zellen mit naivem und Gedächtnisphänotyp [190]. In murinen Modellversuchen konnte gezeigt werden, dass IL-7 die Funktion antigenspezifischer T-Zellen nach Vakzinierung oder adoptivem T-Zelltransfer begünstigt [191, 192]. Erste klinische Studien an Melanom- oder Nierenzellkarzinom-erkrankten Patienten belegen eine initiale Lymphopenie, gefolgt von einer 3-4-fachen Expansion CD4- und CD8-positiver T-Zellen im peripheren Blut. Die Nebenwirkungen der IL-7-Therapie sind moderat und beschränken sich auf leichtes Fieber, Übelkeit und einen vorrübergehenden Anstieg der Leberwerte im Blut [193].

2.3.5.4 Interleukin-15

Struktur und funktionelle Eigenschaften von IL-15 wurden bereits in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. In einer Reihe präklinischer Studien konnte ein therapeutischer Effekt von IL-15 gegen Neoplasien, darunter Melanome und kolorektale Karzinome, gezeigt werden [194]. Die ersten klinischen Studien mit IL-15 wurden in einer Gruppe von Patienten mit refraktär metastatischem Melanom oder Nierenzellkarzinom durchgeführt. Dabei wurde rekombinant hergestelltes IL-15 aus *E. coli* verwendet und täglich über einen Zeitraum von 12 Tagen durch Bolusinfusionen verabreicht. Die maximal verträgliche Dosis betrug 0,3 µg/kg Körpergewicht. Als dosisbegrenzende Nebenwirkungen wurden Hypotonie sowie ein 50-facher Anstieg von IL-6 und IFN-γ im Serum der Patienten angegeben. Die Frequenzen von NK-Zellen, $CD8^+$ γδ-T-Zellen und T_{MEM} waren bis zu 8-fach erhöht, es konnte jedoch keine

Tumorreduktion erreicht werden. In einigen Patienten stagnierte das Tumorwachstum allerdings vorrübergehend [195]. Studien an Rhesusaffen haben gezeigt, dass c.i.v. (engl.: *continuous intravenous*) Infusionen von IL-15 über einen längeren Zeitraum eine stärkere Expansion von Effektorzellen bewirken, wobei eine bis zu 100-fache Expansion von $CD8^+$ T_{EM} im Blut festgestellt wurde. Diese Ergebnisse werden zurzeit in mehreren klinischen Studien an Patienten mit fortgeschrittenem Melanom, Nierenkrebs, Lungenkrebs oder Kopf-Hals-Karzinom überprüft [194]. Auch in präklinischen Studien konnte bereits mehrfach eine stark verlängerte Persistenz von T_{MEM} beobachtet werden. Dabei wurde vor allem die Expansion bzw. das Langzeitüberleben von T_{EM}, aber auch von T_{CM} sowie einer CD45RA-positiven T_{CM}-Population beobachtet [77, 196]. Zusätzlich waren die Effektorfunktionen von IL-15-behandelten T-Zellen *in vitro* stärker ausgeprägt als für andere Zytokine aus der γ_c-Familie. Die homöostatische Proliferation der T_{MEM} wurde *in vivo* sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit spezifischer Antigene gefördert und ohne IL-15 konnten häufig keine Gedächtnispopulationen ausgebildet werden. Die Anwesenheit von IL-15 war für die Persistenz einiger Subpopulationen essentiell [77, 197, 198]. Im klinischen Einsatz im Rahmen der Immuntherapie könnten diese Effekte vor allem dabei helfen, T_{MEM}-Populationen zu erhalten und dadurch eine langanhaltende Reaktivität gegen Tumore oder virale Infektionen zu vermitteln.

2.4 Präklinische Mausmodelle in der Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien

Die Forschung zur Entwicklung und Validierung neuer immuntherapeutischer Verfahren wie z.B. der adoptiven T-Zelltherapie erfordert idealerweise Modelle, welche es ermöglichen, die Bedingungen der klinischen Situation bestmöglich abzubilden. Durch *in vitro*-Versuche in Zellkultursystemen können häufig erste Aussagen über die Wirksamkeit von Therapiemethoden getroffen werden. Allerdings ist es bisher nicht möglich, das komplexe Zusammenspiel von Tumorzellen, Tumor-Mikroumgebung, Botenstoffen und T-Zellen *in vitro* zufriedenstellend zu simulieren. Besonders Fragestellungen zur Migration der T-Zellen zum Tumor, zu den Auswirkungen des Tumor-Mikromillieus auf die T-Zellfunktionalität sowie zum Langzeitüberleben und zur Ausbildung von T-Gedächtnispopulation sind *in vitro* nur unzureichend adressierbar. Auch eventuelle Nebenwirkungen der Therapie können auf diese Weise nicht aufgeklärt werden. Aus diesem Grund werden für fortgeschrittene Fragestellungen zur Wirksamkeit immuntherapeutischer Methoden *in vivo*-Studien mit Versuchstieren durchgeführt. Dabei ist die Hausmaus *Mus musculus* das am häufigsten verwendete Versuchstier. Der Stamm C57BL/6 ist ein immunkompetenter Stamm mit normalem Phänotyp und wird für eine Vielzahl von Fragestellungen eingesetzt. Um die Transplantation humaner Zellen und Gewebe über die Speziesbarriere in die Maus ohne starke Abstoßungsreaktionen zu ermöglichen werden jedoch immundefiziente Mäuse benötigt. Erst dadurch ist es möglich, die Funktionalität und Wechselwirkungen hu-

maner Zellen näherungsweise im murinen Modell zu analysieren. Einer der ersten Mausstämme, der für derartige Versuche verwendet wurde, ist CB17-Prkdc^{scid}, kurz als SCID bezeichnet. Diese Mäuse tragen eine Genmutationen, die der Auslöser der SCID-Erkrankung (engl.: *severe combined immunodeficiency*) ist. Sie betrifft das PRKDC-Gen (engl.: *protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*) auf Chromosom 16, welches ein Enzym kodiert, das für die DNA-Reparatur und V(D)J-Rekombination (siehe Abschnitt 2.1.1) benötigt wird. Durch die Mutation verliert das Enzym seine Funktion und die Mäuse können keine funktionellen B- und T-Zellen ausbilden [199]. Dadurch sind die lymphoiden Organe wie Thymus und Lymphknoten stark verkleinert. In CB17-Prkdc^{scid}-Mäusen konnten humane PBMCs (engl.: *peripheral blood mononuclear cells*) bereits über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten engraftet werden [200]. Durch Kreuzungen dieses Stammes mit NOD/ShiLt (engl.: *non obese diabetic*) wurde der Stamm NOD.CB17-Prkdc^{scid} (NOD.scid) generiert, in dem ein verbessertes Engraftment humaner PBMCs und HSCs mit höheren Frequenzen erreicht werden konnte [200, 201]. Die Mäuse haben jedoch zusätzliche Defekte in der angeborenen Immunantwort und besitzen aufgrund der spontanen Entwicklung von Thymomen eine relativ geringe Lebenserwartung von 8,5 Monaten [202]. Des Weiteren wird das Engraftment humaner Zellen in beiden Stämmen stark durch murine NK-Zellaktivität limitiert [203]. Der Stamm NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/Sz, (NSG) ist aktuell einer der Stämme mit der höchsten Immundefizienz [204]. Zusätzlich zum NOD.scid-Hintergrund haben diese Mäuse eine Knockout-Mutation des IL-2Rγ-Gens (siehe Abschnitt 2.2.2) und bilden dadurch keine NK-Zellen mehr aus. In NSG-Mäusen kann dadurch ein nochmals höheres Engraftment humaner PBMCs bzw. HSCs mit langfristiger Persistenz erreicht werden. Sie eignen sich dadurch besonders zur Generierung humanisierter Mäuse. Dabei wird beispielsweise durch Transplantation humaner, CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen eine funktionelle humane Hämatopoese in den Mäusen ausgebildet [205-207]. Durch die Humanisierung nähern sich die physiologischen Bedingungen im Tiermodel denen des Menschen an, was zu einer besseren Übertragbarkeit der Ergebnisse für die Anwendung im Menschen beiträgt.

2.5 Zielsetzung

Aufgrund der förderlichen Effekte von IL-15 auf die Proliferation und Funktion von CD8$^+$ T-Zellen und die bedeutende Rolle bei der Ausbildung und Persistenz von langlebigen T_{MEM}-Populationen, sollte die Wirkung von IL-15 in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Modellsystemen zur adoptiven Immuntherapie im Hinblick auf einen zukünftigen klinischen Einsatz bei der Therapie von Krebserkrankungen untersucht werden. Dabei sollte die Effekte von IL-15 auf CD8$^+$ T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert werden. Im Fokus der *in vivo*-Versuche standen dabei zunächst die Auswirkungen von IL-15 auf die homöostatische Proliferation und das Langzeitüberleben humaner T-Zellen in NSG-Mäusen. Die NSG-Maus stellt ein

wichtiges Modellsystem für präklinische Versuche dar, da sich aufgrund der starken Immundefizienz dieses Stammes, die sich unter anderem durch vollständige Abwesenheit von T-, B-, und NK-Zellen äußert, viele humane Zelltypen ohne Abstoßungsreaktionen transferieren lassen. Aus vorrausgegangenen Versuchen war allerdings bekannt, dass reine $CD8^+$ T-Zellpopulationen in NSG-Mäusen, aufgrund der Abwesenheit humaner Leukozyten und Zytokine, nur unzureichende Überlebenssignale erhalten und wenige Tage nach dem adoptivem Transfer absterben. In präklinischen Modellen zur Tumortherapie durch adoptiven Transfer tumorreaktiver T-Zellen kann dies zur Verringerung oder zum Ausbleiben des Antitumor-Effekts führen, was die Entwicklung und Validierung neuer, T-Zell-basierter Therapiemethoden behindert. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit $CD8^+$ T-Zellen mit verschiedenen Antigenspezifitäten und Phänotypen in NSG-Mäuse transferiert und regelmäßig mit IL-15 supplementiert werden. So sollten unter anderem die Proliferation und Persistenz von alloreaktiven, Leukämie-reaktiven und EBV-reaktiven T-Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit des jeweiligen Antigens und unter Einfluss von IL-15 untersucht werden. Dabei sollten auch T-Zellen mit stammzellähnlichem T_{SCM}-Phänotyp eingesetzt werden, da diese potenziell eine gesteigerte therapeutische Effizienz aufweisen.

Da für die vorgesehenen Experimente große Mengen IL-15 benötigt wurden, war zunächst die Etablierung eines Protokolls zur rekombinanten Herstellung von IL-15 gefordert. Neben der Produktion von Wildtyp-IL-15, sollten auch Methoden zur Steigerung der IL-15-Aktivität und Bioverfügbarkeit recherchiert und in der Herstellung superagonistischer IL-15-Varianten umgesetzt werden. Für die Produktion der Proteine sollten geeignete Expressionssysteme gefunden und hinsichtlich Ertrag, Reinheit und Bioaktivität der Endprodukte optimiert werden. Zur Validierung der Effizienz der generierten IL-15-Superagonisten sollten diese sowohl in immunkompetenten als auch in NSG-Mäusen, die mit humanen T-Zellen bzw. PBMCs oder HSCs engraftet wurden, getestet werden. Durch den Einsatz der IL-15-Superagonisten im Rahmen der Immuntherapie sollten die vorteilhaften Effekte von IL-15 potenziert und die benötigten Zytokinmengen verringern werden.

Um den potenziellen Nutzwert der IL-15-Superagonisten in Rahmen der adoptiven Immuntherapie zu testen, sollten diese in zwei Tumormodellen mit NSG-Mäusen getestet werden. Als Modell für hämatologische Tumore sollten dabei primäre AML-Blasten in NSG-Mäusen engraftet werden und durch Injektion AML-reaktiver T-Zellen, die nach einem bereits im Vorfeld etablierten Protokoll generiert wurden, unter Supplementierung von IL-15 und IL-15-Superagonisten behandelt werden. In einem weiteren Modell mit CAR-transduzierten T-Zellen gegen eine humane Ovarialkarzinomlinie sollte die Wirkung der IL-15-Superagonisten exemplarisch für solide Tumore untersucht werden. Zusammenfassend sollten so die Effekte von IL-15 auf $CD8^+$ T-Zellen untersucht und für die Optimierung der Persistenz und Funktionalität adoptiv transferierter $CD8^+$ T-Zellen in präklinischen NSG-Modellen genutzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bezugsquellen von Geräten und Reagenzien

3.1.1 Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
^{137}Cs Kleintierbestrahlungsanlage	OB 58-BA	Buchler, Braunschweig
^{137}Cs Zellbestrahlungsanlage	Gammacell-2000	Nuklear Data, Frankfurt
Autoklav	Varioklav 40-60	H+P, Oberschleißheim
Blotkammer, SDS-Gelkammer	Mini-Protean Tetra Cell	Biorad, München
Brutschrank	C1SM	Binder, Tuttlingen
Chirurgisches Besteck	diverse	Fine Science Tools, Heidelberg
CO_2-Inkubator	Heracell 150i	Thermo Fisher, Dreieich
Dispenser	Dial control 1-5	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer	FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg
Einfrierbox	Mr. Frosty	Nalgene. Rochester, UK
Eismaschine	UBE 50/35	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammer	Mupid exU	Mupid, Tokyo, JP
Elektroporationsgerät	X cell Gene Pulser II	Biorad, München
ELISpot Analysesystem	Immunospot S5 Versa	C.T.L., Bonn
Feinwaage	AC210S	Sartorius, Göttingen
Gefrierschrank -80 °C	Hera Freeze, HFU 686	Thermo Fisher, Dreieich
Infrarotlampe	Infraphil	Phillips, Hamburg
Inkubator	B28	Binder, Tuttlingen
Laborschüttler, Linear	SSL2	Stuart, Staffordshire, UK
Laborwaage	MD BA 100	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer, heizbar	Variomag	Monotherm, München
Mikrotiterplatten-Photometer	Safire	Tecan, Crailsheim
Nanodrop Photometer	ND-1000	Thermo Fisher, Dreieich
Netzgerät	E802	Consort, Turnhout, BE
Orbitalschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Phasenkontrastmikroskop	Wilovert S	Hund, Wetzlar
pH-Meter	HI2210 und pH211	Hanna, Vöhringen
Pipetten	Transfer S	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Reinwasseranlage	Purelab Ultra	Elga, Celle
Scintillationscounter	Wallac Betaplate 1205	Perkin Elmer, Baesweiler
Sterilbank	Technoflow 2F180-II	Integra, Fernwald
Sterilbank	HERAsafe	Thermo Fisher, Dreieich
Stickstofftank	Taylor-Wharton XL-180	Tec Lab, Königstein
Taumel-Rollenmischer	7204008	Marienfeld, Königshofen
Thermocycler	TPersonal	Biometra, Göttingen
Thermohaube	TH 30	Bühler, Hechingen
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

Gerät	Typ	Hersteller
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biofuge Fresco	Heraeus, Buckinghamshire, UK
Ultraschallstab	Sonifier 250	Branson, Danbury, US
Ultrazentrifuge	Optima XPN-100	Beckman Coulter, Karlsruhe
Vortexer	Vortex Genie 2	Bohemia, NY, USA
Wasserbad	SW22	Julabo, Seelbach
Zellbank	Espace 151	Air Liquide, Düsseldorf
Zellerntegerät	Mach II	Tomtec, Hamden, US
Zentrifuge Zellkultur	5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, high performance	Avanti J-201	Beckman Coulter, Karlsruhe
Zentrifugenbecher für Ultrafiltration	Jumbosep	Pall, Dreieich

3.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Alternativbezeichnung	Hersteller
Acrylamid-Lösung 29:1	-	Applichem, Darmstadt
AEC Tabletten	-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	-	Starlab, Ahrensburg
AL4 Fixierlösung für Röntgenfilm	-	Kodak, Rochester, US
Ammoniumperoxidsulfat	APS	Applichem, Darmstadt
Azeton	-	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	-	Applichem, Darmstadt
Carboxyfluoresceinsuccinimidylester	CFSE	Life Technologies, Darmstadt
Coomassie Brilliant-Blau G-250	-	Applichem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	DMSO	Applichem, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Applichem, Darmstadt
Essigsäure	Eisessig	Applichem, Darmstadt
Ethanol 100 %	EtOH	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Applichem, Darmstadt
GBX Entwicklerlösung für Röntgenfilm	-	Kodak, Rochester, US
GelRed	-	Thermo Fisher, Dreieich
Glutathion ox. und red.	-	Applichem, Darmstadt
Glycerin	-	Applichem, Darmstadt
Glycin	-	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Urea	Applichem, Darmstadt
Isopropanol	2-Propanol	Hedinger, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	Applichem, Darmstadt
Methanol	MetOH	Applichem, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	$NaHPO_4$	Applichem, Darmstadt
Natriumhydroxid	NaOH	Applichem, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat	SDS	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40	NP-40	Applichem, Darmstadt
Paraformaldehyd	PFA	Applichem, Darmstadt

Bezeichnung	Alternativbezeichnung	Hersteller
Phosphorsäure	-	Applichem, Darmstadt
Salzsäure 37 %	HCl	Applichem, Darmstadt
Tetramethylethylendiamin	TEMED	Applichem, Darmstadt
Trichloressigsäure	TCA	Applichem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	TRIS	Applichem, Darmstadt
Trypanblau	-	Applichem, Darmstadt
Tween-20	-	Applichem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	Applichem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	Applichem, Darmstadt

3.1.3 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Amicon Ultrafiltrationseinheiten	Millipore, Eschborn
Anti-Flag M2 Affinity Beads	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chromatographiesäulen	Biorad, München
CLXPosure Röntgenfilm	Life Technologies, Darmstadt
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmalhandschuhe	Semperit, Wien, AT
Einmal-Skalpelle	Braun, Melsungen
ELISpot-Platten	Millipore, Eschborn
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben aus Polycarbonat	Corning, Fogostraat, NL
FACS Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon-Röhrchen 15 und 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
His60 Ni Superflow Beads	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, FR
Kanülen Sterican	Braun, Melsungen
MACS-Beads	Miltenyi, Bergisch Gladbach
MACS-Säulen LS, MS und LD	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
Protein-A Agarose Beads	Life Technologies, Darmstadt
Serologische Pipetten 1-25 ml	Greiner, Nürtingen
Spritzen 1, 2, 5, 10 ml	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Zellsiebe 40, 70 und 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg

3.1.4 Enzyme, Kits und Reagenzien für die Molekularbiologie

Bezeichnung	Hersteller
Alkaline Phosphatase (rSAP)	Affimetrix, Wycombe, UK
BCA Protein Assay Kit	Life Technologies, Darmstadt
CellTiter 96® AQueous One Solution	Promega, Mannheim
ExpiFectamine 293 Transfection Kit	Life Technologies, Darmstadt
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Life Technologies, Darmstadt
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Frankfurt
mMESSAGE mMACHINE T7 Kit	Life Technologies, Darmstadt
Mung bean Nuklease	Promega, Mannheim
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey Nagel, Düren
peqGOLD Protein Marker IV	Peqlab, Erlangen
Q5 Polymerase	New England Biolabs
Quantikine IL-15 ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Rapid T4 Ligase Kit	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen (diverse)	New England Biolabs
Taq-Polymerase	Thermo Fisher, Dreieich
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Western Lightning Plus ECL Substrate	Perkin Elmer, Baesweiler

3.1.5 Medien, Zytokine und Antibiotika für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
AIM V	Life Technologies, Darmstadt
Blasticidin-S	Life Technologies, Darmstadt
DMEM	Life Technologies, Darmstadt
Expi293 Expression Medium	Life Technologies, Darmstadt
Geneticin G418	Life Technologies, Darmstadt
Humanserum	Transfusionszentrale der Universitätsmedizin, Mainz
IL-12	R&D Systems, Wiesbaden
IL-15	R&D Systems, Wiesbaden
IL-2	Chiron, Emeryville, US
IL-21	Biomol, Hamburg
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden
IL-7	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Lonza, Verviers, B
NEAAs	Biochrom, Berlin
OptiMEM, farblos	Life Technologies, Darmstadt
PBS, steril	Life Technologies, Darmstadt
Pen/Strep	Life Technologies, Darmstadt
RPMI-1640	Life Technologies, Darmstadt
Trypsin-EDTA (0.25%), Phenolrot	Life Technologies, Darmstadt
X-Vivo-15	Lonza, Verviers, B
Zeocin	Life Technologies, Darmstadt

3.1.6 Software

Bezeichnung	Hersteller
myImageAnalysis 2162391.1	Life Technologies, Darmstadt
GENtle 1.94	Magnus Manske, Köln
SE central 5.0	Sci-Ed Software, Morrisville, USA
Immunospot Professional 5.0	CTL, Bonn
Prism 6.0	GraphPAD, La Jolla, USA
FacsDiva 6.0	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo 10.0	FlowJo LLC, Ashland, USA
Serial Cloner 2.6	SerialBasics, FR

3.1.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie

	Klon	Verdünnung	Fluorochrom	Hersteller
CCR7	4B12	1:40	FITC, PE	eBioscience, San Diego, USA
CD27	O323	1:40	FITC	eBioscience, San Diego, USA
CD28	CD28.2	1:40	PE	eBioscience, San Diego, USA
CD3	UCHT1	1:20	APC, PE	BD Biosciences, Heidelberg
CD33	WM53	1:20	PE	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	13B8.2	1:20	FITC, PE	Beckman Coulter, Karlsruhe
CD45	J.33	1:20	APC	Beckman Coulter, Karlsruhe
CD45RA	HI100	1:20	APC, PE	BD Biosciences, Heidelberg
CD45RO	UCHL1	1:20	FITC	Beckman Coulter
CD62L	DREG-56	1:40	PE, APC	BioLegend, Fell
CD8	SK1	1:40	FITC, PE, V450	BD Biosciences, Heidelberg
CD80	MAB104	1:20	FITC	Beckman Coulter
CD86	IT2.2	1:20	PE	BD Biosciences, Heidelberg
CD95	SM1/23	1:40	PE	eBioscience, San Diego, USA
HLA-A2	BB7.2	1:40	PE, FITC	BioLegend, Fell
HLA-ABC	B9.12.1	1:20	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
IgG1	H2	1:20	FITC, PE, APC, V450	BD Biosciences, Heidelberg

3.1.8 Antikörper für IFN-γ-ELISpot

Bezeichnung	Hersteller
Primärantikörper 1-D1K	Mabtech, Nacka Strand, SE
Sekundärantikörper 7-B6-1-Biotin	Mabtech, Nacka Strand, SE

3.1.9 Antikörper für Westernblot

	Klon	Verdünnung	Hersteller
6 × His	AB18184	1:5000	Abcam, Cambridge, UK
anti-Maus	Ziege anti-Maus HRP 170-6516	1:20000	Biorad, München
IL-15	SC-8437	1:5000	Santa Cruz, Heidelberg

3.1.10 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5´- 3´	Ziel	Schnittstellen
UH242	CCACTGCTTACTGGCTTATC	T7 Promotor, Sequenzierung	-
UH243R	GATGGCTGGCAACTAGAAGG	BGH, Sequenzierung	-
UH259	CCTAGCAAACGACAGTTTGTC	IL-15, Mutagenese	-
UH260R	GACAAACTGTCGTTTGCTAGG	IL-15, Mutagenese	-
UH261	CGAATTCCGCCACCATGTACAGG	IL-15, Klonierung	EcoRI
UH262R	CGGATCCGGAAGTGTTGATGAAC	IL-15, Klonierung	BamHI
UH263R	CTCTAGAGGAAGTGTTGATGAA	IL-15, Klonierung	XbaI
UH264	CCAAGCTGGCTAGGTAAG	pEF4,Sequenzierung	NdeI
UH271	GCGCATATGAACTGGGTGAATGTAATAAGTG	IL-15, Klonierung	NdeI
UH272R	CCGGATCCTTAGGAAGTGTGATGAACATTTGG	IL-15, Klonierung	BamHI
UH273	GGAGATATACCATGGGCCATCA	pET-19b, Sequenzierung	-
UH274R	AGTTATTGCTCAGCGGTGGCAG	pET-19b, Sequenzierung	-
UH279	TGGACGTGAGCCACGAAGAC	IgG1-Fc, Deletion	-
UH280R	ACACGGTACGTGCTGTTGTACT	IgG1-Fc, Deletion	-
UH301	GACCACACCATCTCTGAAAT	IL-15Rα, Sequenzierung	-
UH302	GTCCGACTGATCATCAGTGT	IgG1-Fc, Sequenzierung	-
UH328	GTGGTGGAATTCGCCACCAT	ILR-Fc, Klonierung	EcoRI
UH329R	CGCAATGATATCTCACTTGTCATCGTCATCCTT GTAATCAAT GCATTTCAGAGATGGTGTG	ILR-Fc, Klonierung	EcoRV
UH330	AGAGACCCCGCCCTGGTGCACCAGAGACCCGC CCCACCTA AGAGTTGTGACAAAACTCAT	ILR-Fc, 13^+ Insertion	-
UH331R	AGGTGGGGCGGGTCTCTGGTGCACCAGGGCG GGGTCTCTAATGCATTTCAGAGATGGTGT	ILR-Fc, 13^+ Insertion	-
UH332	AGTGTGGTGGAATTCGCCACC	ILR13^+-Fc, Klonierung	-
UH333R	TACGACCTCGAGTCACTTCCCAGGGCTCAGGCT	ILR13^+-Fc, Klonierung	-
UH336R	CGCAATGATATCTCACTTGTCATCGTCATCCTT GTATCAGGTGGGGCGGGTCTCTGGTG	ILR-Ø, Klonierung	EcoRV

3.2 DNA-Aufreinigung und Analyse

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) wurde bei der Konstruktion der IL-15-Fusionsproteine ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^+-Fc eingesetzt, um sequenzspezifisch DNA-Fragmente zu amplifizieren. Dafür wurden Oligonukleotid-Primer generiert, die den Startpunkt der DNA-Polymerase festlegen. Eine Auflistung der eingesetzten Primer findet sich in Abschnitt 3.1.8. Der PCR-Mix wurde in einem 0,2 ml PCR-Tube gemäß den Angaben aus Tabelle 1 angesetzt und im Thermocycler platziert. Standardmäßig wurde die Programmroutine aus Tabelle 2 verwendet. Zur Bestimmung der Temperatur für die Primer-

hybridisierung wurde der Schmelzpunkt der Primer nach der Wallace-Regel, mit der Formel $T_M = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$ berechnet. Vom Ergebnis wurden 5 °C subtrahiert um die Hybridisierungstemperatur zu erhalten [208, 209].

Tabelle 1: Pipettierschema für die PCR

Komponente	50 µl Reaktion	Endkonzentration
5 × Q5 Puffer	10 µl	1 ×
10 nM dNTPs	1 µl µl	200 µM
Primer 1	2,5 µl	0,5 µM
Primer 2	2,5 µl	0,5 µM
Plasmid DNA	1 ng	1 ng
Q5 Polymerase	0,5 µl	0,02 U/µl
ddH_2O, nukleasefrei	auf 50 µl	-

Tabelle 2: PCR-Protokoll für Q5 Polymerase

Schritt	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	98 °C	30 sec	
Denaturierung	98 °C	10-20 sec	25-35 Zyklen
Hybridisierung	50-72 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec/kb	
Finale Extension	72 °C	2 min	
Pause	4 °C	-	

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe. Sie wurde eingesetzt, um die Ergebnisse analytischer Restriktionen zu kontrollieren oder DNA-Fragmente zu isolieren und aufzureinigen. Für die Herstellung der Gele wurden 100 ml 1 × TAE-Puffer (Tabelle 3) mit 1 g Agarose versetzt und kurz aufgekocht. Um die Detektion der DNA unter UV-Licht zu ermöglichen, wurde die Agaroselösung mit 5 µl des Ethidiumbromid-Ersatzstoffs GelRed versetzt. Der Farbstoff interkaliert in die DNA und wird durch UV-Strahlung (λ = 300 nm) zur Emission von Licht im sichtbaren Bereich (λ = 600 nm) angeregt. Die DNA-Proben wurden mit 6 × Ladepuffer versetzt und in 1 × TAE Puffer bei 100 V in der Elektrophoresekammer aufgetrennt.

Tabelle 3: Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

50 × TAE	2 M TRIS, 0,05 M EDTA, pH 8,3
6 × Ladepuffer	1 × TAE, 50 % Glycerin, 0,001 % Bromphenolblau
1 % Gellösung	100 ml 1 × TAE, 1 g Agarose, 5 µl GelRed

3.2.3 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen kann DNA sequenzspezifisch gespalten werden. Dabei entstehen entweder glatte Enden, bei denen Plus- und Minusstrang der DNA exakt an derselben Stelle gespalten werden, oder Enden mit einem Überhang, wenn die Spaltstellen um einige Basenpaare versetzt sind. Während der Klonierung der Expressionskonstrukte für IL-15, ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc wurde die DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen eingesetzt, um gezielt DNA-Fragmente auszuschneiden. Für die Überprüfung von Klonierungen wurden die Restriktionsenzyme so gewählt, dass nur das korrekte Endprodukt ein spezifisches Fragmentmuster nach Auftrennung in der Agarose-Gelelektrophorese erzeugt. Für den analytischen Verdau wurde 1 µg DNA mit 5 U Restriktionsenzym und 2,5 µl des passenden 10 × Puffers auf 25 µl mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt und für 2 h Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei gleichzeitigem Einsatz von mehreren Enzymen wurde ein Puffer gewählt, in dem alle Enzyme aktiv sind. Waren die Enzyme nicht in einem Puffer kombinierbar, so wurden sie sequenziell verwendet. Für eine spätere Isolation und Weiterverwendung einzelner DNA-Fragmente wurden bis zu 5 µg DNA im Restriktionsverdau eingesetzt und die Konzentration der Restriktionsenzyme entsprechend angepasst. Die oben genannten Inkubationsbedingungen und das Gesamtvolumen wurden beibehalten.

3.2.4 Klenow-Reaktion

Die Klenow-Reaktion wurde verwendet um DNA-Fragmente, die mit nicht kompatiblen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, durch Ligation verbinden zu können. Sie beruht auf der Aktivität des Klenow-Fragments, dem größeren der zwei Proteinfragmente, aus denen sich die DNA-Polymerase-I von *E. coli* zusammensetzt. 5´-überhängende DNA-Einzelstränge doppelsträngiger DNA werden dabei durch die 5'→3' Polymeraseaktivität des Klenow-Fragments aufgefüllt und 3´-Überhänge durch die 3'→5'- Exonukleaseaktivität abgeschnitten [210]. So entstehen auf beiden Seiten glatte Enden, die durch Ligation beliebig kombiniert werden können. Zur Durchführung der Reaktion wurde 1 µg DNA mit 1 U Klenow-Fragment mit 33 µM dNTPs in 20 µl Gesamtvolumen für 15 min bei 25°C inkubiert. Da das Klenow-Fragment in allen NEB-Restriktionspuffern aktiv ist, wurden Enzym und dNTPs gewöhnlich gegen Ende der Restriktionszeit dem Restriktionsansatz zugefügt. Optional wurde die Klenow-Reaktion durch Zugabe von EDTA auf eine Endkonzentration von 10 mM und Erhitzen des Ansatzes für 20 min auf 75 °C gestoppt.

3.2.5 Dephosphorylierung endständiger Phosphatgruppen

Die Dephosphorylierung endständiger Phosphatgruppen wurde bei der Klonierung eingesetzt, um unerwünschte Ligationen zu verhindern. Meist wurden linearisierte Plasmidvektoren dephosphoryliert, um ihre Religation ohne *Insert* zu verhindern. Dazu wurde eine rekom-

binant hergestellte, alkalische Phosphatase (*recombinant shrimp alkaline phosphatase*, rSAP) aus der Eismeergarnele *Pandalus borealis* verwendet [211]. Pro Picomol freier DNA-Enden wurde 1 U des Enzyms in einem Gesamtvolumen von 25 µl eingesetzt, was etwa 1 µg eines linearisierten 3 kb Plasmids entspricht. Die DNA wurde für die Reaktion entweder im zugehörigen 1 × rSAP-Puffer gelöst oder die Dephosphorylierung erfolgte nach dem Restriktionsverdau in einem der NEB-Restriktionspuffer. Inkubiert wurde der Reaktionsansatz bei 37 °C für 30-60 min. Optional wurde die rSAP 15 min bei 65 °C inaktiviert.

3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde bei der Klonierung eingesetzt, um zwei oder mehrere DNA-Fragmente zu verbinden. Ligasen bilden eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 3´Hydroxyl- und dem 5´Phosphatrest der Fragmente aus und sind essentielle Komponenten der DNA-Replikation, Rekombination und von Reparaturmechanismen. Für die Experimente dieser Arbeit wurde eine rekombinant hergestellte Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet [212, 213]. Die DNA muss vor der Ligation mit Restriktionsenzymen geschnitten werden, die kompatible, überhängende Enden erzeugen. Alternativ können auch zwei Fragmente mit glatten Enden verknüpft werden. Durch die in Abschnitt 3.2.4 beschriebene Dephosphorylierung der DNA kann die Ligation spezifischer Fragmente inhibiert werden.
DNA-Ligationen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit einem 1:3-Verhältnis von Vektor zum *Insert*. Die DNA-Fragmente wurden in 1 × Rapid-DNA-Ligationspuffer äquilibriert und die Ligation daraufhin durch Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase gestartet. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ligationsansatz entweder direkt für eine Transformation (siehe Abschnitt 3.2.7) genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.7 Herstellung chemokompetenter *E. coli*

Die Herstellung chemokompetenter *E. coli* erfolgte nach der Inoue-Methode [214]. Eine Vorkultur von *E.coli XL1-Blue* wurde 1:100 in 250 ml SOB-Medium (Tabelle 4) angeimpft und bei 18°C bis zu einer Dichte von OD_{600}= 0,6 kultiviert. Die Zellsuspension wurde daraufhin direkt in Eiswasser abgekühlt und 10 min bei dieser Temperatur inkubiert. Die Zellen wurden dann 10 min bei 4°C und 2500 rcf pelletiert und anschließend in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei gleichen Bedingungen wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, mit 1,5 ml DMSO versetzt und aliquotiert zu 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Tabelle 4: Lösungen für die Herstellung chemokompetenter *E. coli*

SOB-Medium 1L	2 % Trypton, 0,55 % Hefeextrakt, 10 mM CaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, pH 7,0, autoklaviert
TB-Puffer	10 mM PIPES, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, pH 7,0 mit KOH eingestellt, sterilfiltriert 0,22 µm

3.2.8 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Als Transformation wird die Aufnahme freier DNA durch Bakterien bezeichnet. Bei der Transformation von Plasmid-DNA wird diese von transformationskompetenten *E. coli* aufgenommen und im Verlauf der Zellteilung repliziert. Dadurch findet eine Amplifikation der DNA statt, die genutzt wurde, um große Mengen der Expressionsplasmide für die Herstellung von IL-15, ILR-Ø, ILR-Fc und $ILR13^+$-Fc zu generieren. Lineare DNA-Fragmente werden von *E. coli* schlecht aufgenommen und nicht repliziert. Aus diesem Grund wurde die Transformation nach Ligationen durchgeführt um erfolgreich kombinierte, zirkuläre Plasmide zu isolieren. Durch den Einsatz von Antibiotika und Resistenzgenen, wurden Klone ohne das gewünschte Plasmid selektiv am Wachstum gehindert.

Für die Transformation wurden chemokompetente *E.coli XL1 Blue* auf Eis aufgetaut und 100 µl der Bakteriensuspension mit 1 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz versetzt. Der Ligationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 1 min bei 37 °C im Wasserbad. Nach erneutem Abkühlen auf Eis für 2 min wurden 900 µl LB-Medium zu jedem Transformationsansatz gegeben und diese für 45 min bei 37 °C und 150 rpm auf dem Bakterienschüttler inkubiert. Es wurden standardmäßig 50 µl der Bakteriensuspension pro Agarplatte ausgestrichen. Bei umfangreicheren Klonierungen mit geringer Wahrscheinlichkeit des gewünschten Endprodukts wurden die Bakterien 10 min bei 4000 rcf pelletiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und davon 20-100 µl ausgestrichen. Die Agarplatten wurden 16-18 h bei 37 °C inkubiert. Positive Kolonien wurden in eine 5 ml Starterkultur überführt und die Plasmidsequenz wurde durch analytischen Restriktionsverdau sowie Sequenzierung verifiziert. Die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien und Konzentrationen der Antibiotikalösungen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

LB-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, 1 % NaCl, 5mM NaOH
LB-Agar	0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, 0,5 % NaCl, 5mM NaOH, 1,5 % Agar
Ampicillin Stock	100 mg/ml Ampicillin in ddH_2O
Kanamycin Stock	50 mg/ml Kanamycin in ddH_2O
Chloramphenicol	34 mg/ml Chloramphenicol in 100 % Ethanol

3.2.9 DNA-Amplifikation und Isolation

Die Amplifikation von Plasmid-DNA erfolgte, wie in Abschnitt 3.2.8 beschrieben, durch Transformation in *E. coli* und anschließende Kultivierung eines positiven Klons in Anwesenheit von Selektionsantibiotika. Kleine Plasmid-DNA-Mengen von Bakterienkulturen bis 5 ml und durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden mit dem *High Pure Plasmid Isolation Kit* isoliert. Größere Mengen von Kulturen bis 500 ml wurden mit dem *NucleoBond Xtra Maxi Kit* isoliert. In beiden Systemen wurden die Bakterien zunächst durch Guanidiniumthiocyanat lysiert und die DNA im Anschluss an eine Siliciumdioxid-Schicht in einem Zenrifugenröhrchen gebunden [215]. Dort wurde die DNA mehrfach durch Pufferlösungen gewaschen und letztlich in nukleasefreiem Wasser eluiert. Zur DNA-Isolation aus Agarose-Gelen wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und über das *High Pure PCR Product Purification Kit* aufgereinigt. Die Anwendung der Kits erfolgte jeweils nach Herstellerangaben.

3.3 Proteinanalyse und rekombinante Proteinexpression

3.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich Proteine in einer Gelmatrix der Größe nach auftrennen [216]. Natriumlaurylsulfat (engl.: *sodium dodecyl sulfate*, SDS) in Gel- und Laufpuffern sowie das Aufkochen der Proben in Anwesenheit von β-Mercaptoethanol sorgen dafür, dass die Proteine bis auf ihre Primärstruktur denaturiert werden. Beim Verzicht auf SDS und β-Mercaptoethanol bleibt die Proteinstruktur erhalten und man spricht von einer nativen PAGE. Die Zusammensetzung der Lösungen, die in der SDS-PAGE verwendet wurden, sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Lösungen für die SDS-PAGE

Lösung C	1,5 M TRIS, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8
Lösung B	0,5 M TRIS, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8
10 × Laufpuffer	2 M Glycin, 250 mM TRIS, 1 % (w/v) SDS
4 × Probenpuffer	10 % β-Mercaptoethanol, 125 mM TRIS, 8 % SDS, 30 % Glycin, 1 % Bromphenolblau, pH 6,8

Die Gele wurden im Mini-Protean System gegossen und elektrophoretisch aufgetrennt. Proteinhaltige Lösungen wurden vor der elektrophoretischen Analyse mit 4 × Probenpuffer versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt. Zellpellets wurden in 1 × Probenpuffer aufgenommen und in gleicher Weise erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V und wurde beendet, sobald die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreichte. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde eine Spur mit dem peqGOLD IV Molekularge-

wichtsmarker mitgeführt. Es wurden Gele mit 5-12,5 % Acrylamid verwendet. Das Pipettierschema für die verschiedenen Gelkonzentrationen findet sich in Tabelle 7. Die Gele wurden nach der Elektrophorese entweder unspezifisch mit dem Coomassie-Farbstoff InstantBlue angefärbt oder nachfolgend im Westernblot (siehe Abschnitt 2.3.2) mit spezifischen Antikörpern behandelt. Die densitometrische Auswertung der Signalstärken erfolgte mit der Software myImageAnalysis v2.0.

Tabelle 7: Pipettierschema für SDS-PAGE-Gele

	Trenngel					Sammelgel
Konzentration	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	17,5 %	5 %
ddH_2O	2442 µl	2028 µl	1614 µl	1200 µl	785 µl	1257 µl
Lösung B	1257 µl	1257 µl	1257 µl	1257 µl	1257 µl	-
Lösung C	-	-	-	-	-	535 µl
Bis-/Acrylamid (30 %)	1257 µl	1671 µl	2085 µl	2500 µl	2914 µl	357 µl
APS (20 %)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	10 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	10 µl

3.3.2 Westernblot

Durch SDS-PAGE aufgetrennte, proteinhaltige Proben können im Westernblot an eine Trägermembran gebunden und dort mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden [217, 218]. Die SDS-PAGE-Gele wurden dazu im Mini-Protean System im Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Hierfür wurden Whatman-Papier, Transfermatten und Nitrozellulosemembran zunächst in Transferpuffer (Tabelle 8) äquilibriert und in folgender Reihenfolge in der Transferkassette übereinander geschichtet: Transfermatte, 3 × Whatman-Papier, Nitrozellulosemembran, SDS-PAGE-Gel, 3 × Whatman-Papier, Transfermatte. Der Transfer erfolgte bei 400 V, 150 mA und 200 W für 1 h und wurde durch eine unspezifische Proteinfärbung mit Ponceau-S-Lösung überprüft. Unregelmäßigkeiten auf der Membran, die zum Beispiel durch den Einschluss von Luftblasen entstehen können, wurden dadurch sichtbar gemacht und ggf. dokumentiert. Die Ponceau-Färbung wurde im Anschluss durch mehrmaliges Waschen der Membran mit PBS rückgängig gemacht. Freie Bindestellen auf der Membran wurden durch eine 30-minütige Inkubation in Blockierpuffer abgesättigt. Die Primärantikörper wurden nach den Angaben aus Abschnitt 3.1.6 in verdünnt und bei 4 °C für 16-24 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBST wurde sie eine Stunde mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten (engl.: *horseradish peroxidase*, HRP) Sekundärantikörper inkubiert. Nach dem Abwaschen des Sekundärantikörpers erfolgte die Detektion der Signale mit dem *Western-Lightning ECL Kit* und CL-XPosure Röntgenfilmen. Die Substratlösung wurde durch Mischen der beiden Lösungen aus dem ECL-Kit im Verhältnis 1:1 hergestellt und auf die Membran gegeben. Nach 1 min wurde die Membran aus der Sub-

stratlösungen genommen und zwischen zwei Plastikfolien platziert. Die Entwicklung der Filme wurde in der Dunkelkammer durchgeführt, wobei die Filme standardmäßig für 1 min belichtet wurden. Bei schwächeren Signalen wurde die Belichtungszeit auf bis zu 30 min verlängert. Die Filme wurden manuell in GBX-Entwicklerlösung entwickelt, kurz in einem Wasserbad gewaschen und abschließend in AL4-Fixierlösung fixiert. Die densitometrische Auswertung der Signalstärken erfolgte mit der Software myImageAnalysis v2.0 der Firma Thermo Scientific.

Tabelle 8: Lösungen für den Westernblot

Transferpuffer	1 × TG-Puffer mit 20 % Methanol
10 × TG-Puffer	1,92 M Glycin, 250 mM TRIS
Blockierpuffer	5 % Magermilchpulver in PBS
Ponceau-S Lösung	0.1 % Ponceau-S in 3 % Trichloressigsäure
PBST	PBS mit 0,2 % Tween

3.3.3 Rekombinante Herstellung von IL-15

IL-15 wurde im Zuge dieser Arbeit rekombinant in *E.coli* hergestellt. Es faltet sich dabei nicht in seine native Form, sondern aggregiert zu Einschlusskörpern (engl.: *inclusion bodies*), die innerhalb der Zelle verbleiben. Diese Einschlusskörperchen wurden isoliert und anschließend denaturiert. Nach einer affinitätschromatographischen Aufreinigung über ein 10 × His-Tag wurde IL-15 durch Rückfaltung wieder in die native Form überführt. In Tabelle 9 sind alle Lösungen aufgeführt, die für die IL-15-Produktion verwendet wurden.

Tabelle 9: Lösungen für die rekombinante Herstellung von IL-15

Lysepuffer	100 mM NaCl, 50 mM TRIS, 1 mM PMSF, 5 mM $MgSO_4$, 10 µg/ml DNAse I, 1 mg/ml Lysozym, pH 8,0
Waschpuffer A	TBS mit 100 mM NaCl, 0,5 % NP40, 0,5 % Triton X-100, 5 mM EDTA, pH 8,0
Waschpuffer B	3 M Harnstoff, 5 mM EDTA in TBS, pH 8,0
Denaturierungspuffer	8 M Harnstoff, 50 mM NaH_2PO_4, 10 mM TRIS, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH 8,0 (6,3 und 4,5 zum Waschen)
Dialysepuffer A	= Denaturierungspuffer
Renaturierungspuffer	100 mM TRIS, 500 mM Glycin, 1mM Glutathion ox., 10 mM Glutathion red., pH 8,0
Dialysepuffer B	10 mM NaH_2PO_4, 27 µM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4

3.3.3.1 Expression in *E. coli*

Die rekombinante Herstellung von IL-15 und IL-15N72D erfolgte im *E.coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Dieser Stamm ist transgen für tRNAs zu den Codons für Arginin (AGA, AGG), Leucin (CUA) und Isoleucin (AUA). Diese Codons werden in *E.coli* selten genutzt und können die Translation von Fremdgenen behindern. Durch die zusätzlichen tRNAs werden höhere Expressionslevel rekombinanter Proteine erreicht. Die Expressionsplasmide pET19b-IL-15 bzw. pET19b-IL-15N72D (Abbildung 41) wurden in kompetente BL-21 transformiert und über Ampicillin und Chloramphenicol selektiert. Positive Klone wurden am nächsten Tag in eine oder mehrere 5 ml Starterkulturen überführt, aus denen größere Kulturansätze mit Volumen bis zu 12 L für die Proteinexpression beimpft wurden. Erreichten die Kulturen eine Dichte von OD_{600} = 0,7 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zu einer Endkonzentration von 400 µM eingeleitet, wobei die Temperatur im Bakterienschüttler für eine gesteigerte Proteinexpression auf 28 °C gesenkt wurde. 16 h nach der IPTG-Induktion wurden die Zellen durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 6000 rcf pelletiert und entweder direkt lysiert oder bei -80 °C gelagert.

