

Identifizierung und Charakterisierung T-zellerkanter Tumorantigene im Melanommodell MZ7

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Volker Lennerz
geb. in Hörstel (NRW)

Mainz, 2002

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Erkennung von Tumoren durch das Immunsystem.....	1
1.2 T-zellvermittelte Immunantworten	4
1.3 Das maligne Melanom als Modell für Tumorimmunologie	5
1.4 Methoden zur Charakterisierung von Tumorantigenen.....	5
1.4.1 cDNA-Expressionsklonierung.....	6
1.4.2 Biochemische Verfahren	7
1.4.3 „Reverse Immunologie“	8
1.5 T-zellerkannte Antigene menschlicher Tumoren.....	9
1.5.1 „Cancer/Testis“-Antigene.....	9
1.5.2 Differenzierungsantigene.....	10
1.5.3 Überexprimierte Antigene	10
1.5.4 Strukturalterierte Antigene	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Plastikwaren.....	15
2.1.3 Glaswaren.....	16
2.1.4 Chemikalien	17
2.1.5 Substanzen für die Bakterienkultur	18
2.1.6 Substanzen für die Zellkultur	18
2.1.7 Enzyme.....	19
2.1.8 Zytokine.....	19
2.1.9 Molekulargewichtsmarker.....	19
2.1.10 Kits	20
2.1.11 Bakteriennährmedien.....	20
2.1.12 Zellkulturmedien	21
2.1.13 Allgemeine Puffer und Lösungen	22
2.1.14 Bakterien.....	23

2.1.15	Plasmide und cDNA-Banken	24
2.1.16	Monoklonale Antikörper	25
2.1.17	Zelllinien	26
2.1.18	Oligonukleotide	28
2.1.19	Synthetische Peptide	30
2.1.20	ELISPOT-Experimente	32
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Zellkultur	34
2.2.2	Langzeitkultur melanomreaktiver zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL)	35
2.2.3	Isolierung peripherer Blutlymphozyten aus Vollblut	35
2.2.4	Generierung tumorspezifischer CD8 ⁺ T-Lymphozyten	35
2.2.5	Zytotoxizitätstest.....	36
2.2.6	TNF-Test.....	37
2.2.7	Gamma-Interferon- und „Granzyme B“-ELISPOT-Assays	37
2.2.8	Durchflusszytometrie	40
2.2.9	Transiente Transfektion von COS-7-Zellen und 293T-Zellen.....	40
2.2.10	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.11	Antikörperblockade der T-Zellen	48
2.2.12	Klonierung antigenkodierender cDNA durch cDNA-Expressionsklonierung	49
2.2.13	Generierung und Klonierung von Fragmenten antigenkodierender cDNA....	49
2.2.14	Peptiderkennungstests	51
2.2.15	Computer-gestützte Datenbanksuchen.....	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Funktionsanalysen tumorreaktiver T-Lymphozyten.....	54
3.1.1	Zytokinprofile tumorreaktiver T-Lymphozyten und die Kinetik ihrer Produktion nach Antigenkontakt	54
3.1.2	Anti-HLA-Antikörperblockade in ELISPOT-Assays.....	57
3.1.3	Funktionalität kryokonservierter tumorreaktiver T-Zellpopulationen unmittelbar nach dem Auftauen	60
3.2	Generierung und Testung tumorreaktiver MLTCs im Modell MZ7	62
3.2.1	Analyse der Spezifität bereits etablierter MLTCs mit Hilfe von ELISPOT-Assays.....	62
3.2.2	Generierung und Testung neuer tumorreaktiver T-Zellpopulationen	66
3.3	Charakterisierung eines neuen T-zellerkannten Peptids aus dem Melanozyten-Differenzierungsantigen gp100.....	72

3.3.1	Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der gp100-cDNA	72
3.3.2	Identifizierung des T-zellerkannten, über HLA-B7.2 präsentierten gp100-Peptidepitops	74
3.4	Identifizierung des über HLA-A26.1 präsentierten Tyrosinase-Peptids.....	77
3.5	Charakterisierung eines neuen T-zellerkannten Melanomantigens	81
3.5.1	Identifizierung eines neuen tumorassoziierten Antigens durch cDNA-Expressionsklonierung: <i>GPNMB^{mutiert}</i>	82
3.5.2	Eine Punktmutation generiert ein T-zellerkanntes Melanomantigen: <i>GPNMB^{G181D}</i>	84
3.5.3	Erkennung von <i>GPNMB^{G181D}</i> durch unabhängig generierte MLTCs	88
3.5.4	Expression von <i>GPNMB^{mutiert}</i> und/oder <i>GPNMB/INT4</i> in verschiedenen Tumoren.....	89
4	Diskussion	94
4.1	Identifizierung T-zellerkannter Antigene durch cDNA-Expression in COS-7-Zellen.....	94
4.2	Die Verwendung nichtklonaler T-Zellpopulationen für die Suche nach Tumorantigenen.....	101
4.3	Tyrosinase und gp100 als Zielantigene für therapeutische Immunisierungen gegen Melanome	105
4.4	Tumorspezifische Antigene für Immuntherapien.....	107
4.5	Welches sind die relevanten Tumorabstoßungsantigene?.....	112
4.6	Die fortgesetzte Suche nach T-zellerkannten Tumorantigenen.....	119
4.7	Einordnung der Arbeit in aktuelle Konzepte der Tumorimmunologie	121
5	Zusammenfassung	125
6	Literaturverzeichnis	127
7	Anhang	147
8	Abkürzungsverzeichnis	150

1 Einleitung

1.1 Erkennung von Tumoren durch das Immunsystem

Erste Beobachtungen über den Einfluss des Immunsystems auf Krebserkrankungen wurden im 19. Jahrhundert berichtet. William Coley beschrieb 1893 die Verwendung von Bakterienextrakten zur unspezifischen Stimulation des Immunsystems von Tumorpatienten. Sporadisch kam es dadurch zu Tumorregressionen [1]. Mit besserem Verständnis für die Funktionen und Prozesse des Immunsystems wurde 1957 von Macfarlane Burnet postuliert, dass das Immunsystem neu exprimierte Antigene auf Tumoren erkennen und die Regression von Tumoren bewirken kann. Er prägte zehn Jahre später den Begriff der „Immunosurveillance“, also der Überwachung von Tumorerkrankungen durch das Immunsystem [1;2]. Diesem Konzept wurde zunächst mit Skepsis begegnet. Aber durch den Erkenntnisgewinn über Tumor-Wirt-Interaktionen auf molekularer Ebene innerhalb der letzten 15 Jahre wurde zumindest die Kritik an dem fehlenden Wissen über die Antigenität der Tumoren ausgeräumt [3]. Insbesondere die Pionierarbeiten von Thierry Boon und seinen Kollegen zeigten, dass karzinogen-induzierte Tumoren in der Maus durch T-Zellen, die punktmutierte tumorspezifische Antigene erkennen können, abgestoßen werden. Diese Arbeiten haben die intensive Suche nach tumorspezifischen Antigenen auch in spontan entstehenden menschlichen Tumoren initiiert [4-6]. Darüber hinaus haben Fortschritte bei der Identifizierung von molekularen Prozessen, welche die Aktivierung von Komponenten des Immunsystems, z. B. der T-Zellen, regulieren sowie Erkenntnisse über Mechanismen, die es dem Tumor ermöglichen, der Kontrolle durch das Immunsystem zu entkommen, neue Möglichkeiten der Immuntherapie von Tumorerkrankungen eröffnet.

Aus verschiedenen Forschungsrichtungen kamen Hinweise auf Möglichkeiten und Limitierungen der natürlichen Kontrolle von Tumorzellen durch das Immunsystem. Dazu zählen: (1) die Identifizierung immunogener tumorassoziierter Antigene auf molekularer Ebene; (2) die Feststellung, dass für die Induktion einer effektiven T-Zellimmunität die Aktivierung professioneller antigenpräsentierender Zellen (insbesondere Dendritischer Zellen) erforderlich ist; (3) neue Erkenntnisse über regulatorische T-Zellen, die eine Erkennung von eigenem Gewebe, inklusive Tumoren, durch T-Zellen inhibieren können [1]. Untersuchungen zur Tumorkontrolle durch das Immunsystem zeigen, dass sowohl Mechanismen der angeborenen als auch der adaptiven/erworbenen Immunität daran beteiligt sind. Zu den Effektorzellen der *angeborenen Immunität* zählen z. B. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und eine Gruppe von T-Zellen, die NK-Zellrezeptoren

exprimieren (NKT-Zellen). NK-Zellen interagieren mit Zellen, die MHC Klasse I-Moleküle und MHC Klasse I-ähnliche Moleküle (z. B. MICA und MICB) exprimieren [1;7]. Die Interaktion des sogenannten „Killer Inhibitory Receptors“ (KIR) der NK-Zellen mit konventionellen MHC Klasse I-Molekülen auf der Zielzelle führt zur Inhibition der Effektorfunktion der NK-Zelle. Andererseits werden MHC-Klasse I-negative Zellen spontan von NK-Zellen lysiert, also auch Tumorzellen, die im Verlauf der Progression MHC-Moleküle verlieren [1;8]. Dennoch können MHC Klasse I-positive Tumorzellen von NK-Zellen lysiert werden, wenn sie MICA oder MICB präsentieren. Diese stressinduzierten, nicht-klassischen MHC I-Moleküle werden durch den NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen erkannt und aktivieren die NK-Zelle. Die Aktivierung erfolgt auch dann, wenn gleichzeitig eine KIR-MHC I-Interaktion stattfindet [1;7;9].

Auch Makrophagen und NKT-Zellen exprimieren neben einigen inhibitorischen Rezeptoren den aktivierenden NKG2D-Rezeptor und können damit gleichfalls mit stressinduzierten MICA- und MICB-Molekülen interagieren. Es wird angenommen, dass Ereignisse, die zur Transformation von normalen zu malignen Zellen führen können, wie zum Beispiel oxidativer Stress, auch zur Expression der MHC I-ähnlichen Moleküle führen. Hierdurch aktivierte Makrophagen stimulieren NKT-Zellen, die ihrerseits die Aktivität von NK-Zellen und CD8-positiven ($CD8^+$) T-Zellen regulieren können. Das angeborene Immunsystem kann durch diese Effektorzellen transformierte Zellen zu einem frühen Zeitpunkt erkennen und bekämpfen [1;10].

Eine *adaptive Immunität* gegen spontan entstehende Tumoren hängt wahrscheinlich von der Aufnahme tumorassoziierter Antigene durch professionelle antigenpräsentierende Zellen ab (insbesondere durch Dendritische Zellen, DCs), welche diese zu peripheren Lymphknoten transportieren, prozessieren und für CD4-positiven ($CD4^+$) T-Zellen über MHC Klasse II-Moleküle und CD8⁺ T-Zellen über MHC Klasse I-Moleküle präsentieren. Dieses Konzept der Kreuzpräsentation („cross-priming“, „cross-presentation“) von Tumorantigenen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen für T-Lymphozyten wird derzeit kontrovers diskutiert [11-14]. Es spricht vieles dafür, dass die Präsentation der Antigene durch DCs allein nicht ausreichend ist, um eine Immunantwort zu initiieren [12]. Die in der Peripherie vorhandenen, unreifen DCs werden in der Tumorumgebung durch Zytokine oder andere Signale, die z. B. von zugrundegehenden Tumorzellen ausgehen (Hitzeschockproteine, freie Nukleotide, reaktive Sauerstoffmetabolite o. ä.), zur Ausreifung veranlasst und aktiviert [1;15]. Sie steigern dadurch die MHC I- und MHC II-Expression, exprimieren kostimulatorische Moleküle wie B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) und exprimieren den CD40-Rezeptor, der wichtig ist für die Aktivierung von CD4⁺ T-Helferzellen über den von ihnen exprimierten CD40-Liganden. Erst reife, aktivierte DCs sind in der Lage, eine T-zelluläre Immunantwort auszulösen. Die Antigenpräsentation durch unreife DCs sowie durch Zellen, die keine kostimulatorischen Moleküle exprimieren, wie z. B. Tumorzellen, löst bei naiven T-

Zellen Toleranz aus [1;16;17]. Die Antigenerkennung auf und Kostimulation sowie Aktivierung durch reife DCs führt bei CD4⁺ T-Zellen zur Differenzierung zu T-Helferzellen, die ihrerseits die Differenzierung und Funktionen von B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen unterstützen. CD8⁺ T-Zellen, die ein Antigen auf einer reifen DC erkennen und kostimuliert werden, proliferieren und differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen (CTL), die in periphere Gewebe wandern und Tumorzellen angreifen können. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen benötigen im Stadium ausdifferenzierter aktivierter Effektorzellen bei erneutem Antigenkontakt keine weitere Kostimulation. In der Peripherie unterstützen die CD4⁺ T-Helferzellen die durch CD8⁺ CTL vermittelte Antwort gegen den Tumor, z. B. durch die Sekretion des T-Zellwachstumsfaktors Interleukin-2 (IL-2). Auch B-zellvermittelte Antworten werden durch die Sekretion weiterer Zytokine der CD4⁺ T-Helferzellen unterstützt. Außerdem aktivieren die T-Helferzellen über CD40-Ligand/CD40-Rezeptor-Interaktion weitere antigenpräsentierende Zellen [1].

Anhaltspunkte für die Fähigkeit des menschlichen Immunsystems, etablierte invasive Tumoren zu kontrollieren, kamen aus Einzelbeobachtungen zur Präsenz tumorreaktiver T-Zellen in regredienten Tumoren und aus Studien zur Behandlung insbesondere von Patienten mit malignen Melanomen und Nierenzellkarzinomen durch Hochdosis-IL-2-Therapie. Diese unspezifische Aktivierung der T-Zellimmunität führte in einigen Patienten zu langanhaltenden Remissionen großer Tumormassen und Metastasen in unterschiedlichen Organen [3;18]. Das Wissen über die Antigenität von Tumoren in Tiermodellen zusammen mit diesen Beobachtungen motivierten zur Suche nach den molekularen Mechanismen für die immunologische Tumorkontrolle in Patienten. Da Tiermodelle zeigten, dass eher zelluläre als humorale Immunantworten zur Tumorabstoßung führen, begann die intensive Suche nach T-zellerkannten Antigenen auf menschlichen Tumoren [3;19]. Seitdem wurden über verschiedene Methoden eine Reihe tumorassoziierter Antigene identifiziert (siehe 1.5). Dennoch ist bisher nicht geklärt, welche Antigene für eine Tumorabstoßung relevant sind und damit am besten für therapeutische Immunisierungen von Tumorkranken eingesetzt werden können.

1.2 T-zellvermittelte Immunantworten

Neben der molekularen Charakterisierung T-zellerkannter Antigene wurden in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte in der phänotypischen Beschreibung antigenreaktiver T-Zellpopulationen gemacht. Mehrere Arbeiten beschrieben die lineare Differenzierung von der antigenunerfahrenen naiven T-Zelle zu Effektor- und „Memory“-Zellen (Gedächtniszellen) anhand von Zelloberflächenrezeptoren [20-22]. Es wird davon ausgegangen, dass aus naiven T-Zellen (Oberflächenmarker: CD45RA⁺CCR7⁺; ca. 5 % des peripheren T-Zellrepertoires) nach geeignetem Antigenkontakt eine primäre Effektorpopulation hervorgeht, die z. B. eine virale Infektion beseitigt, indem alle virusinfizierten Zellen lysiert werden. Aus einem Teil der Effektoren gehen „Memory“-Zellen hervor (CD45RA⁻CCR7⁺), die einen lebenslangen Schutz vor Neuinfektionen durch dasselbe Pathogen gewährleisten. Zusätzlich zu den sogenannten zentralen „Memory“-Zellen gehen aber – und das ist neu – aus der Primärantwort auch Effektor-„Memory“-Zellen hervor (CD45RA⁻CCR7⁻), die andere sogenannte „Homing“-Eigenschaften besitzen als die zentralen „Memory“-Zellen [23;24]. Diese Effektor-„Memory“-Zellen wandern in die Peripherie, die zentralen „Memory“-Zellen in lymphatische Organe. Die Effektor-„Memory“-Population reagiert bei Antigenkontakt sehr schnell und differenziert zu terminalen Effektoren (CD45RA⁺CCR7⁻), die nach Ausführung der Effektorfunktionen zugrunde gehen.

Zusätzlich zur Beschreibung der Ausstattung an Membranrezeptoren der einzelnen Subpopulationen wurden die T-Zelldifferenzierungsstadien auch funktionell besser charakterisiert. Effektor- und „Memory“-T-Zellen haben im Gegensatz zu naiven T-Zellen effizientere Signaltransduktionsmechanismen und können unabhängig von kostimulatorischen Molekülen (z. B. CD28) auf ihr Antigen reagieren. Daraus resultiert eine niedrige Aktivierungsschwelle für die Effektor- und „Memory“-Zellen, die eine schnellere Proliferation und Ausführung von mehreren Effektorfunktionen gleichzeitig ermöglicht [25;26]. Die Effektorzellen und die „Memory“-Zellen können zusätzlich zu den Oberflächenrezeptoren ebenfalls anhand ihrer Effektorfunktionen unterschieden werden. Humane CD8⁺ „Memory“-Zellen reagieren auf Antigenkontakt mit IFN γ -, TNF-, IL-2- und IL-4-Freisetzung, während ihre lytischen Funktionen durch Perforin und „Granzyme“ (eine Familie unterschiedlicher Proteasen, „Granzyme B“ ist in DNA-Fragmentierung und damit Apoptoseinduktion involviert [27]), im Vergleich zur Effektorpopulation, reduziert sind. Effektorzellen lysieren ihre Zielzellen aufgrund größerer Mengen an präformierten Vesikeln mit Perforin und „Granzyme“ zwar besser als „Memory“-Zellen, setzen IFN γ und TNF frei, können allerdings kein IL-2 und IL-4 mehr sezernieren [28].