3.3.3.2 Aufreinigung und Rückfaltung von IL-15 und IL-15N72D aus Einschlusskörperchen

Zum Aufschluss der Bakterien wurden sie zu 5 ml/g Nassgewicht in Lysepuffer resuspendiert und 3 × 3 min bei 200 W und maximalem Output mit einem Ultraschallstab behandelt. Die Suspension wurde dabei mit Hilfe eines Eisbades unter 20 °C gehalten. Anschließend wurden Zelltrümmer und Einschlusskörperchen bei 10000 rcf und 4 °C für 15 min pelletiert und das Pellet in einer 20-fachen Menge Waschpuffer 1 min bei voller Leistung mit einem Ultraschallstab resuspendiert. Unlösliche Bestandteile wurden für 15 min bei 10000 rcf und 4 °C pelletiert. Dieser Schritt, durch den leicht lösliche Zellbestandteile ausgewaschen werden, wurde insgesamt 3-mal wiederholt. Die Prozedur wurde im Anschluss 4-mal mit Waschpuffer B durchgeführt, um schwer lösliche Zellbestandteile zu entfernen. Die Einschlusskörperchen sind in diesen Puffern nicht löslich und werden durch die wiederholte Zentrifugation im Pellet angereichert. Durch Zugabe von Denaturierungspuffer und eine 2-stündige Inkubation bei 37 °C wurde das verbleibende Pellet samt Einschlusskörperchen in Lösung gebracht. IL-15 bzw. IL-15N72D wurde anschließend über ein N-terminales 10 × His-Tag mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus der Lösung isoliert. Dazu wurde *His60 Ni Superflow Resin* in eine Chromatographiesäule gepackt und mit 10 Volumen Denaturierungspuffer mit pH 8.0 äquilibriert. Nach Beladen der Säule wurde diese mit je 10 Volumen Denaturierungspuffer mit pH 8,0, pH 6,3 und pH 4,5 wiederholt. Die Elution von IL-15 bzw. IL-N72D erfolgte in 12 Volumen Denaturierungspuffer mit pH 8,0 und 300 mM Imidazol, welches im Anschluss durch dreifache Dialyse gegen einen 100-fachen Überschuss Dialysepuffer A entfernt wurde.

Die IL-15- bzw. IL-15N72D-Lösung wurde anschließend durch Ultrafiltration bei 3000-4000 rcf in Amicon Ultra oder Jumbosep Filtereinheiten mit einem MWCO (engl.: *molecular weight cut-off*) von 10 kDa auf eine Proteinkonzentration von 2-4 mg/ml konzentriert, tropfenweise bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml in Renaturierungspuffer gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Magnetrührer bei niedriger Stufe inkubiert. Fehlgefaltetes und durch Aggregation ausgefallenes IL-15 bzw. IL-15N72D wurde durch Zentrifugation für 60 min bei 10000 rcf und 4 °C aus der Lösung entfernt. Die löslichen Proteine wurden, wie oben bereits beschrieben, durch Ultrafiltration mit einem MWCO von 10 kDa konzentriert. Nach dreifacher Dialyse gegen einen 100-fachen Überschuss des Dialysepuffers B wurde IL-15 bzw. IL-15N72D aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die genaue Konzentration der Proteine wurde im BCA-Assay bestimmt (siehe Abschnitt 3.4.2) und ihre Bioaktivität im Proliferationsassay mit CTLL-2 validiert (siehe Abschnitt 3.4.3).

3.4 Herstellung von superagonistischen IL-15-Fusionsproteinen

Für die Herstellung der IL-15-Fusionsproteine ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc wurde das Expi293-Expressionssystem verwendet. Die darin enthaltenen Expi293F-Zellen wurden als Suspensionskultur in Expi293-Kulturmedium bei 120 rpm, 37 °C und 8 % CO_2 in einem CO_2-Inkubator mit Linearschüttler kultiviert. Beim Erreichen einer Zelldichte von 5 × 10^6 Zellen/ml wurden sie in frisches Medium überführt und die Kultivierung mit einer Zelldichte von 1 × 10^6 Zellen/ml fortgesetzt. Die Transfektion erfolgte bei einer Zelldichte von 3 × 10^6 Zellen/ml. Für einen 30 ml Ansatz wurden 22,2 µg des Expressionsvektors für das jeweilige IL-15-Fusionsprotein (Abbildung 41 und
Abbildung 42) und 0,3 µg eines Expressionsvektors für das *large T antigen* des Simian-Virus-40 (pcDNA3.1-SV40-LTA) in 1,5 ml Opti-MEM und in einem zweiten Ansatz 80 µl Expifectamine in 1,5 ml Opti-MEM gelöst. Beide Ansätze wurden nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur vereint und anschließend für weitere 25-30 min inkubiert. Die Transfektionslösung wurde auf 25,5 ml Zellsuspension in Expi293-Expressionsmedium gegeben. Nach 16-18 h in Kultur wurden dem Transfektionsansatz 150 µl der Enhancerlösung E1 und 1,5 ml der Enhancerlösung E2 zugesetzt. Nach 5-7 Tagen Proteinexpression wurden die Zellen und Zelltrümmer durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 10000 rcf und 4 °C vom Kulturmedium getrennt und die Fusionsproteine affinitätschromatographisch aus dem Kulturmedium isoliert. Für ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc wurden 30 ml Kulturmedium mit 500 µl Protein-A-Agarose versetzt und über Nacht bei 4 °C in einem 50 ml Falcon-Röhrchen auf einem Taumel-Rollenmischer inkubiert. Für ILR-Ø wurden 500 µl *Anti-Flag M2 Affinity Agarose* verwendet. Am folgenden Tag wurden die Agarose-Beads auf eine Chromatographiesäule geladen und mit 10 Volumen TBS pH 7,5 gewaschen. Die Elution erfolgte in Fraktionen zu 1 ml mit TBS pH 3,0. Alle Elutionsfraktionen wurden direkt mit 110 µl 10 × TBS pH 7,5 versetzt um ihren pH-Wert zu

neutralisieren. Der Proteingehalt der Elutionsfraktionen wurde zunächst näherungsweise photometrisch durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Daraufhin wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereint, durch Ultrafiltration in Amicon Ultra oder Jumbosep Filtereinheiten bei 3000-4000 rcf auf 1-2 mg/ml aufkonzentriert und aliquotiert bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der genauen Proteinkonzentration erfolgte, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, über einen BCA-Assay. Die Bioaktivität wurde durch Proliferationsassays mit CTLL-2 und Mo7e überprüft (siehe Abschnitt 3.4.3).

3.4.1 IL-15-ELISA

ELISA ist ein Akronym für *enzyme linked immunoabsorbent assay* und bezeichnet ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen und anderen Antikörper-Zielstrukturen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen IL-15 und die IL-15-Superagonisten im Mausserum mit einem *Human IL-15 Quantikine ELISA Kit* gemessen. Es handelt sich dabei um einen Sandwich-ELISA, bei dem der primäre Antikörper bereits an eine 96-Well Platte gekoppelt ist. Die Serumproben wurden in dem im Kit enthaltenen Puffer verdünnt, zu 100 µl/Well auf die 96 Well Platte gegeben und 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Waschschritte, Bindung des sekundären Antikörpers und Zugabe der Substratlösung erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Farbreaktion wurde abhängig von ihrer Geschwindigkeit nach 5-30 min durch Zugabe von 50 µl 1 M Phosphorsäure gestoppt. Der kolorimetrische Nachweis erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm im Mikrotiterplatten-Photometer. Als Referenz wurden die Werte bei 570 nm gemessen.

3.4.2 Proteinbestimmung im BCA-Assay

Proteinkonzentrationen aufgereinigter Lösungen wurden im BCA-Assay bestimmt. Bicinchoninsäure (engl.: *bicinchoninic acid*, BCA) ist eine heterozyklische Dicarbonsäure, die mit einwertigen Kupferionen eine violette Komplexverbindung eingeht. In alkalischer Lösung wird Cu^{2+} in der Biuret-Reaktion durch Proteine quantitativ zu Cu^{+} reduziert. In diesem ersten Schritt entsteht bereits eine leichte Blaufärbung, die durch den Zusatz von BCA in ein intensives Violett umschlägt. So entsteht in proteinhaltigen Lösungen eine Farbentwicklung, deren Intensität mit der Proteinkonzentration korreliert. Die Durchführung der Tests erfolgte im Mikrotiterplatten-Format mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* nach Angaben des Herstellers. Die kolorimetrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm.

3.4.3 Bioaktivitätsbestimmung von IL-15 und IL-15-Superagonisten

Die Bestimmung der Bioaktivität von IL-15, ILR-Ø, ILR-Fc und $ILR13^{+}$-Fc erfolgte zunächst über einen Proliferationsassay mit der IL-2/15 abhängigen Zelllinie CTLL-2. Die Proliferationsrate ist dabei direkt abhängig von der Zytokinkonzentration und wurde entweder durch

einen ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsassay oder kolorimetrisch, durch Zugabe der *CellTiter 96 AQueous One Solution* der Firma Promega, bestimmt. Dazu wurden gewöhnlich serielle Verdünnungsreihen von 5-10000 pmol/L der Zytokine hergestellt und 100-200 µl/Well in Mikrotiterplatten auf 1 × 10^5 Zellen gegeben. Nach 4 Tagen Inkubation bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit wurde die Proliferation durch eine der nachfolgend beschriebenen Methoden gemessen.

3.4.3.1 ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsassay

Die Proliferationsbestimmung über den ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsassay beruht auf dem Einbau des radioaktiv markierten Nukleosids ^{3}H-Thymidin in neu synthetisierte DNA. Die Aufnahme von ^{3}H-Thymidin ist dabei direkt abhängig von der Proliferationsrate der Zellen. ^{3}H-Thymidin wurde zur Proliferationsmessung zu einer Endkonzentration von 0,5 µCi/Well auf die Zellen gegeben. Nach 16-18 Stunden Inkubation bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen durch Einfrieren und Auftauen lysiert und mit einem Zellerntegerät auf Glasfiltermatten übertragen. Nicht-DNA-gebundenes ^{3}H-Thymidin wurde durch mehrmaliges Waschen mit ddH_2O im Erntegerät entfernt. Die Glasfiltermatten wurden getrocknet und mit 20 ml Szintillationsflüssigkeit in Folie eingeschweißt. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Strahlung in einem Szintillationsdetektor.

3.4.3.2 CellTiter 96-Assay

CellTiter 96 ist eine MTT-basierte Methode zur Bestimmung der Zellproliferation. Dabei wird der wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch Reduktion in Formazan umgewandelt. Die Farbentwicklung ist dabei proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Probe. Zur Bestimmung der Proliferation wurden 20 µl des CellTiter 96-Reagenzes in 100 µl Kulturmedium gegeben und die Farbentwicklung wurde nach 2-4 h bei 490 nm im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

3.5 Zellkultur und zelluläre Analysen

3.5.1 Kultivierung, Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung von Zelllinien

Alle Arbeitsschritte an Zellen oder deren Kulturmedien erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank. Die Kultivierung erfolgte, mit Ausnahme von Expi293F, in Zellkulturflaschen oder Kulturschalen bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit. Expi293F-Zellen wurden in sterilen Erlenmeyerkolben bei 37 °C, 8 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit auf einem Linearschüttler bei 200 rpm kultiviert. Adhärent wachsende Zellen wurden bei vollständiger Konfluenz neu ausgesät. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen 5-10 min mit Trypsin EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Dadurch lösen sich die Zellen von

der Oberfläche des Kulturgefäßes und der Zellverbund wird aufgebrochen. Die Trypsin-EDTA Lösung wurde zweimal mit Kulturmedium ausgewaschen und die Zellen durch Zentrifugation von je 5 min bei 450 rcf pelletiert. Abschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 0,5-1,5 × 10^6 Zellen/ml in frischem Medium ausgesät. Suspensionszellen wurden bei einer Kulturdichte von 4-7 × 10^6 Zellen/ml durch Zentrifugation bei 450 rcf gesammelt und ebenfalls in einer Konzentration von 0,5-1,5 × 10^6 Zellen/ml in frisches Kulturmedium überführt. Die Zellzahlen wurden unter einem Phasenkontrastmikroskop in einer Neubauer *improved* Zählkammer bestimmt. Die hierbei verwendete Formal lautet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}}$$

Zur Überprüfung der Zellviabilität wurde die Zellsuspension 1:2 bis 1:20 mit Trypanblaulösung verdünnt, wodurch tote Zellen blau angefärbt wurden. Es folgt in den nächsten Abschnitten eine kurze Beschreibung der verwendeten Zelllinien. Die Zusammensetzung der zugehörigen Kulturmedien ist in Tabelle 10 aufgeführt.

3.5.1.1 HEK 293, HEK 293T und Expi293F

HEK 293 (ATCC: CRL-1573) ist eine humane, embryonale Nierenzelllinie (engl.: *human embryonic kidney*, HEK), die durch Insertion von Adenovirus 5 DNA immortalisiert wurde. Die wabenförmigen Zellen wachsen adhärent und bilden eine Monoschicht aus. Die Linie HEK 293T (ATCC: CRL-3216) wurde zusätzlich mit dem SV40-LTA transformiert. Dadurch eignet sie sich besonders für die Produktion von Retroviren und rekombinanten Proteinen mit SV40-Replikationsursprung (siehe Abschnitt 4.5.2.1) [219-221]. Expi293F ist eine kommerzielle Variante der HEK 293-Linie von Life Technologies. Sie erreicht hohe Zelldichten in Suspensionskultur mit bis zu 8 × 10^6 Zellen/ml und wächst in serumfreiem Kulturmedium. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde Expi293F in der vorliegenden Arbeit für die Herstellung von ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13$^+$-Fc verwendet.

3.5.1.2 CHO

CHO (ATCC: CCL-61) ist eine Zelllinie, die aus dem Ovar des chinesischen Streifenhamsters (engl.: *chinese hamster ovarian*, CHO) stammt. Die meist länglichen Zellen wachsen adhärent und bilden eine Monoschicht aus. CHO ist eine der meistgenutzten Zelllinien für die rekombinante Herstellung von Proteinen, insbesondere für Proteine und monoklonale Antikörper, die für Therapiezwecke benötigt werden [222-224].

3.5.1.3 CTLL-2

Die Zelllinie CTLL-2 (ATCC: TIB-214) entstammt einer zytotoxischen T-Zelle einer C57BL/6-Maus [225]. CTLL-2 exprimieren den murinen IL-15Rαβγ und reagieren dadurch auf IL-2 und IL-15 mit konzentrationsabhängiger Proliferation [226]. Aus diesem Grund wird CTLL-2 von kommerziellen Zytokinproduzenten zur Bestimmung der Bioaktivität von IL-2 und IL-15 eingesetzt [227]. In der vorliegenden Arbeit wurde sie außerdem auch zur Bestimmung der Bioaktivitäten von IL-15, ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc verwendet.

3.5.1.4 M-07e

M-07e (DSMZ: ACC 104) ist eine humane, zytokinabhängige Zelllinie, die von einer akuten, megakaryoblastischen Leukämie stammt und wurde aus dem peripheren Blut eines 6 Monate alten Mädchens isoliert [228]. M-07e exprimieren den IL-15Rβγ und reagieren mit konzentrationsabhängiger Proliferation auf GM-CSF, IFN-alpha, IFN-ß, IFN-gamma, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-15, NGF, SCF, TNF-alpha und TPO [229, 230]. Aufgrund der von CTLL-2 verschiedenen Rezeptorkonfiguration wurden sie in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Bioaktivität von ILR-Ø, ILR-Fc und ILR-13^{+}-Fc verwendet.

3.5.1.5 K562 und K562-A2

Die Zelllinie K562 (ATCC: CCL-243) entstammt dem Pleuraerguss einer 53-jährigen Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie in der Blastenkrise [231]. K562-Zellen zeigen eine minimale Expression von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II und werden nicht von CD8^{+} T-Zellen erkannt [232]. Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie häufig als Zielzellen in NK-Zell-Assays bzw. als Negativkontrolle in CD8^{+} T-Zell-Assays eingesetzt. K562-A2 ist eine gentechnisch modifizierte Variante dieser Linie, die konstitutiv HLA-A*0201 exprimiert. Das β_2-Mikroglobulin ist dabei endogenen Ursprungs [233, 234]. K562-A2 wurden in der vorliegenden Arbeit zur Stimulation alloreaktiver T-Zellen gegen HLA-A*0201 genutzt. Außerdem wurden sie als Stimulatoren im IFN-γ-ELISpot verwendet.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Medien für die Zellkultur

Bezeichnung	Kulturmedium
AML-Linien	RPMI-1640, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin 1 % NEAAs, 1 % Pen/Strep
CHO	RPMI-1640, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin 1 % NEAAs, 1 % Pen/Strep
CTLL-2	RPMI-1640, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin 1 % NEAAs, 100 U/ml IL-2, 1 % Pen/Strep
Expi293F	Expi293 Expression Medium, 1 % Pen/Strep (Transfektion ohne Pen/Strep)
HEK 293	DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin 1 % NEAAs, 1 % Pen/Strep
HEK 293T	DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin 1 % NEAAs, 500 µg/ml G418, 1 % Pen/Strep
K562	RPMI-1640, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin 1 % NEAAs, 1 % Pen/Strep
K562-A2	DMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin 1 % NEAAs, 500 µg/ml G418, 1 % Pen/Strep
M-07e	RPMI-1640, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin 1 % NEAAs 10 ng/ml GM-DCF, 1 % Pen/Strep
Einfriermedium	FCS, 10 % DMSO

3.5.1.6 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die langfristige Lagerung von Zellen erfolgte bei -196 °C in der Gasphase von flüssigem Stickstoff. Für den Einfrierprozess wurden die Zellen mit einer Zelldichte bis zu 5×10^7 Zellen/ml in Einfriermedium (Tabelle 10) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden 24 h in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80 °C gelagert. Durch das Isopropanol wird die Zellsuspension um etwa 1 °C pro Minute abgekühlt. Das kontrollierte Abkühlen vermindert die Bildung von Eiskristallen und erhöht dadurch die Viabilität der Zellen. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in die Stickstoffbank überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zum Auftauen wurden die gefrorenen Kryoröhrchen in 37 °C warmem Wasser angetaut und von außen mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Zellsuspension wurde in 10 ml Kulturmedium oder PBS aufgenommen und 5 min bei 450 rcf zentrifugiert. Um DMSO-Reste vollständig auszuwaschen, wurde der Vorgang zweimal wiederholt. Zellzahl und Viabilität wurden anschließend im Hämozytometer (siehe Abschnitt 3.5.1) bestimmt und die Zellen in Kultur genommen.

3.5.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (engl.: *fluorescence-activated cell sorting*, FACS) ist ein optisches Messverfahren mit dem Analysen auf Einzelzellebene durchgeführt werden können. Die Zellen passieren dabei mehrere Laserstrahlen, deren Licht abhängig von Größe, Form und Granularität der Zelle seitlich gestreut wird oder die Zelle ohne größere Beugungserscheinungen passiert, wobei beide Anteile des Lichts von Photodetektoren aufgefangen werden. Die Analyse der Signalstärke und Verteilung ermöglicht Rückschlüsse auf die Zellgröße und die Beschaffenheit der Zelloberfläche zu ziehen. Der wichtigste Teil der Durchflusszytometrie, der die Komplexität der Methode begründet, ist allerdings die Verwendung von Fluoro-

chrom-gekoppelten Antikörpern, die verschiedene charakteristische Anregungs- und Emissionsspektren besitzen. Dadurch können Oberflächenstrukturen der Zellen und durch spezielle Färbeprotokolle auch intrazelluläre Antigene mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert werden. Beim Durchfluss durch das Zytometer werden die Fluorochrome durch monochromatische Laser verschiedener Wellenlängen angeregt und emittieren daraufhin Licht höherer Wellenlängen, wodurch die Zellen in einer einzigen Messung auf eine Vielzahl von Merkmalen untersucht werden können.

Zur Färbung der Zellen wurden Einzelzellsuspensionen mit bis zu 0,5 × 10^6 Zellen/ml in FACS-Puffer (PBS, 0,5 % BSA, 0,01 % Natriumazid) hergestellt und entsprechend den Angaben aus Abschnitt 3.1.7 mit Antikörpern versetzt. Die Inkubation der Antikörper erfolgte in FACS-Röhrchen für 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 450 rcf pelletiert. Für die direkte Messung wurden 0,5 × 10^6 Zellen/ml in FACS Puffer resuspendiert und für spätere Messungen wurden die Zellen in PBS mit 4 % Paraformaldehyd resuspendiert und lichtgeschützt bis zu 72 h bei 4 °C gelagert. Die Messungen wurden an einem FACSCanto II Durchflusszytometer durchgeführt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit den Programmen FACSDiva 6.0 und Flowjo 10.0.

3.5.3 IFN-γ-ELISpot

Der IFN-γ-ELISpot-Assay (engl.: *enzyme-linked immunosorbent spot*) ist ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren für Interferon-γ (IFN-γ), ein proinflammatorisches Zytokin, das von $CD8^+$ T-Zellen nach Antigenkontakt freigesetzt wird. Das Prinzip des ELISpots ist dem ELISA (siehe Abschnitt 3.4.1) ähnlich und kann auch für andere Antigene verwendet werden. Für den IFN-γ-ELISpot-Assay wird ein IFN-γ-spezifischer Antikörper an eine Trägermembran gekoppelt auf der im Anschluss die $CD8^+$ T-Zellen und Stimulatoren inkubiert werden. INF-γ wird von aktivierten T-Zellen sekretiert und bindet lokal an den gekoppelten Primärantikörper. Die Messung der INF-γ-Freisetzung als Reaktion auf verschiedene Stimulatoren kann Auskunft über die Antigenspezifität der untersuchten T-Zellpopulation geben. Die Zellen werden nach der Inkubation abgewaschen und der Nachweis von IFN-γ erfolgt über eine Farbreaktion, die durch einen sekundären, Enzym-gekoppelten, IFN-γ-spezifischen Antikörper katalysiert wird. Dabei entstehen auf der Membran die für diesen Assay charakteristischen Farbpunkte (engl.: *spots*) an den Stellen, an denen sich aktivierte T-Zellen befanden, wobei die Intensität der T-Zellaktivierung mit der Anzahl der Spots korreliert. In der vorliegenden Arbeit wurden ein biotinylierter Sekundärantikörper sowie eine Avidin-gekoppelte Peroxidase verwendet. Als Substrat wurde 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) verwendet, dass durch die Peroxidase in den roten Farbstoff 3-Azo-9-ethylcarbazole umgesetzt wird.

Für die Durchführung wurde die Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) der ELISpot-Platte 1 min mit 20 µl 35 % Ethanol aktiviert und im Anschluss dreimal mit je 200 µl PBST (Tabelle 11) gewaschen. Der primäre Antikörper wurde mit PBS auf eine Konzentration von 10 µg/ml eingestellt und zu 60 µl/Well in die Platte gegeben. Die Bindung des Antikörpers erfolgte durch Inkubation bei 4 °C für 16-18 h. Nicht immobilisierte Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und freie Bindestellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 200 µl Blockierpuffer für 30 min abgesättigt. Pro Well wurden 1-2 × 10^4 T-Zellen zusammen mit 2-5 × 10^4 Stimulatoren für 16-18 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit in AIM V mit 10 % Humanserum kultiviert. Vor der Entwicklung wurde die Platte fünfmal mit je 200 µl PBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde mit PBS, 0,5 % BSA auf eine Konzentration von 2 µg/ml eingestellt, zu je 80 µl in die Wells gegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Der Avidin-Peroxidase-Komplex wurde eine halbe Stunde vor Ablauf der Inkubationszeit angesetzt. Dazu wurden 50 µl Reagenz A und 50 µl Reagenz B aus dem VECTASTAIN Elite ABC Kit in 10 ml PBS gelöst und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde nach Ablauf der Inkubationszeit dreimal mit 200 µl PBST und dreimal mit PBS gewaschen, mit 80 µl/Well des Avidin-Peroxidase-Komplexes beladen und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Herstellung des AEC-Substrates wurde eine AEC-Tablette in 2,5 ml Dimethylformamid gelöst und mit Acetatpuffer auf 50 ml aufgefüllt. Um unlösliche Aggregate zu entfernen, wurde die Lösung durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert. Die Lagerung des Substrates erfolgte unter Lichtausschluss bei 4 °C. Kurz vor Gebrauch wurde dem AEC-Substrat 0,5 µl/ml 30 % H_2O_2 zugegeben. Nachdem ungebundene Peroxidase-Avidin-Komplexe durch dreimaliges Waschen mit PBST und PBS von der ELISpot-Platte entfernt wurden, erfolgte die Farbreaktion mit 100 µl/Well AEC-Substrat für 5-15 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss. Die Reaktion wurde unter fließendem Wasser abgestoppt und die Membran der ELISpot-Platte bei Raumtemperatur getrocknet. Die Zählung der Spots und Auswertung der Ergebnisse wurde an einem Immunospot S5 Versa Analysegerät mit der Immunospot Professional Software in der Version 5.3 durchgeführt.

Tabelle 11: Lösungen für IFN-γ-ELISpot

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBST	PBS, 0,05 % Tween-20
AEC Substrat	1 AEC Tablette, 2,5 ml Dimethylformamid, 47,5 ml Acetatpuffer
	0,45 µm filtriert, vor Gebrauch 0,5 µl/ml 30 % H_20_2 zugeben
Blockierpuffer	AIM V, 5 % Humanserum
Acetatpuffer	46,9 ml ddH_2O, 11 ml 0,2 N Natriumacetat, 4,6 ml Essigsäure

3.5.4 PBMC-Aufreinigung aus Buffy-Coats

Buffy-Coats von gesunden Spendern wurden von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz bezogen. Die Isolierung der PBMCs erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque. Zunächst wurde der Inhalt der Transfusionsbeutel steril mit einer 50 ml Spritze entnommen und im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. Im Anschluss wurden 25 ml Ficoll-Paque in 50 ml Falcons vorgelegt und langsam mit je 25 ml des Buffy-Coat/PBS-Gemisches überschichtet. Durch 20-minütige Zentrifugation bei 800 rcf und 4°C wurden die Bestandteile des Buffy-Coats aufgetrennt. Um eine Verwirbelung der Schichten zu vermeiden, wurde die Zentrifuge dabei ohne Bremse betrieben. Die PBMCs waren nach diesem Schritt als weiße Schicht erkennbar und wurden vorsichtig abgesaugt. Sie wurden zweimal mit je 25 ml PBS gewaschen um Ficoll-Paque Reste zu entfernen und entweder direkt weiterverarbeitet oder zu 5×10^7 Zellen/ml kryokonserviert.

3.5.5 Isolierung von $CD8^+$ T-Zellen durch MACS

Die magnetische Zellsortierung (engl.: *magnetic activated cell sorting*, MACS) ist eine Technik, bei der an superparamagnetische Beads konjugierte, spezifische Antikörper zur Auftrennung eines Zellgemisches eingesetzt werden. Dabei binden die Antikörper ihre Zielstrukturen auf der Zelloberfläche und koppeln dadurch die Zielzellen an die Beads. Beim Durchlauf durch eine magnetisierte Separationssäule werden die Zielzellen zurückgehalten und so vom Rest der Zellsuspension getrennt. Auf diese Weise können spezifische Zellpopulationen angereichert oder ausgeschlossen werden.

Für die Isolierung von $CD8^+$ T-Zellen aus PBMCs wurden humane CD8-Microbeads verwendet. Dazu wurden 1×10^7 PBMCs in 80 µl MACS-Puffer (PBS, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA, pH 7,2) resuspendiert und mit 20 µl der CD8-Microbeads für 15 min bei 4 °C inkubiert. Bei mehr als 1×10^7 PBMCs wurden die Mengen entsprechend angepasst. Die Zellen wurden anschließend mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und zu 2×10^8 Zellen/ml im gleichen Puffer resuspendiert. Zur Separation wurden abhängig von der Zellzahl MACS MS- oder LS-Säulen verwendet. Die Säulen wurden in einer magnetischen Halterung platziert und mit MACS-Puffer äquilibriert. Für MS-Säulen wurden 0,5 ml und für LS-Säulen 3 ml Puffer verwendet. Anschließend wurde die Zellsuspension aufgetragen und die Säule dreimal mit 0,5 bzw. 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Zur Elution wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und 1 bzw. 5 ml MACS-Puffer wurden mit einem Stempel durch die Säule gedrückt. Die Reinheit des Eluats wurde durchflusszytometrisch mit CD4-, CD8- und CD45-spezifischen Antikörpern überprüft und lag gewöhnlich bei über 95 %. Für die Isolierung naiver $CD8^+$ T-Zellen wurde ein naives T-Zell-Isolationskit verwendet. Dabei wird der $CD8^+$-Positivselektion eine weitere MACS-Separation vorgeschaltet, bei der nicht-naive Zellen durch einen Beadcocktail gegen CD45RO, CD56, CD57 und CD244 entfernt werden. Die Durchfüh-

rung gleicht der Positivselektion, allerdings werden die markierten, nicht-naiven Zellen verworfen und der Durchlauf der Säule für die nachfolgende CD8-Positivselektion weiterverwendet.

3.5.6 Generierung maturierter DCs aus Monozyten

Für die Generierung maturierter DCs aus Monozyten wurden bis zu 1 × 10^8 PBMCs eines gesunden Spenders in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Dort wurden sie für 2-3 Stunden in Basis-Medium bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert, bis ein Großteil der Monozyten an der Oberfläche der Schale adhärierte. Nicht-adhärente Zellen wurden durch Spülen der Schale mit PBS entfernt und verworfen. Die adhärente Zellpopulation wurde mit frischem DC-Medium (Tabelle 12) für 6 Tage weiterkultiviert. Zum Ausreifen der DCs wurden sie am sechsten Tag der Kultur in frisches DC-Medium mit Maturierungscocktail überführt und für 24 h weiterkultiviert. Im Anschluss wurden die DCs entweder direkt zur Stimulation von T-Zellen verwendet oder kryokonserviert bei -196 °C gelagert.

Tabelle 12: Kulturmedien für die DC-Generierung

Basis-Medium	X-Vivo 15, 5 % Humanserum, 50 µM β-Mercaptoethanol
DC-Medium	Basismedium, 1000 U/ml GMCSF und 500 U/ml IL-4
Maturierungscocktail	DC-Medium, 10ng/ml IL1β, 10ng/ml TNFα, 15 ng/ml IL-6, 1µg/ml Prostaglandin E2

3.5.7 RNA-Elektroporation in DCs

Für die Generierung HLA-A2-reaktiver T-Zellen wurden zur initialen Stimulation HLA-A2-transduzierte DCs verwendet, deren Generierung in Abschnitt 3.5.9.3 beschrieben wird. HLA-A*0201-RNA wurde durch *in vitro*-Transkription mit dem mMESSAGE mMACHINE T7-Kit generiert. Der dafür verwendete Vektor pcDNA3.1-HLA-A*0201 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Wölfel der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt. Am Tag der Elektroporation wurden die DCs zweimal mit farblosem OptiMEM gewaschen und 5 × 10^6 Zellen in 200 µl OptiMEM aufgenommen. Die 200 µl Zellsuspension wurde mit 20 µg HLA-A*0201-RNA gemischt und luftblasenfrei in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte für 5 ms mit einem 400-V-Impuls in Rechteckschwingung. Danach wurde die Zellen sofort in 1 ml vorgewärmtes DC-Medium gegeben und in einer 12-Well-Platte bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 24 Stunden wurde die HLA-A2-Expression durchflusszytometrisch überprüft.

3.5.8 Bestrahlung von Zellen

Die Bestrahlung von Zellen erfolgte in einer Gammacell-2000 ^{137}Cs-Zellbestrahlungsanlage. Dazu wurden die Zellen in Suspension gebracht und in 15 oder 50 ml Falcon-Röhrchen im Gerät platziert. Die Strahlendosis wurde über die Bestrahlungszeit reguliert. Aus Strahlenschutzgründen wurden stets ein Dosisleistungsmessgerät und ein Filmdosimeter mitgeführt.

3.5.9 Generierung antigenspezifischer T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden humane, antigenspezifische CD8$^+$ T-Zellen *in vitro* durch wöchentliche Stimulation mit verschiedenen Zellpopulationen generiert. Unabhängig von der Spezifität der T-Zellen erfolgte die Kultivierung der T-Zellen in T-Zellmedium (Tabelle 13) bei 37 °C, 5 % CO_2, 95 % Luftfeuchtigkeit und bei einer initialen Zelldichte von 1-2 × 10^6 Zellen/ml. Die Anzahl der eingesetzten Stimulatoren wurde in Abhängigkeit ihrer Zellgröße, Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Kostimulation variiert. Stimulatoren und Kulturmedium wurden wöchentlich ausgewechselt. Ab Tag 14 wurde IL-12 im Kulturmedium durch IL-21 ausgetauscht. Bei Stimulation mit DCs wurde auf zusätzliches IL-12 im Kulturmedium verzichtet. In den folgenden drei Abschnitten wird die Generierung der HLA-A2, AML und EBV-reaktiven T-Zellen im Detail beschrieben.

Tabelle 13: Kulturmedien für die T-Zellkultur

T-Zellmedium bis Tag 14	AIM V, 10 % Humanserum, 5 ng/ml IL-7, 1 ng/ml IL-12, 5 ng/ml IL-15, 10 ng/ml IL-21
T-Zellmedium ab Tag 14	AIM V, 10 % Humanserum, 5 ng/ml IL-7, 1 ng/ml IL-12, 5 ng/ml IL-15, 100 U/ml IL-2

3.5.9.1 Generierung alloreaktiver T-Zellen gegen HLA-A*0201

CD8$^+$ T-Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.5.5 beschrieben, über CD8-MACS aus PBMCs eines gesunden, HLA-A2 negativen Spenders isoliert. Die ersten zwei Stimulationen erfolgten mit autologen, HLA-A*0201 transduzierten DCs im Verhältnis 10:1. Die Elektroporation der DCs mit HLA-A*0201 RNA erfolgte gemäß der Angaben aus Abschnitt 3.5.7. Die DCs wurden mit 25 Gy bestrahlt um ihr Auswachsen zu verhindern und den T-Zellen im Verhältnis 1:10 zugesetzt. Ab Tag 14 wurden K562-A2 zur Stimulation verwendet, die mit 100 Gy bestrahlt und den T-Zellen ebenfalls im Verhältnis 10:1 zugesetzt wurden. Die Reaktivität der so generierten T-Zellen wurde gewöhnlich an Tag 21 sowie vor der Weiterverwendung der T-Zellen im IFN-γ-ELISpot gegen K562-A2 überprüft.

3.5.9.2 Generierung AML-reaktiver T-Zellen

Vorstimulierte, AML-reaktive T-Zellen waren bereits kryokonserviert vorhanden und wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Wolfgang Herr der Universitätsmedizin Mainz generiert. Dazu wurden naive $CD8^+$ T-Zellen eines gesunden Spenders über MACS isoliert und repetitiv mit HLA-inkompatiblen, primären AML-Blasten, die zuvor mit 35-65 Gy bestrahlt wurden, im Verhältnis 1:1 stimuliert. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden kryokonservierte, AML-reaktive T-Zellen mit einer Kulturdauer von 35-42 Tagen aufgetaut, im Verhältnis 1:1 mit AML-Blasten restimuliert und nach 5 Tagen in Kultur für die *in vivo*-Versuche verwendet. Die Reaktivität der Zellen wurde an Tag 4 mittels IFN-γ-ELISpot gegen Blasten der jeweiligen AML überprüft.

3.5.9.3 Generierung EBV-reaktiver T-Zellen mit T_{SCM}-Phänotyp

Für die Generierung EBV-Peptid-spezifischer T_{SCM} wurden $CD8^+$ T-Zellen über CD8-MACS oder naive-CD8-MACS isoliert. Beide Populationen wurden in Anwesenheit von 5 µM TWS119 (Biozol) mit EBV-Peptid beladenen DCs im Verhältnis 10:1 stimuliert. Dabei wurden die Peptide LMP2 (CLGGLLTMV), BMLF1 (GLCTLVAML) und BRLF1 (YVLDHLIVV) mit einer Konzentration von je 5 µg/ml Kulturmedium eingesetzt. Die DCs wurden direkt vor ihrem Einsatz mit 25 Gy bestrahlt und die Reaktivität der generierten T-Zellen wurde vor ihrer weiteren Verwendung im IFNγ-ELISpot gegen EBV-Peptid beladenen DCs überprüft.

3.6 Arbeiten mit Versuchstieren

Die Zucht und Haltung der Mäuse, die für die *in vivo*-Versuche dieser Arbeit verwendet wurden erfolgte durch die Tierpfleger der zentralen Versuchstiereinrichtung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (engl.: *Translational Animal Research Center*, TARC). Die Mäuse wurden unter kontrollierten SPF-Bedingungen (engl.: *specific pathogen free*) in Filtertop-Käfigen gehalten und erhielten autoklaviertes Wasser und Trockenfutter *ad libitum*. Dem Trinkwasser wurde zum Schutz vor bakterieller Kontamination 0,08 mg/ml des Antibiotikagemisches Borgal zugesetzt (40 mg/ml Sulfadoxin, 200 mg/ml Trimethoprim). Alle Versuche wurden nach behördlicher Genehmigung, im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und nach den Empfehlungen der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde / *Society of Laboratory Animals*) durchgeführt.

3.6.1 Ganzkörperbestrahlung

NSG-Mäuse wurden vor dem AML-Transfer subletal mit 1,5 Gy bestrahlt. Durch die Bestrahlung erfolgt eine Konditionierung des Knochenmarks, die das Engraftment der AML-Blasten unterstützt [206, 235]. Die Bestrahlung erfolgte in der Kleintierbestrahlungsanlage mit einer ^{137}Cs Strahlungsquelle. Die Regulation der Strahlendosis erfolgte über die Bestrahlungszeit. Ein Dosisleistungsmessgerät und ein Filmdosimeter wurden dabei aus Strahlenschutzgründen mitgeführt.

3.6.2 Blutentnahme an der Schwanzvene

Vor Entnahme peripherer Blutproben wurden die Mäuse in einem Käfig mit einer Rotlichtlampe erwärmt, um eine Dilatation der Blutgefäße zu erreichen. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Schwanzvene und das Blut wurde in 500 µl Eppendorfgefäßen gesammelt. Um die Gerinnung der Blutproben zu verhindern, wurden 10-20 µl Heparin vorgelegt. Bei der Serumgewinnung wurde dem Blut kein Heparin zugesetzt.

3.6.3 Injektion von Zellsuspensionen und Zytokinlösungen

Die Injektionen von Zellsuspensionen und Zytokinlösungen erfolgte unter sterilen Bedingungen in den Räumen des TARC und unter einer Sicherheitswerkbank. Dabei wurden gewöhnlich sterile 1 ml Spritzen mit 26 G Kanüle verwendet. In den folgenden zwei Abschnitten werden die drei angewandten Injektionsroutinen näher beschrieben.

3.6.3.1 Intravenöse Injektion

Der Transfer von T-Zellen und AML-Blasten erfolgte durch intravenöse (i.v.) Injektionen. Die Zellen wurden vor dem Transfer zweimal mit PBS gewaschen und in PBS mit 0,5 % FCS resuspendiert. Die Mäuse wurden zunächst in einem Käfig mit einer Rotlichtlampe erwärmt, wodurch die Schwanzvene deutlich sichtbar hervortritt. Für die Injektion wurden die Mäuse in einem *Restrainer* fixiert und der Schwanz der Mäuse mit 70 % Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem Maximalvolumen von 200 µl in die laterale Schwanzvene der Mäuse injiziert.

3.6.3.2 Intraperitoneale Injektion

Zytokinlösungen wurden gewöhnlich intraperitoneal (i.p.) injiziert. Dabei wurden die Mäuse durch einen Nackengriff mit der linken Hand fixiert. Die Einstichstelle wurde ventral, etwa 2 cm über dem Schwanzansatz und 1 cm rechts oder links der Körpermitte gewählt. Das maximale Injektionsvolumen betrug hierbei 300 µl.

3.6.3.3 Subkutane Injektion

Die Etablierung subkutaner Tumore erfolgte durch subkutane (s.c.) Injektion tumorigener Zellen. Dafür wurden die Mäuse im Nackengriff fixiert und die Haut an der Einstichstelle zwischen Daumen und Zeigefinger leicht angehoben. Die Injektion von 200 µl Zellsuspension erfolgte ventrolateral unter die Haut. Bei korrekter Durchführung bildet sich direkt nach der Injektion eine sichtbare Wölbung um die Einstichstelle, die nach wenigen Minuten verschwindet.

3.6.4 Chirurgische Organentnahme und Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Die Versuchstiere wurden am Ende der Versuche durch zervikale Dislokation getötet und die Organentnahme erfolgte mit sterilem chirurgischem Besteck unter einer Sicherheitswerkbank. Dazu wurden die toten Tiere mit 70 % Ethanol desinfiziert und die Bauchhöhle wurden durch einen ventralen Schnitt eröffnet.
Milz, Leber und Dünndarm wurden aus der Bauchhöhle entfernt und kurzfristig in Präparationsmedium (RPMI-1640, 10 % FCS) gelagert. Der Brustraum wurde geöffnet um Proben der Lunge zu entnehmen oder Blutproben durch Punktion des Herzens zu gewinnen. Proben des Knochenmarks wurden aus dem Femur der hinteren Extremitäten ausgespült. Dazu wurde der Knochen von umliegender Muskulatur und Geweberesten befreit, kurz durch Eintauchen in Isopropanol desinfiziert und die Epiphysen mit sterilem Besteck abgetrennt. Dadurch liegt die Markhöhle (*Cavitas medullaris*) frei und das Knochenmark wurde mit Präparationsmedium und einer 25 G Kanüle ausgespült. Um Einzelzellsuspenionen von Knochenmark oder anderen Organen herzustellen, wurde der Zellverbund mechanisch durch Reiben mit der Stempelplatte einer 1 ml Spritze auf einem Zellsieb mit 70 µm Maschenweite gelöst. Das Sieb wurde mit Präparationsmedium gespült und die Zellsuspenion in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Optional wurden die Zellen 2-3 min in Erythrozyten-Lysepuffer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Einzelzellsuspenionen gewöhnlich der durchflusszytometrischen Analyse zugeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Rekombinante Herstellung von IL-15 und IL-15N72D

Für die *in vivo*-Versuche dieser Arbeit wurden große Mengen von IL-15 benötigt. Aus diesem Grund wurde zunächst ein Protokoll für die rekombinante Herstellung von IL-15 in *E. coli* etabliert und neben Wildtyp-IL-15 auch IL-15N72D produziert, eine Punktmutante, die bereits in Abschnitt 2.2.3 vorgestellt wurde. Die Einzelheiten, die das verwendete Expressionssystem und den Herstellungsprozess betreffen, finden sich im Material und Methoden-Teil dieser Arbeit in Abschnitt 3.3.3. In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse, welche die Reinheit, den Ertrag und die Bioaktivität von IL-15 und IL-15N72D aus eigener Produktion betreffen, besprochen.

4.1.1 Design der Expressionsvektoren

Zur rekombinanten Herstellung von IL-15 und IL-15N72D wurden die cDNA-Sequenzen beider Zytokine mit den Primern UH271 und UH272R amplifiziert. Die Primer führen am 5´-Ende eine NdeI- und am 3´-Ende eine BamHI-Schnittstelle ein, die zur Insertion der PCR-Produkte in die multiple Klonierungsstelle (engl.: *multiple cloning site*, MCS) des durch IPTG induzierbaren Expressionsvektors pET19b genutzt wurden. Außerdem wurde durch UH271 ein N-terminales 10 × HIS-Tag mit Enterokinase-Schnittstelle inseriert, das für die spätere, affinitätschromatographische Aufreinigung genutzt wurde. Für die Klonierung wurden pET19b und die PCR-Produkte von IL-15 bzw. IL-15N72D mit NdeI und BamHI geschnitten, über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und mit pET19b ligiert. Die Ligationsansätze wurden in chemokompetente *XL-1 Blue* transformiert und über Ampicillin selektiert. Die Plasmid-DNA je eines positiven Klons wurde amplifiziert und die korrekte Basenabfolge der proteinkodierenden Regionen (engl.: *coding sequence*, CDS) durch Restriktionsanalyse und zwei unabhängigen Sequenzierungen mit den Primern UH273 und UH274R verifiziert. Um unerwünschte Punktmutationen auszuschließen, wurden die Aminosäuresequenzen mit der IL-15-Referenzsequenz verglichen. Die Sequenzalignments sind in Abbildung 6 dargestellt. Dabei ist die Punktmutation in pET19b-IL-15N72D durch einen Asterisk hervorgehoben. Eine Plasmidkarte der beiden Konstrukte findet sich im Anhang (Abbildung 41).

A

```
pET19b-IL-15        1 MGHHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYT   50
                                      ||||||||||||||||||||||||||
IL-15_mature        1 ----------------------NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYT   27

pET19b-IL-15       51 ESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN  100
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IL-15_mature       25 ESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN   77

pET19b-IL-15      101 GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS  137
                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||
IL-15_mature       75 GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS  114
```

B

```
pET19b-IL-15N72D    1 MGHHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYT   50
                                      ||||||||||||||||||||||||||
IL-15_mature        1 ----------------------NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYT   27

pET19b-IL-15N72D   51 ESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANDSLSSN  100
                      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||*|||||
IL-15_mature       25 ESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN   77

pET19b-IL-15N72D  101 GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS  137
                      |||||||||||||||||||||||||||||||||||
IL-15_mature       75 GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS  114
```

Abbildung 6: Aminosäure-Alignment von IL-15 und IL-15N72D. Die CDS von pET19b-IL-15 und pET19b-IL-15N72D wurden sequenziert und in Aminosäuresequenzen übersetzt. Diese Sequenzen wurden mittels lokalem Sequenzalignment mit der IL-15-Referenzsequenz (NCBI: AAB97518) verglichen. A) Alignment von pET19b-IL-15 mit IL-15 Referenzsequenz B) Alignment von pET19b-IL-15N72D mit der IL-15-Referenzsequenz.

4.1.2 Aufreinigung und Unterscheidung einzelner Chargen

Die Produktion von IL-15 und IL-15N72D wurde wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben durchgeführt. Um einzelne Chargen besser unterscheiden zu können, wurden sie mit einem Index versehen, der aus einer Kombination von Ziffern und Buchstaben besteht, die dem Proteinnamen (IL-15 oder IL-15N72D) mit einem Doppelkreuz (#) nachgestellt wurde. Aus einer mehrere Liter umfassenden Bakterienkultur wurden zunächst die Einschlusskörperchen isoliert und in Lösung gebracht. Diese wurde aliquotiert und für die nachfolgenden Aufreinigungen verwendet. So wurden aus einer Bakterienkultur verschiedene Chargen aufgereinigt, die aufsteigend nummeriert wurden. Dabei sind die Ziffern unabhängigen Kulturansätzen zuzuordnen, während die Buchstaben die individuellen Aufreinigungen kennzeichnen. Die genaue Zuordnung jeder Charge war wichtig, um eine homogene Bioaktivität von IL-15/IL-15N72D für die *in vivo*-Versuche gewährleisten zu können.

4.1.3 Bestimmung von Ertrag und Reinheit

Die Expression von IL-15 und IL-15N72D konnte bis zu 16 h durchgeführt werden, ohne dass unerwünschte Abbauprodukte entstanden, welche bei der Affinitätschromatographie stören könnten. Die Proteinkonzentration nach Aufreinigung der Einschlusskörperchen wurde durch BCA-Assays bestimmt, für die näherungsweise Bestimmung wurden auch photometrische Messungen bei 280 nm durchgeführt. Die Reinheit der Proteine wurde anhand densitometrischer Auswertungen von SDS-PAGE-Signalen berechnet. Es werden hier beispielhaft die Ergebnisse der Chargen IL-15#5A und IL-15#5B sowie IL-15N72D#2A und IL-15N72D#2B gezeigt. Die Ergebnisse der anderen Chargen waren vergleichbar und Chargen mit einer Reinheit unter 93 % oder einer niedrigen Bioaktivität, d.h. mit einer ED_{50} > 3 mg/ml im CTLL-2-Proliferationsassay, wurden verworfen und nicht für die *in vivo*-Versuche verwendet. Abbildung 7A zeigt die Proteinkonzentrationen von IL-15#5A und IL-15N72D#2B nach Aufreinigung der Einschlusskörperchen. Die gezeigten Werte beziehen sich auf jeweils 1 l Kulturansatz. Für IL-15#5A wurden 47 mg/l gemessen, für IL-15N72D#2B 53 mg/l. Die densitometrisch bestimmte Reinheit von IL-15#5A lag bei 75 % und die von IL-15N72D#2B bei 71 %. Üblicherweise lagen die Proteinkonzentrationen auf dieser Produktionsstufe im Bereich von 40-55 mg/l und die Reinheiten bei 60-80 %. Abbildung 7B zeigt eine SDS-PAGE, in der die Einschlusskörperchen beider Proteine elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Das IL-15/IL-15N72D-Signal liegt bei etwa 14 kDa und ist bereits deutlich als das stärkste Signal zu erkennen. Verunreinigungen mit höherem Molekulargewicht sind darüber als Schweif sichtbar. Die nachfolgenden Schritte im Aufreinigungsprotokoll, also Affinitätschromatographie und Rückfaltung, sowie Dialyse und Proteinkonzentration, waren durch starke Verluste von IL-15/IL-15N72D gekennzeichnet. Besonders während der Rückfaltung ging ein Großteil des eingesetzten Proteins verloren, da fehlgefaltete IL-15/IL-15-N72D-Varianten entstanden, die in der Pufferlösung aggregierten und letztlich ausfielen. Von den 47 mg/l IL-15#5A, die nach Aufreinigung der Einschlusskörperchen gemessen wurden, konnten am Ende der Aufreinigung nur 2,0 mg/l natives IL-15 isoliert werden. Für IL-15N72D#2B betrug der finale Ertrag 1,8 mg/l. Die Reinheit der Proteine wurde durch den Aufreinigungsprozess für IL-15#5A auf 96 % und für IL-15N72D#2B auf 95 % angehoben. Üblicherweise konnten 1,6-2,2 mg IL-15/IL-15N72D mit einer Reinheit von über 95 % aus einem Liter Bakterienkultur isoliert werden. Abbildung 7C zeigt exemplarisch eine SDS-PAGE der final aufgereinigten Chargen IL-15#5A und IL-15N72D#2B. Das Protein erscheint als klar abgegrenztes Signal, Verunreinigungen sind kaum vorhanden.

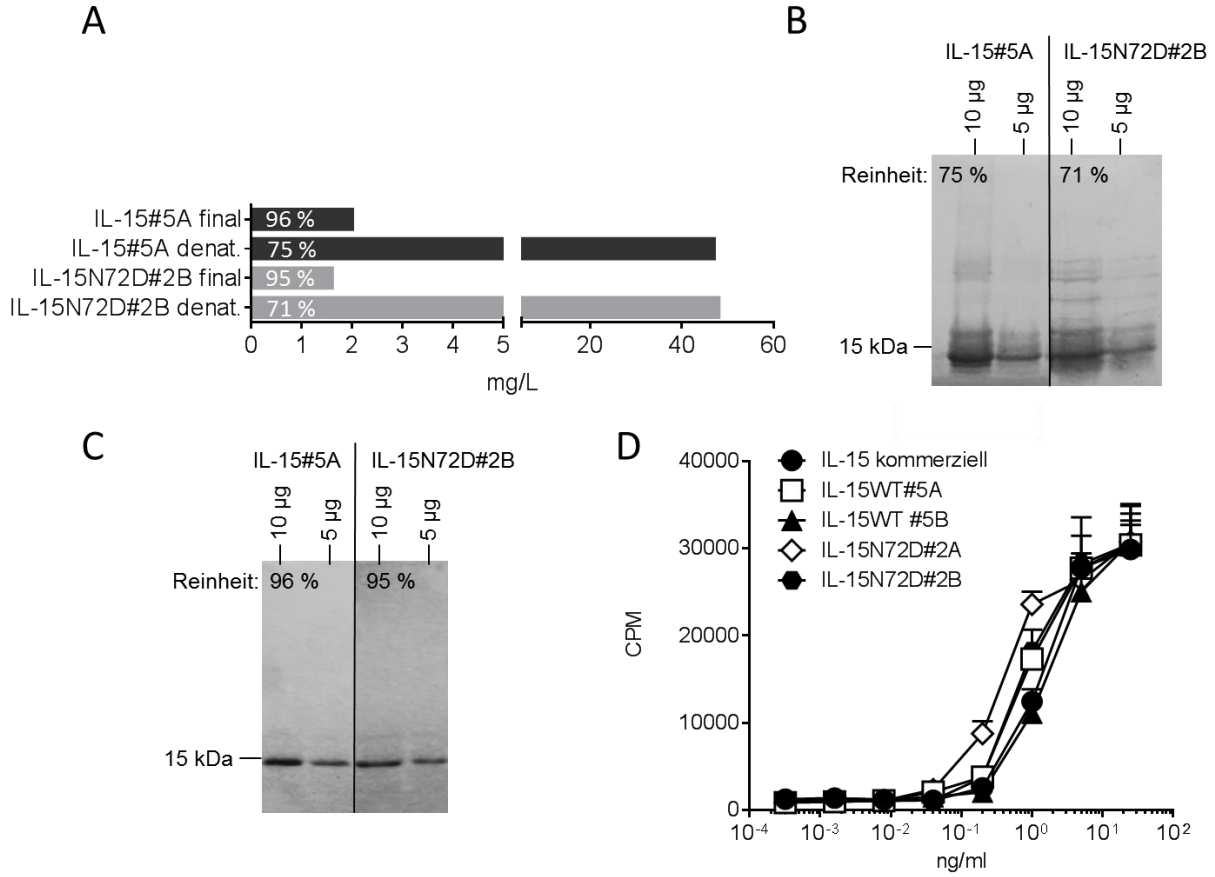


Abbildung 7: Ertrag, Reinheit und Bioaktivität von IL-15 und IL-15N72D. A) Reinheiten und Erträge von IL-15#5A und IL-15N72D#2B nach Aufreinigung der Einschlusskörperchen und für die rückgefalteten Endprodukte. Die Reinheiten sind als Prozentwerte angegebenen und wurden densitometrisch anhand von SDS-PAGE-Aufnahmen bestimmt. B) SDS-PAGE von IL-15#5A und IL-15N72D#2B nach Aufreinigung der Einschlusskörperchen. C) SDS-PAGE mit rückgefaltetem IL-15#5A und IL-15N72D#2B. D) Vergleich der Bioaktivitäten von IL-15- und IL-15N72D-Chargen im Vergleich zu kommerziell erworbenem IL-15. Für die Messung wurden CTLL-2 Zellen 4 Tage mit verschiedenen IL-15-Konzentrationen kultiviert und die Proliferation daraufhin in einem ^{3}H-Thymidin-Assay bestimmt. IL-15REF = kommerziell erworbenes IL-15 als Referenz.

4.1.4 Bestimmung der Bioaktivität im CTLL-2-Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Bioaktivität von IL-15 und IL-15N72D wurde standardmäßig die IL-2/15-abhängige Zelllinie CTLL-2 verwendet. Das Wachstum dieser Zelllinie setzt voraus, dass eines der beiden Zytokine in mindestens picomolarer Konzentration im Kulturmedium vorhanden ist. Höhere Konzentrationen bewirken eine verstärkte Proliferation, wodurch sich konzentrationsabhängige Wachstumskurven erstellen lassen. Für die Bioaktivitätsbestimmung wurden serielle Verdünnungsreihen der IL-15/IL-15N72D-Chargen hergestellt und im CTLL-2-Proliferationsassay getestet. Die Proliferation wurde nach 4 Tagen durch Zugabe von ^{3}H-Thymidin für 16 h und anschließender Messung im Betastrahlendetektor bestimmt. Als Richtwert wurde kommerziell erworbenes IL-15 der Firma Peprotech mitgeführt (IL-15REF). Wie in Abbildung 7D gezeigt, waren die IL-15/IL-15N72D-Chargen, welche auch

in den *in vivo*-Experimenten zum Einsatz kamen, hinsichtlich ihrer Bioaktivität auf CTLL-2 gleichwertig zur kommerziellen Kontrolle. Die ED_{50} lag üblicherweise zwischen 0,5 und 1 ng/ml. Die geringen Unterschiede in der Bioaktivität zwischen den einzelnen Chargen wurden für die nachfolgenden Versuche berücksichtigt. Dazu wurde ein Standard-IL-15 mit einer ED_{50} von 1 ng/ml im CTLL-2-Proliferationsassay definiert und die *in vivo* eingesetzten IL-15/IL-15N72D-Konzentrationen hinsichtlich der Bioaktivität der jeweiligen Charge angepasst.

4.2 Vergleich der Bioaktivitäten von IL-15 und IL-15N72D

IL-15N72D ist eine IL-15-Punktmutante mit erhöhter Bioaktivität. Wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, wurde diese gesteigerte Bioaktivität bisher nur *in vitro* und mit Zellen, die den humanen, niederaffinen IL-15Rβγ exprimieren, beschrieben [87]. In den hier vorgestellten Versuchen wurde die Bioaktivität von IL-15 und IL-15N72D sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und zusätzlich mit unterschiedlichen IL-15-Rezeptorkonfigurationen ermittelt.

4.2.1 *In vitro*-Proliferationsassay mit CTLL-2- und AML-reaktiven T-Zellen

Um die gesteigerte Proliferationswirkung von IL-15N72D gegenüber Wildtyp-IL-15 *in vitro* zu testen, wurden Proliferationsassays mit der murinen, IL-2/15 abhängigen Zelllinie CTLL-2 und der oligoklonalen, AML-reaktiven T-Zelllinie 5B2 durchgeführt. CTLL-2 exprimieren den murinen, niederaffinen IL-15Rβγ während 5B2 den humanen, niederaffinen IL-15Rβγ exprimieren.

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten mit verschiedenen Konzentrationen von IL-15 und IL-15N72D kultiviert. Zur zusätzlichen Stimulation wurden die 5B2-T-Zellen im Verhältnis 10:1 mit letal (100 Gy) bestrahlten Zellen der AML MZ667 kultiviert. Der 5B2-Ansatz wurde in Anwesenheit und Abwesenheit einer festen Konzentration von 5 ng/ml IL-7 durchgeführt. Die Proliferationsrate wurde in allen Ansätzen nach 4 Tagen durch Zugabe von ^{3}H-Thymidin für 16 h und durch anschließende Messung im Betastrahlendetektor bestimmt.

Abbildung 8A zeigt die Ergebnisse des CTLL-2-Proliferationsassays. Wie auch in Abschnitt 4.1.4 ersichtlich, konnte für IL-15N72D keine erhöhte Bioaktivität beobachtet werden. Alle drei Zytokine bewirkten eine ähnlich starke, dosisabhängige Vermehrung der Zellen. Hingegen konnte die gesteigerte Bioaktivität im Ansatz mit 5B2-T-Zellen bestätigt werden. Sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von 5ng/ml IL-7 wurde eine gesteigerte Proliferation für IL-15N72D beobachtet, woraus eine etwa 5-fach erhöhte Bioaktivität für IL-15N72D gegenüber dem IL-15-Wildtyp berechnet wurde (Abbildung 8B). Die Zugabe von IL-7 bewirkte keine Veränderung im Proliferationsverhalten und es wurden durchgehend ähnliche Werte wie im Ansatz ohne IL-7 erreicht. IL-15REF und IL-15 zeigten wie erwartet sowohl auf CTLL-2, als auch auf 5B2-T-Zellen näherungsweise identische Bioaktivitäten.

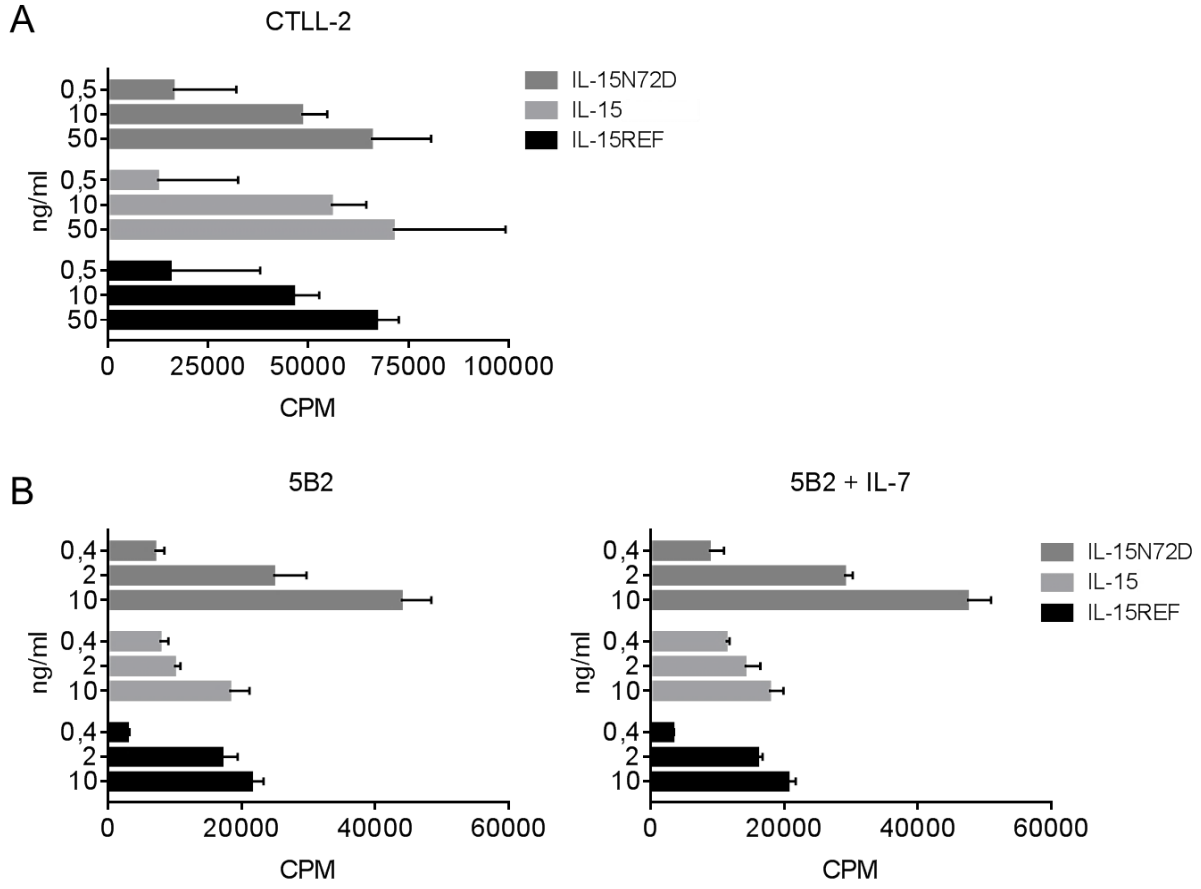


Abbildung 8: Bioaktivität von IL-15 und IL-15N72D *in vitro*. CTLL-2 oder die AML-reaktive T-Zell-Linie 5B2 wurden mit verschiedenen Konzentrationen von IL-15 oder IL-15N72D stimuliert. Als Referenz (IL-15REF) wurde kommerziell erworbenes IL-15 mitgeführt. Die Proliferationsmessung erfolgte durch einen ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsassay nach 4 Tagen A) CTLL-2 mit murinem IL-15Rβγ B) 5B2 mit humanem IL-15Rβγ. Zur TCR-Stimulation wurden den 5B2-Ansätzen letal bestrahlte Zellen der AML MZ667 im Verhältnis 10:1 zugesetzt. Einer der Ansätze wurde in Anwesenheit einer festen Konzentration von 5 ng/ml IL-7 im Kulturmedium inkubiert.

4.2.2 Proliferation alloreaktiver CD8^{+} T-Zellen im NSG-Mausmodell

Um die gesteigerte Bioaktivität von IL-15N72D *in vivo* zu testen, wurden alloreaktive CD8^{+} T-Zellen in einem NSG-Mausmodell verwendet. Dabei wurde die Wirkung von IL-15 und IL-15N72D auf die homöostatische Proliferation der T-Zellen in Abwesenheit ihres spezifischen Antigens untersucht. Die Generierung der alloreaktiven T-Zellen erfolgte, wie in Abschnitt 3.5.9.1 beschrieben, durch Stimulation einer CD8-MACS-isolierten, polyklonalen CD8^{+} T-Zellpopulation aus einem HLA-A2^{-} Spender mit HLA-A*0201-RNA-transduzierten, autologen DCs im Verhältnis 10:1. Ab Tag 14 wurden zur Stimulation letal bestrahlte (100 Gy) K562-A2 verwendet. Bis zum Transfer waren die T-Zellen 25 Tage in Kultur. Abbildung 9 zeigt eine Übersicht über den Ablauf des Versuchs. Pro Maus wurden 5 × 10^{6} T-Zellen i.v. injiziert, die Injektionen von IL-15 und IL-15N72D erfolgten i.p. an Tag 0 und 3. Die finalen

T-Zellfrequenzen in Blut, Milz und Knochenmark der Mäuse wurde nach 7 Tagen durchflusszytometrisch mit spezifischen Antikörpern gegen CD3 und CD8 bestimmt.

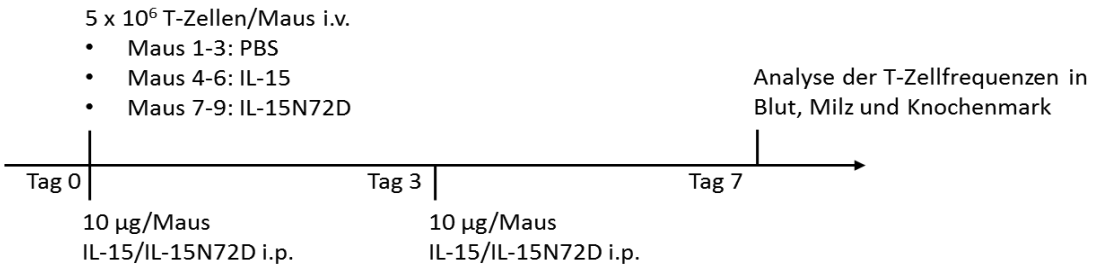


Abbildung 9: Versuchsablauf zur Proliferation alloreaktiver T-Zellen im NSG-Modell. NSG-Mäuse (n = 3) erhielten i.v. Injektionen von 5 × 10^6 HLA-A2-reaktiven T-Zellen/Maus. Kurz darauf wurden 10 µg/Maus IL-15, IL-15N72D oder eine PBS Kontrolle i.p. injiziert. Die Zytokininjektionen wurden an Tag 3 wiederholt. Nach 7 Tagen erfolgte die Analyse der T-Zellfrequenzen in Blut Milz und Knochenmark.

Abbildung 10 fasst die Ergebnisse zusammen. Sowohl IL-15 als auch IL-15N72D führten zu stark erhöhten T-Zell-Frequenzen in Blut, Milz und Knochenmark der Mäuse. Die für IL-15N72D gemessenen Frequenzen waren dabei im Vergleich zu Wildtyp-IL-15 nicht auffällig erhöht. Im Blut wurden in den behandelten Gruppen T-Zellfrequenzen mit Mittelwerten von 28 % für IL-15 und 20 % für IL-15N72D gemessen, während die PBS-Kontrollgruppe bei 0,7 % lag. In der Milz wurde für IL-15 ein Mittelwert von 12 %, für IL-15N72D 13 % und für die PBS-Kontrolle 2,5 % bestimmt. Die T-Zellfrequenzen im Knochenmark waren gruppenübergreifend sehr niedrig und lagen im Mittel bei 0,5 % für IL-15, 0,43 % für IL-15N72D und 0,08 % für die PBS-Kontrolle. Die etwa 5-fach erhöhte Bioaktivität, die für humane T-Zellen *in vitro* beobachtet wurde, konnte somit *in vivo* nicht bestätigt werden.

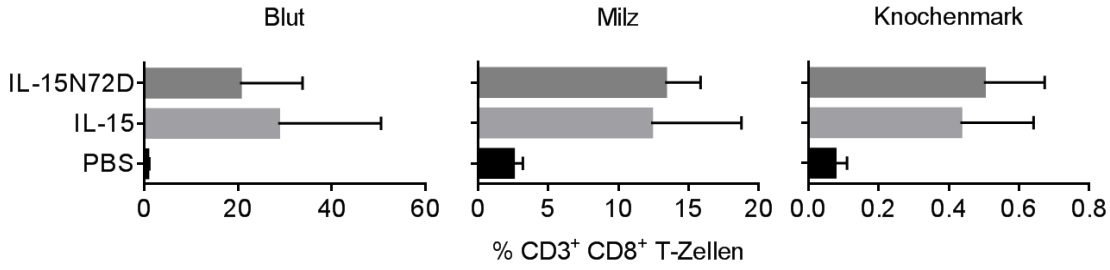


Abbildung 10: Wirkung von IL-15 und IL-15N72D auf $CD8^+$ T-Zellen *in vivo*. NSG-Mäuse (n = 3) erhielten i.v. Injektionen von 5 × 10^6 HLA-A2-reaktiven $CD8^+$ T-Zellen. Die Injektionen von 10 µg/Maus IL-15, N72D oder einer PBS-Kontrolle erfolgten i.p. an Tag 0 und 3. Nach 7 Tagen wurden die Frequenzen von $CD3^+CD8^+$ T-Zellen in Blut Milz und Knochenmark durchflusszytometrisch bestimmt. Die gezeigten Werte beziehen sich auf ein vorgeschaltetes FSC/SSC-Lymphozytengate.

4.3 Einfluss von IL-15 auf die Persistenz von antigenspezifischen CD8$^+$ T-Zellen im NSG-Modell

Die NSG-Maus ist stark immundefizient und bietet isolierten CD8$^+$ T-Zellen keine ausreichenden Überlebenssignale. Die T-Zellen persistieren in Abwesenheit und oft auch in Anwesenheit ihres spezifischen Antigens nicht ohne Hilfe exogener Zytokine oder anderer humaner Zellpopulationen wie beispielsweise CD4$^+$ T-Zellen und sterben gewöhnlich innerhalb weniger Tage nach dem Transfer ab. Nachdem in Abschnitt 4.2.2 bereits ein Effekt von IL-15 auf die homöostatische Proliferation von CD8$^+$ T-Zellen in NSG-Mäusen nach 7 Tagen festgestellt werden konnte, wurde in den Versuchen dieses Abschnitts die T-Zellpersistenz über einen längeren Zeitraum von 28 Tagen beobachtet.

4.3.1 Persistenz allo- und AML-reaktiver T-Zellen in NSG-Mäusen

Allo- und AML-reaktive T-Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.5.9 beschrieben, durch Stimulation mit HLA-A2-RNA-transduzierten DCs und K562-A2 oder HLA-identischen Blasten der Leukämien MZ308 oder MZ667 generiert. Die HLA-A2-reaktiven T-Zellen wurden aus frisch isolierten PBMCs generiert und waren zum Zeitpunkt des Transfers 35 Tage in Kultur. Von den MZ308- und MZ667-reaktiven T-Zellen wurden hingegen Kryokonserven von 42 Tage kultivierten T-Zellen aufgetaut, antigenspezifisch restimuliert und bis zur Injektion weitere 4 Tage in Kultur gehalten. Pro Maus wurden 5 × 10^6 T-Zellen i.v. injiziert. Eine Übersicht über den zeitlichen Verlauf des Experiments findet sich in Abbildung 11. Die i.p. Injektionen von 10 µg/Maus IL-15 oder IL-15REF begannen am Tag des T-Zelltransfers und wurden jeden zweiten Tag über den gesamten Versuchsverlauf durchgeführt. Die finale Analyse der T-Zellpersistenz erfolgte an Tag 28 durch mechanischen Aufschluss der Milzen und durchflusszytometrische Untersuchung der Einzelzellsuspensionen auf die Frequenz von humanen CD8$^+$CD45$^+$ T-Zellen.

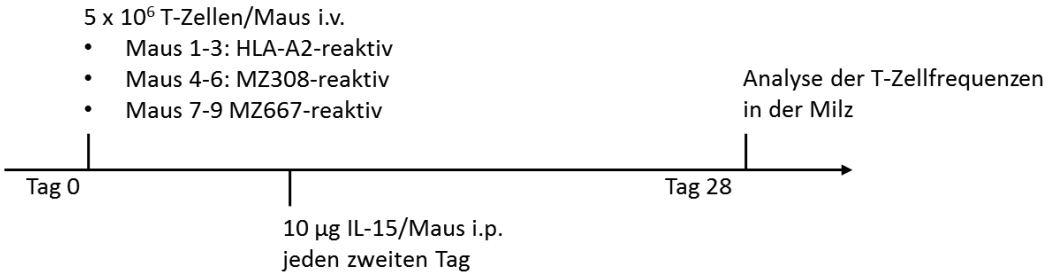


Abbildung 11: Versuchsablauf zur Persistenz allo- und AML-reaktiver T-Zellen in NSG-Mäusen. 5 × 10^6 CD8$^+$ T-Zellen gegen HLA-A2, MZ308 oder MZ667 wurden i.v. in NSG-Mäuse injiziert. 10 µg/Maus IL-15, IL-15REF oder eine PBS-Kontrolle wurden jeden zweiten Tag i.p. injiziert. Die durchflusszytometrische Analyse der T-Zellfrequenzen in der Milz erfolgte nach 28 Tagen.

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse dieses Versuchs zusammengefasst. Während in den Kontrollgruppen, die PBS-Injektionen erhielten, nur T-Zell-Frequenzen auf Höhe des unspezifischen Hintergrundsignals detektiert werden konnten, waren diese in den IL-15- und IL-15REF-Gruppen deutlich erhöht. Die T-Zellen aller untersuchten Spezifitäten zeigten durch die IL-15-Supplementierung eine deutlich gesteigerte Persistenz, waren aber mit unterschiedlichen Frequenzen in der Milz nachweisbar. Die MZ308-reaktiven T-Zellen persistierten am besten und erreichten im Mittel Frequenzen von 13,0 % für IL-15 und 13,7 % für IL-15REF. Die HLA-A2-reaktiven T-Zellen persistierten mit niedrigeren Frequenzen und es wurden 8,9 % für IL-15 und 11,0 % für IL-15REF gemessen. Die niedrigsten Frequenzen wurden für die MZ667-reaktiven T-Zellen beobachtet und lagen für IL-15 bei 3,5 % und für IL-15REF bei 2,9 %. Die Ergebnisse wurden in einer Signifikanzanalyse durch einen einseitigen ANOVA mit Tukey-Test überprüft. Die T-Zellfrequenzen für IL-15 und IL-15REF waren innerhalb der HLA-A2-Gruppe mit $p < 0,05$ signifikant höher als die der PBS-Kontrolle. In der MZ308-Gruppe waren die Ergebnisse von IL-15 und IL-REF gegenüber der PBS-Kontrolle mit $p < 0,01$ ebenfalls signifikant erhöht. Für die MZ667-reaktiven T-Zellen konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

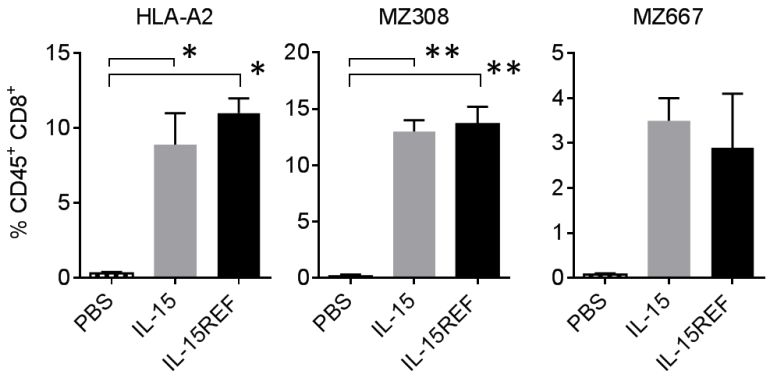


Abbildung 12: T-Zell-Frequenzen in NSG-Milzen nach adoptivem Tranfer mit und ohne IL-15. NSG-Mäuse (n = 3) erhielten i.v. Injektionen von 5×10^6 HLA-A2-, MZ308- oder MZ667-reaktiven, $CD8^+$ T-Zellen. 10 µg/Maus IL-15, IL-15 REF oder PBS wurden jeden zweiten Tag i.p. injiziert. Nach 28 Tagen erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der T-Zellfrequenzen in der Milz. Die Prozentangaben beziehen sich auf ein vorgeschaltetes FSC/SSC-Lymphozytengate. IL-15REF = kommerzielles IL-15 als Referenz. * = $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in einem einseitigen ANOVA mit Tukey-Test.

4.3.2 Persistenz EBV-reaktiver T_{SCM} in NSG-Mäusen

IL-15 ist ein wichtiger Überlebensfaktor, insbesondere für T-Zellen mit Gedächtnis-Phänotyp. In diesem Versuch sollte die Wirkung von IL-15 auf T-Zellen mit T_{SCM}-Phänotyp untersucht werden. T_{SCM} wurden durch TWS119, einen Inhibitor der Glykogensynthase-Kinase 3 (engl.: *glycogen synthase kinase 3*, GSK3) generiert. Die GSK3-Inhibierung täuscht eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs vor, die in einem Anstieg von β-Catenin resultiert. Dadurch behal-

ten die T-Zellen auch nach mehrmaliger Stimulation einen T_{SCM}-Phänotyp, der durch die Expression von CD45RA, CD62L, CCR7 und CD95 [46] gekennzeichnet ist.
Naive T-Zellen wurden durch ein naives CD8-MACS-Isolationskit gewonnen und wöchentlich mit EBV-Peptid-beladenen DCs in Anwesenheit oder Abwesenheit von 5 µM TWS119 stimuliert. Nach 38 Tagen in Kultur wurden 2,5 × 10^6 T-Zellen pro Maus i.v. in NSG-Mäuse injiziert. Eine phänotypische Analyse der eingesetzten T-Zellen zum Zeitpunkt des T-Zelltransfers findet sich in Abbildung 14. Die TWS119-behandelten T-Zellen behielten einen naiven Phänotyp mit stark erhöhter Expression von CD45RA, CCR7 und CD62L. Die Expression von CD27 und CD28 war im Vergleich zu den TWS119-unbehandelten Zellen ebenfalls leicht erhöht. Zwei Versuchsgruppen erhielten die TWS119-behandelten T-Zellen und zwei Gruppen die unbehandelten. Je eine dieser Gruppen erhielt jeden zweiten Tag 10 µg/Maus IL-15, die andere eine PBS-Kontrolle. An Tag 28 wurde der Versuch beendet und Milz, Blut, Knochenmark und Lunge der Mäuse durchflusszytometrisch auf die Frequenz von humanen $CD45^+CD8^+$ T-Zellen untersucht. Eine Übersicht über den Versuchsablauf findet sich in Abbildung 13.

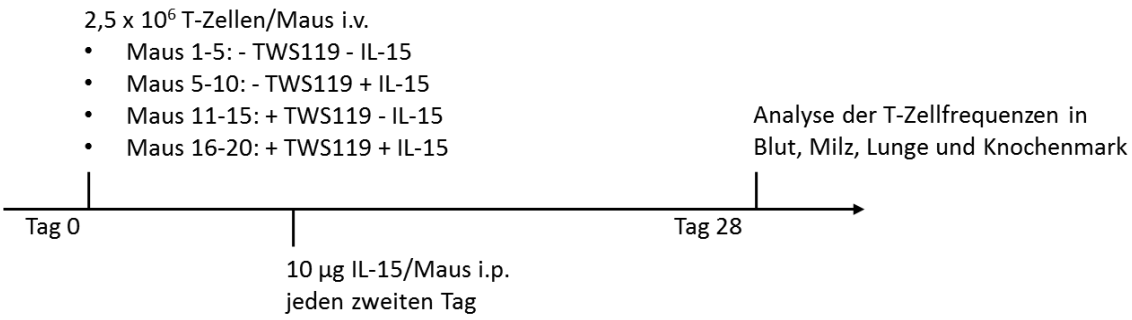


Abbildung 13: Versuchsablauf zur Persistenz EBV-reaktiver T_{SCM} in NSG-Mäusen. An Tag 0 wurden 5 × 10^6 T-Zellen/Maus in die Schwanzvene von NSG-Mäusen injiziert. Die i.p. Injektionen von 10 µg/Maus IL-15 begannen am selben Tag und wurden alle 2 Tage wiederholt. Nach 28 Tagen wurden Blut, Milz, Lunge und Knochenmark der Mäuse durchflusszytometrisch auf die Frequenzen von $CD8^+$ T-Zellen untersucht.

Die Ergebnisse wurden in Abbildung 15 zusammengefasst. Wie bereits für die allo- und AML-reaktiven T-Zellen aus Abschnitt 4.3 gezeigt wurde, bewirkte die IL-15-Supplementierung auch in diesem Versuch eine verlängerte Persistenz der T-Zellen, ersichtlich durch die erhöhten T-Zellfrequenzen in den analysierten Organen an Tag 28. In allen Organen führte die Kombination von T_{SCM} und IL-15 zu den besten Ergebnissen. In der Milz lagen die Frequenzen von $CD8^+$ T-Zellen dieser Gruppe bei durchschnittlich 5 %, in Blut und Lunge wurden 2,0 bzw. 2,4 % gemessen. Die Frequenzen im Knochenmark lagen bei 0,3 %. Auffällig war eine ungewöhnlich niedrige Persistenz der unbehandelten T-Zellen mit IL-15 in der Milz, in der lediglich eine Frequenz von 0,1 % und damit auf Höhe des unspezifischen Hin-

tergrunds gemessen wurde. In Lunge und Blut wurden jedoch Mittelwerte von 1,1 und 0,9 % detektiert. TWS119 behandelte T_{SCM} ohne IL-15 zeigten, verglichen mit unbehandelten T-Zellen ohne IL-15, keine verbesserte Persistenz. Für beide Gruppen wurden organübergreifend Mittelwerte unter 0,1% gemessen. Zusammenfassend konnte die Persistenz TWS119-behandelter und unbehandelter T-Zellen über 28 Tage durch regelmäßige IL-15-Injektionen erreicht werden, wobei die TWS119-behandelten T_{SCM} mit höheren Frequenzen persistierten als unbehandelte T-Zellen, was auf eine stärkere IL-15-Abhängigkeit der T_{SCM} hindeutet.

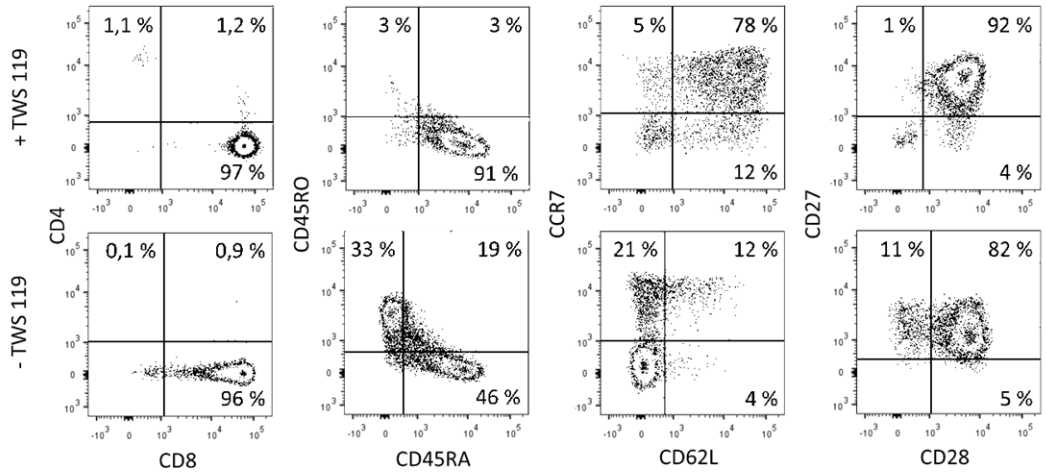


Abbildung 14: Phänotypische Analyse von kultivierten T-Zellen mit und ohne TWS119. T_{SCM} wurden durch Einsatz von 5 µmol/l TWS119 im Kulturmedium generiert. Die phänotypische Analyse der kultivierten, TWS119-behandelten und unbehandelten T-Zellen erfolgte am Tag des T-Zelltransfers durch FACS mit spezifischen Antikörpern gegen die oben angegebenen Markerproteine.

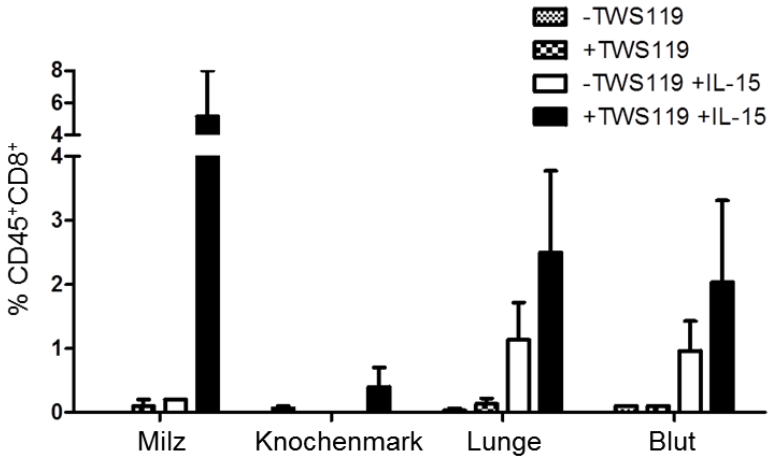


Abbildung 15: Frequenzen TWS119-behandelter und unbehandelter $CD8^+$ T-Zellen *in vivo* unter Einfluss von IL-15. NSG-Mäuse (n = 5) erhielten i.v. Injektionen von 2,5 × 10^6 TWS119-behandelten T_{SCM} oder unbehandelten T-Zellen, die durch Stimulation mit EBV-Peptiden generiert wurden. IL-15 oder eine PBS-Kontrolle wurden jeden zweiten Tag i.p. injiziert. An Tag 28 wurden Einzelzellsuspensionen von Blut, Milz, Knochenmark und Lunge durchflusszytometrisch auf die Frequenz von $CD45^+CD8^+$ T-Zellen untersucht.

4.4 Einfluss von IL-15 auf die Funktionalität alloreaktiver T-Zellen im NSG-HLA-A2/HHD-Modell

In den bisher gezeigten *in vivo*-Versuchen wurde die homöostatische Proliferation und Persistenz von $CD8^+$ T-Zellen in Abwesenheit spezifischer Antigene untersucht. Im hier gezeigten Versuch wurde ergänzend das Verhalten alloreaktiver T-Zellen in Anwesenheit des spezifischen Antigens und unter Einfluss von IL-15 beobachtet. Dafür wurden HLA-A2-reaktive T-Zellen und Mäuse des Stamms NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}Tg(HLA-A/H2-D/B2M)1Dvs/SzJ, kurz NSG-HLA-A2/HHD-Mäuse verwendet [236]. Dieser Stamm zeichnet sich durch die ubiquitäre Expression des chimären HLA-A2-Konstruktes HHD aus, das aus der α1- und α2-Domäne der schweren Kette des humanen HLA-A*0201-Allels und der murinen H-2Db-α3-Domäne, die den zytoplasmatischen und den Transmembranteil des Proteins umfasst, besteht. Das humane β2-Mikroglobulin ist in HHD kovalent durch eine 15 AA lange Linkersequenz verbunden [237]. HLA-A2-reaktive T-Zellen sollten in diesem Stamm die Symptome einer GVHD hervorrufen, wodurch die T-Zell-Proliferation und Funktionalität humaner, HLA-A2-reaktiver T-Zellen unter Einfluss von IL-15 im Mausmodell untersucht werden konnte.

4.4.1 HLA-A2-Expression im peripheren Blut von NSG-HLA-A2/HHD-Mäusen

Zum Nachweis der HLA-A2/HHD-Expression wurde peripheres Blut von 6 NSG-HLA-A2/HHD-Mäusen entnommen und durchflusszytometrisch mit einem HLA-A2-spezifischen Antikörper untersucht, wobei als Kontrolle Blut einer NSG-Maus mitgeführt wurde. Wie in Abbildung 16 zu sehen, konnte die HLA-A2/HHD-Expression bei allen NSG-HLA-A2/HHD-Mäusen nachgewiesen werden und der Anteil der HLA-A2-positiven Zellen reichte dabei von 10,1-43,9 %, während der Wert der NSG-Kontrolle auf Hintergrundlevel blieb.

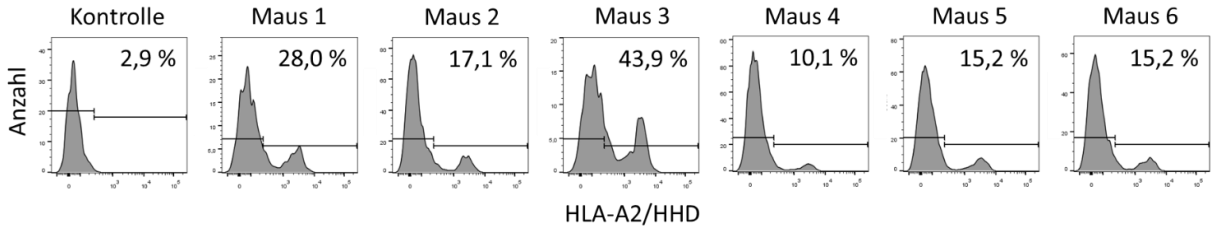


Abbildung 16: Nachweis der HLA-A2 Expression in NSG-HLA-A2/HHD-Mäusen. Peripheres Blut von 6 NSG-HLA-A2/HHD-Mäusen wurde durchflusszytometrisch auf die Expression von humanem HLA-A2/HHD untersucht. Die angezeigten Prozentwerte beziehen sich auf ein vorgeschaltetes FSC/SSC-Lymphozytengate.

4.4.2 T-Zell-Engraftment und GvHD-Induktion

1,5 × 10^7 PBMCs eines HLA-A2$^-$ Spenders oder 5 × 10^6 HLA-A2-reaktive T-Zellen/Maus wurden i.v. in NSG-HLA-A2/HHD-Mäuse transferiert. Die i.p. Injektionen von 10 µg/Maus IL-15 erfolgten wenige Minuten später und wurden jeden zweiten Tag wiederholt. Den Mäusen wurde wöchentlich peripheres Blut an der Schwanzvene entnommen und durchflusszytometrisch auf die Frequenzen von CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen untersucht. Bei klinisch manifesten GvHD-Symptomen wie struppigem Fell, Gewichtsverlust, Bewegungsarmut und ggf. Alopezie wurden die Mäuse aus dem Versuch genommen und final analysiert. Eine Übersicht über den Versuchsablauf findet sich in Abbildung 17.

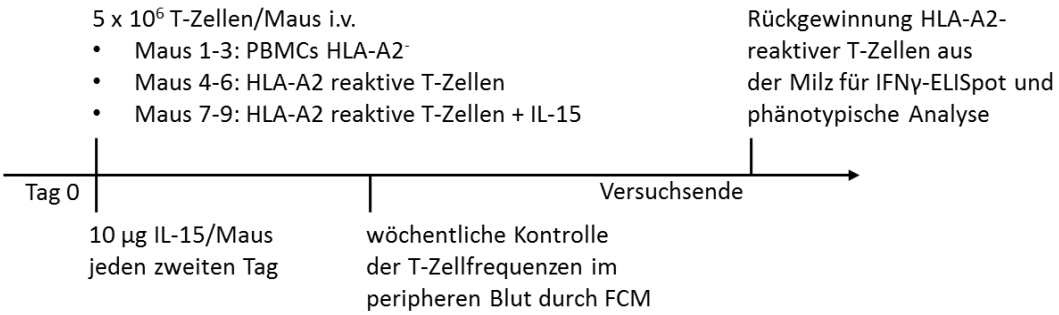


Abbildung 17: Versuchsablauf zu T-Zell-Engraftment und GvHD-Induktion. NSG-HLA-A2/HHD-Mäuse erhielten i.v. Injektionen von 1,5 × 10^6 HLA-A2-PBMCs oder 5 × 10^6 HLA-A2-reaktiven T-Zellen. IL-15 wurde jeden zweiten Tag i.p. injiziert. Wöchentlich wurde peripheres Blut in der Durchflusszytometrie auf Expression von CD4, CD8 und CD45 mit spezifischen Antikörpern untersucht. Bei Eintritt starker GvHD-Symptome wurden die Mäuse aus dem Versuch genommen.