1.3 Das maligne Melanom als Modell für Tumorimmunologie

Das maligne Melanom ist der bösartigste Tumor der Haut mit weltweit steigender Inzidenz [29]. Melanome entstehen aus Pigmentzellen, Melanozyten, die in der gesamten Haut vorkommen, die aber auch in anderen Epithelien, im Auge, Innenohr und in den weichen Hirnhäuten zu finden sind [30]. Der Großteil tumorimmunologischen Wissens beim Menschen wurde in Melanommodellen gewonnen. Dies hat eher praktische Gründe als immunologische. Melanome sind leichter als die meisten anderen Tumoren in Gewebekultur zu etablieren. Dadurch konnten einige autologe Melanommodelle schon relativ früh erfolgreich auf Antikörper- und T-Zellantworten untersucht werden. Da viele Onkologen feststellen mussten, dass Melanome häufig resistent gegenüber traditionellen Chemo- und Bestrahlungstherapien sind, fiel es ihnen leicht, eine Immuntherapie als Alternative zu den Standardtherapien anderer solider Tumoren zu testen [30]. Argumente aus immunologischer Sicht für die Verwendung von Melanomen als Modell für Tumorimmunologie sind das Ansprechen von Immuntherapien bei einigen Patienten und das Vorkommen melanomreaktiver T-Zellen in tumorinfiltrierten Lymphknoten, peripheren Blutlymphozyten und Hautmetastasen von Patienten [5;30;31]. Ähnliche Befunde gibt es allerdings auch bei anderen Tumoren, wie z. B. Nierenzellkarzinomen.

Zunächst erhobene Argumente, dass Melanome im Hinblick auf die Überwachung durch das Immunsystem eine Sonderstellung unter den Tumorerkrankungen einnehmen, werden inzwischen als schwach angesehen. So sind z. B. Spontanregressionen von Melanomen, da sie pigmentiert sind und häufig in die Haut metastasieren, leichter zu sehen als bei anderen Tumoren. Die steigende Anzahl der vom Immunsystem erkannten Tumorantigene aus anderen Tumorarten relativiert die Sonderstellung der Melanome [30].

1.4 Methoden zur Charakterisierung von Tumorantigenen

Seit der Identifizierung der ersten T-zellerkannten Tumorantigene in Mausmodellen [4] wurde eine Reihe tumorassoziierter Antigene in spontan entstandenen menschlichen Tumoren entdeckt (siehe unten). Zunächst wurde fast ausschließlich nach Antigenen gesucht, die über MHC Klasse I-Moleküle tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen präsentiert wurden. Inzwischen haben aber Erkenntnisse über die Bedeutung von MHC Klasse II-präsentierten Epitopen dazu geführt, dass die Liste der Klasse II-Epitope ständig erweitert wird [5;32-34]. Für die Identifizierung von Tumorantigenen wurden hauptsächlich die drei folgenden Ansätze verfolgt.

1.4.1 cDNA-Expressionsklonierung

Hier sind zwei Techniken einzuordnen, denen gemeinsam ist, dass sie mit Hilfe autologer Effektoren des Immunsystems, tumorreaktiven T-Zellklonen und Serumantikörpern, in Expressionsbibliotheken von Tumoren nach Antigenen suchen.

1.4.1.1 cDNA-Expressionsklonierung mit Hilfe von tumorreaktiven T-Zellen

Die Methode, mit der MAGE-1 als erstes menschliches Tumorantigen entdeckt wurde, basiert auf der Isolierung zytotoxischer T-Zellklone, die Spezifität für den autologen Tumor aufweisen [35]. Die T-Zellen werden auf Erkennung von Transfektanten überprüft, die mit genetischem Material aus Tumorzellen transfiziert sind. Für die Identifizierung von MAGE-1 wurden für die Transfektion Antigen-Verlustvarianten der Tumorzelllinie verwendet, die dadurch selektioniert wurden, dass sie von einem bestimmten T-Zellklon nicht mehr erkannt wurden. Transfiziert wurde eine Cosmid-Bibliothek der erkannten Tumorzelllinie und die Transfektanten wurden anschließend mit Hilfe des T-Zellklones auf Erkennung getestet. Aus erkannten Transfektanten wurde mit Hilfe der Cosmidsequenz das Gen MAGE-1 identifiziert [35]. Weil die Antigenidentifizierung aus Cosmid-Banken auf der stabilen Transfektion von Tumorzellen beruht, ist die Methode schwierig und zeitaufwendig. Die transiente Transfektion von COS-7-Zellen mit cDNA-Bibliotheken von Tumorzellen erwies sich als bahnbrechend [36-38]. Die Herstellung von Tumor-cDNA-Banken erfolgt unter Verwendung eukaryontischer Expressionsvektoren. COS-7-Zellen werden mit HLA-cDNA und der Tumor-cDNA kotransfiziert und mit T-Zellklonen, die durch das kotransfizierte HLA-Allel restringiert sind, auf Erkennung getestet. Die Expressionsvektoren werden in den COS-7-Zellen episomal multipliziert, wodurch zusätzlich zur starken Expression durch die verwendeten Promotoren auf dem Vektor die Bildung großer Protein- und damit Antigenmengen in den COS-7-Zellen erreicht wird. Die Identifizierung eines T-zellerkannten cDNA-Klons aus der Tumor-cDNA-Bibliothek wird dadurch erreicht, dass im ersten Schritt cDNA-Pools aus 100-200 Bakterienkolonien pro Versuchsansatz transfiziert und getestet werden. Ein von einem T-Zellklon erkannter Pool wird im zweiten Schritt in kleinere cDNA-Pools von z. B. zehn Bakterienkolonien pro Transfektionsansatz getestet. Aus einem erkannten 10er-Pool werden anschließend einzelne cDNA-Klone präpariert und mit dem T-Zellklon auf Erkennung überprüft. Die peptidkodierende Region der cDNA wird danach durch Transfektion von subklonierten Fragmenten der cDNA eingegrenzt. Von einem erkannten cDNA-Fragment kodierte Peptide werden abschließend synthetisiert und auf Erkennung durch den T-Zellklon getestet.

1.4.1.2 SEREX (serological analysis of recombinant expression libraries)

SEREX beruht auf der Erkennung von Tumorantigenen, die von λ -Phagen-Bibliotheken exprimiert werden, durch autologe IgG-Antikörper im Serum von Krebspatienten [39;40]. Obwohl das Verfahren noch relativ jung ist, gibt es bereits eine große Anzahl SEREX-definierter Antigene, die in einer Datenbank des Ludwig-Institut für Krebsforschung veröffentlicht sind (<http://www.licr.org/SEREX.htm>). Manche der durch Antikörper entdeckten Melanomantigene wurden zuvor bereits mit Hilfe von T-Zellklonen identifiziert. Daher wird angenommen, dass humorale und T-zelluläre Anti-Tumorantworten bezüglich der Erkennung bestimmter Antigene überlappen könnten. Daraus resultiert die Hoffnung, dass neue, durch SEREX definierte Antigene, benutzt werden könnten, zytotoxische T-Zellen zu stimulieren, die Tumoren lysieren können. Für das durch SEREX identifizierte Antigen NY-ESO-1 z. B. liegen in einigen Patienten gleichzeitig relativ starke T- und B-Zellantworten vor [33;40;41].

1.4.2 Biochemische Verfahren

Der „biochemische“ Ansatz zur Identifizierung von Tumorantigenen beruht auf der Säureelution von HLA Klasse I-gebundenen Peptiden von Tumorzellen, die nach Fraktionierung durch HPLC (high performance liquid chromatography) auf Erkennung durch tumorreaktive T-Zellklone getestet werden. Dazu werden die Peptidfraktionen entweder auf autologe antigenpräsentierende Zellen oder HLA-passende allogene antigenpräsentierende Zellen geladen und diese auf Lyse durch CTL getestet [42]. Aufgrund geringer Peptidmengen werden die Peptidfraktionen meistens durch Tandemmassenspektrometrie untersucht. Dadurch erhaltene Teilsequenzen von Peptiden werden anschließend durch intensive Datenbankanalysen vervollständigt und das für das Antigen kodierende Gen ermittelt [42].

Ebenfalls in diese Kategorie einzureihen ist die sogenannte Mimotop-Methode, die auf der Testung synthetischer Peptidbibliotheken mit tumorspezifischen T-Zellklonen beruht [43;44]. Kombinatorische Peptidbibliotheken werden synthetisiert, auf antigenpräsentierende Zellen geladen und mit einem T-Zellklon getestet. Für die Suche nach einem CTL-erkannten Mimotop aus neun Aminosäuren werden 171 (9 x 19, alle proteinogenen Aminosäuren außer Cystein) kombinatorische Peptidbibliotheken synthetisiert und getestet. In jeder Bibliothek steht eine Aminosäure an einer Position fest, alle anderen werden frei kombiniert. Anhand der erkannten Bibliotheken findet man auf diese Weise für jede Position im Nonamer eine

oder mehrere Kandidatenamino-säuren. Danach kann durch Datenbankvergleiche nach dem Antigen, aus dem mögliche Peptide stammen können, gesucht werden.

1.4.3 „Reverse Immunologie“

Wie der Name bereits andeutet, geht diese Strategie im Vergleich zu den anderen beiden die Antigenidentifizierung aus entgegengesetzter Richtung an. Anstatt von patienteneigenen T-Zellen oder Antikörpern auszugehen und zu überprüfen, welches Antigen sie erkennen, ist der Ausgangspunkt für die „Reverse Immunologie“ das Antigen selbst. Kandidatenantigene, die bekanntermaßen im Tumor überexprimiert werden oder mutiert sind, werden zur Stimulation von T-Zellen benutzt. Kandidaten sind entweder bekannte T-zellerkannte Tumorantigene, für die weitere immunogene Peptide, die über dasselbe oder andere HLA-Proteine präsentiert werden, ermittelt werden sollen [45]. Andere Kandidaten ergeben sich aus Hochdurchsatzverfahren wie z. B. RDA (representational difference analysis), „*in silico* cloning“, „DNA Micro Array“-Techniken oder Proteomanalysen. Durch die kombinierte Anwendung von RDA und „*in silico* cloning“ wurden z. B. einige Antigene der MAGE-Familie identifiziert [46]. Eine Limitierung des Verfahrens liegt darin, dass z. B. punktmutierte Antigene unter den über ihr Expressionsmuster identifizierten Antigenen nur dann entdeckt werden können, wenn sie gleichzeitig überexprimiert werden.

Für die Stimulation mit den potentiellen Antigenen werden sowohl T-Zellen von Tumorpatienten als auch von gesunden Spendern benutzt. Bei einem Verfahren der „Reversen Immunologie“ werden zur Stimulation der T-Zellen Peptide benutzt, die mit Hilfe von Epitopvorhersageprogrammen ausgesucht werden, weil sie eine hohe Affinität für ein betrachtetes HLA-Molekül aufweisen. Mit Peptiden beladene, autologe antigenpräsentierende Zellen werden für die *in vitro*-Stimulationen der T-Zellen verwendet. Um zu zeigen, dass die Peptide von natürlich prozessierten Tumorantigenen stammen, muss im Nachhinein gezeigt werden, dass die generierten CTL Tumorzellen lysieren, die das putative Antigen und das präsentierende HLA-Allel exprimieren [5;45].

Alternativ zu Stimulationen mit peptidbeladenen antigenpräsentierenden Zellen können auch antigenpräsentierende Zellen, die mit einem das Antigen enthaltenden viralen Vektor transduziert wurden, als Stimulatorzellen eingesetzt werden. Allerdings muss dafür gesorgt werden, dass keine dominierende Immunität gegen das Virus entsteht. Letzteres kann beispielsweise durch den alternierenden Einsatz verschiedener viraler Vektoren im Verlauf der T-Zellstimulation vermieden werden. Die Peptidspezifität solchermaßen generierter T-Zellen wird abschließend durch die Testung synthetischer Peptide ermittelt [47].

1.5 T-zellerkannte Antigene menschlicher Tumoren

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Identifizierung von Melanomantigenen, die von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. Weil die besondere Bedeutung der T-Zellen in der Kontrolle von Tumoren belegt werden konnte [14], werden in diesem Kapitel bisher charakterisierte Tumorantigene, die von T-Zellen erkannt werden, vorgestellt. Andere Antigene, die z. B. über Antikörper identifiziert wurden, können in der oben bereits erwähnten Datenbank des Ludwig Institut für Krebsforschung (LICR) eingesehen werden (<http://www.licr.org/SEREX.htm>). Von T-Zellen erkannte Tumorantigene werden üblicherweise nach ihrer Gewebeexpression klassifiziert. An dieser Stelle sollen die verwendeten Kategorien anhand einiger wichtiger Vertreter vorgestellt werden. Ein aktuelleres Bild über die bisher entdeckten T-zellerkannten Tumorantigene geben Renkvist et. al. [6] sowie eine Datenbank, die ebenfalls vom Ludwig Institut für Krebsforschung eingerichtet wurde und ständig aktualisiert wird (<http://www.cancerimmunity.org/statics/databases.htm>).

1.5.1 „Cancer/Testis“-Antigene

„Cancer/Testis“-Antigene (CT-Antigene) werden in einer Reihe von Tumoren unterschiedlicher Histologie exprimiert, aber nicht in Normalgeweben mit Ausnahme von Spermatogonien. Spermatogonien gelten als immunprivilegiert, da sie keine MHC Klasse I und II-Moleküle exprimieren und dadurch nicht zum Ziel von T-Zellattacken werden können [5]. Der Grund für die ausschließliche Expression in Krebszellen und Testis ist unklar. Diskutiert wird die Möglichkeit, dass die Expression der Antigene aus der Demethylierung von Genen resultiert, die normalerweise in anderen Geweben als Keimbahnzellen stillgelegt sind [5;48]. Weil einige dieser Antigene in verschiedenen Tumorarten vorkommen, erlauben sie grundsätzlich die Entwicklung von breit anwendbaren Tumorstoffen. In diese Kategorie gehört die Familie der MAGE-Antigene, die nach dem ersten identifizierten menschlichen Tumorantigen MAGE-1 benannt wurde [35]. Die Familie umfasst inzwischen mehr als 20 Mitglieder [5]. Ebenfalls gehören in diese Gruppe die Antigene BAGE, GAGE und NY-ESO-1 [5;40;49]. Das letztere ist insbesondere interessant, da es in einem hohen Anteil histologisch unterschiedlicher menschlicher Tumoren, wie z. B. Brustkrebs (30%), Prostatakrebs (25%), Ovarialkarzinomen (25%) und Melanomen (45%) exprimiert wird [40]. NY-ESO-1 scheint unter den derzeit bekannten CT-Antigenen dasjenige mit der höchsten Immunogenität zu sein [5]. In vielen Patienten mit fortgeschrittenem Tumor wurden kombinierte T-Zell- und

Antikörperantworten gegen NY-ESO-1 und unter den T-Zellantworten sowohl zytotoxische Antworten durch CD8⁺ T-Zellen als auch Reaktivität von CD4⁺ T-Helferzellen gefunden [33;41;50;51]. Die humorale Immunreaktion gegen NY-ESO-1 scheint mit steigender Tumorlast der Patienten verstärkt zu werden, eine Situation, vergleichbar mit dem p53-Antikörperstatus von Patienten mit bestimmten Krebsformen [52;53].

1.5.2 Differenzierungsantigene

Diese Antigene werden in Tumoren und den Geweben, aus denen sie entstehen, exprimiert. Die meisten wurden in Melanomen und normalen Melanozyten identifiziert. Einige der antigenen Proteine sind in die Biosynthese von Melanin in Melanosomen involviert. Es wurden sowohl Epitope, die von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen erkannt werden, gefunden, als auch solche, die von CD4⁺ T-Helferzellen erkannt werden [6]. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind Tyrosinase [54;55], Melan-A/MART-1 [56;57] und Glykoprotein 100 (gp100) [58;59]. Das höchste immunogene Potential wird Melan-A/MART-1 zugeschrieben, da sowohl in HLA-A2-positiven Melanompatienten als auch in gesunden Kontrollpersonen T-Zellen gegen ein immundominantes Epitop (Aminosäuren 26-35) gefunden wurden. Allerdings wiesen die Melan-A/MART-1-reaktiven T-Zellen in den Gesunden einen naiven Phänotyp auf, während die T-Zellen bei Patienten mit fortgeschrittener Krankheit aktiviert waren [60;61].