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Messungen zusammengefasst. Nach Injektion von HLA-A2$^-$ PBMCs wurde innerhalb von 14 Tagen eine starke Proliferation von CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen im peripheren Blut detektiert. Dabei stiegen zunächst die Frequenzen der CD4$^+$ T-Zellen an und danach, mit etwa einer Woche Verzögerung, die der CD8$^+$ T-Zellen. Die Mäuse der PBMC-Gruppe zeigten progrediente GvHD-Symptome an Tag 21 und wurden aus dem Versuch genommen. In der FACS-Analyse der Organe wurden neben hohen Frequenzen von CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen auch moderate Frequenzen einer doppelpositiven CD4$^+$CD8$^+$ T-Zellpopulation detektiert. In Mäusen, die HLA-A2-reaktive T-Zellen ohne IL-15 erhielten, konnte trotz Anwesenheit von HHD kein T-Zell-Engraftment festgestellt werden. Während an Tag 3 noch über 10 % CD8$^+$ T-Zellen im Blut vorhanden waren, sanken die Frequenzen bis Tag 14 unter die Nachweisgrenze und die Mäuse dieser Gruppe entwickelten zu keinem Zeitpunkt GvHD-Symptome. In der Gruppe, die HLA-A2-reaktive T-Zellen und IL-15 erhielt, wurden an Tag 14 mit 20-40 % bereits hohe Frequenzen von CD8$^+$ T-Zellen im Blut gemessen. Bis Tag 28 gingen die Frequenzen auf 5-18 % zurück. Darauf folgte eine erneute, starke Expansion der T-Zellen auf Werte über 50 % und die Mäuse zeigten nacheinander

deutliche GvHD-Symptome, so dass sie an Tag 35, 42 bzw. 56 aus dem Versuch genommen wurden. Auffällig waren in dieser Gruppe die hohen Frequenzen von $CD4^+CD8^+$ doppelpositiven T-Zellen ab Tag 28, die zeitlich mit dem Auftreten der GvHD-Symptome korrelierten.

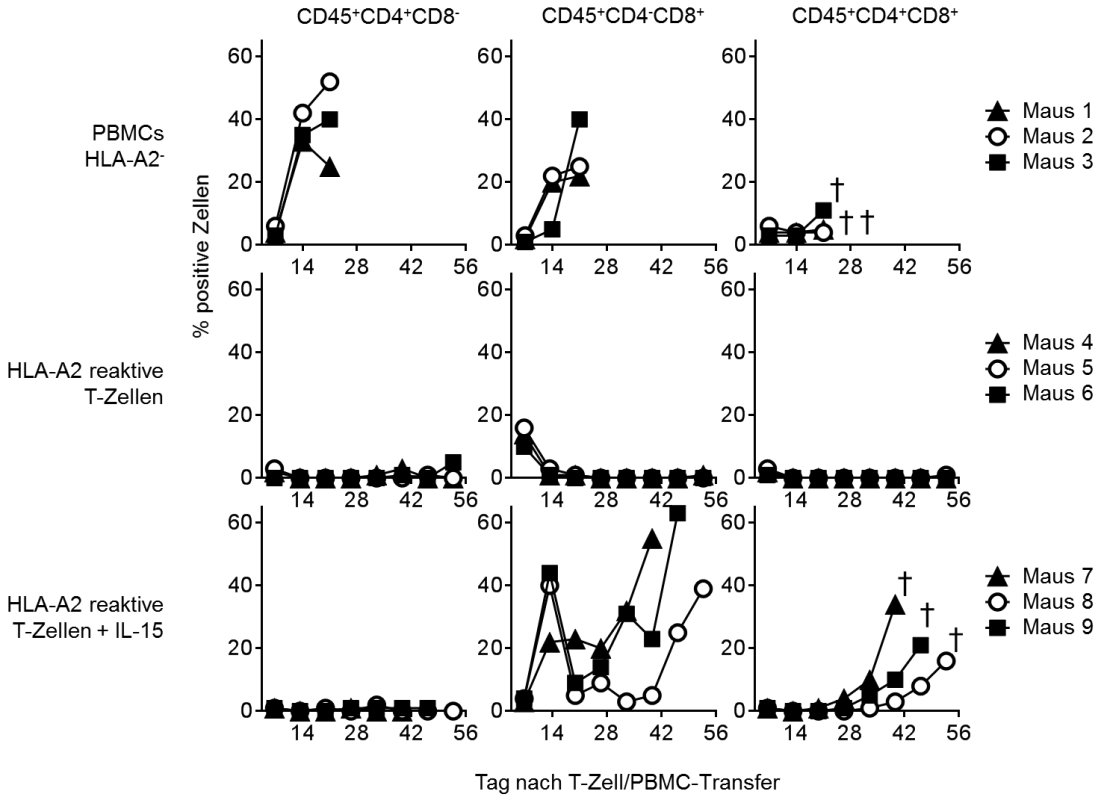


Abbildung 18: Entwicklung der Frequenzen HLA-A2-reaktiver T-Zellen im peripheren Blut von NSG-HLA-A2/HHD-Mäusen unter Einfluss von IL-15. PBMCs eines HLA-$A2^-$ Spenders sowie *in vitro* generierte HLA-A2-reaktive T-Zellen wurden zu 5 × 10^6 Zellen pro Maus i.v. in NSG-HLA-A2/HHD-Mäuse injiziert. Eine Gruppe erhielt zusätzlich i.p. Injektionen von 10 µg/Maus IL-15 jeden zweiten Tag. Peripheres Blut der Mäuse wurde wöchentlich mittels FACS auf die Frequenzen CD4-, CD8- und CD45-positiver T-Zellen untersucht. Aufgetragen wurden prozentuale Werte, die sich auf ein vorgeschaltetes FSC/SSC-Lymphozytengate beziehen. Mäuse, die starke GvHD-Symptome zeigten, wurden aus dem Versuch genommen und sind in der rechten Spalte mit einem † gekennzeichnet.

4.4.3 Phänotypische T-Zellanalyse

Die *in vitro*-generierten, HLA-A2-reaktiven T-Zellen wurden am Tag des T-Zelltransfers auf die Expression der phänotypischen Markerproteine CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CD27, CD28, CCR7 und CD62L untersucht. Auch am Ende des Versuchs wurden $CD8^+$ T-Zellen aus Milz und Knochenmark der Mäuse 8 und 9 per MACS isoliert und phänotypisch charakterisiert. Wie in Abbildung 19 zu sehen, war der Anteil von $CD4^+CD8^+$ doppelpositiven T-Zellen im Vergleich zur Ausgangspopulation von Tag 17 stark erhöht. Außerdem zeigten die *ex vivo* isolierten T-Zellen eine Verschiebung der CD45RA/RO-Verteilung in Richtung CD45RO. Während zu Beginn des Versuchs 34,1 % der T-Zellen positiv für CD45RO waren, wurden an Tag 56 92,0 % gemessen. Die Expression von CD27 und CD28 war am Ver-

suchsende ebenfalls höher als an Tag 17. Der Anteil von $CD27^+CD28^+$ Zellen stieg von 56,4 auf 95,8 % an. Die Frequenz von $CCR7^+CD62L^+$ Zellen sank dagegen von 13,1 auf 6,4 % ab. Insgesamt entspricht dies einer Differenzierung der T-Zellen hin zum Effektor-Phänotyp.

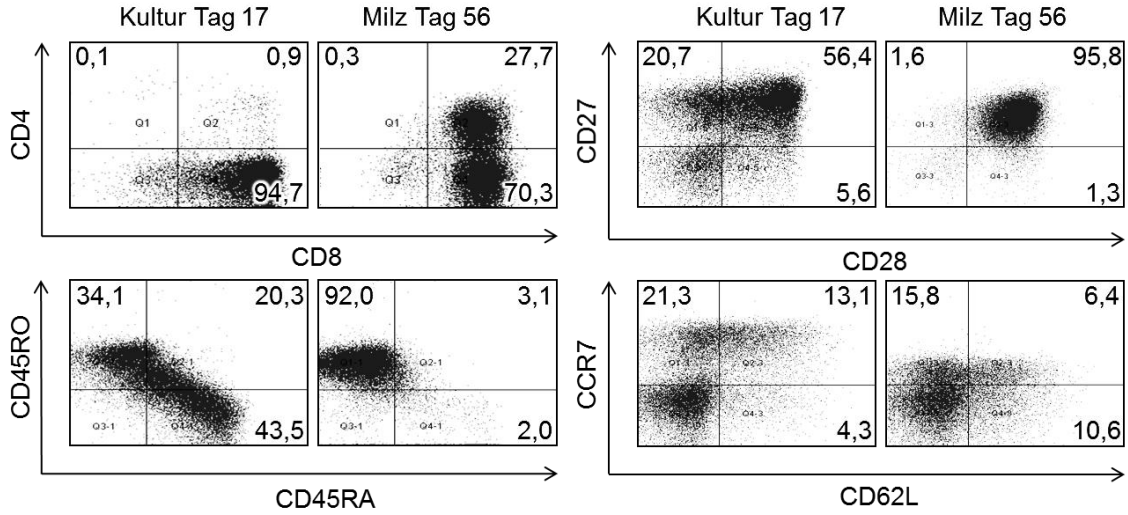


Abbildung 19: Phänotypische Analyse *ex vivo* isolierter, HLA-A2-reaktiver T-Zellen. Kulturzellen vom Tag des T-Zelltransfers sowie nach Versuchsende über CD8-MACS reisolierte, humane T-Zellen von Maus 8 und 9 wurden durchflusszytometrisch auf die Expression phänotypischer Markerproteine untersucht. Die gezeigten Frequenzen entsprechen Prozentwerten in einem vorgeschalteten FSC/SSC-Lymphozytengate.

4.4.4 IFN-γ-Sekretion kultivierter und *ex vivo* isolierter $CD8^+$ T-Zellen

Die Reaktivität der in diesem Versuch eingesetzten, HLA-A2 reaktiven T-Zellen wurde am Tag des T-Zelltransfers durch einen IFN-γ-ELISpot-Assay gegen K562-A2 und NSG-HLA-A2/HHD-DCs überprüft. Pro Well wurden 1×10^4 T-Zellen eingesetzt. Als Stimulatoren dienten K562, K562-A2 und *in vitro* generierte DCs von NSG- oder NSG-HLA-A2/HHD-Mäusen und wurden zu $0{,}5 \times 10^4$ Zellen/Well eingesetzt. Die spontane IFN-γ-Freisetzung wurde durch eine Mediumkontrolle ohne Stimulatoren gemessen. Wie in Abbildung 20A zu sehen, waren die Zellen gegen K562-A2 und NSG-HLA-A2/HHD-DCs reaktiv, zeigten jedoch keine Reaktivität gegen NSG-DCs und K562. Die T-Zellen reagierten somit exklusiv alloreaktiv gegen HLA-A2/HHD und zeigten keinerlei Xenoreaktivität gegen DCs aus NSG-Mäusen. Die Reaktivität gegen K562-A2 war dabei etwas stärker als gegen NSG-HLA-A2/HHD-DCs.
An Tag 42 und 56 wurden humane T-Zellen aus Milz und Knochenmark der Mäuse 8 und 9 über CD8-MACS isoliert. Auch für diese Zellen wurde das Reaktivitätsprofil im IFN-γ-ELISpot untersucht. Dabei wurden dem Kulturmedium 100 U/ml IL-2 zugesetzt, da die *ex vivo*-isolierten T-Zellen aufgrund der vergleichsweise schwachen Stimulation im IFN-γ-ELISpot ohne IL-2 keine Reaktivität zeigten und auch mit IL-2 deutlich weniger Spots als für die T-Zellen aus der Zellkultur beobachtet wurden (Abbildung 20B). Am stärksten fiel die Reaktion gegen

NSG-HLA-A2/HHD DCs aus, die Reaktion gegen K562-A2 war hingegen im Vergleich zu den Kulturzellen abgeschwächt. Die *ex vivo*-isolierten T-Zellen reagierten allerdings auch auf NSG-DCs, was auf das Auswachsen einer xenoreaktiven Subpopulation hindeutet.

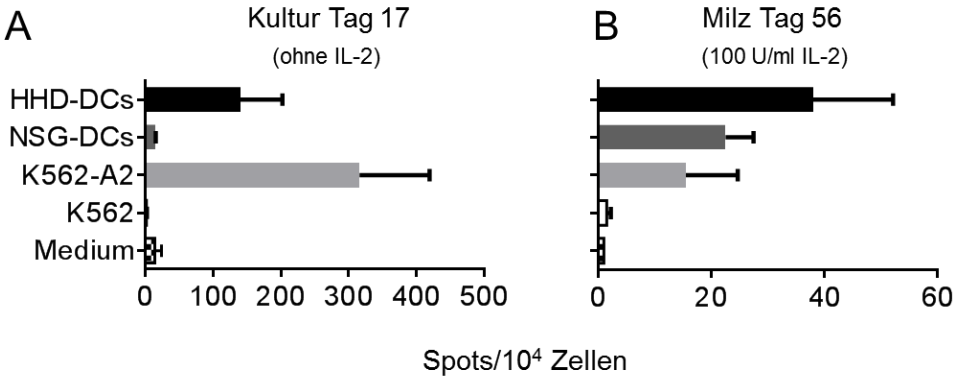


Abbildung 20: IFN-γ-ELISpot von kultivierten und *ex vivo* isolierten, HLA-A2-reaktiven CD8⁺ T-Zellen. A) HLA-A2-reaktive T-Zellen wurden generiert und nach 17 Tagen Kultur zu 10^4 T-Zellen pro Well im IFN-γ-ELISpot gegen die angezeigten Stimulatoren eingesetzt. B) An Tag 42 und 56 wurden humane T-Zellen aus der Milz von Maus 8 und 9 (Gruppe: A2-reaktive T-Zellen und IL-15) durch CD3-MACS isoliert und mit 100 U/ml IL-2 im IFN-γ ELISpot eingesetzt. HHD-DCs = *in vitro* generierte DCs aus einer NSG-HLA-A2/HHD-Maus, NSG-DCs = *in vitro* generierte DCs aus einer NSG-Maus.

4.5 Herstellung und funktionelle Charakterisierung der IL-15-Fusionsproteine ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13⁺-Fc

Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben verursachte die Aufreinigung und Renaturierung von IL-15 aus *E.coli* große Verluste und IL-15 musste für die *in vivo*-Versuche aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit in den NSG-Mäusen mehrfach pro Woche verabreicht werden. Um die Häufigkeit der Injektionen zu reduzieren und die Bioaktivität bzw. Bioverfügbarkeit von IL-15 zu steigern, sollte ein IL-15-Superagonist entwickelt werden. Dazu wurden verschiedene IL-15-Fusionsproteine mit der IL-15Rα-Sushi-Domäne und ggf. einer IgG1-Fc-Domäne hergestellt und hinsichtlich ihrer Wirkung auf IL-15-abhängigen Zelllinien und CD8⁺ T-Zellen getestet. In den folgenden Abschnitten wurden die Daten zur Herstellung, Aufreinigung, Reinheit sowie Funktion und Pharmakokinetik für die in dieser Arbeit entwickelten IL-15-Superagonisten ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13⁺-Fc zusammengefasst.

4.5.1 Aufbau und Abfolge der Domänen

Die Nomenklatur der IL-15-Superagonisten ist angelehnt an eine Publikation von Mortier et al. von 2006 [88]. ILR ist ein Akronym für Interleukin-15, Linker und Rezeptor-α-Sushi. ILR-Fc enthält zusätzlich dazu eine IgG1-Fc Domäne, während diese bei ILR-Ø nicht vorhanden ist. ILR13⁺-Fc hat im Vergleich zu ILR-Fc eine um 13 AA verlängerte Sushi-Domäne.

Abbildung 21 zeigt eine schematische Zusammenfassung, in der die Reihenfolge und Länge der einzelnen Proteindomänen innerhalb der drei superagonistischen IL-15-Fusionsproteine aufgezeigt wird.

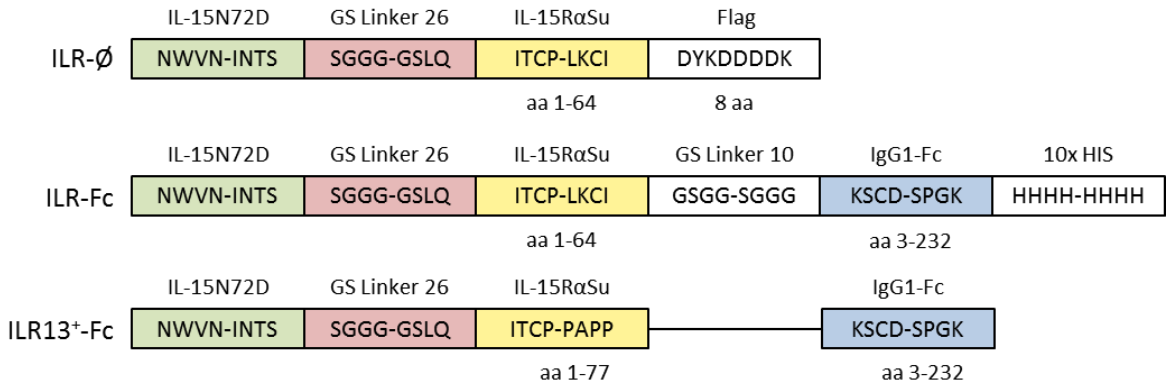


Abbildung 21: Zusammensetzung der Proteindomänen von ILR-Ø, ILR-Fc und ILR-13^{+}-Fc. Schematische Darstellung der Abfolge und Länge von Domänen der IL-15-Superagonisten ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc. In den Kästchen wurden Anfang und Ende der jeweiligen Domäne mit je 4 AA im Einbuchstabencode notiert. GS-Linker 26 = 26 AA langes, flexibles Glycin-Serin-Linkerpeptid; IL-15RαSu = Sushi-Domäne der IL-15Rα-Kette; GS Linker 10 = 10 AA langes, flexibles Glycin-Serin-Linkerpeptid; IgG1-Fc = Fc-Domäne des humanen IgG1; 10 × HIS = Polyhistidin-Tag.

4.5.1.1 Herstellung von pEF4-ILR-Fc

Die Expressionskassette von ILR-Fc besteht aus der AA-Sequenz des IL-15Rα-Signalpeptids (NP_002180.1), IL-15N72D [87], einem 26 AA langen, flexiblen Glycerin-Serin-Linker (GC-Linker) [238], den AA 1-61 der IL-15Rα-Sushi-Domäne (NM_002189.3), einem 10 AA langen GC-linker (GSGGGGSGGG), der humanen IgG1-Fc-Sequenz (AFF59210) und einem 10 × His-Tag. Die Expressionskassette für ILR-Fc wurde *in silico* entworfen, für die Expression in *Homo sapiens* und *Mus musculus* kodonoptimiert und von der Firma GenScript synthetisiert. Die Expressionskassette wurde dann über EcoRI und EcoRV in die multiple Klonierungsstelle (engl.: *multiple cloning site*, MCS) des Vektors pEF4/myc-His-A (Life Technologies) eingebracht. Der daraus resultierende Vektor pEF4-ILR-Fc wurde genutzt, um über PCR und Klonierungsschritte die Expressionskonstrukte für ILR-Ø und ILR13^{+}-Fc zu generieren. Eine Plasmidkarte von pEF4-ILR-Fc findet sich im Anhang in
Abbildung 42. Die proteinkodierende Sequenz des Vektors wurde mit den Primern UH301 und UH302R sequenziert. Die Sequenz stimmte zu 100 % mit dem theoretischen Konstrukt überein und die resultierende AA-Sequenz ist in Abbildung 22 dargestellt.

4.5.1.2 Herstellung von pEF4-ILR-Ø

Bei der Herstellung des ILR-Ø-Expressionsvektors wurde pEF4-ILR-Fc als PCR-Template verwendet. Die Region, welche das IL-15-Signalpeptid, IL-15N72D, den 26 AA langen GC-Linker und die IL-15Rα-Sushi-Domäne enthält, wurde mit den Primern UH328 und UH336R amplifiziert. Durch diese PCR wurden der 10 AA lange GC-Linker und die IgG1-Fc-Domäne deletiert. Außerdem wurden der Sequenz durch die Primer 5´eine EcoRI- und 3´ein Flag-Tag sowie eine EcoRV-Schnittstelle zugefügt. Die Insertion der neu generierten Expressionskassette in die MCS des Vektors pEF4/myc-His-A erfolgte über EcoRI und EcoRV. Die Plasmidkarte von pEF4-ILR-Ø kann im Anhang in Abbildung 41 eingesehen werden. Die proteinkodierende Sequenz wurde durch Sequenzierung mit den Primern UH301 und UH328 überprüft und zeigte 100 % Übereinstimmung zum theoretischen Konstrukt (Abbildung 22).

4.5.1.3 Herstellung von pEF4-ILR13^{+}-Fc

Zur Herstellung des pEF4-ILR13^{+}-Fc Expressionsvektors wurde wiederum pEF4-ILR-Fc als PCR-Template verwendet. In zwei unabhängig voneinander durchgeführten PCRs mit den Primerpaaren UH332 und UH331R bzw. UH330 und UH333R wurden zwei DNA-Fragmente generiert, die in einem Bereich von 39 bp überlappen. Diese 39 bp erweitern die IL15Rα-Sushi-Domäne um 13 AA des 4ten Exons, die nach Bouchaud et al. 2008 an der hochaffinen Bindung zu IL-15 beteiligt sind. Gleichzeitig wurde der 10 AA lange GC-Linker deletiert. Durch eine sich anschließende Fusions-PCR mit den Primern UH332 und UH333R wurden beide Fragmente miteinander verbunden. Dieser Schritt führte außerdem zum Wegfall des N-terminalen 10 × HIS-Tags und der Einbringung einer 5´ EcoRI- und einer 3´ EcoRV-Schnittstelle. Das finale PCR-Produkt wurde über diese Schnittstellen in die MCS des Vektors pEF4/myc-His-A kloniert. Eine Plasmidkarte des Vektors findet sich im Anhang in Abbildung 42. Die Sequenzierung der proteinkodierenden Sequenz erfolgte mit den Primern UH301 und UH302R und stimmte zu 100 % mit dem theoretischen Konstrukt überein (Abbildung 22).

>ILR-Fc
MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLL
ELQVISLESGDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH
WTTPSLKCIGSGGGGSGGGKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHHHHHH--

>ILR-Ø
MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLL
ELQVISLESGDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH
WTTPSLKCIDYKDDDDK--

>ILR13^{+}-Fc
MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLL
ELQVISLESGDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH
WTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK--

Abbildung 22: Aminosäuresequenzen von ILR-Fc, ILR-Ø und ILR13^{+}-Fc. Die proteinkodierenden Regionen der jeweiligen Expressionsvektoren wurden sequenziert und in Aminosäuresequenzen übersetzt. Zur besseren Übersicht wurden die Proteindomänen eingefärbt: grün = IL-15N72D, rot = 26 AA Glycin-Serin-Linker, gelb = IL-15RαSu, blau = IgG1-Fc. IL-15Rα-Signalpeptid sowie der 10 AA lange GS-Linker, Flag-Tag und 10 × His-Tag sind weiß hinterlegt. Das Zeichen „-“ steht für ein Stoppkodon.

4.5.2 Ausbeute und Reinheit

Die IL-15-Superagonisten ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc wurden in ihrer nativen Form durch Affinitätschromatographie mit Protein-A oder Flag-spezifischen Agarose-Beads aus Kulturüberständen transient transfizierter 293F-Zellen aufgereinigt. Dadurch entfielen die Aufreinigung von Einschlusskörperchen und die Renaturierung, die bei IL-15 aus *E.coli* mit hohen Verlusten behaftet waren.

4.5.2.1 Ertragssteigerung durch Kotransfektion mit SV40-LTA

Um die Proteinerträge zu steigern, wurden die Expressionsvektoren mit dem großen T-Antigen des Simian-Virus 40 (engl.: *simian virus 40 large T antigen*, SV40-LTA) kotransfiziert. Das SV40-LTA besitzt eine Helikaseaktivität und kann dadurch die Replikation von Vektoren initiieren, die einen SV40-Replikationsursprung besitzen, wobei die Replikationsenzyme der Wirtszelle genutzt werden [240, 241]. Da in den Expressionsvektoren für ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc ein SV40-Replikationsursprung existiert, sollte eine Kotransfektion mit SV40-LTA zur Amplifikation der intrazellulären Plasmidlevel, und dadurch zu einer verstärkten Proteinexpression führen. Diese theoretische Annahme wurde überprüft, indem 293F mit pEF4-ILR-Fc und 1 % SV40-LTA kotransfiziert wurden und die Proteinkonzentrationen in den

Zellen sowie im Kulturüberstand nach 2, 5 und 7 Tagen in einem IL-15-spezifischen Westernblot bestimmt wurde. Die Transfektion erfolgte wie in Abschnitt 3.4 beschrieben mit Expifectamine. In Abbildung 23A sind die Ergebnisse des Westernblots abgebildet.

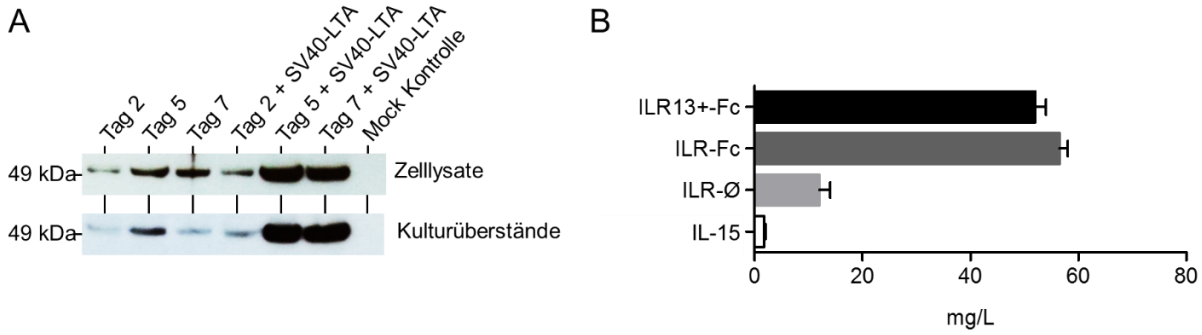


Abbildung 23: Ertrag von ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc. A) pEF4-ILR-Fc wurde entweder isoliert oder mit 1 % SV40-LTA in 293F-Zellen transfiziert. Nach 2, 5 und 7 Tagen wurden Zelllysate und Kulturüberstände in einem IL-15-spezifischen Westernblot analysiert. Als Mock-Kontrolle wurde der leere pEF4-Vektor transfiziert. B) Vergleich der Erträge aufgereinigter und bioaktiver Proteine pro Liter Kulturmedium für IL-15, ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc.

Zwei Tage nach der Transfektion konnte ILR-Fc in Zelllysaten und Kulturüberständen detektiert werden. Die Proben mit Kotransfektion von SV40-LTA zeigten zu diesem Zeitpunkt bereits eine minimal höhere Signalstärke. Nach 5 bzw. 7 Tagen waren die Signale der SV40-LTA-kotransfizierten Proben in Lysaten und Überständen deutlich intensiver als die der Proben ohne SV40-LTA. Eine densitometrische Auswertung des Westernblots an Tag 7 ergab eine Signalsteigerung in den Kulturüberständen der kotransfizierten Zellen um den Faktor 10. Zu späteren Zeitpunkten konnte keine weitere Steigerung der Proteinmengen in den Kulturüberständen beobachtet werden und die Aufreinigung der superagonistischen IL-15-Fusionsproteine erfolgte somit standardmäßig an Tag 7. Aus den kotransfizierten Kulturüberständen konnten zu diesem Zeitpunkt im Mittel 58 mg/l ILR-Fc isoliert werden, während die Ausbeute der einfach transfizierten Proben bei 7 mg/l lag. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc zur Steigerung der Proteinausbeute stets mit 1 % SV40-LTA kotransfiziert.

4.5.2.2 Reinheit

Eine Übersicht über die Erträge aller Proteine in ihrer bioaktiven Form findet sich in Abbildung 23B. Für ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc wurden stets ähnlich hohe Erträge im Bereich von 50-60 mg/l Kulturmedium erzielt. ILR-Ø wurde aufgrund der fehlenden IgG1-Fc-Domäne nicht mit Protein-A, sondern mit Flag-spezifischen Agarose-Beads aufgereinigt. Diese Aufreinigung war weniger effektiv und führte im Mittel zu einer Ausbeute von 17 mg/l. Die Reinheit von ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc wurde gewöhnlich densitometrisch anhand von SDS-PAGE-Aufnahmen bestimmt und lag bereits direkt nach der affinitätschromatographischen

Aufreinigung aus den Kulturüberständen bei über 95 %, weswegen auf weitere Aufreinigungsschritte verzichtet wurde.

4.5.3 Dimerisierungsverhalten

Durch die Anwesenheit der IgG1-Fc-Domäne in ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc sollten beide Proteine in ihrer nativen Form als Homodimere vorliegen. Die Dimerisierung erfolgt durch Ausbildung zweier intramolekularer Disulfidbrücken zwischen den IgG1-CH2-Domänen der Monomere. Da ILR-Ø die IgG1-Fc-Domäne nicht besitzt, sollte es nicht dimerisieren. Eine vereinfachte Darstellung der nativen Proteinkonformationen findet sich in Abbildung 24. Die Dimerisierung der IL-15-Superagonisten wurde durch SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen überprüft. Als reduzierendes Agens wurde dabei β-Mercaptoethanol verwendet.

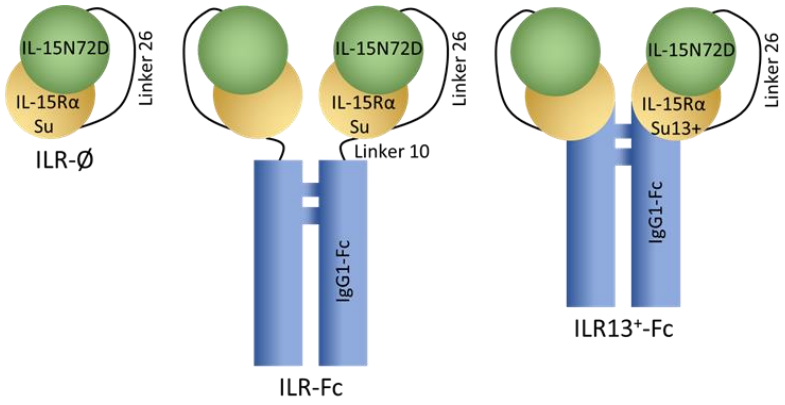


Abbildung 24: Proteinstrukturen der IL-15-Superagonisten. Dargestellt ist die räumliche Anordnung der Proteindomänen innerhalb der IL-15-Superagonisten. ILR-Ø ist ein Monomer, bei dem IL-15N72D durch einen flexiblen GC-Linker (Linker 26) an die IL-15Rα-Sushi-Domäne gekoppelt ist. Bei ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc wurde diese Struktur kovalent an eine IgG1-Fc-Domäne gebunden. Dies führt zur Ausbildung zweier Disulfidbrücken im Bereich von IgG1-Fc und zur Bildung von Homodimeren. Bei ILR13^{+}-Fc wurde IL-15RαSu unter Wegfall des 10 AA langen GC-Linkers und des C-terminalen His-Tags um 13 AA des vierten Exons erweitert.

Aufgereinigte Proteinlösungen von IL-15, ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc wurden durch Erhitzen in SDS-PAGE-Probenpuffer mit und ohne Zusatz von 10 % β-Mercaptoethanol denaturiert. Dadurch wurden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine in allen Proben zerstört, die Disulfidbrücken blieben jedoch in den Proben ohne β-Mercaptoethanol erhalten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mit dem Coomassie-Farbstoff InstantBlue sichtbar gemacht.

Abbildung 42A zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE. Das Laufverhalten von IL-15 war unter nicht-reduzierenden Bedingungen leicht verändert und das Proteinsignal wurde bei etwa 12 kDa detektiert, während es unter reduzierenden Bedingungen bei 15 kDa lag. Auch für ILR-Ø ist unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine Verlagerung des Signals von 34 kDa

auf etwa 22 kDa zu erkennen. IL-15 und ILR-Ø formen zwar keine Dimere, besitzen aber intramolekulare Disulfidbindungen, deren Anwesenheit das Laufverhalten in der SDS-PAGE beeinflussen kann. Die Signale von ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc befinden sich unter reduzierenden Bedingungen im Bereich von 60 kDa. Unter nicht-reduzierten Bedingungen wurden beide Proteine bei etwa 120 kDa detektiert. Die Verdopplung des Molekulargewichts wurde durch die Dimerisierung der Proteine erwartet. Um die Spezifität der Signale zu überprüfen, wurde von den reduzierten Proben zusätzlich ein Westernblot mit einem IL-15-spezifischen Antikörper angefertigt (
Abbildung 42B). Die Verteilung der Signale im Westernblot entspricht genau den Beobachtungen aus der SDS-PAGE, somit können die SDS-PAGE-Signale IL-15 bzw. den IL-15-Superagonisten zugeordnet werden.

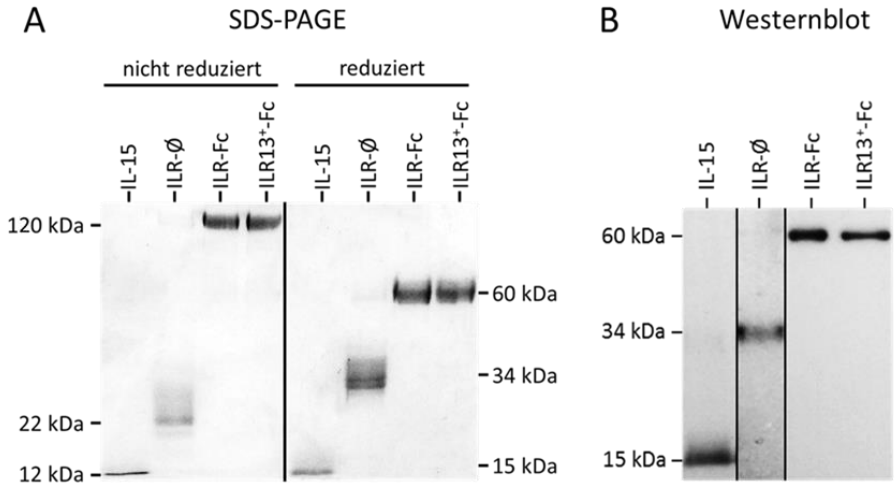


Abbildung 25: Dimerisierung der IL-15-Superagonisten, SDS-PAGE/Westernblot. A) SDS-PAGE von IL-15 und IL-15-Superagonisten unter reduzierenden (rechts) und nicht-reduzierenden (links) Bedingungen. B) Westernblot derselben Proben unter reduzierenden Bedingungen. Der Nachweis erfolgte über einen IL-15-spezifischen Primärantikörper.

4.5.4 Bioaktivität im Proliferationsassay mit CTLL-2- und M-07e-Zellen

Um die Unterschiede in der Wirkung der IL-15-Superagonisten zu untersuchen wurden die Bioaktivitäten von ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc in einem Proliferationsassay auf CTLL-2- und M-07e-Zellen verglichen. CTLL-2 exprimieren den gesamten IL-15Rαβγ-Komplex, während M-07e den IL-15Rβγ ohne α-Kette exprimieren. Serielle Verdünnungsreihen der IL-15-Superagonisten wurden erstellt und im 96-Well Format auf 1 × 10^5 Zellen getestet. Die Proliferation wurde nach 4 Tagen durch einen CellTiter 96-Proliferationsassay anhand des Farbumschlags bei 490 nm gemessen.

Auf M-07e-Zellen wurde eine vergleichsweise hohe IL-15-Konzentration benötigt, um die Proliferation anzuregen. Die errechnete Effektivdosis, die für eine halbmaximale Proliferation

benötigt wurde (ED_{50}), beträgt 2712 pmol/l. ILR-Ø und ILR-Fc wirken bereits in deutlich niedrigeren Konzentrationen mit einer ED_{50} von 282 pmol/l für ILR-Ø und 271 pmol/l für ILR-Fc. Verglichen mit diesen beiden Konstrukten zeigt ILR13$^+$-Fc eine nochmals erhöhte Bioaktivität mit einer ED_{50} von 91 pmol/l. Die Bioaktivitäten von ILR-Ø und ILR-Fc waren somit etwa 10-fach und die von ILR13$^+$-Fc etwa 30-fach höher als die von IL-15. Die Rezeptorkonfiguration von M-07e entspricht auch der physiologischen Konfiguration von humanen T-Zellen.
Auf CTLL-2 wirkte IL-15 bereits in relativ niedrigen Konzentrationen mit einer ED_{50} von 39 pmol/l. ILR-Ø und ILR-Fc zeigten geringere Bioaktivitäten mit einer ED_{50} von 841 pmol/l für ILR-Ø und 1166 pmol/l für ILR-Fc. Die höchste Konzentration wurde von ILR13$^+$-Fc mit einer ED_{50} von 5208 pmol/l benötigt. Die Bioaktivität von ILR-Ø war somit 22-fach niedriger als die von IL-15, während sie für ILR-Fc um den Faktor 30 und für ILR13$^+$-Fc um den Faktor 133 gesenkt war. Die Anwesenheit der IL-15Rα-Sushi-Domäne und besonders der um 13 AA verlängerten Form behinderte somit offensichtlich die Bindung an den murinen, hochaffinen IL-15Rαβγ. Für die ähnlich aufgebauten IL-15-Superagonisten RLI, ILR und Alt803 wurde ein derartiger Effekt auf 32Dβ-Zellen, die den humanen, hochaffinen IL-15Rαβγ exprimieren, nicht beschrieben [88, 238]. Möglicherweise sind strukturelle Unterschiede zwischen dem murinen und dem humanen Rezeptor für die beobachteten Differenzen verantwortlich.

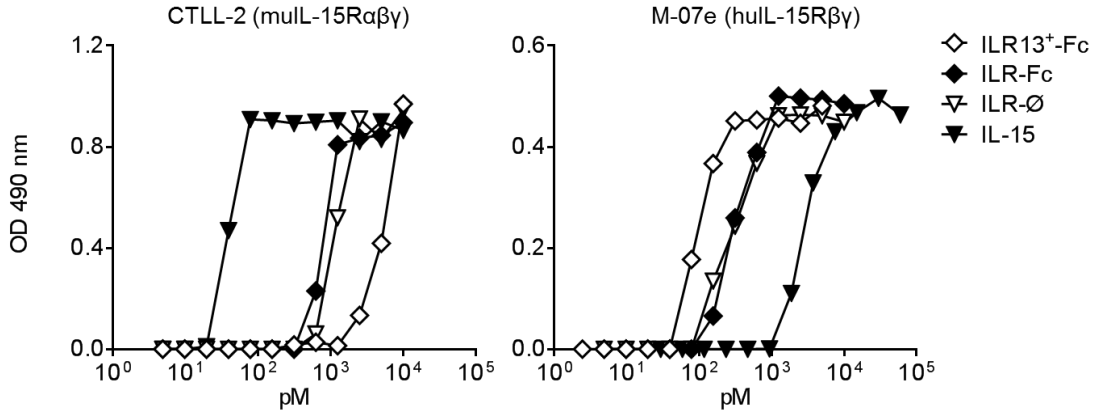


Abbildung 26: Bioaktivität von ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13$^+$-Fc auf CTLL-2 und M-07e. Es wurden serielle Verdünnungsreihen von ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13$^+$-Fc hergestellt und im Proliferationsassay auf CTLL-2- und M-07e-Zellen getestet. Die Proliferation wurde nach 4 Tagen durch Zugabe von Cell-Titer 96-Lösung und Messung des Farbumschlags bei 490 nm bestimmt.

4.5.5 Bestimmung der Halbwertszeiten in murinem Serum

Zur Bestimmung der Halbwertszeiten wurden IL-15, ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13$^+$-Fc in einer Ausgangskonzentration von 60 µmol/kg Körpergewicht i.v. in C57BL/6-Mäuse injiziert. Nach 1, 2, 4, 24, 72, 96 und 144 Stunden wurde den Mäusen eine geringe Menge Blut aus der Schwanzvene entnommen und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis der Gerinnungsprozess vollständig abgelaufen war. Durch Zentrifugation bei 16000 rcf wurde das Serum

von den restlichen Blutbestandteilen abgetrennt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Nach Akquisition aller Serumproben wurden diese im IL-15-Quantikine-ELISA eingesetzt. Die Proben wurden dazu 1:100 in Probenpuffer verdünnt und der Test nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Wie in Abbildung 27 gezeigt, sank die Konzentration von IL-15 bereits nach 4 Stunden unter das Detektionslimit. Die errechnete Halbwertszeit von IL-15 in diesem Versuch betrug 22 min. ILR-Ø konnte demgegenüber bis zu 120 h nach der Injektion detektiert werden. Die Halbwertszeit war verglichen mit IL-15 wesentlich höher und lag bei 12,3 h. ILR-Fc war auch nach 144 h noch im Serum detektierbar, die berechnete Halbwertszeit lag bei 15,7 h. Die höchsten Zytokinkonzentrationen wurden allerdings durchgehend für ILR13^{+}-Fc gemessen. Die Halbwertszeit war auch im Vergleich zu ILR-Fc nochmals erhöht und lag bei 21,5 h.

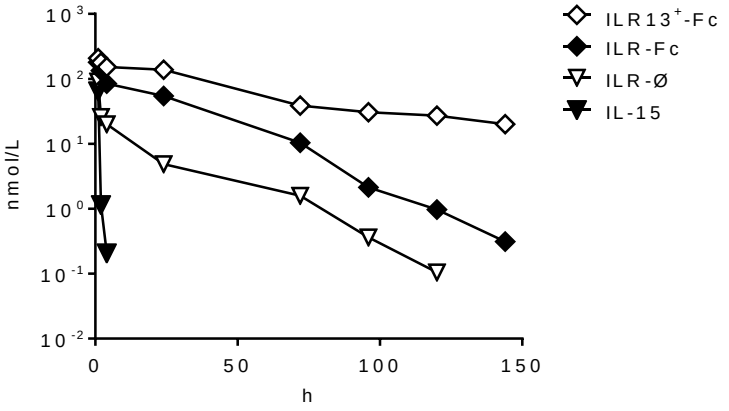


Abbildung 27: Halbwertszeiten von IL15, ILR, ILR-Ø und ILR13^{+}-Fc in Mausserum. Die Zytokine wurden zu 60 µg/kg Körpergewicht i.v. in C57BL/6-Mäuse injiziert. Nach 1, 2, 4, 24, 72, 96, 120 und 144 h wurden Blutproben der Mäuse gesammelt und daraus Serum gewonnen. Die Zytokinkonzentrationen in den Serumproben wurden über einen IL-15-spezifischen ELISA ermittelt.

4.5.6 Einfluss von IL-15 und ILR13^{+}-Fc auf die Expression von NKG2D und PD-1 humaner CD8^{+} T-Zellen

Für den bereits in der Einleitung vorgestellten IL-15-Superagonisten Alt803 wurde eine Hochregulation von NKG2D, einem aktivierenden Rezeptor der angeborenen Immunantwort, auf humanen T-Zellen beschrieben, die mit einem therapeutischen Effekt in Tumormodellen einherging, für den keine antigenspezifische Stimulation notwendig war [89, 242]. Im hier gezeigten Versuch wurden IL-15 und ILR13^{+}-Fc hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Expression von NKG2D sowie auf den inhibierenden Rezeptor PD-1 auf CD8^{+} T-Zellen untersucht. Dazu wurden PBMCs über einen Zeitraum von 4 Tagen in Anwesenheit von 2 oder 20 nM IL-15 bzw. ILR13^{+}-Fc kultiviert. Nach 4 Tagen Kultur wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern für CD4, CD8, PD-1 und NKG2D gefärbt und die Expression beider Rezeptoren durchflusszytometrisch ausgewertet.

Wie in Abbildung 28 dargestellt, lag die Basisexpression von NKG2D und PD-1 auf $CD8^+$ T-Zellen in der unbehandelten Kontrolle bei 27,6 bzw. 4,1 %. IL-15 bewirkte demgegenüber einen deutlichen Anstieg der NKG2D- und PD-1-Expression. Die Probe mit 20 nM IL-15 zeigte im Vergleich zur Probe mit 2 nM IL-15 eine moderat höhere Frequenz von NKG2D und keinen Anstieg von PD-1. $ILR13^+$-Fc aktivierte die Expression von NKG2D schon mit einer Konzentration von 2 nM deutlich stärker als IL-15 mit einer Konzentration von 20 nM. Die höchste NKG2D-Frequenz mit 89,4 % positiven $CD8^+$ T-Zellen wurde in der Probe mit 20 nM $ILR13^+$-Fc gemessen, während die Expression von PD-1 nicht weiter anstieg. So wurden für PD-1 in Anwesenheit von IL-15 oder $ILR13^+$-Fc, unabhängig von der Konzentration der Zytokine, stets Werte um 20 % gemessen.

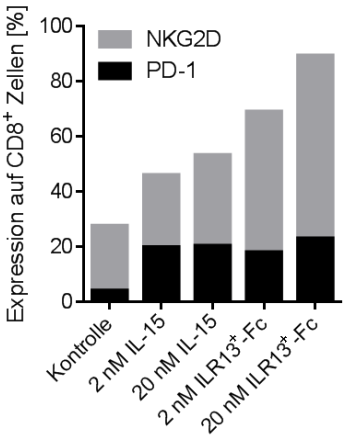


Abbildung 28: Expression von NKG2D und PD1. PBMCs wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen IL-15 oder $ILR13^+$-Fc kultiviert. Die Kontrolle erhielt keine Zytokine. Der Nachweis von NKG2D und PD-1 erfolgte über spezifische Antikörper in der Durchflusszytometrie.

4.6 Einfluss von ILR-Fc auf T- und B-Zellen immunkompetenter Mäuse

Nachdem die IL-15-Superagonisten in den vorigen Versuchen *in vitro* charakterisiert wurden sollten sie in den *in vivo*-Versuchen der nun folgenden Abschnitte in Mausmodellen getestet werden. Da humanes IL-15 und die IL-15-Superagonisten auch auf murinen Zellen aktiv sind, wurde zunächst ihre Wirkung auf die endogenen T- und B-Zellen immunkompetenter Mäuse untersucht. Dazu erhielten B6-OT-1- oder BALB/c-Mäuse eine einfache Dosis ILR-Fc und die Frequenzen von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie von $CD19^+$ B-Zellen in Blut und Milz der Mäuse wurden nach 4 Tagen bestimmt. Zusätzlich wurde das Gewicht der Milzen als Indikator für die T-Zellproliferation gemessen.

4.6.1 B6-OT-1-Mäuse

Im hier vorgestellten Versuch wurde die Wirkung von ILR-Fc auf B- und T-Zellfrequenzen in C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J, kurz B6-OT-1-Mäusen untersucht. Etwa 60-70% der

CD8⁺ T-Zellen dieser Mäuse exprimieren einen T-Zell-Rezeptor, der das Ovalbumin-Peptid SIINFEKL im Kontext von H2-K^b erkennt. Diese Mäuse erhielten Injektionen von 10 µg/Maus IL-15, der molar äquivalenten Dosis von 62 µg/Maus ILR-Fc oder eine PBS-Kontrolle. Nach 4 Tagen wurden Blut- und Milzproben der Mäuse in der Durchflusszytometrie mit CD4-, CD8-, CD19- und CD45-spezifischen Antikörpern untersucht. Das Milzgewicht wurde auf der Feinwaage bestimmt.

Die Milzen der Mäuse in der ILR-Fc-Gruppe waren nach 4 Tagen massiv vergrößert, während in der IL-15-Gruppe keine Vergrößerung festgestellt wurde. Das Milzgewicht in den PBS- und IL-15-Mäusen lag im Schnitt bei 209 bzw. 213 mg, hingegen wurde für die ILR-Fc-Mäuse ein Durchschnittswert von 603 mg errechnet. In Abbildung 29A sind die Gewichte in einem Balkendiagramm aufgetragen. In einem einfaktoriellen ANOVA mit Tukey-Test wurde eine statistische Signifikanz dieser Ergebnisse mit $p < 0,05$ berechnet.

Die Splenomegalie wurde begleitet von stark erhöhten Frequenzen der CD8⁺ T-Zellen in Blut und Milz der ILR-Fc-Mäuse, die in Abbildung 29B zusammengefasst sind.

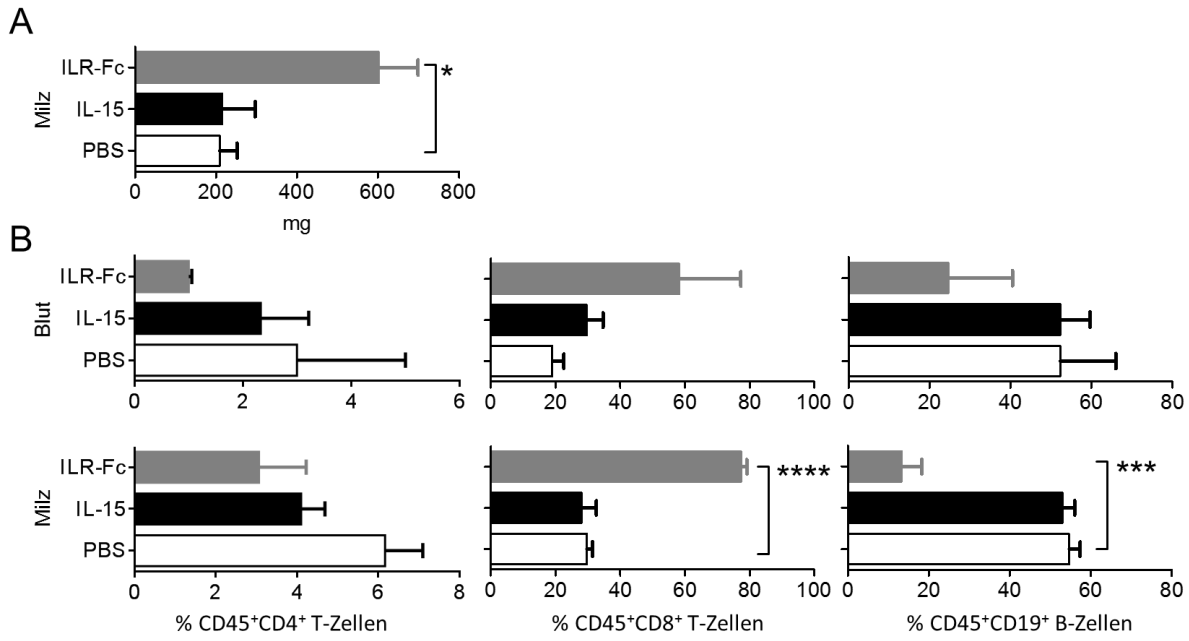


Abbildung 29: Auswirkungen von ILR-Fc auf T- und B-Zellen in B6-OT-1-Mäusen. Die Mäuse erhielten eine einmalige Injektion von 10 µg/Maus IL-15, 62 µg/Maus ILR-Fc oder eine PBS-Kontrolle i.p. (n = 3). Die Analyse erfolgte nach 4 Tagen. A) Gewicht der freipräparierten Milzen. B) Frequenzen muriner CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen in Blut und Milz. Die Werte beziehen sich auf ein vorgeschaltetes FSC/SSC-Lymphozytengate. Statistische Signifikanzen wurden mit einem einfaktoriellen ANOVA mit Tukey-Test berechnet. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Die Frequenz der CD8⁺ T-Zellen im Blut lag für PBS bei 19 % und war in der IL-15-Gruppe mit 30 % leicht erhöht. In der ILR--ruppe war die Frequenz im Verhältnis dazu mit 58 % fast doppelt so hoch. In der Milz wurden ähnliche Ergebnisse mit Frequenzen von 30 % für PBS, 28 % für IL-15 und 77 % für ILR-Fc gemessen. Auch diese Ergebnisse waren statistisch sig-

nifikant (ANOVA mit Tukey-Test; $p < 0,0001$). Die Frequenzen von $CD19^+$ B-Zellen in Blut und Milz waren in der ILR-Fc-Gruppe deutlich erniedrigt. Für diese Ergebnisse wurde eine statistische Signifikanz mit $p < 0,001$ berechnet. IL-15 hatte weder im Blut noch in der Milz einen messbaren Effekt auf die CD19-Frequenzen. Die Frequenzen von $CD4^+$ T-Zellen im Blut und in der Milz der IL-15-Gruppe waren jedoch im Vergleich zur PBS-Kontrolle leicht erniedrigt. Für ILR-Fc war die Absenkung stärker ausgeprägt, eine statistische Signifikanz wurde allerdings in keiner Gruppe erreicht.

4.6.2 BALB/c-Mäuse

Um zu zeigen, dass die Splenomegalie und die veränderten T-Zellfrequenzen, die im letzten Abschnitt beobachtet wurden, nicht exklusiv für den transgenen Stamm B6-OT-1, sondern auch in einem Modell mit unverändertem TCR-Repertoire auftreten, wurde der Versuchsaufbau aus Abschnitt 4.6.1 beibehalten und der Versuch mit BALB/c Mäusen wiederholt. Die Gruppengröße wurde auf 5 erhöht und die Mäuse erhielten einmalige i.p. Injektionen von entweder 10 µg/Maus IL-15, 62 µg/Maus ILR-Fc oder einer PBS-Kontrolle. Nach 4 Tagen wurden Blut- und Milzproben der Mäuse in der Durchflusszytometrie mit CD4-, CD8-, CD19- und CD45-spezifischen Antikörpern untersucht. Zusätzlich wurden die Milzen vorher freipräpariert, ihr Gewicht gemessen und ihre Größe photographisch festgehalten.
Wie schon bei den B6-OT-1-Mäusen waren die Milzen der BALB/c-Mäuse als Reaktion auf die ILR-Fc-Injektion stark vergrößert. Abbildung 30 zeigt eine Photocollage, in der die Splenomegalie deutlich ersichtlich ist. Einhergehend mit der Vergrößerung stieg das durchschnittliche Gewicht der Milzen von 79 bzw. 96 mg für PBS und IL-15 auf 375 mg für ILR-Fc an. Für das Gewicht wurde in einem einfaktoriellen ANOVA mit Tukey-Test eine statistische Signifikanz mit $p < 0,0001$ berechnet.

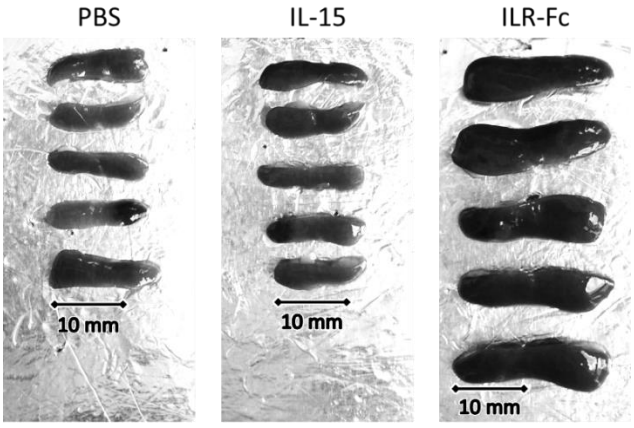


Abbildung 30: Photographische Dokumentation der Splenomegalie in BALB/c Mäusen. Die Mäuse erhielten eine einmalige Injektion von 10 µg/Maus IL-15, 62 µg/Maus ILR-Fc oder eine PBS-Kontrolle i.p. (n = 5). Die photographische Dokumentation der Milzgrößen erfolgte an Tag 4. Die Abbildungen besitzen eine einheitliche Skalierung und in jeder Gruppe findet sich zum Vergleich ein 10 mm Maßstab.

Die Ergebnisse der im Anschluss durchgeführten FACS-Analyse sind in Abbildung 31 zusammengefasst. Die Frequenzen der $CD4^+$ T-Zellen waren in der ILR-Fc-Gruppe sowohl im Blut als auch in der Milz stark erniedrigt, wohingegen IL-15 darauf keinen Einfluss hatte. Ein ausgeprägter Anstieg der $CD8^+$ T-Zellfrequenz wurde wie erwartet durch ILR-Fc in Blut und Milz verursacht, während die Frequenzen in der IL-15-Gruppe auf Höhe der PBS-Kontrolle blieben. Im Blut stieg die Duchschnittsfrequenz der $CD8^+$ T-Zellen von 8,4 % für PBS und 9,0 % für IL-15 auf 24,2 % für ILR-Fc an. In der Milz war der Anstieg ähnlich drastisch. Die $CD19^+$ B-Zellen waren im Blut der Mäuse aus der ILR-Fc Gruppe mit 5,8 % gegenüber denen aus der PBS-Gruppe mit 35,1 % und der IL-15-Gruppe mit 37,9 % deutlich unterrepräsentiert. Auch in der Milz war ein ähnlicher Rückgang zu beobachten. Alle besprochenen Ergebnisse der ILR-Fc-Gruppe waren mit $p < 0{,}0001$ statistisch signifikant. Somit konnte gezeigt werden, dass die durch ILR-Fc ausgelöste Proliferation der $CD8^+$ T-Zellen bei gleichzeitigem Absinken der Frequenzen von $CD19^+$ B-Zellen und $CD4^+$ T-Zellen nicht nur bei den transgenen T-Zellen im B6-OT-1-Modell auftritt, sondern dass es sich um einen generellen Effekt handelt, der unabhängig von der Spezifität der T-Zellen zu beobachten ist.

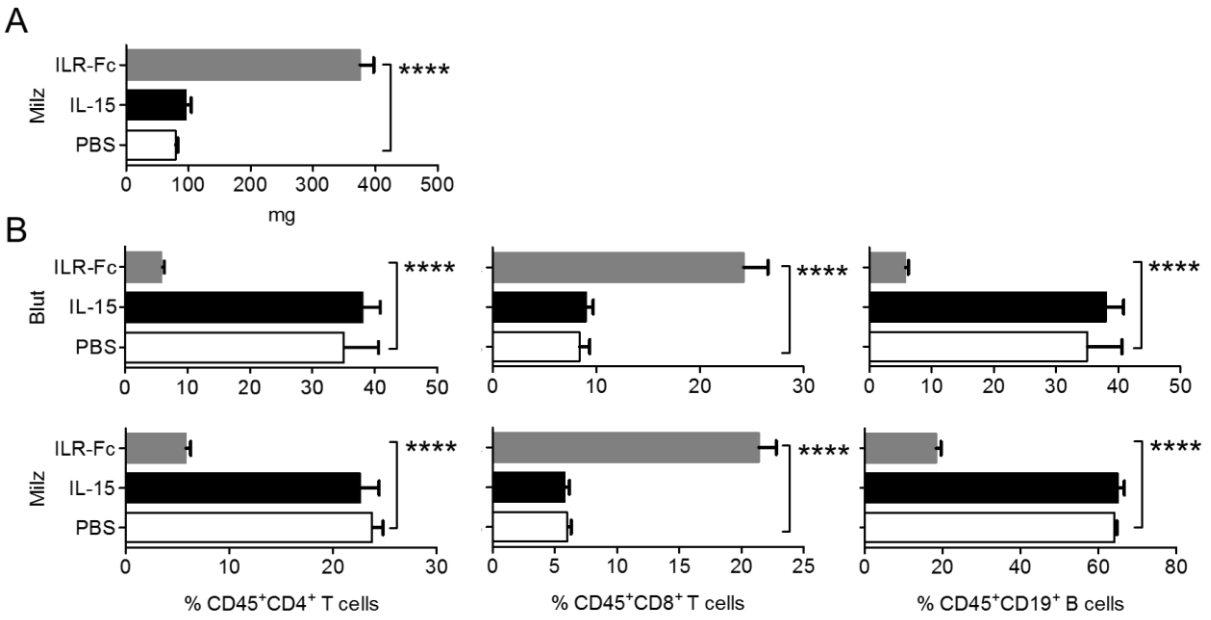


Abbildung 31: Auswirkungen von ILR-Fc auf die endogenen T- und B-Zellfrequenzen im BALB/c-Modell. NSG-Mäuse erhielten einmalige i.p. Injektionen von 10 µg/Maus IL-15, 62 µg/Maus ILR-Fc oder eine PBS-Kontrolle (n = 5). 4 Tage später wurden die Mäuse analysiert A) Gewicht der freipräparierten Milzen. B) Frequenzen muriner $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen und $CD19^+$ B-Zellen in Blut und Milz. Die Werte beziehen sich auf ein vorgeschaltetes Lymphozytengate im FSC/SSC. Die statistischen Berechnungen erfolgten durch einen einfaktoriellen ANOVA mit Tukey-Test. **** $p < 0{,}0001$.

4.7 Dosisabhängige Expansion von $CD8^+$ T-Zellen durch IL-15-Superagonisten in B6-OT-1-Mäusen

Die durch ILR-Fc ausgelöste Splenomegalie in B6-OT-1 und BALB/c Mäusen (siehe Abschnitt 4.6) wurde in diesem Versuch hinsichtlich ihrer Dosisabhängigkeit untersucht. Dazu wurden B6-OT-1-Mäusen unterschiedliche Konzentrationen von ILR-Ø ILR-Fc oder $ILR13^+$-Fc in die Schwanzvene injiziert. Die Konzentrationen betrugen 60, 30, 15, und 7,5 µmol/kg Körpergewicht. 4 Tagen später wurden die Milzen der Mäuse entnommen und peripheres Blut aus dem Thorakalraum gesammelt. Die Milzen wurden gewogen und ihre Größe wurde photographisch dokumentiert. Die Frequenzen muriner B- und T-Zellen in Blut und Milz wurden wie auch in den vorigen Versuchen durchflusszytometrisch mit CD4-, CD8- und CD19-spezifischen Antikörpern gemessen.

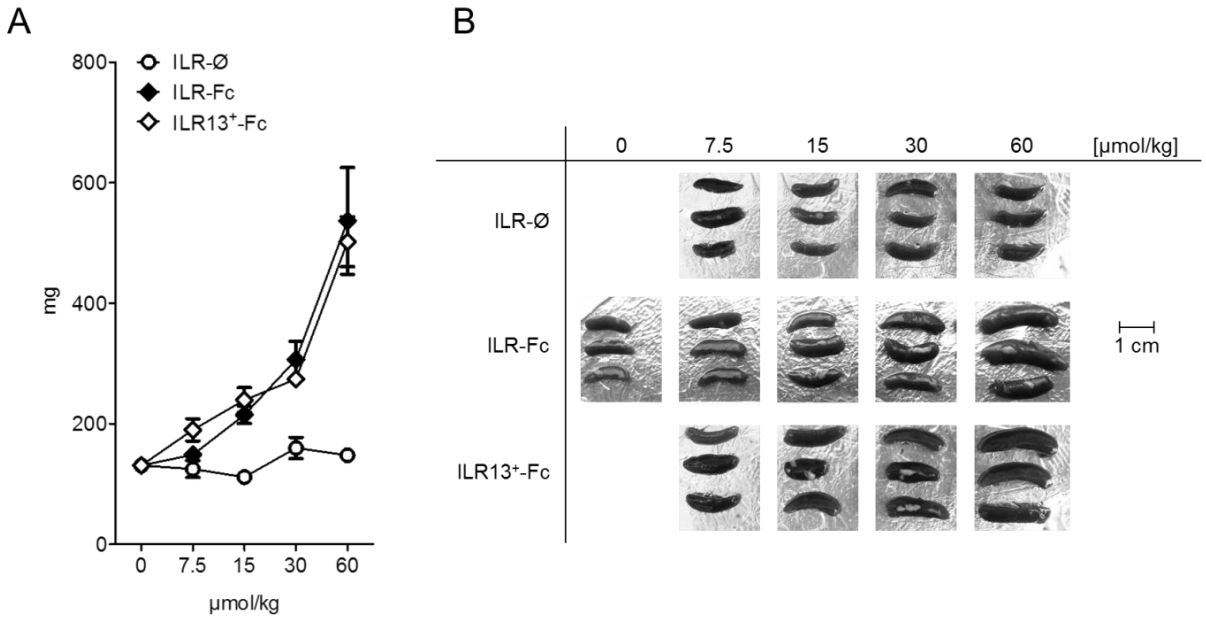


Abbildung 32: Splenomegalie nach Injektion superagonistischer IL-15-Fusionsproteine. B6-OT-1-Mäuse erhielten i.v. Injektionen von 7,5, 15, 30 oder 60 µmol/kg ILR-Ø, ILR-Fc oder ILR13$^+$-Fc (n = 3). An Tag 4 wurden die Milzen präpariert. A) Die Gewichte freipräparierter Milzen wurden auf der Feinwaage gemessen. B) Photographische Dokumentation der ILR-Fc- und ILR13$^+$-Fc induzierten Splenomegalie.

In Abbildung 32A wurden die Gewichtsdaten aller Gruppen zusammengefasst. ILR-Fc und ILR13$^+$-Fc bewirkten auch in diesem Versuch eine dosisabhängige Vergrößerung der Milz. Die Photos der einzelnen Milzen sind in Abbildung 32B gezeigt und wurden einheitlich skaliert. Dadurch ist die Splenomegalie mit zunehmender Dosis deutlich zu erkennen. Für die höchste Dosis von 60 µmol/kg stieg das durchschnittliche Gewicht der Milzen in der ILR-Fc-Gruppe von 131 mg auf 537 mg an. In der ILR13$^+$-Fc-Gruppe wurde ein ähnlich starker Effekt mit einem Anstieg auf 502 mg beobachtet. Für ILR-Ø stieg das Milzgewicht nur marginal auf 148 mg an. Eine Dosisabhängigkeit konnte in dieser Gruppe nicht festgestellt werden.
Die durchflusszytometrischen Messungen zeigten analog zu den Gewichtskurven einen dosisabhängigen Anstieg von CD8$^+$ T-Zellen in Blut und Milz der ILR-Fc- und ILR13$^+$-Fc-behandelten Mäuse. Für die ILR-Ø-Gruppe war dieser Anstieg im Blut nicht zu beobachten, in den Milzen war er jedoch in schwacher Ausprägung vorhanden. Ein leichter Rückgang der CD19$^+$ B-Zellfrequenz konnte für ILR-Ø sowohl im Blut als auch in den Milzen festgestellt werden. Die durchschnittlichen Werte sanken hier von 62 auf 34 %. Für ILR-Fc und ILR13$^+$ war dieser Rückgang stärker und die Frequenzen sanken auf 16 bzw. 24 %. Die Frequenzen der CD4$^+$ T-Zellen waren mit 2-3 % gruppenübergreifend sehr niedrig und eine dosisabhängige Änderung wurde in keiner Gruppe beobachtet. Insgesamt wurden mit diesem Versuch die Beobachtungen aus Abschnitt 4.6 bestätigt und um die Dosisabhängigkeit ergänzt. Die

höchste Dosis von 60 µmol/kg Körpergewicht zeigte dabei die stärksten Effekte und wurde in nachfolgenden Versuchen als therapeutische Dosis eingesetzt.

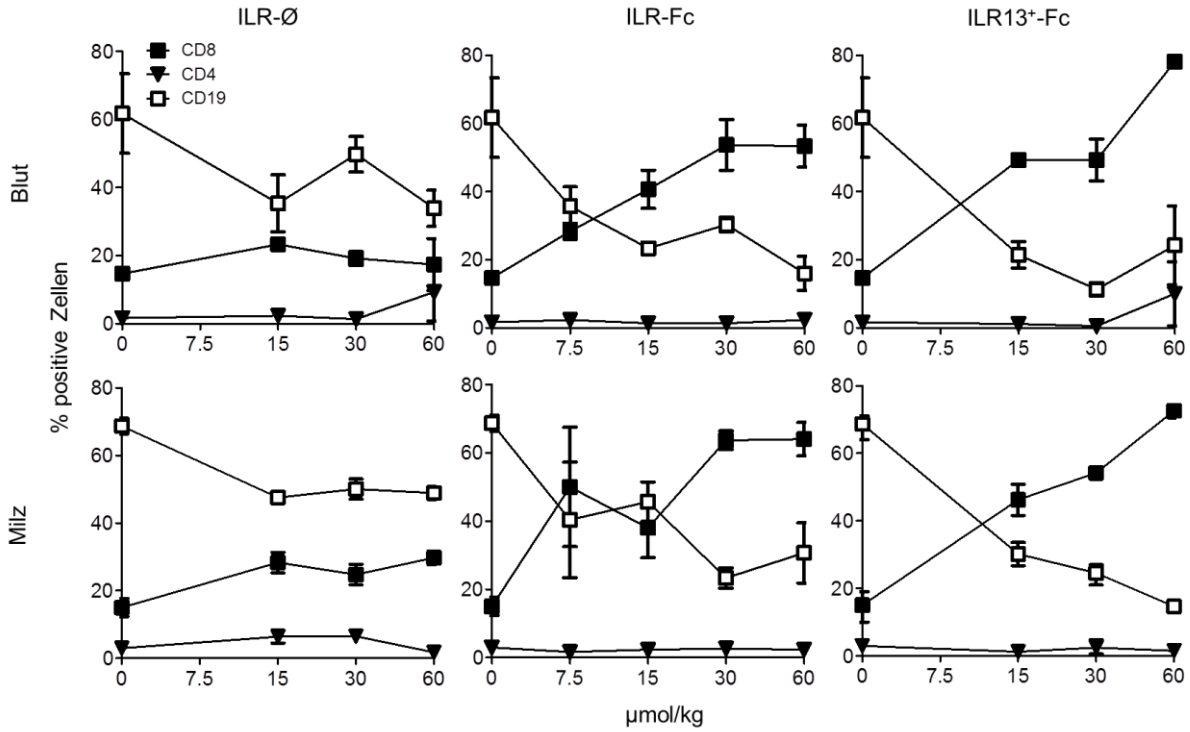


Abbildung 33: Dosisabhängige Verschiebung der Frequenzen von T- und B-Zellen in B6-OT-1-Mäusen nach Injektion von IL-15-Superagonisten. B6-OT-1-Mäuse erhielten i.p. Injektionen mit aufsteigenden Konzentrationen von ILR-Ø, ILR-Fc oder ILR13$^+$-Fc. Nach 4 Tagen wurden Einzelzellsuspensionen von Blut und Milz mit spezifischen Antikörpern gegen murines CD4, CD8 und CD19 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die angegebenen Werte entsprechen Prozentangaben in einem vorgeschalteten FSC/SSC-Lymphozytengate.

4.8 Einfluss von IL-15-Superagonisten auf humane T-Zellen im NSG-Modell

Nachdem in den Versuchen mit B6-OT-1- und BALB/c-Mäusen in Abschnitt 4.6 ein Effekt der IL-15-Superagonisten auf murine T-Zellen gezeigt werden konnte, wurde im Folgenden ihre Wirkung auf humane T-Zellen im NSG-Modell untersucht. Dazu wurden die Mäuse entweder mit humanen CD34$^+$ hämatopoetischen Stammzellen rekonstituiert oder es wurden humane PBMCs i.v. injiziert.

4.8.1 Wirkung von ILR-Fc in humanisierten Mäusen

Für diesen Versuch wurden NSG-Mäuse mit CD34$^+$ hämatopoetischen Stammzellen rekonstituiert, die aus einem für wissenschaftliche Zwecke freigegebenen Leukapheresat eines gesunden Spenders stammten. Sie wurden über CD34-MACS isoliert und i.v. zu 5 × 10^5 Zellen/Maus in 6 Wochen alte, zuvor mit 150 cGy bestrahlte, NSG-Mäuse injiziert. 9 Wochen

später erhielten die Mäuse eine i.p. Injektion von 10 µg/Maus IL-15 oder 62 µg/Maus ILR-Fc. Die Injektionen wurden für IL-15 aufgrund der kurzen Halbwertszeit alle zwei Tage und für ILR-Fc wöchentlich über einen Zeitraum von insgesamt 4 Wochen wiederholt. Die Frequenzen der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen im peripheren Blut der Mäuse wurden wöchentlich in der Durchflusszytometrie überwacht.

Während bis zu 2 Wochen nach Start der Zytokin-Injektionen nur sehr geringe Frequenzen von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unterhalb von 0,2 % detektierbar waren, stiegen sie ab der dritten Woche in der ILR-Fc-Gruppe rapide an. Für IL-15 wurden hingegen nur minimal erhöhte T-Zellfrequenzen gemessen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Versuchen mit murinen T-Zellen stieg die Frequenz der humanen $CD4^+$ T-Zellen ebenfalls mit an. Abbildung 34 zeigt exemplarisch die FACS-Ergebnisse je einer Maus pro Gruppe. Während die Frequenzen der $CD4^+$ T-Zellen in der ILR-Fc-Gruppe im Mittel bei über 30 % lagen, wurden für IL-15 durchschnittlich nur 0,5 % gemessen. Die Frequenzen der $CD8^+$ T-Zellen verhielten sich ähnlich. So wurden in der ILR-Fc-Gruppe Frequenzen von über 40 % detektiert, während sie für IL-15 stets unter 5 % lagen. Die Proben aus den PBS-Kontrollen lagen bei 0,1-0,2 % und nach dem Absetzen der Zytokin-Injektionen verringerten sich die T-Zellfrequenzen der IL-15 und ILR-Fc-Gruppe innerhalb von 28 Tagen, bis sie ebenfalls in diesem Bereich stagnierten.

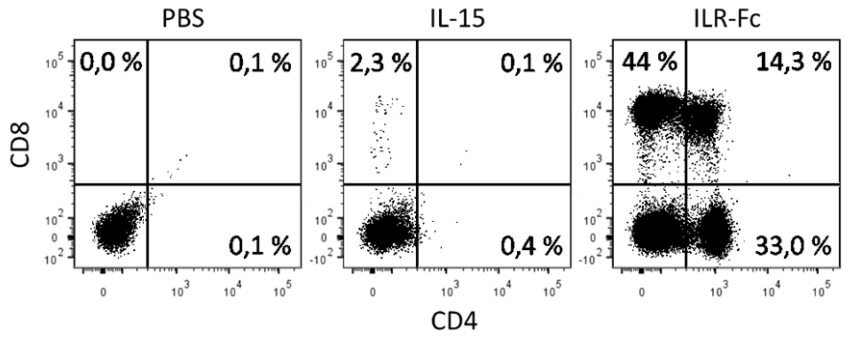


Abbildung 34: Einfluss von ILR-Fc auf die T-Zellfrequenzen humanisierter NSG-Mäuse. NSG-Mäuse (n = 3) erhielten i.v. Injektionen von 1 × 10^5 $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen. Nach 9 Wochen wurden 10 µg/Maus IL-15 jeden zweiten Tag oder 62 µg/Maus ILR-Fc wöchentlich über einen Zeitraum von 28 Tagen i.p. injiziert. Gezeigt sind exemplarisch die T-Zellfrequenzen je einer repräsentativen Maus pro Gruppe an Tag 28 im Blut. Die Prozentwerte beziehen sich auf ein vorgeschaltetes $CD45^+$-Gate.

4.8.2 Wirkung von IL-15-Superagonisten auf humane PBMCs im NSG-Modell

Um die Wirkung der IL-15-Superagonisten ILR-Ø, ILR-Fc und $ILR13^+$-Fc auf humane PBMCs im NSG-Modell zu untersuchen, wurden den Mäusen 1 × 10^7 PBMCs i.v. injiziert. Anschließend wurden jeden zweiten Tag 10 µg/Maus IL-15 bzw. wöchentlich das molare Äquivalent von 33 µg/Maus ILR-Ø, 63 µg/Maus ILR-Fc oder 62 µg/Maus $ILR13^+$-Fc, beginnend am Tag

des PBMC-Transfers durch i.p. Injektionen verabreicht. Nach 10 Tagen wurden die Milzen der Mäuse gewogen und Blut und Knochenmark in der Durchflusszytometrie auf die Frequenzen von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen untersucht.

Wie in Abbildung 35A zu sehen, waren die Milzen der Mäuse mit einem durchschnittlichen Gewicht von 199,4 mg für ILR-Fc und 241,8 mg für $ILR13^+$-Fc auffällig vergrößert. Das Durchschnittsgewicht der PBS-Kontrollgruppe lag bei 79,6 mg. Weniger stark ausgeprägt war die Splenomegalie mit 99,8 mg für ILR-Ø und 127,8 mg für IL-15. Die Ergebnisse wurden im einfaktoriellen ANOVA mit Tukey-Test auf statistische Signifikanz getestet, wobei für ILR-Fc und $ILR13^+$-Fc eine Signifikanz mit $p < 0,001$ festgestellt wurde.

Die Frequenzen der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen im Blut der Mäuse waren in der $ILR13^+$-Fc-Gruppe deutlich erhöht. Für ILR-Fc und IL-15 wurde ein moderater Anstieg detektiert, ILR-Ø hatte keinen Effekt auf die T-Zellfrequenzen (Abbildung 35B). Im Gegensatz zu den Versuchen mit murinen T-Zellen und B6-OT-1 bzw. BALB/c Mäusen und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der humanen T-Zellen aus dem vorigen Abschnitt, waren von der Frequenzsteigerung sowohl $CD8^+$ als auch $CD4^+$ Zellen betroffen. Im Knochenmark wurden für ILR-Fc und $ILR13^+$-Fc signifikant erhöhte CD4- und CD8-Frequenzen gemessen, während für IL-15 und ILR-Ø nur eine mäßige Steigerung zu beobachten war. Die Frequenzen der $CD45RA^+$ und $CD45RO^+$ T-Zellen in der Milz wurden in Abbildung 35C verglichen. Für ILR-Fc und $ILR13^+$-Fc wurden signifikant niedrigere $CD45^+RO$- sowie erhöhte $CD45RA^+$-Frequenzen detektiert, während die Frequenzen von CD62L und CCR7 gleich blieben bzw. ebenfalls leicht erhöht waren (Daten nicht gezeigt). Diese phänotypischen Unterschiede wurden in der IL-15- und ILR-Ø Gruppe nicht beobachtet und deuten auf eine präferentielle Proliferation von T-Zellen mit naivem oder T_{SCM}-Phänotyp hin.

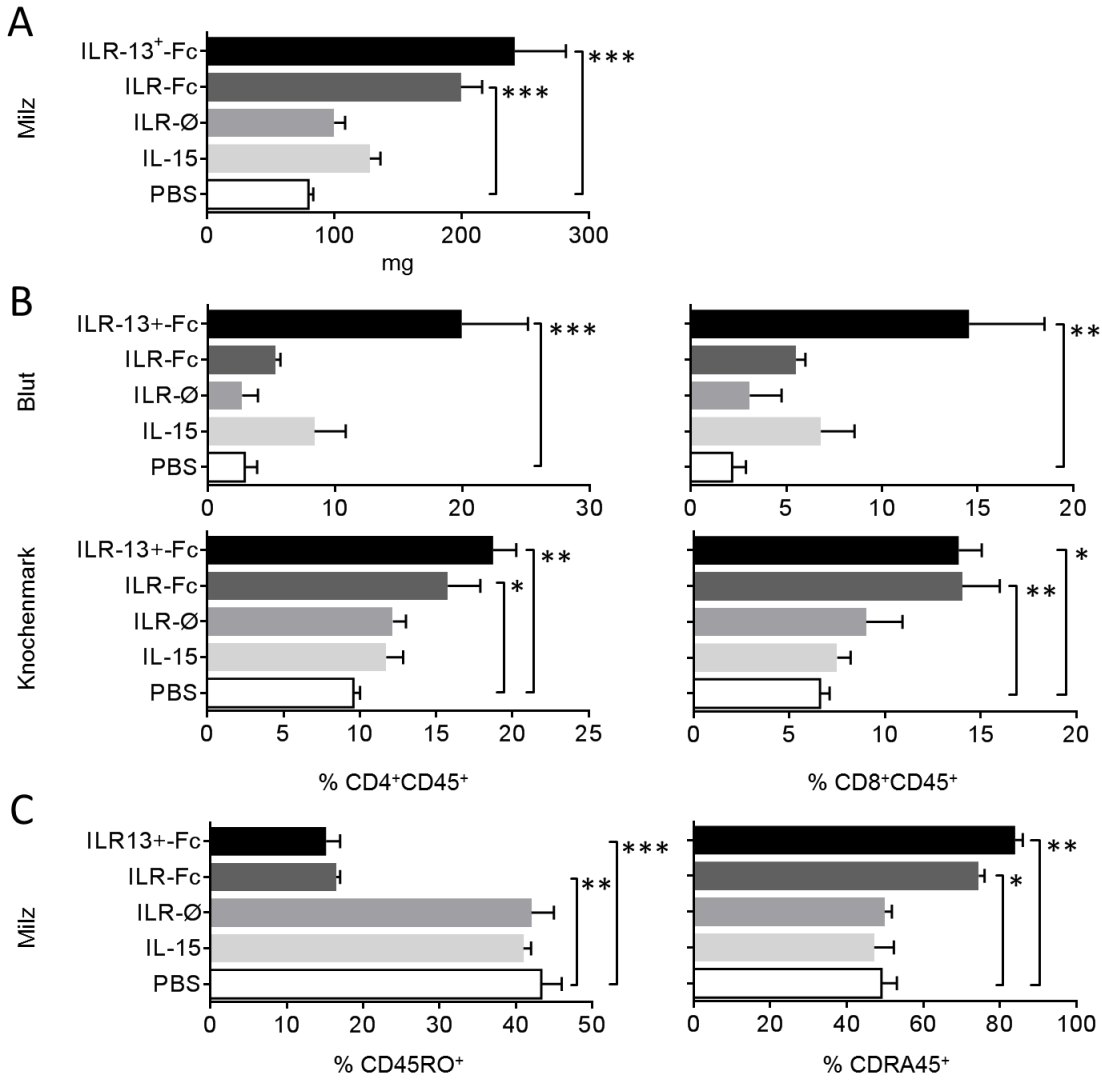


Abbildung 35: T-Zellfrequenzen in NSG-Mäusen nach PBMC-Transfer und Injektionen von IL-15, ILR-Ø, ILR-Fc und ILR13$^+$-Fc. NSG-Mäuse (n = 5) erhielten i.v. Injektionen von 1 × 10^7 PBMCs zusammen mit 10 µg/Maus IL-15, 33 µg/Maus ILR-Ø, 62 µg/Maus ILR-Fc, 63 µg/Maus ILR13$^+$-Fc oder eine PBS-Kontrolle. Die IL-15-Injektionen wurden jeden zweiten Tag, die der restlichen Zytokine wöchentlich wiederholt. Nach 10 Tagen wurde der Versuch beendet. A) Gewicht der Milzen. B) Frequenzen CD45$^+$CD4$^+$ und CD45$^+$CD8$^+$ T-Zellen in Blut und Knochenmark. C) Frequenzen von CD45RA$^+$ und CD45RO$^+$-Zellen in der Milz. Die Signifikanzen wurden in einem einfaktoriellen ANOVA mit Tukey-Test berechnet. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

4.9 Einsatz von ILR13$^+$-Fc in therapeutischen Tumormodellen

4.9.1 AML-Xenograft-Leukämiemodell in NSG-Mäusen

Zum Abschluss der Arbeit wurde der Einfluss von ILR13$^+$-Fc auf die Funktionalität adoptiv transferierter, antigenspezifischer CD8$^+$ T-Zellen in einem therapeutischen AML-Modell mit NSG-Mäusen untersucht. Dabei wurde ein in der Arbeitsgruppe Herr/Hartwig etabliertes Versuchsprotokoll angewendet und für ILR13$^+$-Fc modifiziert. Zunächst wurden die Mäuse mit primären AML-Blasten aus einem therapeutischen Leukapheresat eines AML-Patienten engraftet. Das Protokoll sieht den therapeutischen T-Zelltransfer zu einem Zeitpunkt vor, der einer MRD mit 1-3 % AML-Blasten im Knochenmark entspricht. Die therapeutische Effizienz der transferierten, AML-reaktiven T-Zellen nimmt bei stärkerer AML-Infiltration im Knochenmark schnell ab, da die T-Zellen ein Auswachsen der AML nicht mehr vollständig verhindern können. Bei Engraftmentraten von über 5 % AML im Knochenmark wurden in diesem Modellsystem bisher keine signifikanten Therapieerfolge erzielt. Hier wurde die Wirkung von ILR-Fc auf die Funktionalität transferierter AML-reaktiver T-Zellen bei fortgeschrittenem AML-Engraftment mit über 10 % AML im Knochenmark untersucht.

Für die Generierung der AML-reaktiven CD8$^+$ T-Zellen wurden diese aus einem komplett HLA-kompatiblen Buffy-Coat über CD8-MACS isoliert und gemäß dem etabliertem Protokoll repetitiv mit letal bestrahlten Blasten der AML MZ667 stimuliert [243]. Die so expandierten AML-reaktiven CD8$^+$ T-Zelllinien wurden *in vitro* hinsichtlich ihres Lyseverhaltens gegen MZ667-Blasten und unspezifische Zelllinien auf ihre AML-Reaktivität, sowie durch Untersuchung des TCR-Vβ-Repertoires auf Klonalität getestet, wodurch der AML-reaktive T-Zellklon 5B2 identifiziert werden konnte.

Die NSG-Mäuse wurden einen Tag vor Transfer der Leukämieblasten subletal mit 1,5 Gy bestrahlt und erhielten 18-24 h später i.v. Injektionen von 5×10^5 MZ667-Blasten/Maus. Nach 16 Tagen wurde das AML-Engraftment im Knochenmark von zwei Kontrollmäusen überprüft. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks in der Durchflusszytometrie auf CD33$^+$CD45$^+$ Zellen untersucht. Die AML-Infiltration lag in diesen Kontrollmäusen bei 10,8 bzw. 18,2 % (Abbildung 37A). Der adoptive Transfer von 5×10^6 T-Zellen/Maus des AML-reaktiven T-Zellklons 5B2 oder von Mel-A-spezifischen T-Zellen als Spezifitätskontrolle erfolgte am selben Tag. Eine Gruppe der Mäuse erhielt wöchentliche i.p. Injektionen von 62 µg/Maus ILR-Fc und eine weitere Gruppe erhielt 10 µg/Maus IL-15 jeden zweiten Tag. Einen Überblick über die Gruppen und den Versuchsablauf gibt Abbildung 36.

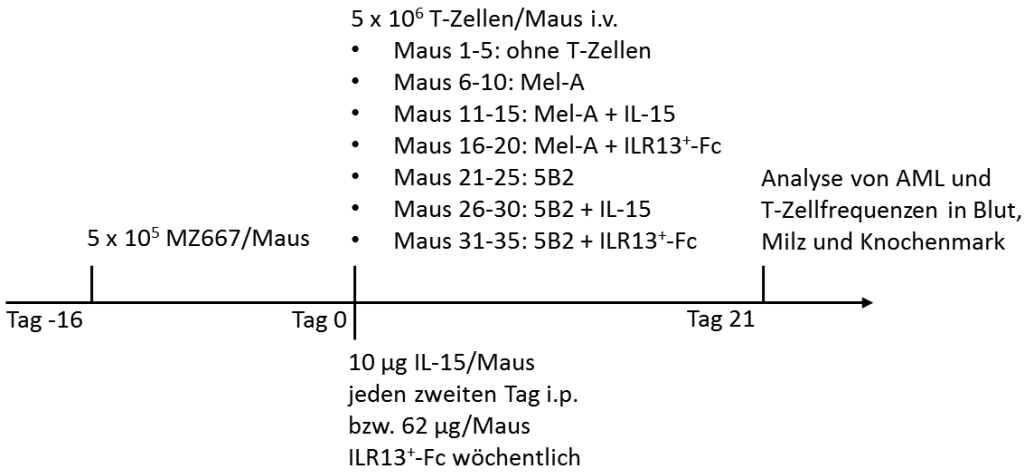


Abbildung 36: Versuchsablauf zum AML-Xenograft-Leukämiemodell. NSG-Mäuse wurden mit 1,5 Gy bestrahlt und erhielten 24 h später i.v. Injektionen von 5 × 10^5 Zellen der AML MZ667. Nach 16 Tagen wurden den Mäusen 5 × 10^6 T-Zellen der AML-reaktiven Linie 5B2 oder eine Mel-A-reaktive Kontrolle i.v. injiziert. Die Zytokininjektionen wurden am selben Tag gestartet und bis zum Versuchsende an Tag 21 regelmäßig wiederholt. Die Analyse der AML- und T-Zellfrequenzen in Blut, Milz und Knochenmark erfolgte durchflusszytometrisch mit CD45-, CD33- und CD8-spezifischen Antikörpern.

21 Tage nach dem adoptivem T-Zelltransfer wurde das Knochenmark der Mäuse präpariert und durchflusszytometrisch auf $CD33^+CD45^+$ AML-Zellen und $CD45^+CD8^+$ T-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 37B zu sehen, lag die Leukämielast im Knochenmark der nichtbehandelten Gruppe an Tag 21 bei 67,6 %. Die Behandlung mit AML-reaktiven T-Zellen des Klons 5B2 konnte das Wachstum der Leukämie nur minimal verlangsamen. Der Mittelwert dieser Gruppe lag bei 63,2 %. Eine stärkere Reduktion wurde für 5B2 und IL-15 beobachtet. Hier lag der Durchschnittswert bei 48,0 %. Der beste therapeutische Erfolg wurde allerdings durch 5B2 in Kombination mit $ILR13^+$-Fc erreicht. Es wurde in dieser Gruppe eine mittlere Leukämielast von 23,8 % gemessen. Auffällig war, dass auch die zur Spezifitätskontrolle eingesetzten Mel-A spezifischen T-Zellen mit $ILR13^+$-Fc ein verlangsamtes Tumorwachstum bewirkten. Der Effekt war dabei mit 49,4 % AML-Blasten im Knochenmark fast so stark ausgeprägt wie für 5B2 und IL-15.

Die Frequenzen der $CD8^+$ T-Zellen im Knochenmark waren einhergehend mit dem therapeutischen Effekt für $ILR13^+$-Fc stark erhöht (Abbildung 37B). In der Gruppe mit 5B2 und $ILR13^+$-Fc wurde die höchste T-Zellfrequenz mit einem Mittelwert von 24,9 % gemessen. Doch auch in der Gruppe mit 5B2 und IL-15 waren die T-Zellfrequenzen mit 4,1 % gegenüber der Kontrolle ohne Zytokine deutlich erhöht. Dort konnten nur vereinzelte T-Zellen detektiert werden und es wurde ein Mittelwert von 0,15 % errechnet. Sowohl IL-15 als auch $ILR13^+$-Fc hatten darüber hinaus einen Einfluss auf die Frequenzen der Mel-A-spezifischen T-Zellen, wobei für Mel-A und IL-15 im Mittel 0,45 % und für Mel-A und $ILR13^+$-Fc im Mittel 1,7 % gemessen wurden. Die Ergebnisse der AML- und T-Zellfrequenzen wurden mittels einfaktoriellem ANOVA mit Tukey-Test statistisch analysiert und die Ergebnisse der Gruppe

mit 5B2 und ILR13$^+$-Fc waren sowohl für die AML- als auch für die T-Zellfrequenzen mit $p < 0{,}0001$ statistisch signifikant. Für die Gruppen mit 5B2 und IL-15 sowie Mel-A und ILR13$^+$-Fc wurde ebenfalls eine statistische Signifikanz mit $p < 0{,}01$ ermittelt. Somit konnte gezeigt werden, dass IL-15 und insbesondere das superagonistische ILR13$^+$-Fc den therapeutischen Effekt des adoptiven T-Zelltransfers im xenogenen AML-Modell mit NSG-Mäusen signifikant verstärken können.

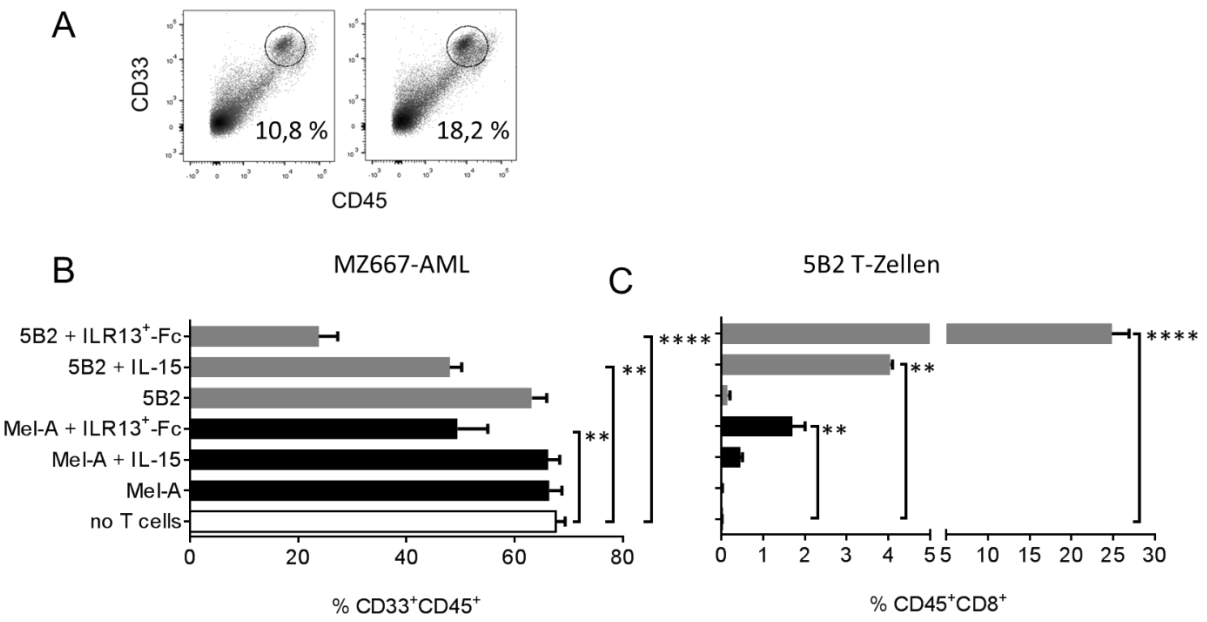


Abbildung 37: ILR-Fc in einem therapeutischen AML Modell in NSG-Mäusen. NSG-Mäuse (n = 5) erhielten i.v. Injektionen von 5×10^5 Zellen/Maus der AML MZ667. Nach 18 Tagen erfolgte die Therapie durch Injektion von 5×10^6 AML- (Klon 5B2) oder Mel-A-reaktiven CD8$^+$ T-Zellen. Die i.p. Applikationen von 10 µg/Maus IL-15 erfolgten jeden zweiten Tag, ILR13$^+$-Fc wurde wöchentlich zu 62 µg pro Maus appliziert. Alle Prozentangaben beziehen sich auf ein vorgeschaltetes FSC/SSC-Lymphozytengate. A) AML-Last im Knochenmark am Tag des therapeutischen T-Zelltransfers. B) AML-Last im Knochenmark 21 Tage nach T-Zelltransfer. C) Frequenz von CD8$^+$ T-Zellen im Knochenmark nach 21 Tagen. Statistische Signifikanzen wurden mit einem einfaktoriellen ANOVA mit Tukey-Test berechnet. ** $p < 0{,}01$; **** $p < 0{,}0001$.