1.5.3 Überexprimierte Antigene

Überexprimierte Antigene werden in einer Reihe von Normalgeweben gering exprimiert und in Tumoren überexprimiert [6]. Interessante Vertreter dieser Kategorie sind *p53*, *PRAME*, *HER2/neu* und *hTERT*. Das Tumorsuppressorgen *p53* ist in mehr als 50 % der Tumoren mutiert [53]. Tumorlast, Tumorprogression und dadurch Prognose der Patienten korrelieren mit Antikörpern gegen *p53* und entsprechend wurden in einigen Tumoren "Memory"-T-Helferzell-Antworten gefunden. Die T-Helferzellen waren auch lange nach Entfernung eines Primärtumors noch nachweisbar, zu einem Zeitpunkt, als keine Antikörper mehr zu messen waren [62]. *PRAME* wird in so unterschiedlichen Tumoren wie Melanomen, kleinzelligen und nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Adenokarzinomen, Sarkomen und Leukämien exprimiert. Darüber hinaus wurde aber auch die Expression in Hoden, Endometrium, Ovar, Niere und Nebenniere, Gehirn und in der Haut nachgewiesen [6;45;63]. Das *HER2/neu*-Onkogen wird in Melanomen, Ovarial- und

Brustkarzinomen sowie in Tumoren des Gastrointestinaltraktes exprimiert. Es zeigte sich aber auch in normalen Epithelien Expression [6]. Mehr als 85 % aller Tumoren weisen hohe Telomeraseaktivität auf. Die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT wurde als CTL-erkanntes Tumorantigen identifiziert [64]. CTL gegen ein über HLA-A2 präsentiertes Peptid lysierten HLA-A2-positive Tumoren verschiedener Histologien, wie z. B. Lungen-, Prostata- und Ovarialkarzinome, Myelome, Melanome, Sarkome, akute Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphome. Allerdings findet man Telomeraseaktivität auch in Hämatopoetischen Stammzellen, in proliferierenden Zellen der Lymphknoten, basalen Keratinozyten, Gonadenzellen und in proliferierenden Epithelzellen [6;64].

1.5.4 Strukturalterierte Antigene

Im engeren Sinne tumorspezifische Antigene (einige sehen „Cancer/Testis“-Antigene auch als tumorspezifisch an) entstehen durch Punktmutationen oder Translokationen in normalen Genen. Oft steht die resultierende Alteration des Proteins mit der Tumorentstehung oder Tumorprogression in Verbindung. Wichtige Antigene aus dieser Gruppe sind zum Beispiel mutiertes *CDK4* und mutierte *CASP-8*. Der Aminosäureaustausch in der in einem Melanom entdeckten mutierten Cyklinabhängigen Kinase 4 ($CDK4^{R24C}$) führt dazu, dass der Zellzyklusregulator p16INK4a nicht mehr binden kann und dadurch der Zellzyklus außer Kontrolle gerät [65]. Die gleiche Mutation wurde sporadisch in anderen Tumoren gefunden (pers. Mitteilung T. Wölfel) sowie als Keimbahnmutation in familiär auftretenden Melanomen [66]. Eine ähnliche Mutation, welche die gleiche Position im Protein ($CDK4^{R24H}$) betrifft, zeigte sich in einer Familie, in der es ebenfalls häufiger als normal zu Melanomen kam [67]. Mutiertes *CASP-8* war das erste CTL-erkannte Antigen auf einem anderen Tumor als einem Melanom oder Nierenzellkarzinom [68]. Es wurde in einem Kopf-Hals-Tumor entdeckt. Caspase-8 ist essentiell für die Apoptoseinduktion über Fas- und TNF-Rezeptoren. Die Punktmutation alteriert das Stop-Codon des offenen Leserahmens und verlängert das Protein um 88 Aminosäuren. Daraus resultiert eine Beeinträchtigung der Apoptoseinduktion durch extrazelluläre Signale über die Caspase-8-Signalkette [68].

Im Falle der meisten tumorspezifischen punktmultierten Antigene ist die Expression auf den Tumor beschränkt, in dem das jeweilige Antigen identifiziert wurde, weshalb sie auch als individualspezifische Antigene bezeichnet werden. Es sei denn, die Alteration ist ein obligatorischer Schritt, der zur neoplastischen Transformation führt, wie zum Beispiel bei *RAS*-Onkogenen [6].

Translokationen führen zu Fusionsproteinen, deren Expression typisch für bestimmte Malignome ist. Peptide aus dem Fusionsbereich werden von CTL erkannt. Beispiele hierfür

sind *bcr-abl* in Chronisch Myeloischen Leukämien [69] und *ETV6/AML* in Akuten Lymphatischen Leukämien [70].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung T-zellerkannter Tumorantigene im Melanommodell MZ7. Mit Hilfe des Verfahrens der cDNA-Expressionsklonierung sollte Antigen-cDNA isoliert, durch Sequenzierung identifiziert und auf strukturelle Alterationen untersucht werden. Zur näheren Charakterisierung eines neuen Antigens gehörten die Ermittlung des von den eingesetzten T-Zellen erkannten Peptids sowie die Durchführung von Expressionsanalysen des Antigens in verschiedenen Tumoren und Normalgeweben.

Im Melanommodell MZ7 standen bereits eine Melanomzelllinie und eine daraus generierte cDNA-Bank in einem eukaryontischen Expressionsvektor zur Verfügung. Außerdem lagen fünf der sechs MHC Klasse I-AAllele, kloniert in Expressionsvektoren, vor. Weiterhin waren eine Reihe tumorreaktiver MLTCs (gemischte Lymphozyten/Tumorzell-Kulturen) generiert worden. Aus einigen davon waren bereits zytotoxische T-Zellklone (CTL) etabliert und expandiert worden, die für ein „Screening“ nach Antigenen verwendet werden konnten. Mit Hilfe eines T-Zellklones wurde in diesem Modell bereits ein Antigen charakterisiert. Eine Punktmutation im *SIRT2*-Gen führt zu einem Aminosäureaustausch im Protein und ein prozessiertes Peptid, das die ausgetauschte Aminosäure enthält, wird von T-Zellklonen erkannt (Diplomarbeit Dorothea Ruf und persönliche Mitteilung M. Fatho).

Die Etablierung tumorreaktiver T-Zellklone, die in Langzeitkultur gehalten und soweit expandiert werden können, dass sie für ein „Screening“ nach Tumorantigenen und die sich daran anschließende Charakterisierung verwendet werden können, ist zeit- und materialaufwendig. Das Ergebnis ist in keiner Weise steuerbar und eventuell sind die gewonnenen T-Zellklone das Ergebnis einer Selektion, die das Wachstum von Klonen begünstigt, die am besten an die gewählten Kulturbedingungen angepasst sind. Das bedeutet jedoch nicht, dass die erhaltenen T-Zellklone bzw. die von ihnen erkannten Antigene *in vivo* von Relevanz wären. Nahezu alle bisher identifizierten T-zellerkannten Tumorantigene wurden mit Hilfe klonaler T-Zell-Langzeitkulturen entdeckt. In dieser Arbeit sollte versucht werden, unter weniger selektionierenden Bedingungen, durch den Einsatz relativ kurz stimulierter tumorreaktiver MLTCs, Antigene zu identifizieren. Als sensitives Testsystem sollte der Zytokin-ELISPOT-Assay eingesetzt werden.

Die zu bearbeitenden Fragestellungen lassen sich wie folgt formulieren:

- Generierung von autologen MLTCs, in denen tumorreaktive T-Lymphozyten angereichert sind.
- Analyse der antitumoralen T-Zellantworten durch ELISPOT-Assays im Hinblick darauf, welche Zytokine antigenabhängig von den T-Zellen freigesetzt werden und zu welchem Zeitpunkt nach *in vitro*-Stimulation der T-Zellen die Zytokinfreisetzung maximal und spezifisch ist. Daneben sollte überprüft werden, ob der Aktivierungszustand einer T-Zellpopulation durch Kryokonservierung erhalten werden kann. Durch den Einsatz von breit expandierten, in Portionen eingefrorenen T-Zellpopulationen direkt nach dem Auftauen in ELISPOT-Assays könnten Schwierigkeiten, die bei der permanenten Kultivierung von T-Zellen auftreten, umgangen werden. Weiterhin sollten tumorreaktive T-Zellen mit diesem Testsystem hinsichtlich ihrer HLA-Restriktion analysiert werden.
- Untersuchung, ob in autologen MLTCs T-Zellen Peptide aus bereits bekannten tumorassoziierten Antigenen in Assoziation mit den HLA-Molekülen der Patientin MZ7 erkennen.
- Identifizierung von neuen Tumorantigenen mit Hilfe der MLTCs durch cDNA-Expressionsklonierung.
- Untersuchung der relativen Bedeutung verschiedener MZ7-Antigene für die Entwicklung einer antitumoralen T-Zellantwort.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklaven	KSG Sterilisatoren (Olching)
Automatic Gamma Counter	1470 Wizard (Pharmacia, Freiburg)
¹³⁷ Cäsiumquelle	Gammacell 2000 (Molsgaarg Medical, Denmark)
CO ₂ -Inkubator	BBD 6220 (Heraeus, Hanau)
Durchflusszytometer	FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg)
Eismaschine	UBE50/35 (Ziegra, Isernhagen)
Elektroporator	(Dr. L. Fischer, Heidelberg)
Elisa-Photometer	Anthos htII (LMS, Dossenheim)
Feinwaage	Precisa (PAG Oerlikan AG, Zürich)
Gelelektrophoresekammern	Easy-Cast™ Minigel Systems (AGS, Heidelberg)
Geldokumentation	BioDocAnalyse (Biometra, Göttingen)
Heizblock	Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg)
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch Economic (Robert Bosch GmbH, Stuttgart) Ökosuper (Liebherr, Ochsenhausen) Hera freeze (Heraeus, Hanau)
Magnetrührer mit Heizplatte	IKAMAG RET (Janke & Kunkel, Staufen)
Netzgeräte	GPS 200/400 (Pharmacia, Freiburg) ST 3002 (Gibco BRL, Karlsruhe)
PCR-Geräte	Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen)
Phasenkontrastmikroskop für Zellkultur	Model TMS (Nikon, Japan)
pH-Meter	Digital CG 837 (Schott, Mainz)

Pipettierhilfen	Pipetus akku (Hirschmann, Eberstadt)
Pipetten	1-10 µl Pipette und 1-10 µl Mehrkanalpipette (Eppendorf, Hamburg) Pipetman 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich) Mehrkanalpipetten 550 µl, 25-200 µl (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach)
Reagenzglasschüttler	Reax Control (Heidolph, Schwabach)
Schüttelinkubator	Certomat [®] R/H (Braun, Melsungen)
Sequenziersysteme	ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Weiterstadt) OpenGene [™] Automated DNA Sequencing System (Visible Genetics, Evry, France)
Spektralphotometer	Ultrospec 3000 (Pharmacia, Freiburg)
sterile Werkbank	Antair BKS (Schrader, Göttingen)
Stickstoffbank	XLC 1370 (MVE Europe, Solingen)
Trockenschrank	UT 6420 (Heraeus, Hanau)
Wasserbad	(GFL, Burgwedel)
Wasserdeionisierungsanlage	Milli-Q plus (Millipore, Eschborn)
Zentrifugen	Rotixa/RP (Hettich, Tuttlingen) Centrifuge 5417 (Eppendorf, Hamburg) 2K15 (Sigma, Deisenhofen) Sorvall RC5C (Du Pont, Bad Homburg)

2.1.2 Plastikwaren

Bakterienplatten, Petrischalen	22 x 22 cm (Nunc, Wiesbaden) Ø 9 cm, Ø 13 cm (Greiner, Nürtingen)
Bechergläser, Kunststoff	(Vitlab, Seeheim-Jugenheim)
Einfrierboxen	(Nalge Nunc, Wiesbaden)
Einfrierröhrchen	Cryotube, 1,8 ml (Nunc, Wiesbaden)
Einmalpipetten, steril	1, 2, 5, 10, 25, 50 ml (Greiner, Nürtingen)
Gewebekulturplatten	6-Loch-Gewebekulturplatten 24-Loch-Gewebekulturplatten

Gewebekulturplatten	48-Loch-Gewebekulturplatten (Greiner, Nürtingen oder Costar, Corning GmbH, Wiesbaden)
Küvetten für Elektroporation	Gene Pulser-Küvetten (Biorad, München)
Pipettenspitzen	ART1000, ART20E, ART10reach (MBP, San Diego, California) Biosphere Filter Tips (Sarstedt, Nümbrecht)
Reaktionsgefäße	0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg)
Spritzen	10 ml, 20 ml, 50 ml Einmalspritzen (Braun, Melsungen)
Sterilfilter	FP30/0,2 CA-S, FP30/0,45 CA-S (Schleicher & Schuell, Dassel) Steritop™ (Millipore, Eschborn) Sartolab®-P20 (Sartorius, Göttingen)
Mikrotiterplatten	Flachboden-, Rundboden-, V-Bodenplatten im 96-Lochformat (Greiner, Nürtingen; Nunc, Wiesbaden)

2.1.3 Glaswaren

Bechergläser	500 ml, 1000 ml, 2000 ml (Jenaer Glas, Schott, Mainz)
Duran-Glasflaschen	0,5 l, 1 l, 2 l, 5 l (Schott, Mainz)
Erlenmeyerkolben	500 ml, 1000 ml, 2000 ml (Jenaer Glas, Schott, Mainz)
Glaszentrifugenröhrchen	Corex, 30 ml (Schott, Mainz)
Quartz-Küvetten	(Pharmacia, Freiburg)
Zählkammern	Fuchs-Rosenthal (Schreck, Hofheim)

2.1.4 Chemikalien

AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)-Tabl.	(Sigma, Deisenhofen)
Aktinomycin D	(Sigma, Deisenhofen)
Agarose	(Eurogentec, Seraing, Belgien)
Agarose, ultrapure	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Albumin, bovine	(Sigma, Deisenhofen)
Ammoniumacetat	(Merck, Darmstadt)
Borsäure	(Merck, Darmstadt)
Bromphenolblau	(Merck, Darmstadt)
Chloroform	(Riedel-de Haen, Seelze)
Chloroquine	(Sigma, Deisenhofen)
DEAE/Dextran	(Pharmacia, Freiburg)
Dimethylformamid (DMF)	(Merck, Darmstadt)
DMSO	(Merck, Darmstadt)
Effectene-Transfektionsreagenz	(Qiagen, Hilden)
Essigsäure	(Carl Roth AG, Karlsruhe)
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	(Merck, Darmstadt)
Ethanol	(Riedel-de Haen, Seelze)
Ethidiumbromid	(Sigma, Deisenhofen)
Ficoll 400	(Biochrom KG, Berlin)
Formaldehyd	(Merck, Darmstadt)
Formamid	(Merck, Darmstadt)
Glycerol	(Sigma, Deisenhofen)
Isopropanol	(Fluka, Deisenhofen)
Kaliumacetat	(Merck, Darmstadt)
Kaliumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Magnesiumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Magnesiumsulfat	(Merck, Darmstadt)
β -Mercaptoethanol	(Sigma, Deisenhofen)
3-(4,5-Dimethylthazol-2-yl)-2,5 diphenyl- 2H-tetrazoliumbromid (MTT)	(Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg)
Natriumacetat	(Merck, Darmstadt)
Natrium-Azid	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumcitrat	(Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Natrium-Dodecylsulfat	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck, Darmstadt)
Natiumhydroxid-Plätzchen	(Merck, Darmstadt)
PBS (phosphat-buffered saline)	(Biochrom KG, Berlin)
PolyFect™ Transfektionsreagenz	(Qiagen, Hilden)
Salzsäure	(Merck, Darmstadt)
SuperFect™ Transfektionsreagenz	(Qiagen, Hilden)
TBE-Puffer (10X)	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Tris (-hydroxymethyl)-aminomethan (Tris base)	(Sigma, Deisenhofen)
Tris-HCl	(Sigma, Deisenhofen)
Trypanblau	(Merck, Darmstadt)
Wasserstoffperoxid 30%	(Merck, Darmstadt)
Xylencyanol	(Merck, Darmstadt)

2.1.5 Substanzen für die Bakterienkultur

Bacto Agar	(Difco, Stuttgart)
Bacto Tryptone	(Difco, Stuttgart)
Hefe-Extrakt	(Difco, Stuttgart)
Ampicillin, Kanamycin	(Sigma, Deisenhofen)

2.1.6 Substanzen für die Zellkultur

AIM V® Medium	(Gibco BRL, Karlsruhe)
FCS (fötales Kälberserum)	(Biochrom KG, Berlin)
Geneticin (G418)	(Gibco BRL, Karlsruhe)
L-Glutamin	(Gibco BRL, Karlsruhe)
HEPES	(Sigma, Deisenhofen)
Melanozyten-Wachstumsmedium	PromoCell (Heidelberg)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck, Darmstadt)
Natriumpyruvat	(Gibco BRL, Karlsruhe)

nicht essentielle Aminosäuren	(Gibco BRL, Karlsruhe)
NuSerum [®]	(Boehringer Ingelheim, Heidelberg)
Pulvermedium RPMI 1640	(Gibco BRL, Karlsruhe)
RPMI 1640, flüssig	(Biochrom KG, Berlin)
Penicillin- Streptomycin	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Trypsin-EDTA	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Versen (1% EDTA)	(Biochrom KG, Berlin)

2.1.7 Enzyme

Taq DNA-Polymerase	(Roche, Mannheim)
AdvanTaq [™] DNA-Polymerase	(BD Clontech, Heidelberg)
Alkalische Phosphatase (CIP)	(Roche, Mannheim)
RNase H	(Qiagen, Hilden)
Restriktionsendonukleasen	(AGS, Heidelberg)
T4 DNA-Ligase	(Roche, Mannheim)

2.1.8 Zytokine

Interleukin-2 (IL-2)	Proleukin (Chiron Behring GmbH & Co, Marburg)
Interleukin-4 (IL-4)	zur Verfügung gestellt von Dr. P. Coulie (LICR, Brüssel, Belgien) (Genzyme, Konstanz)

2.1.9 Molekulargewichtsmarker

Biosizer [™] III	(AGS, Heidelberg)
Biosizer [™] IV	(AGS, Heidelberg)
Biosizer [™] V	(AGS, Heidelberg)
BioLadder [™] 100	(AGS, Heidelberg)

2.1.10 Kits

Aufreinigung von PCR-Produkten	High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim)
cDNA-Synthese	SuperScript™ Preamplification System, Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Gibco BRL, Karlsruhe)
DNA-Isolation aus Agarosegelen Plasmid DNA Isolationen	QIAquick Gelextraction Kit (Qiagen, Hilden) QIAfilter™ Plasmid Kits, EndoFree™ Plasmid Kit, Qiagen® Plasmid Mini Kit, QIAprep® 96 Turbo Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
RNA-Aufreinigungen	RNeasy Mini, Midi Kit (Qiagen, Hilden)
Sequenzierkits	Thermo Sequenase™ Cy5™ Dye Terminator Sequencing Kit, Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing, Thermo Sequenase™ Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit (Amersham, Freiburg)
TA Cloning Kits	TOPO TA Cloning® Kit; pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

2.1.11 Bakteriennährmedien

LB-Medium (Luria-Bertani)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O	ad 1 l
LB-Agar	LB-Medium	1 l
	Bacto-Agar	15 g
Einfriermedium	Bakterien-LB-Kultur + Glycerin	30%

Für Selektionsmedien wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml dem LB-Medium oder dem LB-Agar zugesetzt.