4.9.2 Solides Ovarialkarzinom-Modell in NSG-Mäusen

Analog zum Leukämiemodell wurde in diesem Versuch der Einfluss von ILR13$^+$-Fc in einem präklinischen, soliden Tumormodell nach adoptivem Transfer CAR-transduzierter T-Zellen untersucht. Das Tumormodell wurde in Zusammenarbeit mit der Firma BioNTech zur Validierung eines Claudin-spezifischen (CLDN) CARs entwickelt. CAR-transduzierte T-Zellen und OV-90-Ovarialkarzinomzellen wurden dabei freundlicherweise unter der Leitung von Dr. Petra Simon generiert und zur Verfügung gestellt. Claudine sind an der Ausbildung impermeabler Barrieren (engl.: *tight junctions*) in Zellverbänden beteiligt und werden im Menschen normalerweise nur im Embryonalstadium exprimiert, sind jedoch auch auf den Zellen einiger

Krebsarten präsent [244]. Dazu gehört auch die Zelllinie OV-90, die aus Aszitesflüssigkeit einer 64-jährigen Patientin mit Ovarialkarzinom etabliert wurde.
NSG-Mäuse erhielten s.c. Injektionen von 1 × 10^7 OV-90-Zellen in die rechte Flanke. Daraufhin entwickelten sich innerhalb von 4 Tagen tastbare, solide Tumore im Bereich der Einstichstelle. Metastasierung wurde in diesem Modell nicht beobachtet. Der Transfer von CLDN-CAR- oder Kontroll-CAR transduzierten $CD3^+$ T-Zellen erfolgte 4 Tage nach Injektion der Tumorzellen. Zum Zeitpunkt des T-Zelltransfers wurden 81,2 % CLDN-CAR positive T-Zellen innerhalb der CD4-Fraktion und 83,2 % innerhalb der CD8-Fraktion des T-Zelltransplantates gemessen. Für Kontroll-CAR transduzierte T-Zellen waren es 78,6 % innerhalb der CD4- und 86,0 % innerhalb der CD8-Fraktion. OV-90 exprimiert keine CLDN-Isoform, die durch die Kontroll-CAR transduzierten T-Zellen erkannt wird. Abbildung 38 gibt einen Überblick über den Versuchsverlauf.

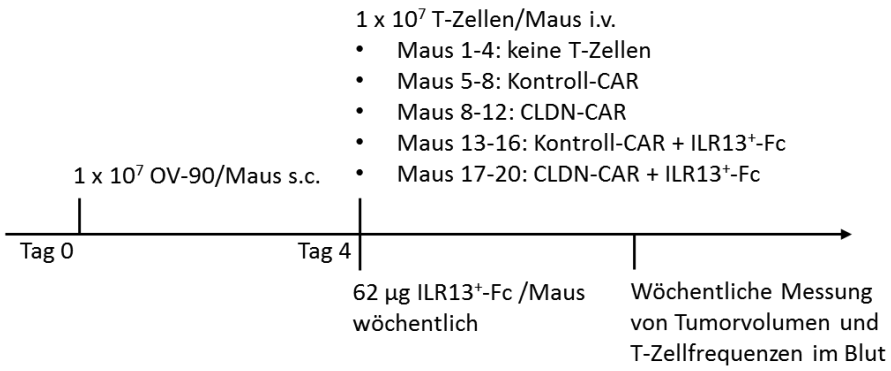


Abbildung 38: Versuchsablauf zum soliden Ovarialkarzinommodell. NSG-Mäuse erhielten s.c. Injektionen von 1 × 10^7 OV-90 Zellen/Maus. Nach 4 Tagen erhielten die Mäuse 1 × 10^7 CLDN-CAR-transduzierte $CD3^+$ T-Zellen i.v. Zur Spezifitätskontrolle wurden auch Gruppen mit Kontroll-CAR-transduzierten T-Zellen injiziert. Am selben Tag wurde 62 µg/Maus $ILR13^+$-Fc i.p. verabreicht. Die Zytokininjektionen wurden wöchentlich wiederholt. Das Tumorwachstum wurde durch ebenfalls wöchentliche Messungen des Tumorvolumens überwacht.

Die T-Zellfrequenzen im peripheren Blut der Mäuse wurden wöchentlich bestimmt. Sie stiegen über den Versuchsverlauf stetig an. Auffällige Unterschiede zwischen den ILR-Fc13^+-Fc-Gruppen und Gruppen ohne Zytokinbehandlung wurden allerdings zu keinem Zeitpunkt festgestellt. Die Ergebnisse des Tumorwachstums sind in Abbildung 39 zusammengefasst. In der Gruppe mit CLDN-CAR-transduzierten T-Zellen war das Wachstum der Tumore gegenüber den Kontrollgruppen signifikant verlangsamt. Auffällig ist, dass sowohl in der Gruppe mit dem spezifischen CLDN-CAR und $ILR13^+$-Fc als auch in der Gruppe mit dem unspezifischem Kontroll-CAR und $ILR13^+$-Fc ein starker Antitumoreffekt zu beobachten war. In beiden Gruppen lag das durchschnittliche Tumorvolumen weit unter dem der CLDN-CAR-Gruppe, die keine Zytokine erhielten. Offensichtlich wurde durch die Supplementierung mit $ILR13^+$-Fc auch in diesem Versuch ein therapeutischer Effekt erzielt, der nicht exklusiv durch die antigenspezifische Erkennung der Zielzellen vermittelt wurde. Dennoch war auch unter Einfluss

von ILR13⁺-Fc weiterhin ein CAR-vermittelter, antigenspezifischer Antitumoreffekt vorhanden. An Tag 31 wurde für die Mäuse 23 und 24 der CLDN-CAR-Gruppe mit ILR13⁺-Fc eine komplette Remission mit vollständiger Abwesenheit sichtbarer Tumore festgestellt. Auch Maus 21 entwickelte zu keinem Zeitpunkt einen sichtbaren Tumor (Abbildung 39B).

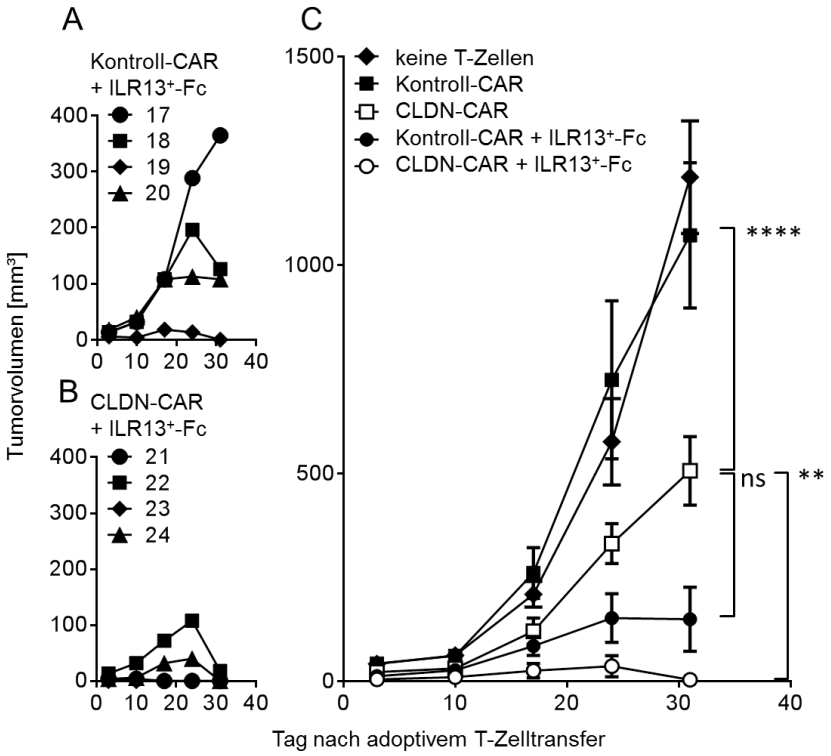


Abbildung 39: Einfluss von ILR13⁺-Fc auf das Wachstum solider OV-90-Tumore nach Transfer CLDN-CAR-transduzierter T-Zellen. NSG-Mäuse (n = 4) erhielten s.c. Injektionen von 1 × 10^7 OV-90-Zellen/Maus der Ovarialkarzinomlinie OV-90. CLDN-CAR- oder Kontroll-CAR-transduzierte T-Zellen wurden nach 4 Tagen i.v. appliziert. ILR13⁺-Fc Injektionen erfolgten wöchentlich zu 62 µg/Maus. A) Entwicklung des Tumorvolumens innerhalb der Kontroll-CAR-Gruppe mit ILR13⁺-Fc. B) Entwicklung des Tumorvolumens innerhalb der CLDN-CAR-Gruppe mit ILR13⁺-Fc. C) Analyse des Tumorwachstums aller Gruppen. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweifaktoriellem ANOVA mit Tukey-Test berechnet. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

In dieser Gruppe hatte nur Maus 22 zum Versuchsende einen messbaren Tumor, zeigte jedoch in den Tagen davor ebenfalls eine starke Reduktion des Tumorvolumens. Das mittlere Tumorvolumen dieser Gruppe betrug zu Versuchsende 4,5 mm³. In der Gruppe mit Kontroll-CAR transduzierten T-Zellen und ILR13⁺-Fc lag es bei 150 mm³. Eine komplette Remission wurde hier für Maus 19 festgestellt (Abbildung 39A). Maus 18 und 20 zeigten dem gegenüber eine Regression bzw. Stagnation des Tumorwachstums ab Tag 24. Die Tumorvolumen lagen jedoch weiterhin deutlich über den für CLDN-CAR und ILR13⁺-Fc gemessenen Werten. Das Tumorwachstum von Maus 17 war zwar gegenüber den Kontrollgruppen verlangsamt, es wurde jedoch keine Tumorregression festgestellt. Die Mäuse aller Gruppen entwickelten ab Tag 28, aufgrund des Transfers der CD3⁺ T-Zellpopulation, starke Symptome ei-

ner xenogenen GvHD, so dass der Versuch an Tag 31 beendet werden musste. Dennoch konnte auch in diesem Versuch eine deutliche Steigerung der therapeutischen Effektivität durch die Supplementierung mit ILR13^{+}-Fc erreicht werden. Auch der antigenunspezifische Antitumoreffekt, der im therapeutischen AML-Modell des vorigen Abschnitts beobachtet wurde, konnte reproduziert werden.

5 Diskussion

Nach neusten Angaben des Statistischen Bundesamts wurden im Jahr 2013 in Deutschland 223842 Sterbefälle mit Krebs als Todesursache registriert. Damit ist Krebs, nach Herz- und Kreislauferkrankungen, die zweithäufigste Todesursache [245]. Krebs ist eine multifaktorielle Krankheit und eine Vielzahl von Mechanismen ist an ihrer Entstehung beteiligt. Die Behandlungsmethoden sind ebenso vielfältig wie die Ursachen und richten sich nach Art und Stadium der Krebserkrankung. Neben den klassischen Therapiemethoden, also dem Entfernen oder Schädigen des Tumorgewebes durch chirurgische Eingriffe, Strahlen oder Chemotherapie, gewinnt die Immuntherapie zunehmend an Bedeutung. Vor allem durch den adoptiven Transfer reprogrammierter T-Zellen konnten in den letzten Jahren beachtliche therapeutische Erfolge erzielt werden [246, 247]. Dabei werden die T-Zellen so manipuliert, dass sie gegen Tumorantigene reagieren und gegebenenfalls weitere therapiefördernde Eigenschaften annehmen. Dazu gehören Veränderungen des Phänotyps sowie die dauerhafte Aktivierung bzw. Deaktivierung von kostimulatorischen und inhibitorischen Signalwegen. Aufgrund seiner proliferationsfördernden und anti-apoptotischen Eigenschaften ist IL-15 besonders interessant, um im Kontext des adoptiven T-Zelltransfers für die zusätzliche Stimulation und Expansion antigenspezifischer T-Zellen genutzt zu werden. In präklinischen Modellen, in denen humane T-Zellen adoptiv in immundefiziente Mäuse transferiert wurden, konnten IL-15 und IL-15-Superagonisten bereits erfolgreich getestet werden. Dabei war IL-15 in der Lage Proliferation, Effektorfunktionen und Persistenz der transferierten T-Zellen zu verbessern. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Herstellung und Funktion von IL-15 und IL-15-Superagonisten mit der aktuellen Fachliteratur verglichen und hinsichtlich zukünftiger Verwendungsmöglichkeiten der Zytokine in klinischen Studien bewertet. Dabei werden vor allem auch die Mechanismen diskutiert, die für die Bioaktivitätssteigerung der IL-15-Superagonisten verantwortlich sind.

5.1 Herstellung von IL-15 und IL15N72D

Der Großteil des kommerziell erhältlichen IL-15 wird heute rekombinant in *E. coli* hergestellt. Dabei wird das Protein während der Aufreinigung denaturiert und rückgefaltet und ihm fehlt die physiologisch vorhandene N-Glykosylierung. Die Bioaktivität wird dadurch augenscheinlich nicht eingeschränkt, Auswirkungen auf die Verteilung und Halbwertszeit des Proteins *in vivo* sind jedoch nicht auszuschließen [248, 249]. Alternative Methoden zur Herstellung von IL-15 in *S. cerevisiae* oder Säugerzellen sind zwar beschrieben, generieren jedoch im Vergleich zur Expression in *E. coli* nur geringe Erträge [250, 251]. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in einer Störung der IL-15-Sekretion, denn physiologisch wird IL-15 über sekretorische Vesikel zusammen mit der Alphakette des IL-15-Rezeptors auf die Zelloberfläche ge-

bracht [80, 84, 85]. In Abwesenheit des IL-15Rα wird nur wenig IL-15 sekretiert. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zur Expression von IL-15 und IL-15N72D in den Säugerzelllinien 293T und CHO unternommen. Dabei wurden nur geringe Erträge erzielt, die für eine Aufreinigung im größeren Maßstab nicht geeignet waren (Daten nicht gezeigt). Um in Säugerzellen generiertes IL-15 auch bei geringer Expression für *in vivo*-Experimente einsetzen zu können, wurde es von Wang et al. stabil in die murine Myelom-Zelllinie NS0 transfiziert und i.p. in immundefiziente NOD/Scid IL-2Rγ^{null}-Mäuse (NOG) injiziert [77]. Zur Vermeidung eines NS0-Tumorwachstums wurden die Zellen vor der Injektion mit 8000 cGy bestrahlt. Nach Angaben der Autoren wurde so eine konstante IL-15-Konzentration von 6-8 pg/ml im Serum der Mäuse erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode mit IL-15 und IL15N72D getestet. Es konnten jedoch trotz Aktivität der generierten Zelllinien im CTLL-2-Proliferationsassay keine überzeugenden *in vivo*-Effekte beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist vermutlich auf ein zu geringes Expressionslevel zurückzuführen. Die Serumkonzentrationen von IL-15 und IL-15N72D konnte in den *in vivo*-Experimenten nicht genau bestimmt werden und lagen unterhalb der Detektionsgrenze von 5pg/ml des verwendeten ELISAs.

Aus diesen Gründen wurde für die Herstellung von IL-15 und IL-15N72D ein System mit rekombinanter Expression in *E. coli* gewählt. Dabei wurde der Stamm BL21 in Kombination mit dem induzierbaren Expressionsvektor pET19b-IL-15 verwendet, der nach Induktion mit IPTG IL-15 in Form von intrazellulären Einschlusskörperchen exprimiert. In einem ähnlichen Protokoll von Ward et al. wurde das gesamte Zellpellet in 6 M Glutathion gelöst und zur Aufreinigung direkt der Affinitätschromatographie zugeführt [250]. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen zunächst die Einschlusskörperchen isoliert, die im Gegensatz zu den meisten anderen Zellbestandteilen weder in 0,5 % NP40/Triton X-100-Lösung noch in 3 M Harnstofflösung löslich waren. Die Aufreinigung war dabei so effektiv, dass schon vor der Affinitätschromatographie eine Reinheit von durchschnittlich 75 % erreicht wurde. Das rückgefaltete Endprodukt hatte gewöhnlich eine Reinheit von über 95 % und besaß mit einer ED_{50} von 0,5-1,0 ng/ml im CTLL-2 Proliferationsassay eine Bioaktivität, die vergleichbar zu kommerziellen Produkten ist. Der entscheidende Schritt, der sich auf die Bioaktivität des Endprodukts auswirkt, war dabei die Rückfaltung des denaturierten Proteins aus 8 M Harnstofflösung. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn das Protein vor der Rückfaltung auf über 2 mg/ml aufkonzentriert wurde. Die Rückfaltung niedriger konzentrierter Lösungen führte hingegen zu stärkeren Verlusten durch Präzipitation und einer geringeren Aktivität des löslichen IL-15. Generell war die Aufreinigung von IL-15 in diesem System mit hohen Arbeitsaufwand und großen Verlusten durch die Rückfaltung verbunden. Darüber hinaus trug die kurze Halbwertszeit des Proteins *in vivo* dazu bei, dass die Zytokininjektionen in den *in vivo*-Versuchen jede zweiten Tag wiederholt werden mussten und somit für längere Versuchsvorhaben un-

erwartet große Mengen an IL-15 benötigt wurden. Aus diesen Gründen wurde mit der Entwicklung der IL-15-Superagonisten begonnen, die eine höhere Bioverfügbarkeit in den *in vivo*-Versuchen aufweisen und ohne größere Verluste durch Rückfaltung aufzureinigen sein sollten.

5.2 Herstellung superagonistischer IL-15-Fusionsproteine

Die Produktion superagonistischer IL-15-Fusionsproteine war im Vergleich zur rekombinanten Herstellung von IL-15 unkompliziert. Die DNA-Sequenz der Fusionsproteine wurde *in silico* entworfen und in den Expressionsvektor pEF4/myc-His-A gebracht. Für die Sequenzen von ILR-Ø und ILR13^{+}-Fc wurden die jeweiligen Änderungen an der DNA-Sequenz über PCR und Klonierungen realisiert. Nach transienter Transfektion der Expressionskonstrukte wurden alle Fusionsproteine von HEK-293T-Zellen exprimiert und in hoher Konzentration ins Zellmedium abgegeben. Durch Kotransfektion mit 1 % SV40-LTA konnte der Ertrag deutlich gesteigert werden (siehe Abschnitt 4.5.2.1). Hintergrund der Ertragssteigerung ist wahrscheinlich eine Amplifikation der intrazellulären Plasmidlevel über den SV40-Replikationsursprung, die unter dem EF1α-Promotor zu einer verstärkten Proteinexpression führt [252, 253]. Die Aufreinigung von ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc erfolgte über native Protein-A-Affinitätschromatografie. ILR-Ø wurde jedoch wegen der fehlenden IgG1-Fc-Domäne mit Anti-Flag-M2-Agarose aufgereinigt. Die finalen Proteine hatten eine Reinheit von über 95 % und waren im Proliferationsassay mit CTLL-2- und M-07e-Zellen aktiv. Einziger Störfaktor dieses Systems war die Anwesenheit von FCS im Kulturmedium, die bei der Protein-A-Affinitätschromatographie zu einer Verunreinigung durch bovine Immunoglobuline führte. Folglich wurde die Produktion auf das serumfreie Expi293-Expressionssystem umgestellt. Durch SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen konnte gezeigt werden, dass ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc in ihrer nativen Form als Homodimere vorliegen (siehe Abschnitt 4.5.3). ILR-Ø und IL-15 lagen als Monomere vor, so dass die Dimerisierung auf die Anwesenheit der IgG1-Fc-Domäne zurückgeführt werden kann. Das Herstellungsverfahren der superagonistischen IL-15-Fusionsproteine hat gegenüber der rekombinanten Herstellung von IL-15 in *E. coli* mehrere Vorteile. Die Proteine können in ihrer nativen Form über einen einzigen Schritt aus Kulturüberständen isoliert werden, wodurch die zeitintensive Aufreinigung der Einschlusskörperchen und die mit hohen Verlusten behaftete Rückfaltung entfallen und der Ertrag der bioaktiven Proteine wesentlich gesteigert wird. Hinzu kommt die erhöhte Bioaktivität der IL-15-Superagonisten, die im weiteren Verlauf der Diskussion ausführlich besprochen wird.

5.3 Biologische Effekte von IL-15 und IL-15N72D

Die therapeutische Effizienz adoptiv transferierter T-Zellen ist von mehreren Faktoren abhängig. Dazu zählen die Affinität des TCRs zur Zielstruktur, die Expressionsstärke und Frequenz des TCRs auf der Zelloberfläche sowie die phänotypische Zusammensetzung der transferierten T-Zellen, die Einfluss auf ihre Proliferation und Persistenz im Wirt hat. Eine höhere T-Zellpersistenz ist mit einer verlängerten Antitumorreaktivität und einer günstigeren Prognose für den weiteren Therapieverlauf verbunden [254]. Für die Reprogrammierung und Expansion von T-Zellen werden diese gewöhnlich in Anwesenheit einer hohen Konzentration von IL-2 kultiviert [255]. Die so generierten T-Zellen bleiben IL-2-abhängig und reagieren mit Apoptose auf die vergleichsweise geringen IL-2-Konzentrationen im Patienten [256]. Eine zusätzliche Administration von IL-2 *in vivo* wurde in einigen murinen und humanen Studien eingesetzt, um die Therapie zu unterstützen, wobei der Einfluss auf die T-Zellpersistenz allerdings nur gering war [181, 257]. Das Zeitfenster, in dem die IL-2-Behandlung stattfindet, scheint für die Wirkung eine entscheidende Rolle zu spielen [258]. Aus weiteren klinischen Studien ist bekannt, dass die Hochdosistherapie mit IL-2 von einer hohen Toxizität begleitet wird [259, 260]. Niedrigere IL-2-Dosierungen stimulieren dagegen präferenziell T_{REG}, welche die Wirkung der Effektorzellen behindern [261, 262]. IL-2 induziert außerdem AICD und verhindert die Ausbildung und das Langzeitüberleben von T_{MEM}-Populationen [263, 264]. IL-15 scheint in vielerlei Hinsicht geeigneter für den Einsatz in der adoptiven T-Zelltherapie. Es besitzt eine anti-apoptotische Wirkung auf T-Zellen, induziert keinen AICD, besitzt eine geringere Toxizität als IL-2, lenkt die T-Zelldifferenzierung in Richtung des T_{CM}-Phänotyps und hemmt das Wachstum von T_{REG} [69, 74, 194].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität von IL-15 und IL-15N72D standardmäßig im CTLL-2 Proliferationsassay überprüft. CTLL-2 exprimieren den murinen, hochaffinen IL-15Rαβγ auf der Zelloberfläche. Beide Zytokine bewirkten eine dosisabhängige Proliferation von CTLL-2, wobei keine gesteigerte Bioaktivität für IL-15N72D festgestellt wurde. Zhu et al. beschreiben eine 4-5-fach erhöhte Bioaktivität von IL-15N72D gegenüber IL-15 exklusiv für Zellen mit humaner IL-15Rβ-Kette und unabhängig von der Anwesenheit der IL-15Rα-Kette [87]. Sie vermuten als Mechanismus hinter der gesteigerten Bioaktivität eine erhöhte Affinität von IL-15N72D zum humanen IL-15Rβ. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde ein Proliferationsassay mit der AML-reaktiven T-Zelllinie 5B2 durchgeführt. Diese oligoklonalen $CD8^+$ T-Zellen exprimieren ebenfalls den humanen, niederaffinen IL-15Rβγ und wurden in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von IL-15 und IL-15N72D mit Blasten der AML MZ667 stimuliert. Hierbei konnte eine etwa 5-fach gesteigerte Bioaktivität von IL-15N72D gegenüber IL-15 beobachtet werden. Die zusätzliche Anwesenheit einer konstanten Konzentration von 5 ng/ml IL-7 im Kulturmedium hatte dabei keinen Einfluss auf die Proliferati-

onsrate. Die Ergebnisse von Zhu et al. konnten somit *in vitro* mit humanen, Leukämie-reaktiven CD8$^+$ T-Zellen bestätigt werden.

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von IL-15 und IL-15N72D auf die Persistenz alloreaktiver humaner CD8$^+$ T-Zellen nach adoptivem Transfer in NSG-Mäuse untersucht. Dazu wurden HLA-A2-reaktive T-Zellen in die Mäuse transferiert und am selben Tag 10 µg/Maus IL-15, IL-15N72D oder eine PBS-Kontrolle i.p. verabreicht. Die Zytokininjektionen wurden nach 3 Tagen wiederholt. An Tag 7 wurden Blut, Milz und Knochenmark der Mäuse hinsichtlich der Frequenzen humaner T-Zellen untersucht. Sowohl für IL-15 als auch für IL-15N72D konnten deutlich gesteigerte Frequenzen in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Dabei konnte, im Gegensatz zu den *in vitro*-Untersuchungen, kein superagonistischer Effekt in Form höherer T-Zellfrequenzen für IL-15N72D beobachtet werden. Die erhöhte Affinität von IL-15N72D zur IL-15Rβ-Kette führte folglich nicht zu einer Steigerung der homöostatischen Proliferation im Vergleich zu IL-15. Möglicherweise wird die superagonistische Wirkung durch die kurzen Halbwertszeiten der Zytokine von etwa 22 min in NSG-Mäusen verhindert. Es ist davon auszugehen, dass die Stimulation der T-Zellen, mit einer ausreichenden IL-15-Konzentration *in vivo* nur über einen kurzen Zeitraum von etwa 1-2 h stattfindet. In der Zellkultur bleibt IL-15 hingegen über einen Zeitraum von mindestens 48 h stabil [265]. Die verbesserte homöostatische Proliferation antigenspezifischer CD8$^+$ T-Zellen durch wiederholte IL-15-Injektionen konnte auch über einen längeren Versuchszeitraum beobachtet werden. So konnten 28 Tage nach adoptivem Transfer AML- oder alloreaktiver CD8$^+$ T-Zellen in NSG-Mäuse mit IL-15 Injektionen, die jeden zweiten Tag stattfanden, 5-12 % humane T-Zellen in der Milz nachgewiesen werden. Die Frequenzen in den PBS-Kontrollen lagen auf Höhe des unspezifischen Hintergrunds. Diese Ergebnisse belegen, dass IL-15 die Proliferation *in vitro* generierter, antigenspezifischer CD8$^+$ T-Zellen auch in Abwesenheit ihres spezifischen Antigens fördert.

Persistenz und therapeutische Wirksamkeit adoptiv transferierter T-Zellen sind unter anderem abhängig vom Phänotyp der verwendeten T-Zellen [266]. Effektorzellen, die aus T_{CM} generiert wurden, besitzen eine höhere Persistenz und bessere Antitumor-Reaktivität als solche, die aus T_{EM} generiert wurden [77, 267]. Studien mit Makaken haben ergeben, dass der Transfer von T_{CM}, nicht aber von T_{EM}, zur Ausbildung einer langlebigen Gedächtnispopulation führt [268]. Die 2011 beschriebenen T_{SCM} sind T-Gedächtniszellen mit wesentlichen Eigenschaften naiver T-Zellen. So konnten nur durch T_{SCM} nach serieller Transplantation ein vollständiger T-Zellpool generiert werden. Verglichen mit T_{EM} und T_{CM} weisen sie eine nochmals erhöhte proliferative Kapazität und Effektivität bei der Tumortherapie auf. In einem Mesotheliom-Modell mit NSG-Mäusen konnte durch den Transfer von T_{SCM} eine starke Reduktion bis hin zur Eradikation des Tumors beobachtet werden. T_{CM} und T_{EM} vermittelten zwar

ebenfalls einen Antitumoreffekt, allerdings war dieser vergleichsweise gering und es wurde keine Eradikation erzielt [46, 51].

T-Zellen mit T_{SCM}-Phänotyp können durch Manipulation des Wnt-Signalwegs (engl.: *wingless int-1*) generiert werden. Der Wnt-Signalweg ist an der Reifung und Differenzierung von T-Zellen beteiligt [269-271]. Durch seine Aktivierung steigt die β-Catenin-Konzentration in der Zelle und die Transkriptionsfaktoren TCF1 (engl.: *T cell factor*) und LEF1 (engl.: *lymphoid enhancer-binding factor*) werden aktiviert [272, 273]. Die Glykogensynthase-Kinase 3 führt bei deaktiviertem Wnt-Signalweg zum Abbau von β-Catenin. Durch den Einsatz des GSK3-Inhibitors TWS119 bei der Kultivierung von T-Zellen kann der Abbau von β-Catenin verhindert werden, was zur Aktivierung der Effektormoleküle des Wnt-Signalwegs führt und die T-Zelldifferenzierung stoppt. Wird TWS119 bei der *in vitro*-Stimulation naiver T-Zellen dem Kulturmedium zugesetzt, lassen sich antigenspezifische T-Zellen mit T_{SCM}-Phänotyp generieren [46, 274].

IL-15 begünstigt im Gegensatz zu IL-2 präferentiell das Wachstum von T_{CM} [275]. Eine Kombination von IL-7 und IL-15 wurde bereits ohne Zugabe von GSK3-Inhibitoren erfolgreich für die *in vitro*-Generierung von T_{SCM} eingesetzt [276]. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden die EBV-reaktiven $CD8^+$ T-Zellen mit T_{SCM}-Phänotyp allerdings durch Stimulation und Kultivierung von naiven T-Zellen in Anwesenheit von TWS119 generiert. Die homöostatische Proliferation dieser Zellen wurde untersucht, indem sie in NSG-Mäuse transferiert und über einen Zeitraum von 28 Tagen mit IL-15 supplementiert wurden (siehe Abschnitt 4.3.2). Ohne IL-15 konnte entgegen den Erwartungen keine verstärkte Proliferation der T_{SCM} im Vergleich zu TWS119-unbehandelten Zellen beobachtet werden. In beiden Gruppen waren organübergreifend nur geringe T-Zellfrequenzen detektierbar. Durch Zugabe von IL-15 wurden die Frequenzen in beiden Gruppen um ein Vielfaches angehoben. Dabei waren die Frequenzen der T_{SCM}-Gruppe deutlich höher als die der TWS119-unbehandelten Zellen. IL-15 ist somit besonders förderlich für die *in vivo*-Proliferation und Expansion antigenspezifischer $CD8^+$ T_{SCM}. Die Kombination aus IL-15 und T_{SCM} könnte in Zukunft eingesetzt werden, um die Effektivität des adoptiven T-Zelltransfers bei der Bekämpfung von Krebs und viralen Injektionen zu steigern. Der Transfer einer geringen Anzahl minimal differenzierter T_{SCM} und IL-15 könnte sich dabei als effektiver erweisen als der derzeit angewandte Transfer einer großen Menge ausdifferenzierter Effektorzellen und ggf. IL-2.

5.3.1 Optimierung von T-Zell-Effektorfunktionen durch IL-15

IL-15 begünstigt nicht nur die Proliferation und Persistenz von $CD8^+$ T-Zellen, sondern aktiviert auch ihre Effektorfunktionen. Dabei wird unter anderem die Produktion von IFN-γ, TNF-β, Granzym B und Perforin induziert und die lytische Aktivität der T-Zellen erhöht [197, 277]. IL-15 ist außerdem in der Lage, antigentolerante T-Zellen zu reaktivieren, die entste-

hen, wenn Infektionen oder Tumorzellen über einen längeren Zeitraum persistieren [75, 278]. Die kontinuierliche Präsenz des Antigens führt zu einem Gewöhnungseffekt, aufgrund dessen die reaktiven T-Zellen zunehmend anerg werden. Dabei werden Mechanismen aktiv, die im Normalfall bei der Inaktivierung autoreaktiver T-Zellen in Kraft treten [279].

Um die Auswirkungen von IL-15 auf die Aktivität von $CD8^+$ T-Zellen *in vivo* zu überprüfen, wurde ein Modell mit alloreaktiven T-Zellen und NSG-HLA-A2/HHD-Mäusen verwendet. In vorigen Versuchen wurde festgestellt, dass reine HLA-A2-reaktive $CD8^+$ T-Zellen in diesem Modell keine Aktivität zeigen und nach kurzer Zeit absterben. Ein Engraftment sowie die damit verbundene Entwicklung einer allogenen GvHD konnten nur beobachtet werden, wenn mindestens 10 % $CD4^+$ T-Zellen im Transplantat enthalten waren oder PBMCs transferiert wurden (Daten nicht gezeigt). Für den Versuch wurden $CD8^+$ T-Zellen aus einem HLA-A2-negativen Spender mit autologen, HLA-A2-RNA-transfizierten DCs stimuliert. Die so generierten T-Zellen wurden in NSG-HLA-A2/HHD-Mäuse transferiert, die eine ubiquitäre Expression von HLA-A2/HHD aufweisen (siehe Abschnitt 4.4). Die Mäuse erhielten jeden zweiten Tag 10 µg/Maus IL-15 oder eine PBS-Kontrolle und das Engraftment der T-Zellen wurde anhand der T-Zellfrequenzen im peripheren Blut verfolgt. Während die T-Zellen in der PBS-Gruppe nach 14 Tagen nicht mehr nachweisbar waren, konnten in der IL-15-Gruppe zu diesem Zeitpunkt noch hohe CD8-Frequenzen detektiert werden. Nach einem vorrübergehenden Absinken der Frequenzen stiegen sie ab Tag 28 wieder kontinuierlich an. Alle Mäuse der IL-15-Gruppe entwickelten starke GvHD Symptome bis spätestens Tag 56 nach T-Zelltransfer. Die Entwicklung der Symptome war zeitlich mit dem Auftreten einer Population von $CD4^+CD8^+$ doppelpositiven T-Zellen assoziiert. Diese doppelpositiven T-Zellen werden, abgesehen von Entwicklungsstadien im Thymus, häufig bei Krankheiten mit chronischem Verlauf ausgebildet [280-282]. Da für den adoptiven Transfer eine reine $CD8^+$ T-Zellpopulation verwendet wurde, ist davon auszugehen, dass CD4 als Reaktion auf die konstante Stimulation durch TCR und IL-15 *de novo* exprimiert wurde. Eine Expansion aus $CD4^+$ oder $CD4^+CD8^+$ doppelpositiven T-Zellen, die in niedrigen Frequenzen im Transplantat enthalten gewesen sein könnten, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Reaktivität der T-Zellen wurde am Tag des Transfers im IFN-γ-ELISpot überprüft. Sie reagierten ausschließlich auf HLA-A2-positive Zellen während T-Zellen, die am Versuchsende über CD8-MACS aus Milz und Knochenmark von Mäusen der IL-15-Gruppe isoliert wurden, zwar weiterhin Reaktivität gegen HLA-A2 besaßen, aber zum Teil auch auf HLA-A2-negative NSG-DCs reagierten, was auf das Auswachsen einer xenoreaktiven T-Zellpopulation mit *off-target*-Reaktivität gegen das Wirtsgewebe hindeutet. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IL-15 sowohl die Proliferation als auch die Aktivität der HLA-A2-reaktiven T-Zellen fördert. Dadurch ist IL-15 ein geeigneter Kandidat für den Einsatz in Therapien, in denen eine initiale T-Zellantwort zwar vorhanden, aber zu schwach ausgeprägt ist, um die

malignen Zellen vollständig zu beseitigen. Gleichzeitig zeigt der Versuch auch, dass IL-15 offensichtlich nicht nur auf T-Zellen mit der gewünschten Reaktivität aktivierend wirkt, sondern auch die Gefahr einer Reaktivierung allo-, bzw. autoreaktiver T-Zellpopulationen im klinischen Setting besteht.

5.4 Mechanismen zur Erhöhung der Bioaktivität von IL-15-Superagonisten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Proliferation, Persistenz und Effektorfunktionen von $CD8^+$ T-Zellen durch IL-15 bzw. IL-15N72D verstärkt werden. Dafür mussten in den *in vivo*-Versuchen jedoch regelmäßig große Mengen des rekombinanten Proteins injiziert werden. Eine Steigerung der Aktivität und Bioverfügbarkeit von IL-15 erschien zunächst aus experimenteller Sicht erstrebenswert, um den Arbeitsaufwand und die Belastung der Versuchstiere während der Versuchsdurchführung gering zu halten. Darüber hinaus ist die Generierung eines superagonistischen IL-15-Fusionsproteins mit hoher Bioaktivität und prolongierter Bioverfügbarkeit von Bedeutung für einen potenziellen Einsatz in der Klinik, da die aktivitätsfördernde Wirkung auf $CD8^+$ T-Zellen durch die Verwendung von IL-15-Superagonisten potenziert werden könnte. Aufgrund der vielversprechenden Eigenschaften von IL-15 für den Einsatz im Rahmen der Immuntherapie, wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen Methoden zur Steigerung der IL-15-Bioaktivität entwickelt (siehe Abschnitt 2.2.3). Dabei wurden im Wesentlichen zwei Ziele verfolgt: Zum einen wurde die Steigerung der Affinität von IL-15 zum IL-15Rβγ angestrebt, zum anderen die Erhöhung der Bioverfügbarkeit durch eine längere Halbwertszeit von IL-15 *in vivo*. Zur Umsetzung dieser Ziele wurden jedoch unterschiedliche Strategien verfolgt. Auf diese Strategien und die zugrunde liegenden Mechanismen wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen. Außerdem werden die in der vorliegenden Arbeit hergestellten IL-15-Superagonisten ILR-Ø, ILR-Fc und $ILR13^+$-Fc hinsichtlich ihrer Wirkmechanismen analysiert und mit anderen IL-15-Superagonisten aus der aktuellen Literatur in Vergleich gestellt.

5.4.1 Steigerung der Affinität zum IL-15Rβγ

Aufgrund der bereits sehr hohen Affinität von IL-15 zur IL15Rα-Kette sowie der physiologisch dominanten Transpräsentation erscheint eine Erhöhung der Affinität zwischen IL-15 und der IL-15Rα-Kette zur Generation eines IL-15-Superagonisten nicht zielführend. Die Interaktion der beiden Proteine wurde wegen ihrer außergewöhnlich hohen Affinität beispielsweise schon als Gerüst für die stabile Verbindung zweier scTCRs genutzt. Eine spontane Dissoziation ist also nicht zu erwarten [283]. Aus diesem Grund wurde der Fokus der Arbeit von Zhu et al. auf die Steigerung der Affinität von IL-15 zur IL-15Rβ-Kette gelegt. Dies wurde durch Einführung der N72D-Punktmutation erreicht und hatte *in vitro* eine 4-5-fach gesteigerte Bio-

aktivität zur Folge [87]. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass sich diese gesteigerte Bioaktivität von IL15N72D gegenüber IL-15 *in vivo* nicht beobachten lässt. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der kurzen Halbwertszeit von IL-15 und IL-15N72D im *in vivo*-Setting, die bewirkt, dass beide Zytokine abgebaut werden, bevor die Effekte der gesteigerten Affinität zum Tragen kommen.

Auch die Bindung oder Kopplung von IL-15 an die IL-15Rα-Kette bewirkt eine Steigerung der Affinität von IL-15 zum niederaffinen IL-15Rβγ. Die Bindung erfolgt physiologisch zumeist im Kontext der Transpräsentation, es sind jedoch sowohl im Menschen als auch in der Maus lösliche Formen des IL-15Rα (sIL-15Rα) bekannt [85]. Funktionell wurde sIL-15Rα zunächst als IL-15-Antagonist eingeordnet, da es die Interaktion zwischen IL-15 und dem hochaffinen IL-15Rαβγ sterisch inhibiert [239, 284]. Eine nachfolgende Arbeit zeigte dann, dass sIL-15Rα in Kombination mit IL-15 eine gesteigerte Bioaktivität auf Zellen mit dem niederaffinem IL-15Rβγ, der auch von NK- und T-Zellen exprimiert wird, besitzt [88]. Die Sushi-Domäne, die vom zweiten Exon des IL-15Rα-Gens kodiert wird, ist für etwa 90 % der Affinität bei der Bindung von IL-15 verantwortlich [239]. Die restliche Bindungsaffinität stammt aus dem Bereich der ersten 13 Aminosäuren des dritten Exons, das C-terminal auf die Sushi-Domäne folgt. Die Sushi-Domäne kann, isoliert vom Rest des IL-15Rα, als lösliches Protein hergestellt werden. Sie bindet mit hoher Affinität an IL-15 und führt zu einer gesteigerten Signaltransduktion durch den niederaffinen IL-15Rβγ. Dabei wird die Interaktion mit dem hochaffinen IL-15Rαβγ, im Gegensatz zur vollständigen IL-15Rα-Kette, nicht behindert. Auch die um 13 AA verlängerte Sushi-Domäne kann als lösliches Protein hergestellt werden und bewirkt eine nochmals gesteigerte Signaltransduktion durch den niederaffinen IL-15Rβγ, ausgelöst durch eine verringerte Dissoziationsrate des Komplexes *in vitro*. Allerdings verhindern die zusätzlichen 13 AA die Bindung an den hochaffinen IL-15Rαβγ [239]. Mortier et al. demonstrierten die Fusion der IL-15Rα-Sushi-Domäne mit IL-15 durch einen flexiblen GC-Linker. Je nach Reihenfolge der Domänen wurden die Fusionsproteine als ILR oder RLI bezeichnet (IL-15, Linker, Rα-Sushi bzw. Rα-Sushi, Linker, IL-15) [88]. Interessant daran ist, dass die Fusionsproteine zwar die um 13 AA verlängerte Sushi-Domäne besitzen, aber trotzdem an den hochaffinen IL-15αβγ binden können. Der Grund dafür könnte nach Angaben der Autoren in der Beschaffenheit des GC-Linkers liegen. Er wurde aufgrund eines älteren Strukturmodells etwas zu kurz kalkuliert und verursacht dadurch wahrscheinlich eine Strukturveränderung, die dem Fusionsprotein die Interaktion mit dem hochaffinen IL-15Rαβγ sterisch ermöglicht. Abbildung 40 dient der Veranschaulichung eben besprochenen Interaktionen zwischen Sushi-Domäne und dem IL-15-Rezeptor.

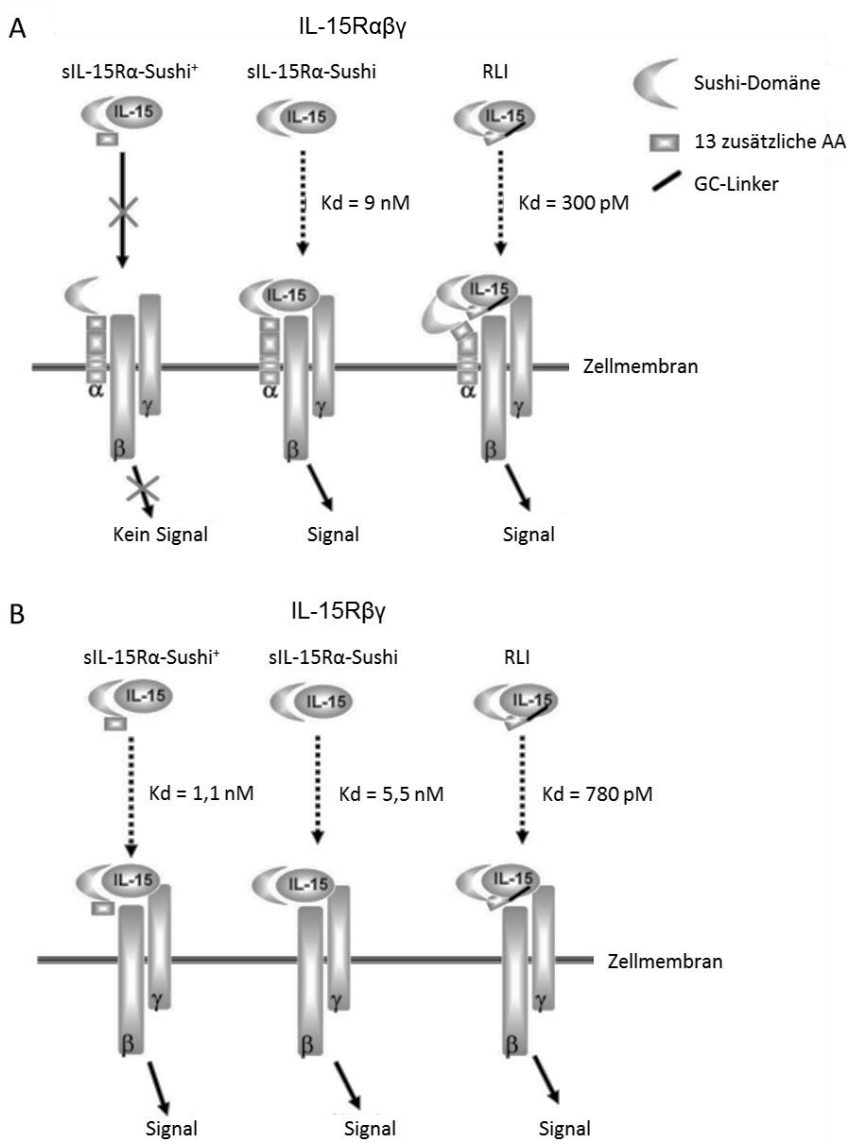


Abbildung 40: Modell zur Wirkung von der IL15Rα-Sushi-Domäne auf den IL-15-Rezeptor. A) Wirkung auf IL-15Rαβγ. B) Wirkung auf IL-15Rβγ. sIL-15Rα-Sushi^{+} = Sushi Domäne mit zusätzlichen 13 AA aus Exon 3; Kd = Gleichgewichtskonstante. Abbildung modifiziert nach Bouchaud 2008 [239]

Bei der Konstruktion der superagonistischen Fusionsproteine der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls der von Mortier et al. beschriebene, flexible GC-Linker zur Verbindung von IL-15 und IL-15Rα verwendet. Während in ILR-Ø und ILR-Fc die IL-15Rα-Sushi-Domäne ohne die zusätzlichen 13 Aminosäuren fusioniert wurde, sind diese in ILR13^{+}-Fc vorhanden. Im Proliferationsassay mit M-07e-Zellen, die den niederaffinen, humanen IL-15Rβγ exprimieren, konnte eine gesteigerte Bioaktivität von ILR13^{+}-Fc gegenüber ILR-Ø und ILR-Fc beobachtet werden. ILR-Ø und ILR-Fc hatten wiederum eine deutlich höhere Aktivität als IL-15 (siehe Abschnitt 4.5.4). Zusätzlich wurde entgegen den Erfahrungen aus dem humanen Setting auf CTLL-2-Zellen, die den hochaffinen, murinen IL-15Rαβγ exprimieren, eine abgeschwächte Bioaktivität von ILR13^{+}-Fc gegenüber ILR-Ø und ILR-Fc beobachtet. ILR-Ø und ILR-Fc wa-

ren auf CTLL-2 wiederum weniger aktiv als IL-15. Es scheint also einen strukturellen Unterschied zwischen dem humanen und dem murinen, hochaffinen IL-15Rαβγ zu geben, der die Bindung der Fusionsproteine aufgrund der Sushi-Domäne, insbesondere für die um 13 AA verlängerte Form, erschwert. Anders als beim Komplex aus IL-15 und sIL-15Rα kommt es dabei aber nicht zu einer vollständigen Blockierung des Signals [239].
Zwischen ILR-Ø und ILR-Fc wurde hinsichtlich der Bioaktivität in den Proliferationstests kein signifikanter Unterschied festgestellt. Die IgG1-Fc-Domäne hatte somit offensichtlich keinen Einfluss auf die Bioaktivität der Fusionsproteine *in vitro*. Sie erhöht allerdings, wie im nächsten Abschnitt besprochen wird, die Halbwertszeit der Fusionsproteine *in vivo* und beeinflusst dadurch entscheidend ihre Bioverfügbarkeit. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Länge der IL-15Rα-Sushi-Domäne die Affinität der IL-15-Superagonisten zum niederaffinen IL-15Rβγ und dadurch ihre Aktivität *in vitro* beeinflusst.

5.4.2 Steigerung der IL-15-Halbwertszeit *in vivo*

Die *in vivo*-Halbwertszeit von IL-15 wurde in mehreren unabhängigen Publikationen mit Werten von 14-60 min angegeben [238, 265, 285, 286]. In der vorliegenden Arbeit ergaben die ELISA-Messungen im Serum von C57BL/6-Mäusen eine Halbwertszeit von 22 min. Eine Erhöhung der Halbwertszeit hat für die meisten Zytokine eine Zunahme der Bioverfügbarkeit und somit auch der Bioaktivität zur Folge. Es sind verschiedene Methoden bekannt, um die Halbwertszeit von Proteinen zu verlängern. Eine Möglichkeit ist die Komplexierung mit einem nicht-blockierenden Antikörper, die zur Stabilisierung des Proteins führen kann. Dies wurde beispielsweise für IL-2 und IL-4 demonstriert [287-290]. Eine weitere, häufig eingesetzte Methode ist die Kopplung des Proteins an eine IgG1-Fc-Domäne, die dem enzymatischen Abbau der Fusionsproteine entgegenwirkt [291, 292]. Die dritte Methode ist die Kopplung oder Komplexierung des Proteins mit einer löslichen Rezeptordomäne und wurde unter anderem für IL-2, IFN-β und IL-15 eingesetzt [293, 294]. IL-15 wurde dabei, wie bereits beschrieben, mit der IL-15Rα-Kette oder der IL-15Rα-Sushi-Domäne verbunden. Das von Mortier et al. entwickelte Fusionsprotein RLI, bei dem IL-15 durch einen flexiblen GC-Linker mit der IL-15Rα-Sushi-Domäne fusioniert wurde, hat eine Halbwertzeit von etwa 3 h [295]. Das ähnlich aufgebaute ILR-Ø hat eine wesentlich höhere Halbwertszeit von 12,3 h (siehe Abschnitt 4.5.5). Unterschiede zwischen beiden Proteinen liegen in der Anordnung der Domänen, der Länge der IL-15Rα-Sushi-Domäne und der Position des Flag-Tags. Allerdings konnte der Grund für die abweichenden Halbwertszeiten beider Proteine nicht aufgeklärt werden. Die Komplexierung von IL-15 mit einem sIL-15Rα-IgG1- bzw. einem IL-15Rα-Sushi-IgG1-Fc-Fusionsprotein führte in zwei unabhängigen Arbeiten zu Halbwertszeiten zwischen 18 und 25 h [238, 285]. Für ILR-Fc und ILR13^{+}-Fc, die eine kovalente Verbindung aller drei Domänen (L-15, IL-15Rα-Sushi und IgG1-Fc) besitzen, wurden vergleichbare Halbwertszeiten von

15,7 und 21,5 h berechnet. Das Vorhandensein der IgG1-Fc-Domäne erhöht die Halbwertszeit somit auch bei bereits bestehender Komplexierung oder Kopplung von IL-15 mit der sIL-15Rα-Kette oder der IL-15Rα-Sushi-Domäne.

5.5 Effekte von IL-15-Superagonisten auf murine und humane Leukozyten *in vivo*

Im vorigen Abschnitt wurden die Wirkmechanismen der superagonistischen IL-15-Fusionsproteine *in vitro* analysiert. Um ihre Funktion auf die Leukozytenfrequenzen *in vivo* zu überprüfen, wurden Versuche mit immunkompetenten B6-OT-1- und BALB/c-Mäusen durchgeführt (siehe Abschnitt 4.6). Dabei fiel zunächst auf, dass eine einfache Dosis von 62 µg/Maus innerhalb von 4 Tagen zu einer massiven Steigerung der Frequenzen von $CD8^+$ T-Zellen in Blut und Milz führte. Dieser Effekt wurde begleitet von einer Absenkung der Frequenzen von $CD19^+$ B-Zellen und $CD4^+$ T-Zellen in Blut und Milz sowie einer starken Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) auf das 3-4-fache ihres normalen Volumens. Nach Injektion einer molar äquivalenten Dosis von IL-15 konnten weder Splenomegalie noch eine Verschiebung der Leukozytenfrequenzen beobachtet werden. Um sicherzustellen, dass die Splenomegalie sowie die veränderten T- und B-Zellfrequenzen nicht exklusiv für die Ovalbumin-spezifischen T-Zellen im transgenen B6-OT-1 Modell auftreten, wurde der Versuch mit BALB/c-Mäusen wiederholt. Dabei wurden gleichwertige Ergebnisse erzielt, die zeigen, dass der hohe Anteil Ovalbumin-spezifischer T-Zellen nicht ausschlaggebend für die ILR-Fc-induzierten Effekte war. Für den IL-15-Superagonisten Alt803 wurden ähnliche Ergebnisse aus Versuchen mit C57BL/6-Mäusen publiziert [238]. Die Autoren vermuteten, dass die IgG1-Fc-Domäne durch die erhöhte Halbwertszeit oder die Möglichkeit zur Transpräsentation von Alt803 durch Fc-Rezeptoren zur superagonistischen Funktion beiträgt. Dass die IgG1-Fc Domäne für die beobachteten Effekte notwendig ist, zeigt auch die Dosiskinetik der IL-15-Fusionsproteine im B6-OT-1-Modell (siehe Abschnitt 4.7). Sowohl für ILR-Fc als auch für $ILR13^+$-Fc wurde eine dosisabhängige Splenomegalie und Verschiebung der Leukozytenfrequenzen beobachtet. ILR-Ø, das zwar die IL-15Rα-Sushi-Domäne, aber keine IgG1-Fc-Domäne besitzt, verursachte dabei keine Splenomegalie und bestenfalls eine vergleichsweise geringe Verschiebung der Leukozytenfrequenzen. Die Halbwertszeit von ILR-Ø ist nur etwa 20 % niedriger als die von ILR-Fc. Falls die Effekte alleine durch die Halbwertszeit ausgelöst würden, hätten sie auch für höhere Konzentrationen von ILR-Ø auftreten müssen. Das legt nahe, dass die IgG1-Fc-Domäne über einen bisher unbekannten Mechanismus zur Funktion der IL-15-Superagonisten beiträgt. Für mit sIL-15Rα komplexiertes IL-15 wurde eine Abhängigkeit der Aktivität von Fc-Rezeptoren *in vivo* beschrieben [296]. Die Transpräsentation von ILR-Fc und $ILR13^+$-Fc im Kontext von Fc-Rezeptoren ist daher sehr wahrscheinlich. Für die Auflösung des genauen Mechanismus könnten in Zukunft die Blockierung der Fc-Rezeptoren mit spezi-

fischen Antikörpern sowie die Verhinderung der Dimerisierung durch gerichtete Mutationen der an den Disulfidbrücken beteiligten Cysteine untersucht werden [297-299].

Die Wirkung der superagonistischen IL-15-Fusionsproteine auf humane Leukozyten wurde weiterführend im NSG-Modell untersucht (siehe Abschnitt 4.8.1). Dafür wurden Mäuse mit $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen rekonstituiert und zeigten nach 9 Wochen geringe Frequenzen von humanen $CD45^+$ Zellen im peripheren Blut. $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen waren nur vereinzelt detektierbar [201, 206, 300]. Ab diesem Zeitpunkt erhielt eine Gruppe der Mäuse wöchentliche Injektionen von 63 µg/Maus ILR-Fc und die Leukozytenfrequenzen im peripheren Blut wurden regelmäßig überprüft. Nach 3-4 Wochen stiegen die CD8-Frequenzen sprunghaft von 0,1-0,2 % auf über 30 % an. Anders als in den murinen Versuchen war die Frequenz $CD4^+$ T-Zellen dabei ebenfalls stark erhöht. Der Grund für das unterschiedliche Verhalten der $CD4^+$ T-Zellen konnte abschließend nicht geklärt werden.

Die Wirkung aller IL-15-Superagonisten wurde in einem weiteren NSG-Versuch überprüft. Die Mäuse wurden nach Injektion humaner PBMCs mit 10 µg/Maus IL-15 oder einer molar äquivalenter Dosis ILR-Ø, ILR-Fc oder $ILR13^+$-Fc behandelt (siehe Abschnitt 4.8.2). Die Injektionen von IL-15 erfolgten jeden zweiten Tag, die der IL-15-Superagonisten wöchentlich, über einen Zeitraum von 10 Tagen. Wie schon bei den $CD34^+$ rekonstituierten Mäusen bewirkten ILR-Fc und $ILR13^+$-Fc eine Splenomegalie und einen Anstieg der Frequenzen von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Die Werte für $ILR13^+$-Fc waren dabei, zumindest im peripheren Blut, deutlich höher als für ILR-Fc. Der Grund dafür könnte die bereits besprochene höhere Affinität von $ILR13^+$-Fc zum niederaffinen IL-15Rβγ sein. Interessanterweise zeigten in diesem Modell auch die IL-15-Injektionen einen relativ starken Einfluss auf die Milzgröße und Leukozytenfrequenzen, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Injektionen in dieser Gruppe dreimal wöchentlich stattfanden, wohingegen die IL-15-Superagonisten nur einmal wöchentlich injiziert wurden. Die Wirkung von ILR-Ø war gegenüber den anderen IL-15-Superagonisten schwach und bestätigt die Annahme, dass die IgG1-Fc-Domäne für die *in vivo*-Effektivität der IL-15-Superagonisten von Bedeutung ist. ILR-Fc und $ILR13^+$-Fc bewirkten beide eine moderate Verschiebung der Frequenzen von CD45RA und CD45RO zugunsten von CD45RA. Gleichzeitig konnte in diesen Gruppen eine leichte Erhöhung von CD62L und CCR7 detektiert werden, was auf die bevorzugte Expansion wenig differenzierter T-Zellen mit einem T_{SCM}-ähnlichen Phänotyp und nicht auf die Differenzierung zu terminalen Effektorzellen hindeutet [46]. Der Phänotyp der T-Zellen aus der IL-15- und ILR-Ø-Gruppe war nicht auffällig verändert.

Zusammenfassend zeigten ILR-Fc und insbesondere $ILR13^+$-Fc eine starke Aktivierung der T-Zellproliferation, wie sie auch durch mehrfache Injektionen von IL-15 bestenfalls annähernd erreicht werden konnte. Hierbei spielt die IgG1-Fc-Domäne eine wichtige Rolle. Wahrscheinlich wird die erhöhte Bioaktivität von ILR-Fc und $ILR13^+$-Fc *in vivo* neben der höheren

Halbwertszeit auch durch Transpräsentation der Proteine im Kontext von Fc-Rezeptoren vermittelt. ILR13^{+}-Fc scheint generell etwas stärkere Effekte hervorzurufen, auch wenn die Ergebnisse meist gleichzusetzen waren. Dies lässt sich wahrscheinlich auf die erhöhte Affinität zum niederaffinen IL-15Rβγ zurückführen, welche von der um 13 AA verlängerten IL-15Rα-Sushi-Domäne vermittelt wird. Für die im folgenden Abschnitt beschriebenen therapeutischen Modelle wurde aus diesem Grund ILR-13^{+}-Fc verwendet.

5.6 IL-15-Superagonisten in präklinischen Tumormodellen

Es sind bereits einige Arbeiten publiziert, in denen IL-15-Superagonisten gegen Tumorzelllinien in präklinischen Therapiemodellen eingesetzt wurden. In einem B16-Melanommodell wurde ein mit sIL-15Rα komplexiertes IL-15 getestet [296]. Dazu wurden B16-Melanomzellen i.v. in C57BL/6 Mäuse injiziert, was ein Tumorwachstum in der Lunge zur Folge hatte. Die daraufhin durchgeführten Zytokininjektionen erfolgten mehrfach wöchentlich. Für die Gruppe mit den sIL-15Rα-Komplexen wurde gegenüber einer IL-15- und einer PBS-Kontrollgruppe ein signifikant verlängertes Überleben festgestellt. Ebenfalls im B16-Melanommodell konnte eine Reduktion der Metastasenbildung in Lunge und Leber der Mäuse nach Injektion des IL-15-Superagonisten RLI beobachtet werden. Dieselbe Arbeit beschreibt auch die Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasierung der humanen, kolorektalen Karzinomlinie HCT-116 nach Injektion in den Blinddarm von Nacktmäusen [295]. Die Wirkung des IL-15-Superagonisten Alt803 wurde in zwei multiplen Myelom-Modellen mit den Zelllinien 5T33P und MOPC-315 in C57BL/6 und BALB/c-Mäusen getestet [89]. Eine einmalige Injektion von Alt803 bewirkte einen starken Rückgang der Tumorlast im Knochenmark und führte bei dem Großteil der Mäuse zu einer komplette Remission. Geheilte Mäuse waren resistent gegen erneute Tumorzell-Injektion.

In den vorgestellten Arbeiten wurden mit Ausnahme der Versuche mit der kolorektalen Karzinomlinie HCT-116 immunkompetente Mäuse und murine Tumore verwendet. Die Antitumor-Reaktivität war somit auf endogen T- oder NK-Zellen zurückzuführen. Im Gegensatz dazu lag der Fokus der therapeutischen Versuche der vorliegenden Arbeit auf adoptiv transferierten T-Zellen in zwei xenogenen Tumormodellen mit humanen Tumorzellen und NSG-Mäusen. Für diese Versuche wurden primäre Tumorblasten der AML MZ667 und die Ovarialkarzinom-Linie OV90 verwendet.

Für das AML Modell erhielten die Mäuse i.v. Injektionen der AML MZ667 (siehe 4.9.1). Das Tumorwachstum in diesem Modell beschränkte sich zunächst auf das Knochenmark und konnte nicht im peripheren Blut überwacht werden. Der optimale Therapiezeitpunkt ist erreicht, wenn die AML im Knochenmark eine Frequenz von 1-3 % erreicht hat (Manuskript zur Publikation eingereicht). Bis zu diesem Zeitpunkt kann das AML-Engraftment durch den adoptiven T-Zelltransfer ohne Zusatz von Zytokinen aufgehalten werden. Um den therapeuti-

schen Nutzen von ILR13$^+$-Fc in diesem Modell zu bestätigen, wurde bewusst ein späterer Therapiezeitpunkt gewählt. Für die Therapie wurde der T-Zellklon 5B2 eingesetzt, wobei Mel-A-spezifische T-Zellen als Spezifitätskontrolle dienten [243, 301]. Zum Zeitpunkt des adoptiven T-Zelltransfers lag die AML-Last im Knochenmark von zwei Kontroll-Mäusen bei 10,8 bzw. 18,2 %. Erwartungsgemäß zeigten die 5B2 T-Zellen ohne Zytokine keinen therapeutischen Effekt. Durch zusätzliche Injektionen von 10 µg/Maus IL-15 jeden zweiten Tag über einen Zeitraum von 28 Tagen konnte die AML-Last im Knochenmark um etwa 25 % im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert werden. Die wöchentliche Injektion einer molar äquivalenten Dosis von ILR13$^+$-Fc bewirkte eine deutlich verstärkte Reduktion um etwa 67 %. Die verringerte Tumorlast korrelierte mit erhöhten T-Zellfrequenzen im Knochenmark, wobei für ILR13$^+$-Fc deutlich höhere T-Zellfrequenzen als für IL-15 detektiert wurden. Der Antitumoreffekt war folglich abhängig von der Proliferation der T-Zellen *in vivo*. Interessanterweise zeigten auch Mel-A-spezifische T-Zellen mit ILR13$^+$-Fc einen antitumoralen Effekt mit Reduktion der Tumorlast um etwa 28 %. Ähnliche, antigenunspezifische Effekte wurden bereits für CD8$^+$ T-Zellen nach Zytokinbehandlung, insbesondere auch mit dem IL-15-Superagonisten Alt803 demonstriert [89, 242, 302]. In einem Teil der Versuche konnten sie auf die Überexpression von NKG2D zurückgeführt werden. Es handelt sich dabei um einen von NK- und T-Zellen exprimierten Rezeptor der angeborenen Immunantwort, der bei Aktivierung zelluläre Effektorfunktionen induziert [303, 304]. NKG2D wird als Reaktion auf IL-15 und Alt803 überexprimiert [89, 305, 306]. Auch ILR13$^+$-Fc induzierte eine starke Überexpression von NKG2D auf CD8$^+$ T-Zellen, während die Expression von PD-1 nicht beeinflusst wurde (siehe Abschnitt 4.5.6). Dies passt zum Profil einer kürzlich beschriebenen Population von CD8$^+$ T-Gedächtniszellen, die nach Zytokinbehandlung Effektorfunktionen der angeborenen Immunantwort übernehmen [302]. Der beobachtete Antitumoreffekt war dennoch teilweise antigenspezifisch, da die AML-reaktiven 5B2 T-Zellen, auch unter Einfluss von ILR13$^+$-Fc das Tumorwachstum deutlich stärker einschränkten als Mel-A spezifische T-Zellen.

Der Einfluss von ILR13$^+$Fc auf adoptiv transferierte, tumorreaktive T-Zellen wurde auch in einem soliden Tumormodell mit der CLDN-positiven Ovarialkarzinom-Linie OV-90 untersucht. Der Tumortransfer erfolgte durch subkutane Injektionen der OV-90-Zellen in NSG-Mäuse. Nach 4 Tagen bildeten sich palpable, solide Tumore im Bereich der Einstichstelle. An diesem Tag erfolgte der Transfer CD3-positiver, CLDN-CAR- oder Kontroll-CAR-transduzierter T-Zellen. ILR13$^+$-Fc wurde wöchentlich mit einer Konzentration von 62 µg/Maus appliziert. Die Therapie mit CLDN-CAR-transduzierten T-Zellen bewirkte bereits ohne Zytokinzugabe eine deutliche Verzögerung des Tumorwachstums (siehe Abschnitt 4.9.2). Unter Zusatz von ILR13$^+$-Fc konnte allerdings in 3 von 4 Mäusen eine komplette Remission bis Tag 31 nach T-Zelltransfer erreicht werden. Analog zu dem therapeutischen Versuch mit AML-reaktiven T-Zellen wurde auch in diesem Versuch eine ausgeprägter Antitumoreffekt

der Spezifitätskontrolle mit ILR13$^+$-Fc beobachtet. Das Tumorwachstum wurde dabei sogar stärker inhibiert als in der Gruppe, die CLDN-CAR-transduzierte T-Zellen ohne Zytokine erhielten. Dies könnte, wie schon im AML-Versuch, durch die Überexpression von NKG2D und anderen Rezeptoren der angeborenen Immunantwort verursacht worden sein. Möglicherweise wurde der Effekt auch zusätzlich durch den HLA-Mismatch zwischen OV90 und den verwendeten T-Zellen verstärkt. Dennoch blieb auch in diesem Versuch neben der unspezifischen weiterhin eine antigenspezifische Reaktivität erhalten. Die T-Zellfrequenzen in Milz und Blut wurden zum Ende des Versuchs bestimmt, waren jedoch wenig aussagekräftig, da alle Mäuse zu diesem Zeitpunkt aufgrund des Transfers der CD3$^+$ T-Zellpopulation Symptome einer xenogenen GvHD und dadurch bedingt hohe Frequenzen von CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen zeigten. In zukünftigen Versuchen könnte die GvHD durch den Einsatz einer reinen CD8$^+$ T-Zellpopulation verhindert werden.

Die beiden vorgestellten therapeutische Versuche belegen, dass ILR13$^+$-Fc die Effektivität des adoptiven Transfers tumorreaktiver T-Zellen entscheidend verbessern kann. Dabei fördert es sowohl die Proliferation der T-Zellen als auch die TCR und CAR-vermittelten Effektorfunktionen. Zusätzlich dazu scheint eine Überexpression von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort wie NKG2D die T-Zellantwort zu verstärken.

5.7 Klinische Einsatzmöglichkeiten von IL-15 und IL-15-Superagonisten

Die Verwendung von IL-15 und IL-15-Superagonisten in der Klinik könnte in vielen Situationen hilfreich sein. Da sie die homöostatische Proliferation von T-Zellen auch in Abwesenheit spezifischer Antigene fördern, könnten sie beispielsweise in immunkompromittierten Patienten beim Wiederaufbau des Immunsystems eingesetzt werden. Vor allem auch im Kontext einer MRD erscheint der Einsatz sinnvoll, da Patienten mit MRD frei von klinischen Symptomen sind, aber weiterhin aber residuale Krebszellen besitzen, die als Hauptursache für das Auftreten von Rezidiven nach einer Krebsbehandlung angesehen werden [307, 308]. Hier könnten IL-15 und IL-15-Superagonisten die Proliferation und Aktivität endogener sowie adoptiv transferierter, tumorreaktiver T-Zellen auch bei niedrigen Antigenfrequenzen verstärken [197]. So könnten residuale Tumorzellen vernichtet und die Ausbildung einer langlebigen Population von T-Gedächtniszellen gefördert werden. Diese könnten im Falle eines Rezidivs frühzeitig aktiv werden und ein Auswachsen des Tumors verhindern. Im Gegensatz zu IL-2 induzieren IL-15 und die IL-15-Superagonisten dabei keine Apoptose, inhibieren das Wachstum regulatorischer T-Zellen und fördern das Langzeitüberleben von therapeutisch effizienten T-Gedächtniszellen. Auch die Toxizität und das Auftreten des Kapillarlecksyndroms sind reduziert [66, 309]. Sie könnten daher als Ersatz für IL-2 bei der Behandlung von Melanomen und Nierenzellkarzinomen Verwendung finden. Eine weitere wichtige Eigenschaft von IL-15 und IL-15-Superagonisten ist die Fähigkeit zur Reaktivierung anerger und antigentoleranter

T-Zellen. Dies könnte beispielsweise bei persistierenden viralen Infektionen zur Aktivierung einer erneuten Immunantwort eingesetzt werden. So wurden in einigen präklinischen Studien bereits Effekte gegen HIV und HBV beobachtet [310-313]. Gleichzeitig birgt diese Eigenschaft aber auch das Risiko der Reaktivierung autoreaktiver T-Zellen und könnte dadurch unerwünschte Autoimmunreaktionen verursachen [82, 306]. Außerdem wurde berichtet, dass ein konstitutives IL-15-Signal zu Chromosomeninstabilität bei Leukozyten und einer damit verbundenen malignen Transformation führen kann [314-316]. Diese Risiken müssen vor allem bei Behandlungen über einen längeren Zeitraum berücksichtigt werden.

Da IL-15 und insbesondere die IL-15-Superagonisten die Proliferation, Aktivität und den Phänotyp adoptiv transferierter T-Zellen positiv beeinflussen, könnten sie als Adjuvantien beim adoptiven T-Zelltransfer eingesetzt werden. In Kombination mit der mittlerweile sehr erfolgreichen Reprogrammierung von T-Zellen gegen Tumorantigene eröffnet sich eine Vielzahl zusätzlicher Einsatzgebiete, in denen IL-15 bzw. die IL-15-Superagonisten zur Steigerung der therapeutischen Effizienz beitragen könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. Lieber, M.R., Chang, C.P., Gallo, M., Gauss, G., Gerstein, R., et al. (1994) The mechanism of V(D)J recombination: site-specificity, reaction fidelity and immunologic diversity. *Semin Immunol,* **6**: 143-153.
2. Davis, M.M. and Bjorkman, P.J. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature,* **334**: 395-402.
3. Arstila, T.P. (1999) A Direct Estimate of the Human T Cell Receptor Diversity. *Science,* **286**: 958-961.
4. Kesmir, C., Borghans, J.A.M. and De Boer, R.J. (2000) Diversity of human alpha beta T cell receptors. *Science,* **288**: 1135.
5. Girardi, M. (2006) Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol,* **126**: 25-31.
6. Borowski, C., Martin, C., Gounari, F., Haughn, L., Aifantis, I., et al. (2002) On the brink of becoming a T cell. *Curr Opin Immunol,* **14**: 200-206.
7. Fink, P.J. and Hendricks, D.W. (2011) Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. *Nat Rev Immunol,* **11**: 544-549.
8. Ting, J.P. and Trowsdale, J. (2002) Genetic control of MHC class II expression. *Cell,* **109**: S21-33.
9. Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., et al. (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature,* **329**: 506-512.
10. Jones, E.Y. (1997) MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol,* **9**: 75-79.
11. Gorbulev, S., Abele, R. and Tampe, R. (2001) Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **98**: 3732-3737.
12. Gao, B., Adhikari, R., Howarth, M., Nakamura, K., Gold, M.C., et al. (2002) Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity,* **16**: 99-109.
13. Hammer, G.E., Gonzalez, F., Champsaur, M., Cado, D. and Shastri, N. (2006) The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol,* **7**: 103-112.
14. Trombetta, E.S. and Mellman, I. (2005) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol,* **23**: 975-1028.
15. Burster, T., Macmillan, H., Hou, T., Boehm, B.O. and Mellins, E.D. (2010) Cathepsin G: roles in antigen presentation and beyond. *Mol Immunol,* **47**: 658-665.
16. Hsing, L.C. and Rudensky, A.Y. (2005) The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev,* **207**: 229-241.
17. Hiltbold, E.M. and Roche, P.A. (2002) Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr Opin Immunol,* **14**: 30-35.
18. Gregers, T.F., Nordeng, T.W., Birkeland, H.C., Sandlie, I. and Bakke, O. (2003) The cytoplasmic tail of invariant chain modulates antigen processing and presentation. *Eur J Immunol,* **33**: 277-286.
19. Cresswell, P. (1994) Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol,* **12**: 259-293.
20. Brownlie, R.J. and Zamoyska, R. (2013) T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol,* **13**: 257-269.
21. Seddon, B. and Zamoyska, R. (2002) TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells. *J Immunol,* **169**: 2997-3005.
22. Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M. and Bolen, J.B. (1988) The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell,* **55**: 301-308.
23. Gascoigne, N.R. (2008) Do T cells need endogenous peptides for activation? *Nat Rev Immunol,* **8**: 895-900.

24. Mescher, M.F., Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Casey, K.A., Gerner, M., et al. (2006) Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev,* **211**: 81-92.
25. Wingren, A.G., Parra, E., Varga, M., Kalland, T., Sjogren, H.O., et al. (1995) T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit Rev Immunol,* **15**: 235-253.
26. Alegre, M.L., Frauwirth, K.A. and Thompson, C.B. (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol,* **1**: 220-228.
27. Liechtenstein, T., Dufait, I., Bricogne, C., Lanna, A., Pen, J., et al. (2012) PD-L1/PD-1 Co-Stimulation, a Brake for T cell Activation and a T cell Differentiation Signal. *J Clin Cell Immunol,* **S12**.
28. Schmidt, C.S. and Mescher, M.F. (2002) Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12. *J Immunol,* **168**: 5521-5529.
29. Schmidt, C.S. and Mescher, M.F. (1999) Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo. *J Immunol,* **163**: 2561-2567.
30. Barry, M. and Bleackley, R.C. (2002) Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol,* **2**: 401-409.
31. Lieberman, J. (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol,* **3**: 361-370.
32. Pinkoski, M.J., Hobman, M., Heibein, J.A., Tomaselli, K., Li, F., et al. (1998) Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood,* **92**: 1044-1054.
33. Russell, J.H. and Ley, T.J. (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol,* **20**: 323-370.
34. Pipkin, M.E. and Lieberman, J. (2007) Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current Opinion in Immunology,* **19**: 301-308.
35. Fan, Z. and Zhang, Q. (2005) Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cell Mol Immunol,* **2**: 259-264.
36. Lieberman, J. and Fan, Z. (2003) Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol,* **15**: 553-559.
37. Pasternack, M.S., Bleier, K.J. and McInerney, T.N. (1991) Granzyme A binding to target cell proteins. Granzyme A binds to and cleaves nucleolin in vitro. *J Biol Chem,* **266**: 14703-14708.
38. Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature,* **391**: 96-99.
39. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., et al. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature,* **391**: 43-50.
40. Los, M., Wesselborg, S. and Schulze-Osthoff, K. (1999) The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity,* **10**: 629-639.
41. Parkin, J. and Cohen, B. (2001) An overview of the immune system. *Lancet,* **357**: 1777-1789.
42. Chaplin, D.D. (2010) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol,* **125**: S3-23.
43. Mahnke, Y.D., Brodie, T.M., Sallusto, F., Roederer, M. and Lugli, E. (2013) The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol,* **43**: 2797-2809.
44. Hammarlund, E., Lewis, M.W., Hansen, S.G., Strelow, L.I., Nelson, J.A., et al. (2003) Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med,* **9**: 1131-1137.
45. Ciocca, M.L., Barnett, B.E., Burkhardt, J.K., Chang, J.T. and Reiner, S.L. (2012) Cutting edge: Asymmetric memory T cell division in response to rechallenge. *J Immunol,* **188**: 4145-4148.
46. Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., et al. (2011) A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med,* **17**: 1290-1297.
47. Merkenschlager, M., Terry, L., Edwards, R. and Beverley, P.C. (1988) Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal

antibody UCHL1: implications for differential CD45 expression in T cell memory formation. *Eur J Immunol,* **18**: 1653-1661.

48. Akbar, A.N., Terry, L., Timms, A., Beverley, P.C. and Janossy, G. (1988) Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol,* **140**: 2171-2178.
49. Picker, L.J., Treer, J.R., Ferguson-Darnell, B., Collins, P.A., Buck, D., et al. (1993) Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol,* **150**: 1105-1121.
50. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature,* **401**: 708-712.
51. Gattinoni, L., Klebanoff, C.A. and Restifo, N.P. (2012) Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer,* **12**: 671-684.
52. Takada, K. and Jameson, S.C. (2009) Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol,* **9**: 823-832.
53. Surh, C.D. and Sprent, J. (2008) Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity,* **29**: 848-862.
54. Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A. and Rajewsky, K. (2001) How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **98**: 8744-8749.
55. Labrecque, N., Whitfield, L.S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C., et al. (2001) How much TCR does a T cell need? *Immunity,* **15**: 71-82.
56. Goldrath, A.W. and Bevan, M.J. (1999) Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity,* **11**: 183-190.
57. Kieper, W.C., Burghardt, J.T. and Surh, C.D. (2004) A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J Immunol,* **172**: 40-44.
58. Tanchot, C., Lemonnier, F.A., Perarnau, B., Freitas, A.A. and Rocha, B. (1997) Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science,* **276**: 2057-2062.
59. Dooms, H. (2013) Interleukin-7: Fuel for the autoimmune attack. *J Autoimmun,* **45**: 40-48.
60. Carrette, F. and Surh, C.D. (2012) IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Semin Immunol,* **24**: 209-217.
61. Krause, H., Jandrig, B., Wernicke, C., Bulfone-Paus, S., Pohl, T., et al. (1996) Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15). *Cytokine,* **8**: 667-674.
62. Tagaya, Y., Kurys, G., Thies, T.A., Losi, J.M., Azimi, N., et al. (1997) Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **94**: 14444-14449.
63. Waldmann, T.A. and Tagaya, Y. (1999) The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol,* **17**: 19-49.
64. Chirifu, M., Hayashi, C., Nakamura, T., Toma, S., Shuto, T., et al. (2007) Crystal structure of the IL-15-IL-15Ralpha complex, a cytokine-receptor unit presented in trans. *Nat Immunol,* **8**: 1001-1007.
65. Steel, J.C., Waldmann, T.A. and Morris, J.C. (2012) Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci,* **33**: 35-41.
66. Berger, C., Berger, M., Hackman, R.C., Gough, M., Elliott, C., et al. (2009) Safety and immunologic effects of IL-15 administration in nonhuman primates. *Blood,* **114**: 2417-2426.
67. Dooms, H., Van Belle, T., Desmedt, M., Rottiers, P. and Grooten, J. (2000) Interleukin-15 redirects the outcome of a tolerizing T-cell stimulus from apoptosis to anergy. *Blood,* **96**: 1006-1012.
68. Ahmadzadeh, M. and Rosenberg, S.A. (2006) IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood,* **107**: 2409-2414.

69. Jakobisiak, M., Golab, J. and Lasek, W. (2011) Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev,* **22**: 99-108.
70. Ottonello, L., Frumento, G., Arduino, N., Bertolotto, M., Dapino, P., et al. (2002) Differential regulation of spontaneous and immune complex-induced neutrophil apoptosis by proinflammatory cytokines. Role of oxidants, Bax and caspase-3. *J Leukoc Biol,* **72**: 125-132.
71. Huntington, N.D., Puthalakath, H., Gunn, P., Naik, E., Michalak, E.M., et al. (2007) Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat Immunol,* **8**: 856-863.
72. Sandau, M.M., Kohlmeier, J.E., Woodland, D.L. and Jameson, S.C. (2010) IL-15 regulates both quantitative and qualitative features of the memory CD8 T cell pool. *J Immunol,* **184**: 35-44.
73. Li, Y., Zhi, W., Wareski, P. and Weng, N.P. (2005) IL-15 activates telomerase and minimizes telomere loss and may preserve the replicative life span of memory CD8+ T cells in vitro. *J Immunol,* **174**: 4019-4024.
74. Cheever, M.A. (2008) Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol Rev,* **222**: 357-368.
75. Oelert, T., Papatriantafyllou, M., Pougialis, G., Hammerling, G.J., Arnold, B., et al. (2010) Irradiation and IL-15 promote loss of CD8 T-cell tolerance in response to lymphopenia. *Blood,* **115**: 2196-2202.
76. Le Maux Chansac, B., Misse, D., Richon, C., Vergnon, I., Kubin, M., et al. (2008) Potentiation of NK cell-mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma: role of NKG2D-dependent pathway. *Int Immunol,* **20**: 801-810.
77. Wang, X., Berger, C., Wong, C.W., Forman, S.J., Riddell, S.R., et al. (2011) Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice. *Blood,* **117**: 1888-1898.
78. Ochoa, M.C., Mazzolini, G., Hervas-Stubbs, S., de Sanmamed, M.F., Berraondo, P., et al. (2013) Interleukin-15 in gene therapy of cancer. *Curr Gene Ther,* **13**: 15-30.
79. Bodnar, A., Nizsaloczki, E., Mocsar, G., Szaloki, N., Waldmann, T.A., et al. (2008) A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. *Immunol Lett,* **116**: 117-125.
80. Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A. and Tagaya, Y. (2002) IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity,* **17**: 537-547.
81. Schluns, K.S., Stoklasek, T. and Lefrancois, L. (2005) The roles of interleukin-15 receptor alpha: trans-presentation, receptor component, or both? *Int J Biochem Cell Biol,* **37**: 1567-1571.
82. Fehniger, T.A. (2001) Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood,* **97**: 14-32.
83. Budagian, V., Bulanova, E., Paus, R. and Bulfone-Paus, S. (2006) IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev,* **17**: 259-280.
84. Bergamaschi, C., Rosati, M., Jalah, R., Valentin, A., Kulkarni, V., et al. (2008) Intracellular interaction of interleukin-15 with its receptor alpha during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity. *J Biol Chem,* **283**: 4189-4199.
85. Bergamaschi, C., Bear, J., Rosati, M., Beach, R.K., Alicea, C., et al. (2012) Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15Ralpha in human and mouse serum. *Blood,* **120**: e1-8.
86. Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., Sabzevari, H., Sakai, Y., et al. (2005) Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood,* **105**: 721-727.
87. Zhu, X., Marcus, W.D., Xu, W., Lee, H.I., Han, K., et al. (2009) Novel human interleukin-15 agonists. *J Immunol,* **183**: 3598-3607.
88. Mortier, E., Quemener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., et al. (2006) Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. *J Biol Chem,* **281**: 1612-1619.

89. Xu, W., Jones, M., Liu, B., Zhu, X., Johnson, C.B., et al. (2013) Efficacy and mechanism-of-action of a novel superagonist interleukin-15: interleukin-15 receptor alphaSu/Fc fusion complex in syngeneic murine models of multiple myeloma. *Cancer Res,* **73**: 3075-3086.
90. Kermer, V., Hornig, N., Harder, M., Bondarieva, A., Kontermann, R.E., et al. (2014) Combining antibody-directed presentation of IL-15 and 4-1BBL in a trifunctional fusion protein for cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther,* **13**: 112-121.
91. Labbe, D.P., Zadra, G., Ebot, E.M., Mucci, L.A., Kantoff, P.W., et al. (2014) Role of diet in prostate cancer: the epigenetic link. *Oncogene*.
92. Baena, R. and Salinas, P. (2015) Diet and colorectal cancer. *Maturitas,* **80**: 258-264.
93. Baena Ruiz, R. and Salinas Hernandez, P. (2014) Diet and cancer: risk factors and epidemiological evidence. *Maturitas,* **77**: 202-208.
94. Gilbert, E.S. (2009) Ionising radiation and cancer risks: what have we learned from epidemiology? *Int J Radiat Biol,* **85**: 467-482.
95. Bikle, D.D. (2012) Protective actions of vitamin D in UVB induced skin cancer. *Photochem Photobiol Sci,* **11**: 1808-1816.
96. Albin, M., Magnani, C., Krstev, S., Rapiti, E. and Shefer, I. (1999) Asbestos and cancer: An overview of current trends in Europe. *Environ Health Perspect,* **107**: 289-298.
97. Doll, R. (1953) Smoking and lung cancer. *Br Med J,* **1**: 505-506.
98. Loeb, L.A., Ernster, V.L., Warner, K.E., Abbotts, J. and Laszlo, J. (1984) Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Res,* **44**: 5940-5958.
99. Wen, J., Fu, J.H., Zhang, W. and Guo, M. (2011) Lung carcinoma signaling pathways activated by smoking. *Chin J Cancer,* **30**: 551-558.
100. Pannone, G., Zamparese, R., Pace, M., Pedicillo, M.C., Cagiano, S., et al. (2014) The role of EBV in the pathogenesis of Burkitt's Lymphoma: an Italian hospital based survey. *Infect Agent Cancer,* **9**: 34.
101. Morales-Romero, J., Vargas, G. and Garcia-Roman, R. (2014) Occult HBV infection: a faceless enemy in liver cancer development. *Viruses,* **6**: 1590-1611.
102. Paydas, S. (2015) Hepatitis C virus and lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol,* **93**: 246-256.
103. Harper, D.M. and Demars, L.R. (2014) Primary strategies for HPV infection and cervical cancer prevention. *Clin Obstet Gynecol,* **57**: 256-278.
104. Gramolelli, S. and Schulz, T.F. (2015) The role of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in the pathogenesis of Kaposi sarcoma. *J Pathol,* **235**: 368-380.
105. Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science,* **266**: 66-71.
106. Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., et al. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature,* **378**: 789-792.
107. Perica, K., Varela, J.C., Oelke, M. and Schneck, J. (2015) Adoptive T cell immunotherapy for cancer. *Rambam Maimonides Med J,* **6**: e0004.
108. Robbins, P.F. and Kawakami, Y. (1996) Human tumor antigens recognized by T cells. *Curr Opin Immunol,* **8**: 628-636.
109. Zhu, Q., Liu, M., Dai, L., Ying, X., Ye, H., et al. (2013) Using immunoproteomics to identify tumor-associated antigens (TAAs) as biomarkers in cancer immunodiagnosis. *Autoimmun Rev,* **12**: 1123-1128.
110. Vigneron, N., Stroobant, V., Van den Eynde, B.J. and van der Bruggen, P. (2013) Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer Immun,* **13**: 15.
111. Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature,* **256**: 495-497.
112. Weiner, L.M., Surana, R. and Wang, S. (2010) Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol,* **10**: 317-327.
113. Wildes, T.M., Farrington, L., Yeung, C., Harrington, A.M., Foyil, K.V., et al. (2014) Rituximab is associated with improved survival in Burkitt lymphoma: a retrospective analysis from two US academic medical centers. *Ther Adv Hematol,* **5**: 3-12.

114. McLaughlin, P., White, C.A., Grillo-Lopez, A.J. and Maloney, D.G. (1998) Clinical status and optimal use of rituximab for B-cell lymphomas. *Oncology (Williston Park),* **12**: 1763-1769; discussion 1769-1770, 1775-1767.
115. Chen, J.S., Lan, K. and Hung, M.C. (2003) Strategies to target HER2/neu overexpression for cancer therapy. *Drug Resist Updat,* **6**: 129-136.
116. Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., et al. (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol,* **20**: 719-726.
117. Hudis, C.A. (2007) Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med,* **357**: 39-51.
118. Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., et al. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med,* **344**: 783-792.
119. Ellis, L.M. and Hicklin, D.J. (2008) VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer,* **8**: 579-591.
120. Mittal, K., Ebos, J. and Rini, B. (2014) Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond. *Semin Oncol,* **41**: 235-251.
121. Kumler, I., Christiansen, O.G. and Nielsen, D.L. (2014) A systematic review of bevacizumab efficacy in breast cancer. *Cancer Treat Rev,* **40**: 960-973.
122. Trinh, V.A. and Hagen, B. (2013) Ipilimumab for advanced melanoma: a pharmacologic perspective. *J Oncol Pharm Pract,* **19**: 195-201.
123. Callahan, M.K., Postow, M.A. and Wolchok, J.D. (2014) CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. *Front Oncol,* **4**: 385.
124. Leung, A.M., Lee, A.F., Ozao-Choy, J., Ramos, R.I., Hamid, O., et al. (2014) Clinical Benefit from Ipilimumab Therapy in Melanoma Patients may be Associated with Serum CTLA4 Levels. *Front Oncol,* **4**: 110.
125. Poole, R.M. (2014) Pembrolizumab: first global approval. *Drugs,* **74**: 1973-1981.
126. Qian, X., Wang, X. and Jin, H. (2014) Cell transfer therapy for cancer: past, present, and future. *J Immunol Res,* **2014**: 525913.
127. Bernatchez, C., Radvanyi, L.G. and Hwu, P. (2012) Advances in the treatment of metastatic melanoma: adoptive T-cell therapy. *Semin Oncol,* **39**: 215-226.
128. Khammari, A., Knol, A.C., Nguyen, J.M., Bossard, C., Denis, M.G., et al. (2014) Adoptive TIL transfer in the adjuvant setting for melanoma: long-term patient survival. *J Immunol Res,* **2014**: 186212.
129. Wu, R., Forget, M.A., Chacon, J., Bernatchez, C., Haymaker, C., et al. (2012) Adoptive T-cell therapy using autologous tumor-infiltrating lymphocytes for metastatic melanoma: current status and future outlook. *Cancer J,* **18**: 160-175.
130. Zittoun, R.A., Mandelli, F., Willemze, R., de Witte, T., Labar, B., et al. (1995) Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med,* **332**: 217-223.
131. Fefer, A., Sullivan, K.M., Weiden, P., Buckner, C.D., Schoch, G., et al. (1987) Graft versus leukemia effect in man: the relapse rate of acute leukemia is lower after allogeneic than after syngeneic marrow transplantation. *Prog Clin Biol Res,* **244**: 401-408.
132. Gupta, V., Tallman, M.S. and Weisdorf, D.J. (2011) Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns. *Blood,* **117**: 2307-2318.
133. Miles, J.J., McCluskey, J., Rossjohn, J. and Gras, S. (2015) Understanding the complexity and malleability of T-cell recognition. *Immunol Cell Biol*.
134. Dominietto, A., Pozzi, S., Miglino, M., Albarracin, F., Piaggio, G., et al. (2007) Donor lymphocyte infusions for the treatment of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood,* **109**: 5063-5064.