2.1.12 Zellkulturmedien

RPMI 1640	Pulvermedium RPMI	104,3 g
	NaHCO ₃	22 g
	HEPES	23,8 g
	Natriumpyruvat	100 ml
	nicht-essentielle Aminosäuren	100 ml
	Penicillin-Streptomycin	100 ml
	H ₂ O	ad 10 l
	mit 1N HCl auf pH 7,2 eingestellt	
T-Zellmedium (TZM)	Pulvermedium 1640	104,3 g
	NaHCO ₃	20 g
	HEPES	23,8 g
	Penicillin-Streptomycin	100 ml
	H ₂ O	ad 10 l
	mit 1N HCl auf pH 7,2 eingestellt	

Die Medien RPMI und TZM wurden direkt in autoklavierte Glasflaschen mit Schraubverschluß sterilfiltriert. Vor Gebrauch der Medien wurden 1% L-Glutamin und 10% FCS oder Humanserum ergänzt. RPMI ohne Glutamin und Serum wird im folgenden RPMI genannt, mit Glutamin und Serum wird es als RPMI_{komplett} bezeichnet. Das gleiche gilt für TZM und TZM_{komplett}. Vor der Zugabe war das Serum durch Inkubation bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert worden. Auf diese Weise sollten hitzelabile Komplementfaktoren zerstört werden. Das Humanserum wurde aus Blutspenden gewonnen, die von der ortsansässigen Blutbank aufgearbeitet wurden.

Alternativ zum TZM wurde AIMV[®] Medium verwendet. Auch hier wurden 10% Humanserum ergänzt (AIMV_{komplett}). Für die T-Zellkultur wurden dem TZM_{komplett} oder AIMV_{komplett} zusätzlich 250 IU/ml Interleukin-2 (IL-2) zugesetzt. Einige T-Zellklone waren aus gemischten T-Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen, die mit zusätzlichem IL-4 kultiviert worden waren, hervorgegangen. In die Kulturen dieser T-Zellklone wurden auch weiterhin 5 IU/ml IL-4 zugegeben. Alle Medien wurden bei 4°C gelagert.

Als Einfriermedium wurde FCS mit 10% DMSO verwendet.

2.1.13 Allgemeine Puffer und Lösungen

Acetatpuffer für ELISPOT-Assays	H ₂ O		46,9 ml
	Essigsäure 0,2 N		4,6 ml
	Natriumacetat 0,2 N		11,0 ml
Aktinomycin D (2 mg/ml)	Actinomycin D		25,0 mg
	DMSO		2,5 ml
	RPMI		10,0 ml
	In 2 ml-Aliquots bei -20°C gelagert		
Ammoniumacetat 10M	Ammoniumacetat		770,0 g
	H ₂ O	ad	1,0 l
Ampicillin (25 mg/ml)	Ampicillin		25,0 g
	H ₂ O	ad	1,0 l
	In 10 ml-Aliquots bei -20°C gelagert		
Chloroquine 10 mM	Chloroquine		520,0 mg
	H ₂ O	ad	100,0 ml
	In 10 ml-Aliquots bei -20°C gelagert		
DEAE/Dextran 10 mg/ml	DEAE/Dextran		1,0 g
	H ₂ O	ad	100,0 ml
	In 10 ml-Aliquots bei -20°C gelagert		
Elispotpuffer	NaHCO ₃		2,9 g
	Na ₂ CO ₃		1,6 g
	Na-Azid		0,2 % (w/v)
	H ₂ O	ad	1,0 l
Essigsäure 0,2 N	Essigsäure (96%)		11,3 g
	H ₂ O	ad	1,0 l
Ladungspuffer für Agarosegele	Bromphenolblau		25,0 mg
	Xylencyanol		25,0 mg
	Glycerol		3,0 ml
	H ₂ O	ad	10,0 ml
MTT-Lösung 2,5 mg/ml	MTT		1,0 g
	1X PBS		400,0 ml
	lichtgeschützt bei 4°C gelagert		
NaCl 0,15 M	NaCl		4,5 g
	H ₂ O	ad	100,0 ml
Natriumacetat 0,2 N	Natriumacetat		16,4 g
	H ₂ O	ad	1,0 l

PBS 1X	Instamed PBS-Pulver H ₂ O	ad	95,5 g 10,0 l
SDS 30% (w/v)	SDS H ₂ O	ad	150,0 g 500,0 ml
SDS/DMF	DMF SDS 30% Eisessig		500,0 ml 1,0 l 37,5 ml
Tris-HCl 1M	Tris-Base H ₂ O mit HCl auf pH 8,5 eingestellt und autoklaviert	ad	157,6 g 1,0 l
Trypanblau (Stammlösung)	Trypanblau H ₂ O	ad	2,0 g 1,0 l
Trypanblau (Gebrauchslösung)	Trypanblau Stammlösung NaCl 0,15 M		75,0 ml 25,0 ml

2.1.14 Bakterien

Escherichia coli TOP 10 und TOP 10F' (Invitrogen, Leek, Niederlande). Die *E. coli* mit einer Transformationseffizienz von 1×10^9 cfu/ μ g „supercoiled“ DNA sind geeignet für die Klonierung und Amplifikation von Plasmiden in hoher Kopienzahl. Der Genotyp von TOP10 bietet folgende Eigenschaften:

- *hscR* für effiziente Transformation nichtmethylierter DNA aus PCR-Amplifikationen.
- *mcrA* für die Transformation methylierter DNA aus genomischen Präparationen.
- *lacZ* Δ M15 für Blau/Weiß-Selektion von Rekombinanten.
- *endA1* ermöglicht saubere DNA-Präparationen und damit Erfolg in nachfolgenden Applikationen durch die Elimination des unspezifischen Verdau durch Endonuklease I.
- *recA1* reduziert ungewollte Rekombinationsereignisse in klonierter DNA.

Genotyp: F *mcrA* Δ (*mrr-hscRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galJ* *galK* *rpsL*(Str^R) *endA1* *nupG*

Der TOP10F' Genotyp ist identisch zum TOP10 Genotyp mit dem zusätzlichen F'-Episom. Das F'-Episom enthält das Tetrazyklin-Resistenzgen und erlaubt die Isolation einzelsträngiger DNA aus Vektoren mit einem f1-Replikationsursprung. Darüber hinaus trägt F' das *lacI^q*-Gen für die regulierte Expression von *trc*, *tac* und *lac*-Promotoren.

2.1.15 Plasmide und cDNA-Banken

Die Expressionsvektoren pcDNA1/Amp und pcDNA3 (Invitrogen, Leek, Niederlande) wurden für die Expression heterologer DNA in eukaryontischen Zellen entwickelt. Eine Weiterentwicklung des pcDNA3 ist der pcDNA3.1/V5-His TOPO, der zusammen mit dem pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Cloning[®] Kit verwendet wurde. Die wichtigsten Eigenschaften für die prokaryontische Amplifikation sind:

- Beide Vektoren ermöglichen durch die Expression des β -Lactamasegens die Selektion von rekombinanten Bakterien durch Ampicillin.
- Durch die ColE1 Replikationsinitiationssequenz aus dem pUC19 Plasmid wird eine hohe Kopienzahl pro Bakterienzelle erreicht.

Die wichtigsten Eigenschaften für die Expression in eukaryontischen Zellen sind:

- Der Promotor/Enhancer des humanen Cytomegalievirus kontrolliert die Expression des nachgeschalteten Gens. Das erste ATG der Insertsequenz dient als Translationsstart.
- Der „Polylinker“ enthält Erkennungssequenzen für je 11 verschiedene Restriktionsendonukleasen, die eine Klonierung von cDNA in gewünschter Orientierung erlauben.
- Eine Polyadenylierungssequenz aus dem SV40 Virus (pcDNA1/Amp) bzw. dem bovinen Wachstumshormon (BGH, pcDNA3) gewährleistet die Polyadenylierung des Transkripts.
- Der SV40 Replikationsursprung und der des murinen Polyomavirus (nur in pcDNA1/Amp) ermöglichen die episomale Replikation des Plasmids in Zellen, die das große T-Antigen des jeweiligen Virus stabil exprimieren. Daraus resultiert eine massive Expression des transfizierten Gens, die schließlich nach 72 Stunden zum Absterben der transfizierten Zellen führt.

- pcDNA3 enthält zusätzlich das Neomycingen, das unter der Kontrolle des SV40 Promotors steht. Es erlaubt die Selektion stabiler Transfektanten mit G418.

Die Plasmide pcDNA3/HLA-A*03011, pcDNA3/HLA-A*2601, pcDNA3/HLA-B*07021, pcDNA3/HLA-B*3801, pcDNA3/HLA-Cw*1203 bestehen aus dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3, in den die aus der Melanomzelllinie MZ7-MEL amplifizierte HLA-cDNA-Sequenzen über die *EcoRI*- und *Sall/XhoI*-Schnittstellen inkliniert wurden (Primer siehe 2.1.18.1) [71]. Die cDNA-Klone wurden anschließend sequenziert. Das serologisch nachgewiesene HLA-Cw7 der Patientin konnte nicht kloniert werden. Die cDNA-Bank aus RNA der MZ7-MEL-Zelllinie wurde in pcDNA1/Amp konstruiert (siehe 2.2.11).

2.1.16 Monoklonale Antikörper

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten monoklonalen Antikörper (mAk) wurden in der vorliegenden Arbeit in der Durchflusszytometrie und für T-Zellblockadeexperimente verwendet. Zum Nachweis der gebundenen Mausantikörper wurden in der Durchflusszytometrie Fluoreszein-markierte Ziege-anti-Maus-Fab-Fragmente (Beckman-Coulter, Krefeld) eingesetzt. Mit Hilfe von T-Zellblockadeexperimenten wurde versucht, die HLA-Restriktionen von T-Zellklonen und MLTCs zu ermitteln (siehe 2.2.12).

BEZEICHN.	SPEZIFITÄT	ISOTYP	ATCC*	LIT.
<i>B1.23.2</i>	HLA-B, HLA-C, HLA-Aw19-Subgruppe	IgG2b	(1)	[72;73]
<i>BB7.1</i>	HLA-B7	IgG1	HB-56	[74]
<i>4E</i>	HLA-B, HLA-C, HLA-Aw19-Subgruppe	IgG2a	(2)	[75;76]
<i>GAP-A3</i>	HLA-A3	IgG2a	HB-122	[77]
<i>SFR8-B6</i>	HLA-Bw6, einige HLA-C-Allele	IgG2b**	HB-152	[78]
<i>W6/32</i>	HLA-Klasse I	IgG2a	(3)	[79;80]

*American Type Tissue and Cell Cultures;

** der SFR8-B6-Antikörper stammt aus der Ratte;

- (1) freundlich von Dr. F. A. Lemmoniere (Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy, Frankreich) zur Verfügung gestellt;
- (2) freundlich von Dr. S. Y. Yang (Dana-Farber Cancer Institute, Boston Massachusetts, USA) zur Verfügung gestellt;
- (3) freundlich von Dr. P. Parham (Departments of Structural Biology and Microbiology and Immunology, Stanford University, Stanford, USA) zur Verfügung gestellt;

2.1.17 Zelllinien

Melanomzelllinien

Die Melanomzelllinie MZ7-MEL wurde aus dem Gewebe einer Milzmetastase der Patientin MZ7 etabliert. Die Primärkultur wurde bereits 1988 angelegt. Die Patientin erkrankte 1985 im Alter von 23 Jahren an einem malignen Melanom, das operativ entfernt wurde. Nachdem 1987 Hautmetastasen festgestellt wurden, erhielt die Patientin eine Chemotherapie mit DTIC (*Dacarbazin*). 1988 erfolgte eine Splenektomie und die Entfernung rechtsseitiger axillärer Lymphknotenmetastasen. 1989 wurden Metastasen der linken Adnexe (Anhangsgebilde der Gebärmutter) und des rechten Ovars entfernt und sie erhielt eine Therapie mit dem monoklonalen Anti-GD3-Antikörper R24. 1990 wurden ihr eigene, *in-vitro* stimulierte zytotoxische T-Lymphozyten reinfundiert. 1992 mußten Lymphknotenmetastasen der rechten Axilla (Achselhöhle) operativ entfernt werden. Im gleichen Jahr wurde der Verdacht einer CML (Chronisch Myeloische Leukämie) diagnostiziert. Die Patientin verstarb am Fortschreiten des Tumorleidens im August 1992.

Aus Blutlymphozyten der Patientin MZ7 wurde die Zelllinie MZ7-EBV-B generiert, die als „Normalzelle“ zum Vergleich mit den Melanomzellen dienen sollte. Dazu wurden die Lymphozyten mit dem Epstein-Barr-Virus transformiert und damit immortalisiert.

Zu Kontrollzwecken kamen noch weitere Melanomzelllinien zur Anwendung. Sie werden in der Beschreibung des jeweiligen Experiments erwähnt.

COS-7-Zellen

COS (CV-1 origin SV40)-7-Zellen sind fibroblastenähnliche CV-1-Nierenzellen aus einem adulten Männchen der Meerkatzenart *Ceropithecus aethiops*. Die Zellen wurden mit dem defekten Genom des SV40-Virus transformiert, in dem der DNA-Replikationsursprung deletiert war. COS-7-Zellen exprimieren konstitutiv das große T-Antigen dieses Polyomavirus und ermöglichen dadurch die episomale Replikation von zirkulären Plasmiden, die einen SV40-DNA-Replikationsursprung tragen [38;81]. Die Expressionsplasmide pcDNA1/Amp, pcDNA3 und pcDNA3.1 tragen den SV40-DNA-Replikationsursprung.

293 T-Zellen

Die 293-Zelllinie ist eine permanente Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen, die durch das transformierende Gen des Adenovirus-Typ5 immortalisiert wurden [82]. Die 293-Zelllinie wurde zusätzlich mit dem großen T-Antigen des SV40-Virus stabil transfiziert und freundlicherweise von N. Shastri (The University of California, Berkeley, USA) zur Verfügung gestellt. Die so erzeugte 293T-Zelllinie eignet sich alternativ zur COS-7-Zelllinie für die transiente oder stabile Transfektion mit Plasmiden, die den SV40-Replikationsursprung tragen.