135. Roddie, C. and Peggs, K.S. (2011) Donor lymphocyte infusion following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther,* **11**: 473-487.
136. Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P. and Holler, E. (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet,* **373**: 1550-1561.
137. Jacobsohn, D.A. and Vogelsang, G.B. (2007) Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis,* **2**: 35.
138. Bolanos-Meade, J. and Vogelsang, G.B. (2004) Acute graft-versus-host disease. *Clin Adv Hematol Oncol,* **2**: 672-682.
139. Castro-Malaspina, H., Harris, R.E., Gajewski, J., Ramsay, N., Collins, R., et al. (2002) Unrelated donor marrow transplantation for myelodysplastic syndromes: outcome analysis in 510 transplants facilitated by the National Marrow Donor Program. *Blood,* **99**: 1943-1951.
140. Arai, S. and Vogelsang, G.B. (2000) Management of graft-versus-host disease. *Blood Rev,* **14**: 190-204.
141. Petersdorf, E.W. (2004) HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol,* **11**: 386-391.
142. Nowak, J. (2008) Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant,* **42**: S71-76.
143. Thomas, S., Klobuch, S., Besold, K., Plachter, B., Dorrie, J., et al. (2012) Strong and sustained effector function of memory- versus naive-derived T cells upon T-cell receptor RNA transfer: implications for cellular therapy. *Eur J Immunol,* **42**: 3442-3453.
144. Zhao, Y., Zheng, Z., Cohen, C.J., Gattinoni, L., Palmer, D.C., et al. (2006) High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol Ther,* **13**: 151-159.
145. Van Tendeloo, V.F., Willems, R., Ponsaerts, P., Lenjou, M., Nijs, G., et al. (2000) High-level transgene expression in primary human T lymphocytes and adult bone marrow CD34+ cells via electroporation-mediated gene delivery. *Gene Ther,* **7**: 1431-1437.
146. Qasim, W. and Thrasher, A.J. (2014) Progress and prospects for engineered T cell therapies. *Br J Haematol,* **166**: 818-829.
147. Kessels, H.W., Wolkers, M.C., van den Boom, M.D., van der Valk, M.A. and Schumacher, T.N. (2001) Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nat Immunol,* **2**: 957-961.
148. Kershaw, M.H., Westwood, J.A., Slaney, C.Y. and Darcy, P.K. (2014) Clinical application of genetically modified T cells in cancer therapy. *Clin Transl Immunology,* **3**: e16.
149. Leuci, V., Mesiano, G., Gammaitoni, L., Aglietta, M. and Sangiolo, D. (2014) Genetically redirected T lymphocytes for adoptive immunotherapy of solid tumors. *Curr Gene Ther,* **14**: 52-62.
150. Johnson, L.A., Morgan, R.A., Dudley, M.E., Cassard, L., Yang, J.C., et al. (2009) Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood,* **114**: 535-546.
151. Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., et al. (2006) Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science,* **314**: 126-129.
152. Rapoport, A.P., Stadtmauer, E.A., T., V.D., W., B., Binder-Scholl, G.K., et al. (2013) Adoptive immunotherapy with engineered T cells expressing and HLA-A2 restricted affinity-enhanced TCR for LAGE-1 and NY-ESO-1 in patients with multiple myeloma following auto-SCT. *Journal for Immunotherapy of Cancer*: 1.
153. Bendle, G.M., Linnemann, C., Hooijkaas, A.I., Bies, L., de Witte, M.A., et al. (2010) Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat Med,* **16**: 565-570, 561p following 570.
154. van Loenen, M.M., de Boer, R., Amir, A.L., Hagedoorn, R.S., Volbeda, G.L., et al. (2010) Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **107**: 10972-10977.
155. Cohen, C.J., Li, Y.F., El-Gamil, M., Robbins, P.F., Rosenberg, S.A., et al. (2007) Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. *Cancer Res,* **67**: 3898-3903.

156. Voss, R.H., Thomas, S., Pfirschke, C., Hauptrock, B., Klobuch, S., et al. (2010) Coexpression of the T-cell receptor constant alpha domain triggers tumor reactivity of single-chain TCR-transduced human T cells. *Blood,* **115**: 5154-5163.
157. Aggen, D.H., Chervin, A.S., Schmitt, T.M., Engels, B., Stone, J.D., et al. (2012) Single-chain ValphaVbeta T-cell receptors function without mispairing with endogenous TCR chains. *Gene Ther,* **19**: 365-374.
158. Stone, J.D., Harris, D.T., Soto, C.M., Chervin, A.S., Aggen, D.H., et al. (2014) A novel T cell receptor single-chain signaling complex mediates antigen-specific T cell activity and tumor control. *Cancer Immunol Immunother,* **63**: 1163-1176.
159. Ochi, T., Fujiwara, H., Okamoto, S., An, J., Nagai, K., et al. (2011) Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked antileukemia reactivity and safety. *Blood,* **118**: 1495-1503.
160. Provasi, E., Genovese, P., Lombardo, A., Magnani, Z., Liu, P.Q., et al. (2012) Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat Med,* **18**: 807-815.
161. van der Veken, L.T., Hagedoorn, R.S., van Loenen, M.M., Willemze, R., Falkenburg, J.H., et al. (2006) Alphabeta T-cell receptor engineered gammadelta T cells mediate effective antileukemic reactivity. *Cancer Res,* **66**: 3331-3337.
162. Marincola, F.M., Shamamian, P., Rivoltini, L., Salgaller, M., Cormier, J., et al. (1995) HLA associations in the antitumor response against malignant melanoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol,* **18**: 242-252.
163. Pule, M.A., Straathof, K.C., Dotti, G., Heslop, H.E., Rooney, C.M., et al. (2005) A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther,* **12**: 933-941.
164. Hombach, A.A., Heiders, J., Foppe, M., Chmielewski, M. and Abken, H. (2012) OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4(+) T cells. *Oncoimmunology,* **1**: 458-466.
165. Bridgeman, J.S., Hawkins, R.E., Hombach, A.A., Abken, H. and Gilham, D.E. (2010) Building better chimeric antigen receptors for adoptive T cell therapy. *Curr Gene Ther,* **10**: 77-90.
166. Shirasu, N. and Kuroki, M. (2012) Functional design of chimeric T-cell antigen receptors for adoptive immunotherapy of cancer: architecture and outcomes. *Anticancer Res,* **32**: 2377-2383.
167. Dotti, G., Savoldo, B. and Brenner, M. (2009) Fifteen years of gene therapy based on chimeric antigen receptors: "are we nearly there yet?". *Hum Gene Ther,* **20**: 1229-1239.
168. Hombach, A., Kohler, H., Rappl, G. and Abken, H. (2006) Human CD4+ T cells lyse target cells via granzyme/perforin upon circumvention of MHC class II restriction by an antibody-like immunoreceptor. *J Immunol,* **177**: 5668-5675.
169. Biagi, E., Marin, V., Giordano Attianese, G.M., Dander, E., D'Amico, G., et al. (2007) Chimeric T-cell receptors: new challenges for targeted immunotherapy in hematologic malignancies. *Haematologica,* **92**: 381-388.
170. Maus, M.V., Grupp, S.A., Porter, D.L. and June, C.H. (2014) Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood,* **123**: 2625-2635.
171. Kochenderfer, J.N. and Rosenberg, S.A. (2013) Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nat Rev Clin Oncol,* **10**: 267-276.
172. Kakarla, S. and Gottschalk, S. (2014) CAR T cells for solid tumors: armed and ready to go? *Cancer J,* **20**: 151-155.
173. Beatty, G.L., Haas, A.R., Maus, M.V., Torigian, D.A., Soulen, M.C., et al. (2014) Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res,* **2**: 112-120.
174. Lee, S. and Margolin, K. (2011) Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel),* **3**: 3856-3893.

175. Mocellin, S., Pasquali, S., Rossi, C.R. and Nitti, D. (2010) Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst,* **102**: 493-501.
176. Gogas, H., Ioannovich, J., Dafni, U., Stavropoulou-Giokas, C., Frangia, K., et al. (2006) Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med,* **354**: 709-718.
177. Jonasch, E. and Haluska, F.G. (2001) Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist,* **6**: 34-55.
178. Weiss, K. (1998) Safety profile of interferon-alpha therapy. *Seminars in Oncology,* **25**: 9-13.
179. Paul, S., Calmels, B. and Acres, R.B. (2002) Improvement of adoptive cellular immunotherapy of human cancer using ex-vivo gene transfer. *Curr Gene Ther,* **2**: 91-100.
180. Overwijk, W.W., Theoret, M.R. and Restifo, N.P. (2000) The future of interleukin-2: enhancing therapeutic anticancer vaccines. *Cancer J Sci Am,* **6**: S76-80.
181. Rosenberg, S.A. (2014) IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol,* **192**: 5451-5458.
182. Atkins, M.B. (2002) Interleukin-2: clinical applications. *Semin Oncol,* **29**: 12-17.
183. Atkins, M.B., Regan, M. and McDermott, D. (2004) Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clin Cancer Res,* **10**: 6342S-6346S.
184. Mavroukakis, S.A., Muehlbauer, P.M., White, R.L., Jr. and Schwartzentruber, D.J. (2001) Clinical pathways for managing patients receiving interleukin 2. *Clin J Oncol Nurs,* **5**: 207-217.
185. Schwartzentruber, D.J. (2001) Guidelines for the safe administration of high-dose interleukin-2. *J Immunother,* **24**: 287-293.
186. Schwartzentruber, D.J. (2001) High-dose interleukin-2 is an intensive treatment regardless of the venue of administration. *Cancer J,* **7**: 103-104.
187. Atkins, M.B., Lotze, M.T., Dutcher, J.P., Fisher, R.I., Weiss, G., et al. (1999) High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol,* **17**: 2105-2116.
188. Pockaj, B.A., Topalian, S.L., Steinberg, S.M., White, D.E. and Rosenberg, S.A. (1993) Infectious complications associated with interleukin-2 administration: a retrospective review of 935 treatment courses. *J Clin Oncol,* **11**: 136-147.
189. Klempner, M.S., Noring, R., Mier, J.W. and Atkins, M.B. (1990) An acquired chemotactic defect in neutrophils from patients receiving interleukin-2 immunotherapy. *N Engl J Med,* **322**: 959-965.
190. Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C. and Lefrancois, L. (2000) Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol,* **1**: 426-432.
191. Melchionda, F., Fry, T.J., Milliron, M.J., McKirdy, M.A., Tagaya, Y., et al. (2005) Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *J Clin Invest,* **115**: 1177-1187.
192. Colombetti, S., Levy, F. and Chapatte, L. (2009) IL-7 adjuvant treatment enhances long-term tumor-antigen-specific CD8+ T-cell responses after immunization with recombinant lentivector. *Blood,* **113**: 6629-6637.
193. Mackall, C.L., Fry, T.J. and Gress, R.E. (2011) Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol,* **11**: 330-342.
194. Waldmann, T.A. (2014) Interleukin-15 in the treatment of cancer. *Expert Review of Clinical Immunology,* **10**: 1689-1701.
195. Conlon, K.C., Lugli, E., Welles, H.C., Rosenberg, S.A., Fojo, A.T., et al. (2015) Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J Clin Oncol,* **33**: 74-82.
196. Markley, J.C. and Sadelain, M. (2010) IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood,* **115**: 3508-3519.

197. Weng, N.P., Liu, K., Catalfamo, M., Li, Y. and Henkart, P.A. (2002) IL-15 is a growth factor and an activator of CD8 memory T cells. *Ann N Y Acad Sci,* **975**: 46-56.
198. Sosinowski, T., White, J.T., Cross, E.W., Haluszczak, C., Marrack, P., et al. (2013) CD8alpha+ dendritic cell trans presentation of IL-15 to naive CD8+ T cells produces antigen-inexperienced T cells in the periphery with memory phenotype and function. *J Immunol,* **190**: 1936-1947.
199. Bosma, G.C., Custer, R.P. and Bosma, M.J. (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature,* **301**: 527-530.
200. Mosier, D.E., Gulizia, R.J., Baird, S.M. and Wilson, D.B. (1988) Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature,* **335**: 256-259.
201. Wiekmeijer, A.S., Pike-Overzet, K., Brugman, M.H., Salvatori, D.C., Egeler, R.M., et al. (2014) Sustained Engraftment of Cryopreserved Human Bone Marrow CD34(+) Cells in Young Adult NSG Mice. *Biores Open Access,* **3**: 110-116.
202. Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Schweitzer, I.B., et al. (1995) Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol,* **154**: 180-191.
203. Rongvaux, A., Takizawa, H., Strowig, T., Willinger, T., Eynon, E.E., et al. (2013) Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. *Annu Rev Immunol,* **31**: 635-674.
204. Brehm, M.A., Wiles, M.V., Greiner, D.L. and Shultz, L.D. (2014) Generation of improved humanized mouse models for human infectious diseases. *J Immunol Methods,* **410**: 3-17.
205. Shultz, L.D., Goodwin, N., Ishikawa, F., Hosur, V., Lyons, B.L., et al. (2014) Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. *Cold Spring Harb Protoc,* **2014**: 694-708.
206. Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., et al. (2005) Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol,* **174**: 6477-6489.
207. Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., et al. (2002) NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood,* **100**: 3175-3182.
208. Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T., et al. (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res,* **6**: 3543-3557.
209. Chuang, L.Y., Cheng, Y.H. and Yang, C.H. (2013) Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett,* **35**: 1541-1549.
210. Turner, R.M., Jr., Grindley, N.D. and Joyce, C.M. (2003) Interaction of DNA polymerase I (Klenow fragment) with the single-stranded template beyond the site of synthesis. *Biochemistry,* **42**: 2373-2385.
211. Nilsen, I.W., Overbo, K. and Olsen, R.L. (2001) Thermolabile alkaline phosphatase from Northern shrimp (Pandalus borealis): protein and cDNA sequence analyses. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol,* **129**: 853-861.
212. Lehman, I.R. (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science,* **186**: 790-797.
213. Weiss, B. and Richardson, C.C. (1967) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, I. Repair of single-strand breaks in DNA by an enzyme system from Escherichia coli infected with T4 bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **57**: 1021-1028.
214. Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene,* **96**: 23-28.
215. Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., et al. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol,* **28**: 495-503.
216. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* **227**: 680-685.

217. Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem,* **112**: 195-203.
218. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **76**: 4350-4354.
219. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol,* **36**: 59-74.
220. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. and Graham, F.L. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J,* **16**: 869-871.
221. Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. and Baltimore, D. (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **90**: 8392-8396.
222. Puck, T.T., Cieciura, S.J. and Robinson, A. (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med,* **108**: 945-956.
223. Tjio, J.H. and Puck, T.T. (1958) Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J Exp Med,* **108**: 259-268.
224. Hacker, D.L., De Jesus, M. and Wurm, F.M. (2009) 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here? *Biotechnol Adv,* **27**: 1023-1027.
225. Gillis, S. and Smith, K.A. (1977) Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature,* **268**: 154-156.
226. Finch, D.K., Midha, A., Buchanan, C.L., Cochrane, D., Craggs, R.I., et al. (2011) Identification of a potent anti-IL-15 antibody with opposing mechanisms of action in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol,* **162**: 480-490.
227. Weston, L., Geczy, A. and Farrell, C. (1998) A convenient and reliable IL-2 bioassay using frozen CTLL-2 to improve the detection of helper T lymphocyte precursors. *Immunol Cell Biol,* **76**: 190-192.
228. Avanzi, G.C., Lista, P., Giovinazzo, B., Miniero, R., Saglio, G., et al. (1988) Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features. *Br J Haematol,* **69**: 359-366.
229. Avanzi, G.C., Brizzi, M.F., Giannotti, J., Ciarletta, A., Yang, Y.C., et al. (1990) M-07e human leukemic factor-dependent cell line provides a rapid and sensitive bioassay for the human cytokines GM-CSF and IL-3. *J Cell Physiol,* **145**: 458-464.
230. Drexler, H.G., Zaborski, M. and Quentmeier, H. (1997) Cytokine response profiles of human myeloid factor-dependent leukemia cell lines. *Leukemia,* **11**: 701-708.
231. Lozzio, C.B. and Lozzio, B.B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood,* **45**: 321-334.
232. Ziegler, A., Laudien, D., Heinrichs, H., Muller, C., Uchanska-Ziegler, B., et al. (1981) K562 cells express human major histocompatibility antigens. *Immunogenetics,* **13**: 359-365.
233. Britten, C.M., Meyer, R.G., Kreer, T., Drexler, I., Wolfel, T., et al. (2002) The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays. *J Immunol Methods,* **259**: 95-110.
234. Wehler, T.C., Nonn, M., Brandt, B., Britten, C.M., Grone, M., et al. (2007) Targeting the activation-induced antigen CD137 can selectively deplete alloreactive T cells from antileukemic and antitumor donor T-cell lines. *Blood,* **109**: 365-373.
235. Greiner, D.L., Hesselton, R.A. and Shultz, L.D. (1998) SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells,* **16**: 166-177.
236. Shultz, L.D., Saito, Y., Najima, Y., Tanaka, S., Ochi, T., et al. (2010) Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r gamma(null) humanized mice. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **107**: 13022-13027.
237. Pascolo, S., Bervas, N., Ure, J.M., Smith, A.G., Lemonnier, F.A., et al. (1997) HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin

(beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med,* **185**: 2043-2051.

238. Han, K.P., Zhu, X., Liu, B., Jeng, E., Kong, L., et al. (2011) IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: high-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization. *Cytokine,* **56**: 804-810.
239. Bouchaud, G., Garrigue-Antar, L., Sole, V., Quemener, A., Boublik, Y., et al. (2008) The exon-3-encoded domain of IL-15ralpha contributes to IL-15 high-affinity binding and is crucial for the IL-15 antagonistic effect of soluble IL-15Ralpha. *J Mol Biol,* **382**: 1-12.
240. Topalis, D., Andrei, G. and Snoeck, R. (2013) The large tumor antigen: a "Swiss Army knife" protein possessing the functions required for the polyomavirus life cycle. *Antiviral Res,* **97**: 122-136.
241. Pipas, J.M. (1992) Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *J Virol,* **66**: 3979-3985.
242. Wong, H.C., Jeng, E.K. and Rhode, P.R. (2013) The IL-15-based superagonist ALT-803 promotes the antigen-independent conversion of memory CD8 T cells into innate-like effector cells with antitumor activity. *Oncoimmunology,* **2**: e26442.
243. Albrecht, J., Frey, M., Teschner, D., Carbol, A., Theobald, M., et al. (2011) IL-21-treated naive CD45RA+ CD8+ T cells represent a reliable source for producing leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes with high proliferative potential and early differentiation phenotype. *Cancer Immunol Immunother,* **60**: 235-248.
244. Micke, P., Mattsson, J.S., Edlund, K., Lohr, M., Jirstrom, K., et al. (2014) Aberrantly activated claudin 6 and 18.2 as potential therapy targets in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer,* **135**: 2206-2214.
245. Graf, T. *Krebs war 2013 die zweithäufigste Todesursache*, in *Pressemitteilung Nr. 34/15*. 2015, Statistisches Bundesamt Deutschland.
246. Al-Khami, A.A., Mehrotra, S. and Nishimura, M.I. (2011) Adoptive immunotherapy of cancer: Gene transfer of T cell specificity. *Self Nonself,* **2**: 80-84.
247. Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., Yang, J.C., Morgan, R.A. and Dudley, M.E. (2008) Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer,* **8**: 299-308.
248. Duitman, E.H., Orinska, Z., Bulanova, E., Paus, R. and Bulfone-Paus, S. (2008) How a cytokine is chaperoned through the secretory pathway by complexing with its own receptor: lessons from interleukin-15 (IL-15)/IL-15 receptor alpha. *Mol Cell Biol,* **28**: 4851-4861.
249. Saeed, S. and Revell, P.A. (2001) Production and distribution of interleukin 15 and its receptors (IL-15Ralpha and IL-R2beta) in the implant interface tissues obtained during revision of failed total joint replacement. *Int J Exp Pathol,* **82**: 201-209.
250. Ward, A., Anderson, M., Craggs, R.I., Maltby, J., Grahames, C., et al. (2009) E. coli expression and purification of human and cynomolgus IL-15. *Protein Expr Purif,* **68**: 42-48.
251. Eisenman, J., Ahdieh, M., Beers, C., Brasel, K., Kennedy, M.K., et al. (2002) Interleukin-15 interactions with interleukin-15 receptor complexes: characterization and species specificity. *Cytokine,* **20**: 121-129.
252. Heinzel, S.S., Krysan, P.J., Calos, M.P. and DuBridge, R.B. (1988) Use of simian virus 40 replication to amplify Epstein-Barr virus shuttle vectors in human cells. *J Virol,* **62**: 3738-3746.
253. Matz, B. (1989) Herpes simplex virus causes amplification of recombinant plasmids containing simian virus 40 sequences. *J Gen Virol,* **70 (Pt 6)**: 1347-1358.
254. Robbins, P.F., Dudley, M.E., Wunderlich, J., El-Gamil, M., Li, Y.F., et al. (2004) Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol,* **173**: 7125-7130.
255. Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Shelton, T.E., Even, J. and Rosenberg, S.A. (2003) Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother,* **26**: 332-342.
256. Liu, K. and Rosenberg, S.A. (2003) Interleukin-2-independent proliferation of human melanoma-reactive T lymphocytes transduced with an exogenous IL-2 gene is stimulation dependent. *J Immunother,* **26**: 190-201.

257. Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., et al. (2002) Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **99**: 16168-16173.
258. Blattman, J.N., Grayson, J.M., Wherry, E.J., Kaech, S.M., Smith, K.A., et al. (2003) Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nat Med,* **9**: 540-547.
259. Siegel, J.P. and Puri, R.K. (1991) Interleukin-2 toxicity. *J Clin Oncol,* **9**: 694-704.
260. Schwartz, R.N., Stover, L. and Dutcher, J. (2002) Managing toxicities of high-dose interleukin-2. *Oncology (Williston Park),* **16**: 11-20.
261. Bayer, A.L., Pugliese, A. and Malek, T.R. (2013) The IL-2/IL-2R system: from basic science to therapeutic applications to enhance immune regulation. *Immunol Res,* **57**: 197-209.
262. Rosenzwajg, M., Churlaud, G., Mallone, R., Six, A., Derian, N., et al. (2015) Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *J Autoimmun,* **58**: 48-58.
263. Waldmann, T.A. (2002) The IL-2/IL-15 receptor systems: targets for immunotherapy. *J Clin Immunol,* **22**: 51-56.
264. Zheng, L., Trageser, C.L., Willerford, D.M. and Lenardo, M.J. (1998) T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death. *J Immunol,* **160**: 763-769.
265. Rubinstein, M.P., Kovar, M., Purton, J.F., Cho, J.H., Boyman, O., et al. (2006) Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R{alpha}. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **103**: 9166-9171.
266. Bleakley, M., Turtle, C.J. and Riddell, S.R. (2012) Augmentation of anti-tumor immunity by adoptive T-cell transfer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol,* **5**: 409-425.
267. Williams, M.A. and Bevan, M.J. (2007) Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol,* **25**: 171-192.
268. Berger, C., Jensen, M.C., Lansdorp, P.M., Gough, M., Elliott, C., et al. (2008) Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest,* **118**: 294-305.
269. Staal, F.J. and Clevers, H. (2000) Tcf/Lef transcription factors during T-cell development: unique and overlapping functions. *Hematol J,* **1**: 3-6.
270. Gattinoni, L., Zhong, X.S., Palmer, D.C., Ji, Y., Hinrichs, C.S., et al. (2009) Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat Med,* **15**: 808-813.
271. Steinke, F.C., Yu, S.Y., Zhou, X.Y., He, B., Yang, W.J., et al. (2014) TCF-1 and LEF-1 act upstream of Th-POK to promote the CD4(+) T cell fate and interact with Runx3 to silence Cd4 in CD8(+) T cells. *Nature Immunology,* **15**: 646-656.
272. Gattinoni, L., Ji, Y. and Restifo, N.P. (2010) Wnt/beta-catenin signaling in T-cell immunity and cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res,* **16**: 4695-4701.
273. Eastman, Q. and Grosschedl, R. (1999) Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol,* **11**: 233-240.
274. Flynn, J.K. and Gorry, P.R. (2014) Stem memory T cells (TSCM)-their role in cancer and HIV immunotherapies. *Clin Transl Immunology,* **3**: e20.
275. Daudt, L., Maccario, R., Locatelli, F., Turin, I., Silla, L., et al. (2008) Interleukin-15 favors the expansion of central memory CD8+ T cells in ex vivo generated, antileukemia human cytotoxic T lymphocyte lines. *J Immunother,* **31**: 385-393.
276. Cieri, N., Camisa, B., Cocchiarella, F., Forcato, M., Oliveira, G., et al. (2013) IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood,* **121**: 573-584.
277. Liu, K., Catalfamo, M., Li, Y., Henkart, P.A. and Weng, N.P. (2002) IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **99**: 6192-6197.

278. Teague, R.M., Sather, B.D., Sacks, J.A., Huang, M.Z., Dossett, M.L., et al. (2006) Interleukin-15 rescues tolerant CD8+ T cells for use in adoptive immunotherapy of established tumors. *Nat Med,* **12**: 335-341.
279. Schietinger, A. and Greenberg, P.D. (2014) Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol,* **35**: 51-60.
280. Overgaard, N.H., Jung, J.W., Steptoe, R.J. and Wells, J.W. (2015) CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol,* **97**: 31-38.
281. Nascimbeni, M., Pol, S. and Saunier, B. (2011) Distinct CD4+ CD8+ double-positive T cells in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C. *PLoS One,* **6**: e20145.
282. Giraldo, N.A., Bolanos, N.I., Cuellar, A., Guzman, F., Uribe, A.M., et al. (2011) Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis,* **5**: e1294.
283. Wong, R.L., Liu, B., Zhu, X., You, L., Kong, L., et al. (2011) Interleukin-15:Interleukin-15 receptor alpha scaffold for creation of multivalent targeted immune molecules. *Protein Eng Des Sel,* **24**: 373-383.
284. Mortier, E., Bernard, J., Plet, A. and Jacques, Y. (2004) Natural, Proteolytic Release of a Soluble Form of Human IL-15 Receptor -Chain That Behaves as a Specific, High Affinity IL-15 Antagonist. *The Journal of Immunology,* **173**: 1681-1688.
285. Stoklasek, T.A., Schluns, K.S. and Lefrancois, L. (2006) Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J Immunol,* **177**: 6072-6080.
286. Perdreau, H., Mortier, E., Bouchaud, G., Sole, V., Boublik, Y., et al. (2010) Different dynamics of IL-15R activation following IL-15 cis- or trans-presentation. *Eur Cytokine Netw,* **21**: 297-307.
287. Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M.P., Surh, C.D. and Sprent, J. (2006) Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science,* **311**: 1924-1927.
288. Letourneau, S., van Leeuwen, E.M., Krieg, C., Martin, C., Pantaleo, G., et al. (2010) IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor alpha subunit CD25. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **107**: 2171-2176.
289. Boyman, O., Krieg, C., Letourneau, S., Webster, K., Surh, C.D., et al. (2012) Selectively expanding subsets of T cells in mice by injection of interleukin-2/antibody complexes: implications for transplantation tolerance. *Transplant Proc,* **44**: 1032-1034.
290. Finkelman, F.D., Madden, K.B., Morris, S.C., Holmes, J.M., Boiani, N., et al. (1993) Anti-cytokine antibodies as carrier proteins. Prolongation of in vivo effects of exogenous cytokines by injection of cytokine-anti-cytokine antibody complexes. *J Immunol,* **151**: 1235-1244.
291. Nam, H.J., Song, M.Y., Choi, D.H., Yang, S.H., Jin, H.T., et al. (2010) Marked enhancement of antigen-specific T-cell responses by IL-7-fused nonlytic, but not lytic, Fc as a genetic adjuvant. *Eur J Immunol,* **40**: 351-358.
292. Zheng, X.X., Steele, A.W., Nickerson, P.W., Steurer, W., Steiger, J., et al. (1995) Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *J Immunol,* **154**: 5590-5600.
293. Kobayashi, H., Tagaya, Y., Han, E.S., Kim, I.S., Le, N., et al. (1999) Use of an antibody against the soluble interleukin 2 receptor alpha subunit can modulate the stability and biodistribution of interleukin-2. *Cytokine,* **11**: 1065-1075.
294. Peleg-Shulman, T., Roisman, L.C., Zupkovitz, G. and Schreiber, G. (2004) Optimizing the binding affinity of a carrier protein: a case study on the interaction between soluble ifnar2 and interferon beta. *J Biol Chem,* **279**: 18046-18053.
295. Bessard, A., Sole, V., Bouchaud, G., Quemener, A. and Jacques, Y. (2009) High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Mol Cancer Ther,* **8**: 2736-2745.
296. Dubois, S., Patel, H.J., Zhang, M., Waldmann, T.A. and Muller, J.R. (2008) Preassociation of IL-15 with IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8+/CD44high T cells and its antitumor action. *J Immunol,* **180**: 2099-2106.

297. Bruhns, P. (2012) Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood,* **119**: 5640-5649.
298. Lightle, S., Aykent, S., Lacher, N., Mitaksov, V., Wells, K., et al. (2010) Mutations within a human IgG2 antibody form distinct and homogeneous disulfide isomers but do not affect Fc gamma receptor or C1q binding. *Protein Sci,* **19**: 753-762.
299. Ying, T., Chen, W., Gong, R., Feng, Y. and Dimitrov, D.S. (2012) Soluble monomeric IgG1 Fc. *J Biol Chem,* **287**: 19399-19408.
300. Ishikawa, F., Yasukawa, M., Lyons, B., Yoshida, S., Miyamoto, T., et al. (2005) Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood,* **106**: 1565-1573.
301. Distler, E., Bloetz, A., Albrecht, J., Asdufan, S., Hohberger, A., et al. (2011) Alloreactive and leukemia-reactive T cells are preferentially derived from naive precursors in healthy donors: implications for immunotherapy with memory T cells. *Haematologica,* **96**: 1024-1032.
302. Tietze, J.K., Wilkins, D.E., Sckisel, G.D., Bouchlaka, M.N., Alderson, K.L., et al. (2012) Delineation of antigen-specific and antigen-nonspecific CD8(+) memory T-cell responses after cytokine-based cancer immunotherapy. *Blood,* **119**: 3073-3083.
303. Decot, V., Voillard, L., Latger-Cannard, V., Aissi-Rothe, L., Perrier, P., et al. (2010) Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression. *Exp Hematol,* **38**: 351-362.
304. Hayakawa, Y. and Smyth, M.J. (2006) NKG2D and cytotoxic effector function in tumor immune surveillance. *Semin Immunol,* **18**: 176-185.
305. Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhang, J. and Tian, Z. (2008) Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine,* **42**: 128-136.
306. Wu, J. (2013) IL-15 Agonists: The Cancer Cure Cytokine. *J Mol Genet Med,* **7**: 85.
307. Hourigan, C.S. and Karp, J.E. (2013) Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol,* **10**: 460-471.
308. Hauwel, M. and Matthes, T. (2014) Minimal residual disease monitoring: the new standard for treatment evaluation of haematological malignancies? *Swiss Med Wkly,* **144**: w13907.
309. Waldmann, T.A., Lugli, E., Roederer, M., Perera, L.P., Smedley, J.V., et al. (2011) Safety (toxicity), pharmacokinetics, immunogenicity, and impact on elements of the normal immune system of recombinant human IL-15 in rhesus macaques. *Blood,* **117**: 4787-4795.
310. Ahmad, A., Ahmad, R., Iannello, A., Toma, E., Morisset, R., et al. (2005) IL-15 and HIV infection: lessons for immunotherapy and vaccination. *Curr HIV Res,* **3**: 261-270.
311. Mastroianni, C.M., d'Ettorre, G., Forcina, G. and Vullo, V. (2004) Teaching tired T cells to fight HIV: time to test IL-15 for immunotherapy? *Trends Immunol,* **25**: 121-125.
312. Mueller, Y.M. and Katsikis, P.D. (2010) IL-15 in HIV infection: pathogenic or therapeutic potential? *Eur Cytokine Netw,* **21**: 219-221.
313. Cheng, L., Li, F., Bility, M., Chi, L. and Su, L. (2014) Hyper-IL15 enhances human immune function and suppresses hepatitis B virus replication in humanized mice with both human liver and immune system (VAC12P.1024) *The Journal of Immunology,* **192**.
314. Fehniger, T.A., Suzuki, K., Ponnappan, A., VanDeusen, J.B., Cooper, M.A., et al. (2001) Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med,* **193**: 219-231.
315. Mishra, A., Liu, S., Sams, G.H., Curphey, D.P., Santhanam, R., et al. (2012) Aberrant overexpression of IL-15 initiates large granular lymphocyte leukemia through chromosomal instability and DNA hypermethylation. *Cancer Cell,* **22**: 645-655.
316. Mishra, A., Sullivan, L. and Caligiuri, M.A. (2014) Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. *Clin Cancer Res,* **20**: 2044-2050.

7 Anhang

7.1 Plasmidkarten

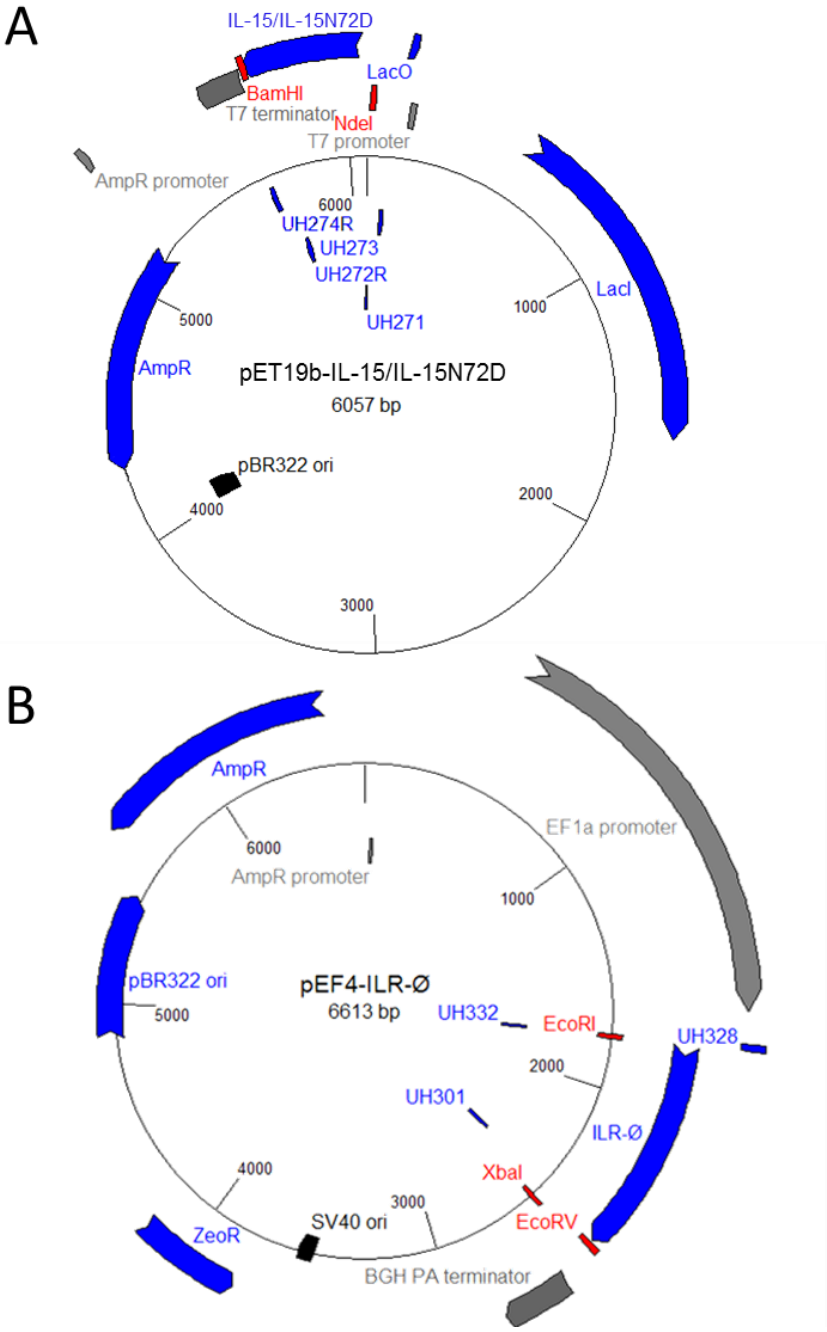


Abbildung 41: Plasmidkarte von pET19b-IL-15/IL-15N72D und pEF4-ILR-Fc.. A) Die Expressionsvektoren für IL-15 und IL-15N72D unterscheiden sich lediglich in der N72D-Punktmutation und wurden in einer Karte zusammengefasst. B) AmpR = Ampicillin-Resistenz; AmpR promoter = Promotor des AmpR-Gens; ZeoR = Zeocin-Resistenz; LacO = Repressorbindestelle aus dem Laktose Operon; lacI = Repressor aus dem Laktose-Operon; T7 promotor = Promotorregion für die T7-RNA-Polymerase; T7 terminator = Terminatorregion für die T7-RNA-Polymerase; pBR322 ori = Replikationsursprung; UH271-UH274 = Primerbindestellen für Klonierung und Sequenzierung

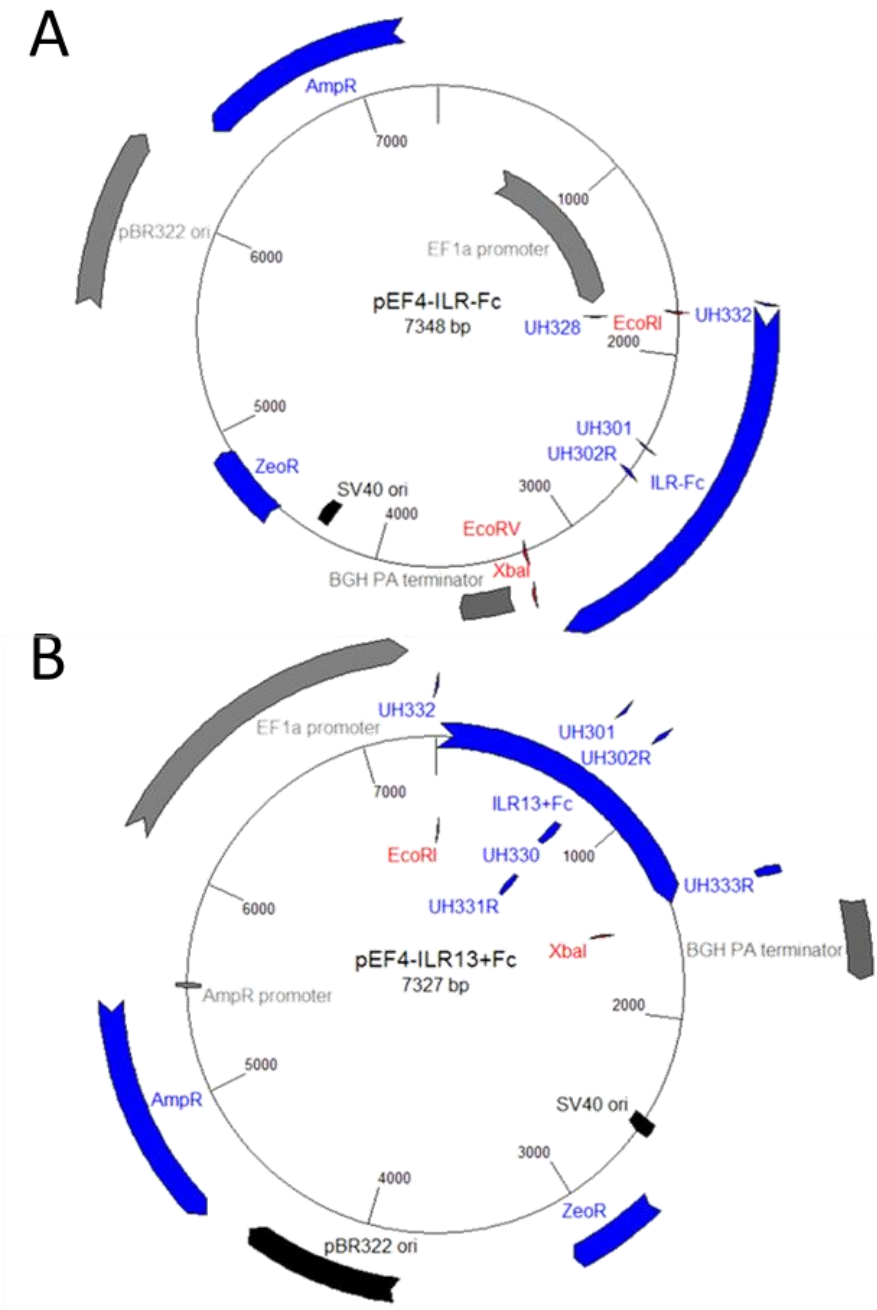


Abbildung 42: Plasmidkarte von pEF4-ILR-Fc und pEF4-ILR13^{+}-Fc. A) pEF4-ILR-Fc B) pEF-ILR13^{+}-Fc AmpR = Ampicillin-Resistenz; AmpR promoter = Promotor des AmpR-Gens; ZeoR = Zeocin-Resistenz; BGH PA terminator = Terminatorregion für die RNA-Polymerase; pBR322 ori = Replikationsursprung; UH301-UH333 = Primerbindestellen für Klonierung und Sequenzierung

7.2 Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure (engl.: *amino acid*)
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod (engl.: *activation induced cell death*)
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: *analysis of variance*)
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl.: *antigen presenting cell*)
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	Engl.: *American Type Culture Collection*
B6-OT-1	C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J
Bcl-2	B-Zelllymphom 2 (engl.: *B-cell lymphoma 2*)
BGH	Engl.: *Bovine growth hormone*
BRCA1	Engl.: *Breast cancer 1*
c.i.v.	Kontinuierlich intravenös
CAD	Engl.: *Caspase activated DNase*
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CCR7	Engl.: *C-C chemokine receptor type 7*
CD	Engl.: *Cluster of differentiation*
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CHO	Engl.: *Chinese hamster ovarian*
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CLS	Kapillarlecksyndrom (*capillary leak syndrome*)
CML	Chronische myeloische Leukämie
CO2	Kohlendioxid
CPM	Engl.: *Counts per minute*
Cys	Cystein
DC	Dendritische Zelle (engl.: *dendritic cell*)
ddH_2O	Doppelt destilliertes Wasser
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
DMEM	Engl.: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: *deoxyribonucleic acid*)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	Lat.: *Escherichia coli*
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	Verstärkte Chemolumineszenz (engl.: *enhaced chemoluminescence*)
ED_{50}	Effektivdosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Engl.: *Epidermal growth factor receptor*
ELISA	Engl.: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
ELISpot	Engl.: *Enzyme Linked Immuno Spot Assay*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	Engl.: *Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing*
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (engl.: *fluorescence-activated cell sorting*)
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl.: *forward scatter*)
GC-Linker	Glycin-Cystein-Linkerpeptid
GM-CSF	Engl.: *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl.: *graft-versus-host disease*)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (engl.: *graft-versus-leukemia effect*)
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde (engl.: *society of laboratory animals*)
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEK	Engl.: *Human embryonic kidney*
HER2	Engl.: *Human epidermal growth factor receptor 2*
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: *horse radish peroxidase*)
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (engl.: *hematopoietic stem cell*)
HSCT	Hämatopoetische Stammzeltransplantation
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IFN	Inteferon
IgG1	Immunglobulin G1
IL	Interleukin
IL-15R	Interleukin-15-Rezeptor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITAM	Engl.: *Immunoreceptor tyrosine based activation motif*
JAK	Januskinase
K_d	Dissoziationskonstante
LB	Engl.: *lysogeny broth*
LCK	Engl.: *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*
LEF	Engl.: *Lymphoid enhancer-binding factor*
LSP	Langes Signalpeptid (engl.: *long signal petide*)
LTA	Großes T-Antigen (engl.: *large T antigen*)
mAB	Monokolonaler Antikörper (engl.: *monoclonal antibody*)
MACS	Magnetische Zellseparation (engl.: *magnetic activated cell sorting*)
MAP-Kinase	Engl.: *Mitogen-activated protein*
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl.: *multiple cloning site*)
Mel-A	Melan-A
MetOH	Methanol
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mHags	Minorhistokompatibilitätsantigen (engl.: *minor histocompatibility antigen*)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: *major histocompatibility complex*)
MRD	Minimale Resterkrankung (engl.: *minimal residual disease*)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: *messenger RNA*)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	Engl.: *Molecular weight cutoff*
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHPO4	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEAAs	Nicht-essentielle Aminosäuren (engl.: *non-essential amino acids*)
NF-κB	Engl.: *Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells*
NKG2D	Engl.: *Natural-killer group 2, member D*
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSG	NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/Sz
NSG-HLA-A2/HHD	NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1WjlTg(HLA-A/H2-D/B2M)1Dvs/SzJ

OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung (engl.: *origin of replication*)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMCs	Engl.: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: *phosphate buffered saline*)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*)
PD-1	Engl.: *Programmed cell death 1*
PD-L1	Engl.: *Programmed cell death ligand 1*
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin, Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLCγ1	Phosphoinositid-Phospholipase Cγ1
PRKDC	Engl.: *Protein Kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rcf	Relative Zentrifugalkraft (engl.: *relative centrifugal force*)
s.c.	Subkutan
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase (engl.: *shrimp alkaline phosphatase*)
scTCR	Einzelketten T-Zell-Rezeptor (engl.: *single chain T cell receptor*)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: *sodium dodecyl sulfate*)
SHC	Engl.: *Src homology and collagen protein*
SRC	Engl.: *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase cellular sacroma*
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl.: *sideward scatter*)
SSP	Kurzes Signalpeptid (engl.: *short signal peptide*)
STAT	Engl.: *Signal transducer and activator of transcription*
STAT	Engl.: *Signal transducer and activator of transcription*
SV40	Simianvirus 40
SYK	Engl.: *Spleen tyrosine kinase*
TAA	Tumorassoziiertes Antigen (engl.: *tumor associated antigen*)
TAP	Engl.: *Transporters associated with antigen processing*
TARC	Engl.: *Translational Animal Research Center Mainz*
TCA	Trichloressigsäure
TCF	Engl.: *T cell factor*
T_{CM}	Zentrale T-Gedächtniszelle (engl.: *central memory T cell*)
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl.: *T cell receptor*)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TILs	Tumorinfiltrierende Lymphozyten (engl.: *tumor infiltrating lymphocytes*)
T_{REG}	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Tumorspezifisches Antigen (engl.: *tumor specific antigen*)
T_{SCM}	Stammzellähnliche T-Gedächtniszelle (engl.: *stem cell like memory T cell*)
VEGF	Engl.: *Vascular endothelial growth factor*
Wnt	Engl.: *Wingless int-1*
β2M	Beta-2-Mikroglobulin