Melanomreaktive zytotoxische T-Zellen

Periphere Blutlymphozyten (PBL) der Patientin MZ7 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 1988 und 1992 kryokonserviert. Die PBL wurden aufgetaut und in einer gemischten Lymphozyten-Tumor-Zellkultur (MLTC von „Mixed Lymphocyte-Tumor Cellculture“) mit der MZ7-Melanomzelllinie kokultiviert. Lymphozyten aus verschiedenen gut gewachsenen MLTCs wurden im Grenzverdünnungsverfahren [83] kloniert. Sowohl wöchentlich stimulierte MLTCs als auch zytotoxische T-Zellklone (CTL) wurden auf ihre Tumorspezifität und ihre HLA-Restriktion überprüft. Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten T-Lymphozytenpopulationen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, wobei nur die markierten im Verlauf der Arbeit auch generiert wurden:

PBL	MLTC	Klone	In dieser Arbeit generiert
1988	# 13		v
1989	# 9 # 14	34	v
1990	# 7 # 15 # 16 ⁽²⁾	3	v v
1992	# 10.2 # 11 ⁽²⁾ # 12 ⁽¹⁾ # 17 # 18 ⁽²⁾	31 ⁽²⁾	v v

⁽¹⁾ MLTCs wurden in Anwesenheit von IL-4 kultiviert;

⁽²⁾ MLTCs wurden mit Melanomzellen stimuliert, die mit IFN γ vorbehandelt wurden;

2.1.18 Oligonukleotide

Für HLA-Sequenzen

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5'→3')
HLA-5p2	sense	GGGCGAATTCGGACTCAGAATCTCCCCAGACGCCGAG
HLA-3pA	antisense	CCGC <u>GTCGACT</u> TGGGGAGGGAGCACAGGTCAGCGTGGGAAG
HLA-3pB	antisense	GGGC <u>GTCGACT</u> TGGGGAGGAAACACAGGTCAGCATGGGAAC
HLA-3pC	antisense	GGGC <u>GTCGACT</u> CTGCATCTCAGTCCCACACAGGC
HLA-2S	sense	AGGGGCCGGAGTATTGGGAC
HLA-2N	antisense	GTCCCAATACTCCGGCCCT
HLA-3S	sense	CGGCAAGGATTACATCGCCCTG
HLA-3N	antisense	CAGGGCGGTGTAATCCTTGCCG
HLA-4S	sense	GCGGAGATCACACTGACCTGGC
HLA-4N	antisense	GCCAGGTCAGTGTGATCTCCGC

Die unterstrichenen Sequenzen kennzeichnen die *EcoRI*- bzw. *Sall*-Restriktionsschnittstellen für die gerichtete Klonierung in die verwendeten Expressionsvektoren pcDNA1 und pcDNA3.

Für SILV (*gp100*)-cDNA

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5'→3')
gp100-s1	sense	GGAATCCGGAAGAACA ATGGAT CTG
gp100-as1	antisense	AGGTCAGAGGCTAATTTCTCAGGAAGT
gp100-as2	antisense	CGGAAAAGGAACCTTATCGATACAGAA
gp100-as3	antisense	ATATGAGAGTACTCAGACCTGCTGCCC
gp100-as4	antisense	CTGGCACCCCTGGCTATGAGAT
gp100-as5	antisense	TGTTGGTATCAGCCAGTTACACAT
gp100-as6	antisense	AAGGACCACAGCCATCTACAC
gp100-as7	antisense	GGGTACGGAGAAGTCTTACTTCA

Das ATG-Translationsstartcodon in Primer gp100-s1 ist fettgedruckt.

Für TYR (Tyrosinase)-cDNA

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5'->3')
Tyr-1.1	sense	TT <u>GAATTC</u> GCCGCCAT G CTCCTGGCGGTT
Tyr-1.2	antisense	AATCTAGACCTAGCTTCATGGGCAAAA
Tyr-1.3	sense	TT <u>GAATTC</u> GCCGCCAT G CATACCATCAGCT
Tyr-1.4	antisense	AATCTAGACTACTGTACCTGGGACAT
Tyr-2.3	sense	TT <u>GAATTC</u> GCCGCCAT G TATTGGGACTGGCGG
Tyr-2.4	sense	TT <u>GAATTC</u> GCCGCCAT G CACAATGCCTTG
Tyr-Vb23	sense	TT <u>GAATTC</u> GCCGCCAT G CTCCTGGCTGTT
Tyr-Vb24	sense	TT <u>GAATTC</u> GCCGCCAT G GGGCCATTTCCCT
Tyr-Vb29	antisense	AATCTAGACGCCTAGCTACAGACAATCTGCCA
Tyr-Vb24-as1	antisense	AATCTAGAGCCGCCGAACCTCTGCCCGAA
Tyr-Vb24-as2	antisense	AATCTAGAGCCGCCACGACTCCCGGTCAT
Tyr-Vb24-as3	antisense	AATCTAGAGCCGCCACCAAGAGTCGTCT

Die unterstrichenen Sequenzen kennzeichnen *EcoRI*- bzw. *XbaI*-Restriktionsschnittstellen, die eine gerichtete Klonierung des Amplifikats in die verwendeten Expressionsvektoren erlauben. Die ATG-Translationsstartcodons sind fettgedruckt. Die GCC-Wiederholung davor wurden zur Optimierung der Kozak-Translationsinitiationssequenz [84] eingefügt.

Für GPNMB- und GPNMB/INT4-cDNA

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5'->3')
nmb-129s	sense	CCGTGAGAATTCAGC ATG GAATGT
nmb-449s	sense	CCCTAGATGCCAAAAGGAAGATGC
nmb-849s	sense	TGGTTAACCTTGCCAAATCTCCAG
nmb-1267s	sense	CTGGGCAACAGAGTGAGACTCCAT
nmb-532as	antisense	GGATCAGCAGATAAACCAGCCTCA
nmb-876as	antisense	TGTCCTGGAGATTTGGCAAGGTTA
nmb-960as	antisense	CCAGTATTATCCCCGAAGCTCCAC
nmb-1252as	antisense	GCTCAATCTCCTCTCACTGCAACC
nmb-1671as	antisense	GTCGACCAAAGCGGAACAGTAGTT

In der Sequenz des Primers nmb-129s ist das natürliche Translationsstartcodon hervorgehoben. Die Primer sind nach ihren Positionen im in dieser Arbeit identifizierten *GPNMB*-cDNA-Klon benannt. Die Primer für die HLA-cDNA wurden von der Firma Carl Roth AG (Karlsruhe) bezogen. Alle anderen Primer wurden von der MWG-Biotech GmbH (Ebersberg) hergestellt.

2.1.19 Synthetische Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von Boehringer Ingelheim Austria (Wien, Österreich), Sigma Genosys (Taufkirchen) oder MWG-Biotech GmbH (Ebersberg) synthetisiert. Die lyophilisierten Peptide wurden in PBS/5% DMSO gelöst und auf eine Konzentration von 2 mg/ml eingestellt. Sie wurden aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

gp100-Peptide (Boehringer Ingelheim Austria, MWG Biotech)

Bezeichnung	Peptidposition im Protein	Sequenz
gp100-1	545-553	LPSPACQLV
gp100-2	537-545	AQRLCQPVL
gp100-3	542-550	QPVLPSAC
gp100-4	544-552	VLPSPACQL
gp100-5	559-567	KGGSGTYCL
gp100-6	563-571	GTYCLNVSL
gp100-7	569-577	VSLADTNSL
gp100-8	570-578	SLAVVSTQL
gp100-9	550-558	CQLVLHQIL
gp100-10	578-586	AVVSTQLIM
gp100-11	532-540	GCQPPAQR
gp100-12	534-542	QPPAQRLCQ
gp100-13	546-552	PSPACQLVL
gp100-14	530-538	SPGCQPPAQ
gp100-15	547-555	SPACQLVLH
gp100-16	529-537	SSPGCQPPA
gp100-17	528-535	ISSPGCQPP
gp100-18	529-538	SSPGCQPPAQ
gp100-19	531-539	PGCQPPAQR

Die Synthese von zwei weiteren Peptiden, gp100-20 (SPGCQPPAQR, 530-539) und gp100-21 (ISSPGCQPPA, 528-537), wurde bei MWG-Biotech in Auftrag gegeben, sie konnten aber in mehreren Versuchen nicht synthetisiert werden.

Tyrosinaseptide (Sigma-Genosys)

Bezeichnung	Peptidposition im Protein	Sequenz
Tyros-1	87-95	RTCQC SGNF
Tyros-2	76-84	DRESWPSVF
Tyros-3	90-98	QCSGNFMGF
Tyros-3a	90-98	[N-acetyl-]QCSGNFMGF
Tyros-4	97-105	GFNCGNCKF
Tyros-5	112-120	CTERRLLVR
Tyros-6	73-81	DDRESWPSV
Tyros-7	78-86	FTGVDDRES
Tyros-8	82-90	SVFYNRTCQ
Tyros-9	71-79	GVDDRESWP
Tyros-10	75-83	ESWPSVFYN
Tyros-11	91-99	CSGNFMGFN
Tyros-12	91-100	CSGNFMGFNC
Tyros-13	89-97	CQCSGNFMG
Tyros-14	89-98	CQCSGNFMGF
Tyros-15	90-99	QCSGNFMGFN

GPNMB/INT4- und GPNMB^{G181D}-Peptide (Sigma-Genosys)

Bezeichnung	Peptidposition im Protein	Sequenz
GPNMB-1	179-188	TLDWLLQTPK ⁽¹⁾
GPNMB-2	180-188	LDWLLQTPK ⁽¹⁾
GPNMB-3	178-187	HTLDWLLQTP ⁽¹⁾
GPNMB-4	180-188	LGWLLQTPK
GPNMB-5	179-188	TLGWLLQTPK
GPNMB-6	179-187	TLGWLLQTP
GPNMB-7	179-187	TLDWLLQTP ⁽¹⁾

(1) Peptide aus GPNMB^{G181D}. Das T-zellerkannte Tumorantigen enthält eine Punktmutation, die in dieser Arbeit erstmals beschrieben wurde. Die Punktmutation führt dazu, dass Glycin (G) an Position 181 im Protein durch Asparaginsäure (D) ersetzt wird. *GPNMB/INT4* ist eine Spleißvariante von *GPNMB*.

2.1.20 ELISPOT-Experimente

Nitrozellulose-Platten

ELISPOT-Assays wurden auf gemischten Nitrozelluloseplatten vom Typ „MultiScreen Assay System 96-well Filtration Plate“ der Firma Millipore (Eschborn) durchgeführt. Die Mikrotiterplatten werden im folgenden als Elispotplatten bezeichnet. Die Böden der Platten bestehen aus einer Nitrozellulosemischung, die Proteine und Nukleinsäuren bindet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Nitrozellulose mit zytokinspezifischen Antikörpern beschichtet, die von T-Zellen freigesetzte Zytokine binden. Durch einen ebenfalls zytokinspezifischen Zweitantikörper wurden die Zytokine nachgewiesen. Nach Abschluß des Experiments können die Nitrozelluloseplättchen aller Testeinheiten (TE) auf Folie aufgeklebt werden, so daß Position und Abstand der TE zueinander erhalten bleiben. Auf diese Weise werden die Zelluloseplättchen der automatischen Auswertung durch das KS Elispot-System (siehe unten) zugänglich gemacht.

Antikörper

Die Antikörperpaare für den IFN γ -ELISPOT-Assay und den „Granzyme B“- ELISPOT-Assay wurden von der Firma Hölzel Diagnostika (Köln) bezogen. Hergestellt werden die Antikörper bei Mabtech AB (Nacka, Schweden). Für den IFN γ -ELISPOT-Assay wurde für die Beschichtung der Elispotplatte der Klon 1-D1K (Maus-IgG1) verwendet und für den Nachweis von gebundenem IFN γ der biotinylierte Klon 7-B6-1 (Maus-IgG1). Der Beschichtungsantikörper für „Granzyme B“ war der Klon HC4 (Maus-IgG1), der biotinylierte Nachweisantikörper war dabei HC2 (Maus-IgG1). Für IL-4, IL-5 und IL-10 wurden die Antikörper Klon 18500D (BD-Pharmingen, Heidelberg) und Klon 12.1-biot. (Mabtech) für IL-4, Klon 18051D (Pharmingen) sowie Klon 18522D-biot. (Pharmingen) für IL-5 und Klon 9D7 (Mabtech) sowie Klon 12G8 (Mabtech) für IL-10 verwendet.

Automatische Auswertung

Die Auswertung der ELISPOT-Experimente erfolgte automatisch mit dem KS ELISPOT-System Version 4.2.0 der Firma Zeiss (Jena). Das System besteht aus einem Auflichtmikroskop mit Motortisch und Autofokus. Jede einzelne Testeinheit (TE) der Elispotplatte kann vom Motortisch präzise angesteuert werden. Eine angeschlossene Farbkamera nimmt die Zytokinspots auf, die digitalisiert und anschließend durch die KS ELISPOT-Software ausgewertet werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultur eukaryontischer Zellen erfolgte nach Standardmethoden (Lindl, Zell- und Gewebekultur, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag). Hier werden nur Besonderheiten und Abwandlungen aufgeführt. Alle Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen bearbeitet.

Monolayerkulturen wie Tumorzelllinien aus soliden Tumoren, COS-7-Zellen und 293T-Zellen wurden in Zellkulturflaschen in RPMI_{komplett} kultiviert und jeden dritten bis vierten Tag subkultiviert. Zur Passage wurden die Tumorzellen und die COS-7-Zellen in PBS/0,05% EDTA für 10 Minuten inkubiert und anschließend durch Klopfen und Schütteln der Flasche sowie durch Spülen mit RPMI in Suspension gebracht. Die 293T-Zellen adhären nur bei 37°C vollständig. Bei Raumtemperatur können sie leicht durch Klopfen und Schütteln der Flasche in Suspension gebracht werden. Nach Abzentrifugation der Zellen wurden COS-7-Zellen in einer Dichte von 8×10^3 Zellen/cm² wieder ausgesät (z. B. $1,5 \times 10^6$ Zellen/T175-Flasche mit einer Kulturfläche von 182 cm²) und die Tumor- und 293T-Zellen wurden mit einer Dichte von 10^4 Zellen/cm² ausgesät.

Die Subkultivierung von Suspensionszellkulturen wie z. B. EBV-B-transformierten B-Zelllinien gestaltete sich einfacher: Sie wurden in den gleichen Intervallen wie die adhären Zellen durch Zugabe von frischem RPMI_{komplett} subkultiviert. Dabei wurden sie jeweils auf 2×10^5 Zellen/ml RPMI_{komplett} eingestellt. Alle zwei bis drei Wochen wurden die Zellen abzentrifugiert und in komplett frischem RPMI_{komplett} in der gleichen Zelldichte wieder aufgenommen. Die TNF-sensitive Indikatorzelllinie WEHI 164 Klon 13 wurde unter den gleichen Bedingungen in sterilen, unbeschichteten Petrischalen kultiviert.

Die Inkubation aller Zellen erfolgte bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂.

2.2.2 Langzeitkultur melanomreaktiver zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL)

CTL-Klone (CTL) wurden in 24-Loch-Platten kultiviert und wöchentlich mit Tumorzellen restimuliert. Dazu wurden 5×10^5 CTL mit 5×10^4 Melanomzellen und 2×10^5 AK-EBV-B-Zellen (eine EBV-B-Zelllinie, die sich besonders gut als „feeder“-Zelle bewährt hat) in 2 ml AIM V_{komplett} mit 250 IU/ml rhIL-2 pro Kultureinheit (KE) ausgesät. Die Melanomzellen und die AK-EBV-B-Zellen waren zuvor mit 100 Gy durch eine $^{137}\text{Cäsium}$ quelle bestrahlt worden. Schnell wachsende CTL wurden nach drei bis vier Tagen subkultiviert indem die Zellen resuspendiert und der Inhalt jeder KE auf zwei neue Löcher aufgeteilt wurde. Danach wurde jede KE mit AIM V_{komplett} auf 2 ml wieder aufgefüllt.

Nicht-klonale CD8^+ -Lymphozytenpopulationen wurden mit 1×10^6 Zellen/KE ausgesät und mit 1×10^5 bestrahlten Melanomzellen stimuliert. In frühen Passagen wurden 2×10^5 autologe bestrahlte PBL (periphere Blutlymphozyten) dazugegeben, in späteren Passagen die autologen PBL durch 2×10^5 bestrahlte AK-EBV-B-Zellen ersetzt. Auch diese Lymphozytenpopulationen wurden in AIM V_{komplett} inklusive 250 IU/ml rhIL-2 kultiviert.

2.2.3 Isolierung peripherer Blutlymphozyten aus Vollblut

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation durch Ficoll in 50 ml-LEUCO SEP-Röhrchen (Greiner). Das Blut wurde vorsichtig direkt in die Röhrchen pipettiert, die zuvor mit 15 ml Ficoll beschickt worden waren. Nach Zentrifugation bei $1000 \times g$ für 20 Minuten bei Raumtemperatur und ohne Abbremsung waren die Lymphozyten als trübe Interphase oberhalb der Ficollschicht erkennbar und konnten mit einer Pipette abgenommen werden. Sie wurden mindestens zweimal mit RPMI oder PBS gewaschen und dann entweder im entsprechenden Medium in Kultur genommen oder eingefroren.

2.2.4 Generierung tumorspezifischer CD8^+ T-Lymphozyten

Kryokonservierte PBL der Patientin MZ7 wurden in einem 37°C -Wasserbad aufgetaut, 1:10 in RPMI verdünnt, zweimal mit RPMI gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in AIM V_{komplett} in eine 24-Loch-Platte ausgesät. Die eingestellte Zellzahl war zunächst $1,5 \times 10^6/\text{ml}$ Aim V_{komplett} . MZ7-Melanomzellen wurden mit 100 Gy bestrahlt, danach

auf 1×10^5 /ml AIM V_{komplett} eingestellt und zu den PBL in die MLTC (aus dem Englischen: „mixed lymphocyte-tumorcell culture“) eingesetzt. Nach drei Tagen wurde aus jeder Kultureinheit (KE) der 24-Loch-Platte die Hälfte des Mediums verworfen und durch 1 ml/KE frisches AIM V_{komplett} mit 500 IU/ml rhIL-2 ersetzt (entsprechend einer Endkonzentration von 250 IU/ml). Sieben Tage nach der ersten Stimulation wurden die nicht-adhärenen Zellen aus den KE vereinigt, die adhärenente Population wurde verworfen. Die Lymphozyten wurden erneut auf 1×10^6 /ml AIM V_{komplett} (inklusive IL-2) eingestellt und erneut 1×10^5 bestrahlte Tumorzellen/ml dazugegeben. Von nun an wurden die Zellen wöchentlich auf gleiche Weise restimuliert. Nur wenn die Zellen stark proliferierten, wurden sie bereits nach vier Tagen subkultiviert, indem je der Inhalt einer KE auf zwei aufgeteilt wurde und die Zellen frisches Medium mit 250 IU/ml IL-2 bekamen. Unmittelbar vor der vierten Stimulation wurden die CD8⁺ T-Lymphozyten mit Hilfe von MiniMACS-Säulen (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach) isoliert und weiterstimuliert. Die CD8⁺Zellen (2×10^5 /KE) wurden bestrahlt und zusätzlich zu den Tumorzellen in die Kultur dazugegeben. Nach der 6. Stimulation wurden anstelle der autologen CD8⁺-Zellen bestrahlte AK-EBV-B-Zellen als „feeder-Zellen“ mit in die Kultur gegeben: ebenfalls 2×10^5 /KE.

2.2.5 Zytotoxizitätstest

Zytotoxische T-Zellen (CTL) setzen bei Kontakt mit ihrem Antigen auf einer Zielzelle Zytokine frei und lysieren die Zielzelle durch verschiedene Effektormechanismen. Diese Zell-Zellinteraktion kann durch den ⁵¹Cr-Freisetzungstest gemessen werden [85]. Die Zielzellen wurden vor dem Test chromiert, indem sie für eine Stunde mit 100 µCi Na(⁵¹Cr)O₄ im Brutschrank inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen wurden 2000 Zellen/Testeinheit einer Spitzboden-Mikrotiterplatte ausgesät. Die T-Zellen wurden in verschiedenen Effektor/Zielzell-Verhältnissen zwischen 1:1 und 60:1 dazugegeben. Der Test wurde für vier Stunden im Brutschrank inkubiert und durch Abzentrifugation der Zellen abgebrochen. 90 µl der Überstände wurden sodann im Gamma-Counter auf freigesetztes Chrom überprüft. Als Positivkontrolle diente der Überstand chromierter Zellen, die durch Zugabe von Nonidet P-40 (130 µl/Ansatz einer 1 %-igen Lösung) vollständig lysiert wurden. Die spontane Chromfreisetzung durch die Zellen, gemessen an der Chrominkorporation, lag in der Regel zwischen 15-20 %. Die spezifische Lyse eines T-Zellklons wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}{\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}} \times 100$$

Zytotoxische T-Zellklone wurden vier oder fünf Tage nach einer Restimulation in einen Chromtest eingesetzt. Alle Testansätze wurden doppelt bestimmt.

2.2.6 TNF-Test

Eines der nach Antigenkontakt von T-Zellen freigesetzten Zytokine ist TNF (Tumornekrosefaktor). Das ins Kulturmedium abgegebene Zytokin wurde durch einen Bioassay mit einer TNF-sensiblen murinen Fibrosarkomzelllinie (WEHI 164.13 [86]) nachgewiesen. Ein einfacher Farbttest unterscheidet dabei die vom TNF getöteten Indikatorzellen von den überlebenden Zellen, da nur letztere in der Lage sind, den Farbstoff MTT umzusetzen.

Zur Durchführung von TNF-Tests in Mikrotiterplatten wurden pro Testeinheit (TE) 2000 Zellen eines CTL-Klones mit 10.000 Melanomzellen oder mit Antigen-cDNA transfizierten COS-7-Zellen in 100 µl RPMI_{komplett} (inklusive 250 IU/ml IL-2) für 20 h im Brutschrank koinkubiert. Danach wurden 50 µl der Kulturüberstände auf 40000 WEHI 164.13 (in 50 µl RPMI_{komplett}) gegeben. Das Medium enthielt 2 µg/ml Actinomycin D, einen Transkriptioninhibitor, der das Wachstum der WEHI-Zellen hemmen sollte. Nach 20 bis 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden 50 µl MTT (2 mg/ml MTT in PBS) pro TE dazupipettiert und die Platte(n) weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Durch die Aktivität mitochondrialer Enzyme in überlebenden Zellen, wurde das MTT in wasserunlösliche Formazankristalle umgesetzt, die anschließend in einer vierstündigen Inkubation mit SDS-DMF bei 37°C oder bei Raumtemperatur über Nacht erneut gelöst wurden. Der dabei entstehende Farbumschlag konnte im ELISA-Photometer bei 570 nm (die Referenzwellenlänge war 690 nm) bestimmt werden.

Der Aktivierungszustand der für den TNF-Test vorgesehenen CTL mußte sehr niedrig sein. Die T-Zellen wurden frühestens an Tag 7, manchmal auch erst bis zu Tag 14 nach der Restimulation eingesetzt.

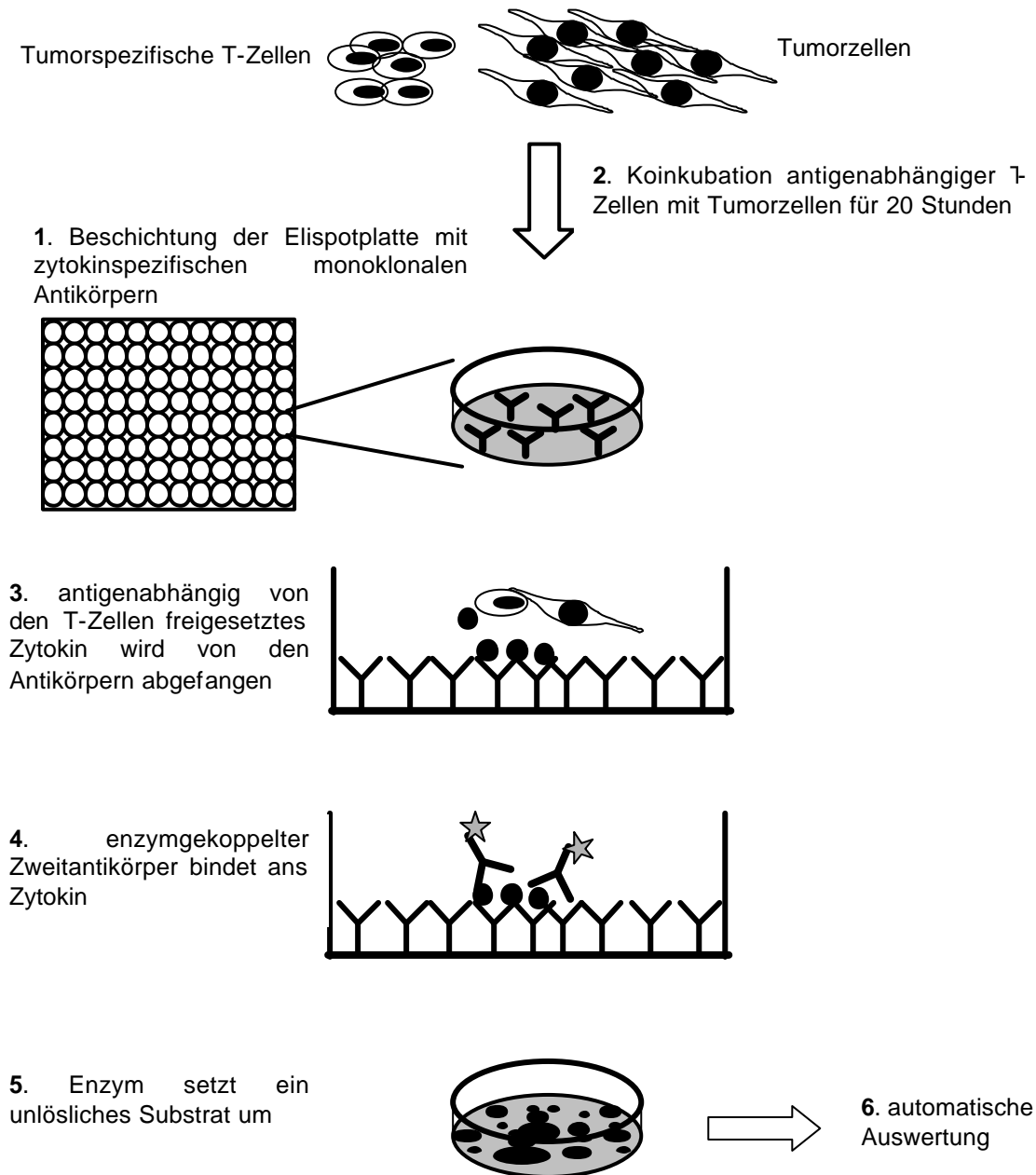
2.2.7 Gamma-Interferon- und „Granzyme B“-ELISPOT-Assays

Gamma-Interferon (IFN γ) und „Granzyme B“ (GrB, eine Serinprotease) sind zwei weitere Zytokine, die von T-Lymphozyten nach Antigenkontakt freigesetzt werden. Das Prinzip des ELISPOT-Assays (Enzyme-linked Immunosorbent Spot-Assay [87]) besteht darin, daß ein monoklonaler Antikörper gegen ein Zytokinepitop mit dem konstanten Teil seiner schweren

Kette an eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran gebunden wird. Daraufhin werden Lymphozyten, die bei Antigenkontakt das Zytokin sezernieren können, mit ihren Zielzellen auf der Membran koinkubiert und die dabei freigesetzten Zytokine durch den variablen Abschnitt des Antikörpers gebunden. Nach Abwaschen der Zellen wird ein Detektionsantikörper, der ein zweites Epitop des Zytokins erkennt, dazugegeben. Der Zweitantikörper ist an Biotin gekoppelt, das wiederum durch Avidin nachgewiesen werden kann. Ein an Avidin gebundenes Enzym (Peroxidase oder Alkalische Phosphatase) setzt im nachfolgenden Schritt sein Substrat um und kennzeichnet dadurch die Orte der Zytokinfreisetzung auf der Membran (siehe Abb. 2.1).

Die Elispotplatte wurde am Vorabend des Testtages mit dem Primärantikörper (z. B. Klon 1-D1K für IFN γ oder HC4 für GrB) beschichtet und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Der Antikörper für IFN γ wurde auf 10 μ g/ml PBS verdünnt, der für GrB auf 15 μ g/ml PBS. Danach wurden 50 μ l/Testeinheit (TE einer Elispotplatte) eingesetzt. Vor Ansetzen des Tests wurde der nichtgebundene Antikörper durch sechsmaliges Waschen mit PBS (100 μ l/TE) entfernt. Da freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran blockiert werden müssen, wurde die Platte entweder mit serumhaltigem Medium vorinkubiert oder die Zielzellen wurden in serumhaltigem Medium auf die Platte vorgelegt. Zielzellen waren transient transfizierte COS-7-Zellen oder 293 T-Zellen (in der Regel wurden 20.000 Zellen/TE transfiziert), Melanomzellen (> 30.000/TE) oder mit synthetischen Peptiden beladene EBV-B-Zellen (75.000/TE). Die Vorinkubation dauerte 30 bis 60 Minuten. In der Zwischenzeit wurden die Lymphozyten mit RPMI gewaschen, auf die erforderliche Zellzahl in AIM V_{komplett} inklusive 250 IU/ml rhIL-2 eingestellt und nach Ablauf der Vorinkubation auf die Zielzellen gegeben. Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden mit 100.000 Zellen, mehrfach restimulierte aber nicht-klonale T-Zellen mit 10.000 und CTL-Klone mit 1000 – 5000 Zellen pro TE eingesetzt. Der Test wurde für 12 bis 20 Stunden im Brutschrank inkubiert und danach entwickelt. Dazu wurden die Platten sechsmal mit PBS/0,05% Tween20 mit Hilfe des Nunc-ImmunoTMWasher (Nunc, Wiesbaden) gewaschen. Danach wurden 60 μ l/TE Detektionsantikörper in einer Konzentration von 2 μ g/ml PBS/0,5% BSA in die Platten pipettiert und diese für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen wurde der Avidin-Peroxidase-Komplex für eine Stunde auf die Platte gegeben. Der Komplex musste bereits 30 Minuten vorher angesetzt werden, indem zu je 10 ml PBS/0,1% Tween20 je ein Tropfen Reagenz A und Reagenz B aus dem Vectastain[®] Elite Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) gegeben wurden. Pro TE wurden 100 μ l eingesetzt. Die Platte wurde bei Raumtemperatur inkubiert.

Abb.2.1: Vereinfachte schematische Darstellung des Zytokin-ELISPOT-Assays



Danach wurde die Platte dreifach mit PBS/Tween20 und dreifach mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 100 μ l/TE AEC-Substratlösung wurde der Test entwickelt. Die Substratlösung bestand aus einer AEC-Tablette (Sigma), die in 2,5 ml Dimethylformamid gelöst und mit 47,5 ml Acetatpuffer (46,9 ml Wasser, 4,6 ml 0,2N Essigsäure, 11 ml 0,2N

Natriumacetat) verdünnt und gut gemischt wurde. Nach Zugabe von 25 µl H₂O₂ (30%) und Filtration durch einen 0,45 µm-Spritzenfilter war die Substratlösung gebrauchsfertig. In der Regel war die Färbung nach wenigen Minuten intensiv genug, so dass die Reaktion durch Abspülen der Platte unter fließendem Leitungswasser abgestoppt werden konnte. Die Zählung der Zytokinspots erfolgte erst nach vollständiger Abtrocknung der Nitrozellulose.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde für die Bestimmung der Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern eingesetzt. Die Zellen wurden einmal mit RPMI gewaschen, gezählt und für jeden zu testenden Antikörper zwischen 500.000 und 1.000.000 Zellen in FACS-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, das Zellpellet resuspendiert und der Antikörper (als unverdünnter Hybridomüberstand oder 1:100 bis 1:1000 verdünnter, aufgereinigter Antikörper) direkt zu den Zellen gegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/1%BSA wurde der gebundene Erstantikörper, der meistens aus der Maus stammte, durch Inkubation mit einem FITC-gekoppelten Ziege-anti-Maus Fab-Fragment für 15 Minuten bei 4°C markiert. Dieser Zweitantikörper wurde 1:100 mit PBS/1%BSA verdünnt und 50 µl pro Ansatz in die resuspendierten Zellen gegeben. Die Auswertung erfolgte nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS im Durchflusszytometer (siehe 2.1.1).

2.2.9 Transiente Transfektion von COS-7-Zellen und 293T-Zellen

Für die transiente Transfektion von COS-7-Zellen und 293T-Zellen mit antigenkodierender cDNA standen drei Methoden zur Verfügung: Die DEAE/Dextran-Chloroquine-Methode nach Aruffo und Seed [36;88;89] sowie die Transfektionen mit Hilfe der SuperFect[®]- bzw. PolyFect[®]-Reagenzien von Qiagen (Hilden). Die Transfektionen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Für alle drei Methoden und beide Zelllinien war es wichtig, daß die Zellen sich im Wachstum befanden, um gute Transfektionseffizienzen zu erreichen. Daher wurden die Zellen 2 bis 4 Tage vor der Transfektion subkultiviert. Eine Subkultivierung am Tag vor dem Transfektionsexperiment hatte – im Gegensatz zu den Angaben in den Benutzerhandbüchern von Qiagen – eher nachteilige Auswirkungen auf die Transfektionseffizienz.

Die Transfektion der COS-7-Zellen und 293T-Zellen mit SuperFect® und PolyFect® konnte direkt in antikörperbeschichteten Elispotplatten durchgeführt werden. Die Transfektion mit DEAE/Dextran-Chloroquine wurde in Rund- oder Flachboden-Mikrotiterplatten durchgeführt und die Transfektanten wurden anschließend in die Elispotplatten überführt. Dafür wurde das Transfektionsprotokoll modifiziert.

Transfektion mit DEAE/Dextran-Chloroquine

COS-7-Zellen, die für einen Einsatz im TNF-Test vorgesehen waren, wurden als adhärenente Zellen transfiziert. 10.000 Zellen/Testeinheit (TE) einer Flachboden-Mikrotiterplatte wurden zwei Tage vor dem Transfektionsexperiment in 100 µl RPMI_{komplett} ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden in einer Rundboden-Mikrotiterplatte die HLA- und Antigen-Expressionsvektoren mit dem Transfektionsreagenz gemischt. Dazu wurden in der Regel 100 ng HLA-Plasmid in 20 µl RPMI/10% Nu-Serum pro TE vorgelegt, 100 ng Antigen-Plasmid in 2-5 µl des gleichen Mediums dazugemischt und anschließend 20 µl Transfektionsreagenz, bestehend aus 800 µg/ml DEAE/Dextran (Stammlösung: 10 mg/ml) und 400 µM Chloroquine (Stammlösung: 10mM), dazupipettiert. Der Transfektionsansatz wurde für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen, um die Bildung von Komplexen aus DEAE/Dextran und DNA zu gewährleisten. In der Zwischenzeit wurden die COS-7-Zellen zweimal mit 50 µl PBS/TE gewaschen und danach je Loch 40 µl Transfektionsreagenz auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 3 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend das Transfektionsreagenz dekantiert und durch 50 µl/TE vorgewärmtes PBS/10% DMSO ersetzt. Nach exakt 2 Minuten wurde das PBS/DMSO entfernt und 100 µl RPMI_{komplett} pro TE auf die Zellen pipettiert. 24 bis 48 Stunden später wurden die Transfektanten im TNF-Test hinsichtlich der Erkennung durch T-Zellen getestet.

Sollten die transfizierten COS-7-Zellen in einen ELISPOT-Assay eingesetzt werden, mussten die adhärenente Zellen abgelöst und auf die antikörperbeschichtete Elispotplatte überführt werden. Dazu wurde das Medium durch PBS ersetzt, um die Zellen zu waschen, danach erfolgte eine Inkubation der Zellen für 10 Minuten mit 1x Versen® (0,05% EDTA) bei 37°C. Anschließend wurden die nun abgelösten Zellen abzentrifugiert, in 50 µl Medium aufgenommen und auf die Elispotplatte übertragen.

Da das Ablösen und das Übertragen der Zellen auf die Elispotplatte oft zu Zellverlusten führte, woraus eine schlechte Reproduzierbarkeit der Experimente resultierte, wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem COS-7-Zellen als Suspensionszellen transfiziert werden konnten. Am Tag der Transfektion wurden 20.000 bis 25.000 COS-7-Zellen/TE einer

Rundboden-Mikrotiterplatte in 20 µl RPMI/10% Nu-Serum ausgesät. Auf einer separaten Rundboden-Mikrotiterplatte wurden die Transfektionsreagenzien vorbereitet.

Dazu wurden folgende Bestandteile zusammengegeben:

- 30 µl RPMI/10% NuSerum inklusive 800 µg/ml DEAE/Dextran und 400 µM Chloroquine
- 150 ng HLA-cDNA in 2 µl RPMI/10% NuSerum
- 2 µl antigenkodierende cDNA (50 bis 200 ng)

Die Reagenzien wurden durch Pipettieren gut gemischt und für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden je 20 µl Transfektionsreagenz pro TE zu den COS-7-Zellen gegeben und für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Es folgte der „DMSO-Schock“ durch Zugabe von 40 µl/TE PBS/20% DMSO für 2 Minuten. Das DMSO wurde durch 100 µl RPMI/TE verdünnt und die Zellen durch Zentrifugation (2000 rpm, 10 Minuten) gesammelt. Nach Abkippen des Überstands wurden die Zellen in 100 µl RPMI/10% FCS resuspendiert und auf die beschichtete und gewaschene Elispotplatte überführt. Nach 24 Stunden wurde der ELISPOT-Assay durchgeführt.

Transfektion mit SuperFect™ oder PolyFect™

Am Tag der Transfektion wurden die COS-7-Zellen auf 20.000/120 µl RPMI_{komplett} eingestellt und pro TE auf die antikörperbeschichtete Elispotplatte gegeben. Auf einer Rundboden-Mikrotiterplatte wurden je TE folgende Reagenzien zusammengegeben:

- 10 µl RPMI inklusive 100 ng HLA-cDNA
- 2 µl antigenkodierende cDNA (50 bis 200 ng)
- 20,5 bis 22,5 µl RPMI inklusive 0,5 bis 2,5 µl Superfect oder Polyfect (die Chargen wurde jeweils ausgetestet)

Die Ansätze wurden für 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich Komplexe aus sogenannten aktivierten Dendrimern und der cDNA ausbilden konnten. Danach wurden 30 µl Transfektionslösung/TE zu den 120 µl COS-7-Zellen gegeben und durch Pipettieren gut gemischt. Nach 20 bis 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Transfektanten im IFN_γ-ELISPOT-Assay getestet (siehe 2.2.7).

2.2.10 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Methoden wurden entsprechend den zitierten Protokollen durchgeführt. Lediglich Abweichungen von den Protokollen und Anpassungen werden detailliert beschrieben.

Isolierung von Plasmid-DNA aus rekombinanten Bakterien

Plasmid-DNA wurde aus rekombinanten Bakterien mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kits (500 µg bis 1 mg Plasmid-DNA aus 500 ml LB-Übernachtskultur), Qiagen Plasmid Midi Kits (100 bis 200 µg Plasmid-DNA aus 25 ml LB-Kultur) oder verschiedener Qiagen Plasmid Mini Kits (5 bis 20 µg Plasmid-DNA aus 1,5 bis 5 ml LB-Übernachtskultur) extrahiert. In jedem Fall wurde nach den vom Hersteller angegebenen Protokollen verfahren. Allerdings wurden für die Amplifikation von pcDNA1- oder pcDNA3-Plasmiden die Inkubationszeiten im Bakterieninkubator auf 20 bis 24 Stunden verlängert, da nach der von Qiagen angegebenen Dauer (12 bis 16 Stunden) die Ausbeute an extrahierter Plasmid-DNA regelmäßig zu gering ausfiel.

Elektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren

PCR-Produkte, Plasmid-DNA, genomische DNA, enzymatisch restringierte DNA und auch RNA-Spezies wurden durch Agarose-Gelelektrophorese in TBE-Puffern untersucht. Dabei richtete sich die Konzentration der Agarose nach den erwarteten Fragmentgrößen und die angelegte Spannung und Stromstärke nach der Größe des Gels (ca. 5-10 V/cm). DNA-Hydrolysen mit Restriktionsendonukleasen wurden nach den Vorschriften der Enzymhersteller durchgeführt. Die größenfraktionierte DNA wurde durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (10 µg/ml Agarosegel) sichtbar gemacht und das Ergebnis der Elektrophorese mit dem BioDocAnalyse-System von Biometra (Göttingen) dokumentiert.

RNA-Spezies wurden mit Hilfe von denaturierenden Agarosegelen analysiert. Das Agarosegel wurde dafür nicht mit TBE-Puffer angesetzt, sondern mit MOPS-Puffer unter Zugabe von Formaldehyd. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Puffer bei 5-10 V/cm (Sambrook and Russell, 3rd Edition, CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 2001).

Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA in wässrigen Lösungen wurde ein Spektralphotometer verwendet. Dabei wurde die Extinktion der Lösung bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen. Durch folgende Formeln wurde die Nukleinsäurekonzentration ermittelt:

$$\begin{aligned} E_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{Verdünnung} &= \mu\text{g/ml dsDNA} \\ E_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnung} &= \mu\text{g/ml ssDNA oder RNA} \end{aligned}$$

Der Quotient aus dem Wert der Extinktion bei 260 nm und dem der Extinktion bei 280 nm diente zur Qualitätskontrolle der Nukleinsäurelösung. Ein Ergebnis zwischen 1,8 und 2,0 wurde als akzeptabel betrachtet, da Proteinkontaminationen weitgehend ausgeschlossen werden konnten.

Extraktion von Nukleinsäuren aus Zellen

Die Extraktion von genomischer DNA aus der MZ7-Melanomzelllinie oder anderen Zelllinien erfolgte mit dem QIAamp Tissue Kit nach den Vorschriften des Herstellers. Die Präparation beinhaltete die Entfernung von RNA-Kontaminationen durch eine Inkubation mit RNase A. Je Präparation wurden 1×10^7 Melanomzellen eingesetzt. Die Zellen wurden mit EDTA (1x Versen[®]) abgelöst und bei $500 \times g$ für 5 Minuten abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte die DNA-Extraktion. Die Ausbeute lag regelmäßig zwischen 40 und 100 μg genomischer DNA. Die Qualität der DNA wurde durch Elektrophorese in einem 0,7 %igen Agarosegel überprüft.

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellkulturen oder Gewebe wurde mit dem RNeasy Mini- oder Midi-Kit nach den Angaben von Qiagen durchgeführt. Adhärente Zellen wurden abgelöst und gewaschen. Suspensionszelllinien wurden zweimal mit RPMI gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in die Aufarbeitung eingesetzt. Typischerweise wurden 5×10^5 bis 5×10^6 Zellen (Mini-Kit) oder bis zu 1×10^7 Zellen (Midi-Kit) pro Ansatz verarbeitet. Anschließend wurde die RNA einem DNase-Verdau unterzogen. Mit dem Midi-Kit lag die Ausbeute an Gesamt-RNA z. B. aus 10^7 Melanomzellen um 700 μg und aus 10^7 EBV-B-Zellen um 200 μg .

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Frischgewebe erforderte die Einhaltung einer lückenlosen Kühlkette. Das frisch operierte Gewebe war in flüssigem Stickstoff (N_2) schockgefroren worden und wurde bei -80°C oder im N_2 -Behälter bis zur Verwendung

aufbewahrt. Mörser und Pistill wurden vor Gebrauch mit flüssigem N₂ vorgekühlt. Mit einem Skalpell wurde unter flüssigem N₂ Gewebe von den gefrorenen Blöcken abgeschabt und mit dem kalten Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Pulver wurde mit dem Rest flüssigen N₂ in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Abdampfen des Stickstoffs wurde unverzüglich der Lysepuffer auf das Gewebe gegeben und das Zelllysate mit Hilfe von Spritze und Kanüle homogenisiert. Danach wurde nach dem RNeasy-Protokoll weiterverfahren.

Die in RNase-freiem Wasser gelöste RNA wurde portioniert und bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren. Die Menge der isolierten RNA wurde photometrisch, die Qualität durch Elektrophorese über ein denaturierendes Agarosegel bestimmt.

cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA durch Reverse Transkription (RT) als Voraussetzung für die Amplifikation und Klonierung von HLA-Allelen oder zur Überprüfung der Expression von möglichen Tumorantigenen in Tumorzellen oder Normalzellen erfolgte mit dem „Superscript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis“ von Gibco BRL (Eggenstein) oder mit dem „Reverse Transcription System“ von Promega (Mannheim). Wie von beiden Herstellern empfohlen, wurden pro Ansatz 1-5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Für Standard-RT-Reaktionen wurden in der Regel Oligo-dT-Primer eingesetzt und eine anschließende PCR (siehe unten) mit genspezifischen Primern durchgeführt.

Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation z. B. von HLA-cDNA, Tumor-cDNA oder von Abschnitten genomischer DNA durch PCR („polymerase chain reaction“) erfolgte nach Standardverfahren. Ein typischer PCR-Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

cDNA (in Tris-HCl, pH 8)	2-5 µl,
10 x Reaktionspuffer	5 µl,
dNTPs (100 mM)	1 µl,
5'-Primer (2µM)	2 µl,
3'-Primer (2µM)	2 µl,
Taq-DNA-Polymerase	1 µl,
H ₂ O	ad 50 µl.

Zur Kontrolle der PCR wurde jeweils eine Wasserkontrolle durchgeführt, in die anstelle der zu amplifizierenden DNA Wasser eingesetzt wurde und eine Positivkontrolle, in die

Primer für hochexprimierte Sequenzen wie Aktin, HLA-A oder HLA-B eingesetzt wurden. Die Reaktionsansätze wurden grundsätzlich auf Eis pipettiert und die Reagenzien nach dem vollständigen Auftauen für die Dauer ihrer Verwendung auf Eis gelagert. Für die Amplifikation im Thermocycler wurden Standard-Programme verwendet. Dabei richtete sich die „Annealing“-Temperatur der Primer nach ihren Schmelzpunkten. Diese wurden mit Programmen kalkuliert, die im World Wide Web (z. B. www.williamstone.com oder alces.med.umn.edu/rawtm.htm) verfügbar waren oder mit „Primer Designer“ für Windows von Sci-Ed (Scientific & Educational Software, Durham). Ein typisches PCR-Programm mit 3 Schritten pro Zyklus war:

1. 95°C, 5 Minuten,
2. 95°C, 45 Sekunden,
3. 64°C, 45 Sekunden,
4. 72°C, 2 Minuten,
5. 72°C, 5 Minute
6. 4°C, Pause.

Die Schritte zwei bis vier wurden 25-35 mal wiederholt.

Für Primer mit Schmelztemperaturen um 72°C oder höher wurden PCR-Programme mit zwei Schritten pro Zyklus programmiert, in deren Ablauf die Denaturierungstemperatur (95°C) und die Elongationstemperatur (72°C) 25 – 35 mal alterierten. Die PCR-Produkte wurden in 1–1,5 %-igen Agarosegelen aufgetrennt, unter UV-Licht analysiert und dokumentiert.

Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder von PCR-Produkten wurde mit dem „Thermo Sequenase™Cy™5 Dye Terminator Kit“ von Amersham Pharmacia Biotech nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und mit dem „OpenGene™ Automated DNA Sequencing System“ von Visible Genetics ausgewertet. Plasmide wurden mit 0,5 – 1,5 µg in die Sequenzierreaktion eingesetzt, PCR-Produkte mit 100 – 200 ng pro Reaktion.

Die verwendeten Sequenzierprogramme bestanden aus 30 – 35 Zyklen: 45 Sekunden 95°C, 45 Sekunden 50 - 60°C, 2 Minuten 72°C. Anschließend wurde die DNA nach Protokoll des Herstellers mit Ethanol, Ammoniumacetat und Glycogen gefällt, das Pellet getrocknet und danach in 5-8 µl „Stop-Lösung“ (ein Dextran-haltiger Laufpuffer) wieder aufgenommen. Je 2-4 µl jeder Reaktion wurden auf das Sequenziergel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

58°C Geltemperatur,
1400 V angelegte Spannung,
50 % „Laser Power“,
1 s „Run sampling“.

Unter diesen Bedingungen konnten in zwei Stunden 400 – 450 Basenpaare einer DNA-Sequenz gelesen werden. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen mit dem im System enthaltenen Programm GeneObjects™ 3.0 ausgewertet und gegebenenfalls editiert. MHC Klasse I-Sequenzen wurden danach mit Hilfe der GeneLibrarian™ Software und einer systemimmanenten MHC Klasse I-Datenbank näher charakterisiert. Die Datenbank wurde regelmäßig aktualisiert und umfasst die Exons 2 und 3 aller derzeit bekannten HLA-Allele der MHC Klasse I (Stand: April 2001, siehe auch IMGT/HLA-Datenbank [90;91]). Alternativ zum oben genannten Kit konnten PCR-Produkte für HLA-Klasse I-Typisierungen auch mit Hilfe des Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit und mit Cy5-markierten Primern durchgeführt werden. Hierfür waren die Primer, die in der Umgebung der Exons 2 und 3 der HLA-Allele binden mit Cy5 markiert worden.

Gelegentlich wurden Plasmide mit dem „ABI Prism™ Big-Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ von Applied Biosystems (Weiterstadt) sequenziert und auf einem ABI 377 Sequenziergerät im Molekulargenetischen Labor der Kinderklinik (AG Prof. Dr. Zabel) der Universitätsklinik Mainz analysiert.

Präparation von cDNA-Pools aus einer cDNA-Bank der Melanomzelllinie MZ7-MEL

Die bidirektionale cDNA-Bank aus RNA der Melanomzelllinie MZ7-MEL im Expressionsvektor pcDNA1/Amp (Invitrogen) wurde von Frau Dr. C. Wölfel wie von De Plaen et. al. beschrieben hergestellt [38;88]. Dabei wurde zunächst Gesamt-RNA isoliert und dann mRNA mit Hilfe von Oligo-dT-Säulen angereichert. Aus dieser wurde mit dem Superscript™-System von Gibco BRL cDNA hergestellt und diese fraktioniert. Die Fraktionen 7, 8 und 11 enthielten cDNA. Diese cDNA-Spezies wurden nach Ligation an EcoRI-Adaptoren und EcoRI-Verdau in pcDNA1/Amp kloniert und in elektrokompente MC1061/p3 *E. coli*-Zellen elektroporiert. Aus der Fraktion 7 wurde eine Bank hergestellt, die aus 216.000 unabhängigen Klonen bestand. Nach *EcoRI*-Restriktion zeigte sich, dass bis zu 80 % der Klone dieser Fraktion Inserts aufwiesen. Die Integratgröße der meisten Klone lag zwischen 1 und 2 kbp.

Für das Poolen der Klone wurden die Bakterien titriert und mit ungefähr 50 Kolonien/cm² auf 22,5 x 22,5 cm Agarplatten (mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Nach Inkubation bei

37°C über Nacht wurden mit eigens dafür aus Pasteurpipetten hergestellten Spateln je 100 Kolonien eingesammelt und in 5 ml LB/Amp-Medium über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C expandiert. Von jedem 100er-Pool wurde ein Aliquot mit Glycerol eingefroren, der Rest wurde zur Plasmidisolierung mit dem QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit verwendet. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 200 µl Tris-HCl (pH 8,5) pro Pool. Das Elutionsvolumen betrug nach Abzentrifugation der Platten durchschnittlich 100 µl. Die DNA-Konzentrationen der Pools wurden stichprobenartig bestimmt und lagen zwischen 60 ng/µl und 120 ng/µl. Damit lag die Ausbeute (6 – 12 µg) an Plasmid-DNA pro Präparationseinheit etwas niedriger als erwartet, da die Kapazität der Silicamembran einer Präparationseinheit mit 20 µg doppelsträngiger DNA angegeben ist. Insgesamt wurden 24 Flachboden-Mikrotiterplatten mit 100er-Pools präpariert. Damit bestand die für die Identifizierung neuer Melanomantigene präparierte cDNA-Bank aus 2304 100er-Pools, also insgesamt 230.400 Klonen. Diese große Anzahl von Klonen sollte gewährleisten, auch sehr niedrig exprimierte Gene entdecken zu können, die für Tumorantigene kodieren. Die Pools wurden bis zur Transfektion bei –20°C gelagert.

2.2.11 Antikörperblockade der T-Zellen

Die Reaktivität von T-Zellpopulationen gegen ihre Zielzellen kann durch monoklonale Antikörper gegen einzelne HLA-Moleküle oder Gruppen von HLA-Molekülen blockiert werden. Dadurch kann die HLA-Restriktion der T-Zellen ermittelt werden. Unter den inzwischen zahlreichen HLA-spezifischen monoklonalen Antikörpern sind allerdings nur sehr wenige für Blockadeexperimente geeignet. Die Antikörper wurden aus Hybridomüberstand aufgereinigt, aliquotiert und bis zur Anwendung eingefroren. Die aufgereinigten Antikörper hatten Konzentrationen zwischen 1 und 2 mg/ml. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Antikörper für die Blockade von CTL-Klonen oder von mehrfach restimulierten, nicht-klonalen T-Lymphozytenpopulationen im IFN γ -ELISPOT-Assay oder Lysetest verwendet (Literatur siehe Abschnitt 2.1.16):

- Der Antikörper *W6/32* erkennt ein gemeinsames Epitop aller MHC Klasse I-Proteine und blockiert dadurch alle Klasse I-restringierten T-Zellen. Der aufgereinigte Antikörper wurde in Konzentrationen zwischen 50 und 100 µg/ml zur Blockade verwendet.
- Der *B1.23.2*-Antikörper erkennt ein gemeinsames Epitop aller HLA-B- und HLA-Cw-Allele sowie der Mitglieder der HLA-Aw19-Subgruppe der HLA-A-Allele. Die

besten Resultate konnten mit Konzentrationen zwischen 50 und 100 µg/ml des aufgereinigten Antikörpers erzielt werden.

- Der monoklonale Antikörper *SFR8-B6* erkennt ein gemeinsames Epitop (Bw6-Epitop) einer Subgruppe von HLA-B-Proteinen. Die für eine Blockade geeignete Konzentration lag über 300 µg/ml.
- Der HLA-A3-spezifische Antikörper *GAP-A3* wurde in einer Konzentration von 250 µg/ml eingesetzt.

2.2.12 Klonierung antigenkodierender cDNA durch cDNA-Expressionsklonierung

Aus der cDNA-Bank der Melanomzelllinie MZ7-MEL sollten Klone isoliert werden, die für T-zellerkannte Antigene kodieren. Dazu wurden die cDNA-Pools separat in COS-7-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde das HLA-Allel kotransfiziert, für das die T-Zellpopulation mit der nach dem Antigen gesucht werden sollte, restringiert war. Die Transfektionen wurden mit DEAE-Dextran/Chloroquine, SuperFect™ oder PolyFect™ durchgeführt (siehe 2.2.9). Nach 24 Stunden wurden die T-Zellen zu den Transfektanten gegeben. Die Reaktion der T-Zellen wurde durch IFN γ -ELISPOT-Assays gemessen. Positiv getestete cDNA-Pools wurden zunächst in Pools zu je 10 Klonen subkloniert und durch erneute Transfektion auf die Erkennung durch die T-Zellen überprüft. Nach erneuter Subklonierung positiver 10er-Pools in einzelne Kolonien und der Transfektion der daraus isolierten Plasmide wurden Klone identifiziert, sequenziert und näher charakterisiert.

2.2.13 Generierung und Klonierung von Fragmenten antigenkodierender cDNA

Zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region eines identifizierten cDNA-Klons wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) Fragmente amplifiziert und durch das TOPO-TA Cloning-System von Invitrogen in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His TOPO® kloniert. Durch PCR oder direkte Sequenzierung der Klone wurde die Orientierung der Inserts im Vektor überprüft. Durch Transfektion der korrekt orientierten Fragmente in COS-7-Zellen und ELISPOT-Assay wurden die Fragmente auf die Erkennung durch die T-Zellen überprüft und die erkannte Region gegebenenfalls noch einmal fragmentiert. Aus

einer erkannten Region, die noch für 40-60 Aminosäuren kodierte, wurden synthetische Peptide bestellt. Die Sequenzen dieser Peptide wurden mit Hilfe von im Internet zugänglichen Programmen erhalten, die eine in den Algorithmus eingespeiste Aminosäuresequenz nach nona- und dekameren Peptiden mit Bindungsmotiven für ein betrachtetes HLA-Allel absuchen (http://www.bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform; <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>; <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/index.html>).

Fragmentierung der gp100-cDNA

Die gp100-cDNA im Expressionsvektor pB7/Neo wurde freundlicherweise vom LICR (Ludwig Institut für Krebsforschung, Brüssel, Belgien) zur Verfügung gestellt. Aus der cDNA wurden mit Hilfe der unter 2.1.18 angegebenen Primer Fragmente amplifiziert und kloniert. Die Primer waren so gewählt, daß sie einen GC-Gehalt von ca. 50% und Schmelztemperaturen zwischen 60°C und 66°C aufwiesen. Der PCR-Ansatz zur Amplifikation der Fragmente sah wie folgt aus:

5 µl 10x-Reaktionspuffer (inkl. 35 mM Mg(OAc)₂),
 2 µl Primer 1 (2 µM),
 2 µl Primer 2 (2 µM),
 1 µl dNTP-Mix (100 µM),
 5 µl Melanom-cDNA oder 5 µl gp100-pB7/Neo Midiprep (1:100),
 1 µl Advantage 2 Polymerase Mix,
 ad 50 µl H₂O.

Die Amplifikation erfolgte über 25 Zyklen der Schritte 2-4 nach folgendem Programm:

1: 95°C, 5 Minuten,
 2: 95°C, 45 Sekunden,
 3: 60°C, 45 Sekunden ,
 4: 72°C, 90 Sekunden,
 5: 72°C, 5 Minuten,
 6: 4°C, Pause.

Das PCR-Produkt wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft, dokumentiert und sofort nach Protokoll in die TOPO-TA-Klonierungsreaktion eingesetzt (1-4 µl). Die rekombinanten TOP 10 F'-Bakterien wurden auf LB-Agarplatten (mit 100 µg Ampicillin/ml) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden 8-12 Kolonien in je 5 ml LB/Amp-Medium für weitere 24 Stunden inokuliert. Die Plasmide wurden durch den Qiagen Plasmid-Miniprep isoliert. Durch eine erneute PCR mit einem Vektor-Primer und einem gp100-spezifischen Primer wurde die Orientierung der Inserts überprüft.

Korrekt orientierte Fragmente wurden sequenziert, um PCR-Artefakte auszuschließen. Danach wurden die Fragmente in COS-7-Zellen transfiziert und mit den gp100-reaktiven CTL im IFN γ -ELISPOT-Assay auf eine Erkennung überprüft. Die Peptide, die aus der eingegrenzten Region abgeleitet wurden, sind unter 2.1.19 aufgeführt.

Fragmentierung der Tyrosinase-cDNA

Zum Teil waren bereits Fragmente von der Tyrosinase-cDNA im Expressionsvektor pcDNA1/Amp vorhanden. Diese waren schon 1993 für die Eingrenzung der beiden T-zellerkannten Tyrosinasepeptide MLLAVLYCL und YMDGTMSQV verwendet worden [55]. Die Fragmente wurden erneut in COS-7-Zellen transfiziert und mit der Tyrosinase-reaktiven MLTC 18 auf Erkennung im IFN γ -ELISPOT-Assay getestet. Die erkannte Region wurde durch die für die gp100-Fragmentierung beschriebene Methode in weitere Fragmente unterteilt und diese wiederum durch Transfektion und ELISPOT-Assay getestet. Aus einer zuletzt noch für 40 Aminosäuren kodierenden Region wurden die in 2.1.19 aufgelisteten Peptide bestellt.

2.2.14 Peptiderkennungstests

War durch molekularbiologische Methoden eine Annäherung an die peptidkodierende Region eines T-zellerkannten Antigens gelungen, sollte durch Peptiderkennungstests die genaue Spezifität der T-Zellen ermittelt werden. Aus der erkannten Region wurden zunächst die zehn besten vorhergesagten Peptide synthetisiert. Wurde eines davon erkannt, erfolgte Synthese und Testung damit überlappender Nona- und Dekapeptide, um das optimale Peptid für die betrachteten T-Zellen herauszufinden. Die gp100-Peptide wurden von Boehringer Ingelheim Austria und MWG-Biotech, die Tyrosinase- und GPNMB/INT4- und GPNMB^{G181D}-Peptide von Sigma-Genosys synthetisiert. Die lyophilisierten Peptide wurden auf eine Konzentration von 2 mg/ml in PBS/5% DMSO eingestellt, aliquotiert und bis zum Einsatz bei -20°C eingefroren. Die Peptide der einzelnen Antigene und ihre Position in der Aminosäuresequenz sind in Abschnitt 2.1.19 aufgeführt.

Peptiderkennungstests wurden entweder im Lysetest oder im IFN γ -ELISPOT-Assay durchgeführt. In beiden Fällen dienten die MZ7-EBV-B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen. Peptiderkennungstests im IFN γ -ELISPOT-Assay wurden direkt in der Elispotplatte durchgeführt. Die antikörperbeschichtete Platte wurde viermal mit 100 μ l PBS/Testeinheit

(TE) gewaschen. In der Zwischenzeit wurden die EBV-B-Zellen zweimal gewaschen und auf 3×10^6 /ml AIMV_{komplett} eingestellt. Pro Peptid wurden 2 oder 3 Kultureinheiten (KE) mit 25 μ l dieser Zellsuspension (entspricht 75.000 Zellen je KE) beschickt und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Peptide wurden aufgetaut und in AIMV_{komplett} auf 400 μ g/ml verdünnt. Danach wurden 25 μ l der verdünnten Peptide zu den EBV-B-Zellen gegeben und die Zellen in den Brutschrank zurückgestellt. Die T-Zellen wurden gewaschen und in AIMV_{komplett} auf Konzentrationen zwischen 20.000/ml und 100.000/ml für T-Zellklone und 100.000/ml und 200.000/ml für nichtklonale Populationen eingestellt. Danach wurden je 50 μ l T-Zellen auf die Zielzellen gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Entwicklung der Spots erfolgte am kommenden Tag nach Protokoll (2.2.7).

Die Überprüfung der Peptiderkennung im ^{51}Cr -Freisetzungstest wurde ebenfalls mit den autologen EBV-B-Zellen als Zielzellen durchgeführt. 1×10^6 Zellen wurden für eine Stunde chromiert. Die chromierten Zellen wurden zweimal gewaschen und auf 80.000/ml RPMI_{komplett} eingestellt. 25 μ l der Zellsuspension wurden je Testeinheit (TE) einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Alle Ansätze wurden doppelt angelegt. Peptide wurden seriell verdünnt und in je 25 μ l RPMI_{komplett}/TE zu den chromierten EBV-B-Zellen dazugegeben. Gegen Ende der anschließenden einstündigen Inkubationszeit wurden die T-Zellen vorbereitet. Sie wurden zweimal gewaschen und so in RPMI_{komplett} eingestellt, dass die Reaktivität gegen jedes Peptid mit Effektorzell- zu Zielzellverhältnissen zwischen 1:1 und 60:1 getestet werden konnte. Die T-Zellen wurden mit 50 μ l/TE auf die Zielzellen gegeben. Nach einer Inkubationsdauer von vier Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand im Gammacounter gemessen (2.2.5).

2.2.15 Computer-gestützte Datenbanksuchen

Für Homologievergleiche von eigenen Sequenzen mit veröffentlichten wurden im Internet zugängliche Datenbanken verwendet. Von den spezialisierten Datenbanken für MHC-Klasse I-Sequenzen wurden die der ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics: http://www.swmed.edu/home_pages/ASHI/sequences/a_p.htm), die der HLA Informatik Gruppe des Anthony Nolan Bonemarrow Trust (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/>), die Datenbank des International Immunogenetics Projects (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>) und die KABAT-Datenbank, die mit dem BLAST-Programm des NCBI (National Center for Biotechnology Information) genutzt werden konnte (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), verwendet. Für sonstige Sequenzen wurden die

Datenbanken GenBank und SwissProt über das NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sowie EMBL des European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) herangezogen. Weitere nützliche Datenbanken, insbesondere mit Informationen über Tumorantigene von menschlichen Tumoren, sind über Internetseiten des Ludwig-Institut für Krebsforschung zu erreichen: <http://www-ludwig.unil.ch/SEREX/> und [http://www.cancerimmunity.org/peptide database/Tcellepitopes.htm](http://www.cancerimmunity.org/peptide_database/Tcellepitopes.htm).

3 Ergebnisse

Im Melanommodell MZ7 sollten in der vorliegenden Arbeit T-zellerkannte Tumorantigene identifiziert und charakterisiert werden. In Vorarbeiten waren eine Melanomzelllinie sowie tumorreaktive MLTCs und T-Zellklone etabliert worden. Die cDNA-Sequenzen von fünf der sechs serologisch nachgewiesenen HLA-Moleküle lagen in Expressionsvektoren kloniert vor. Das sechste Allel (HLA-Cw7) konnte trotz mehrerer Versuche weder aus der Melanomzelllinie noch aus der autologen EBV-B-Zelllinie isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Eine Tumor-cDNA-Bank, konstruiert in einen eukaryontischen Expressionsvektor, war gleichfalls vorhanden. Aus dieser Tumor-cDNA-Bank war bereits ein T-zellerkanntes Antigen kloniert worden, ein Genprodukt des punktmutierten *SIRT2*-Gens, dessen homologes Gen in *S. cerevisiae* „gene silencing“ reguliert (Protein bezeichnet als $SIRT2^{P182L}$) [92] (Daten zur Veröffentlichung in Vorbereitung). Zusätzlich zur Suche nach Antigenen mit Hilfe von langzeitkultivierten T-Zellklonen sollte getestet werden, ob kurz stimulierte, tumorreaktive MLTCs für die Suche nach Antigenen verwendet werden können. Als Testsystem sollte der Zytokin-ELISPOT-Assay eingesetzt werden, da er sich zum Beispiel für die Untersuchung von T-Zellantworten gegen virale Antigene als sehr sensitiv und reproduzierbar erwiesen hatte [93].

3.1 Funktionsanalysen tumorreaktiver T-Lymphozyten

3.1.1 Zytokinprofile tumorreaktiver T-Lymphozyten und die Kinetik ihrer Produktion nach Antigenkontakt

Für die Identifizierung von T-zellerkannten Melanomantigenen durch cDNA-Expressionsklonierung können prinzipiell alle Effektorfunktionen der tumorreaktiven $CD8^+$ T-Zellen ausgenutzt werden. Testsysteme waren dafür bisher vor allem der TNF-Bioassay und die Messung von $IFN\gamma$ im Testüberstand durch ELISA [58;65;88;94-97]. Eine sensitive Alternative zu diesen Tests, die Zytokine im Überstand messen, ist der Zytokin-ELISPOT-Assay (**Kap. 2.2.7**). Mit diesem Test wurden bis zu Beginn der Arbeit zwar keine neuen Antigene charakterisiert, aber z. B. zytokinproduzierende T-Zellen im peripheren Blut von geimpften Patienten oder von Patienten mit akuten Infektionen nachgewiesen [93;98]. Etablierte ELISPOT-Assays bestanden für die Zytokine $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, „Granzyme B“ (GrB) und

die Interleukine IL-4, IL-5 sowie IL-10. T-Zellklone, die bereits zu Beginn dieser Arbeit im Melanom-Modell MZ7 etabliert waren, wurden auf die Zytokine, die sie antigenabhängig sezernieren, überprüft. In **Abbildung 3.1** sind beispielhaft die Zytokinprofile der beiden T-Zellklone 12/82 und 12/153 nach Inkubation mit der autologen Melanomzelllinie gezeigt. Fast alle im weiteren getesteten T-Zellklone aus dem Modell MZ7 setzten TNF, IFN γ und GrB bei Antigenkontakt frei. Die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-10 fiel für die getesteten Klone deutlich schwächer aus, war aber immerhin messbar. Ein solches Zytokinprofil wird allgemein als charakteristisch für TH1-Zellen (eine Subgruppe der CD4⁺ T-Lymphozyten) beschrieben. CD8⁺-T-Zellen mit einem solchen Profil werden analog hierzu als Tc0/Tc1-Zellen bezeichnet [99;100]. In **Tabelle 3.1** ist die antigenabhängige IFN γ - und GrB-Freisetzung von acht T-Zellklonen gezeigt.

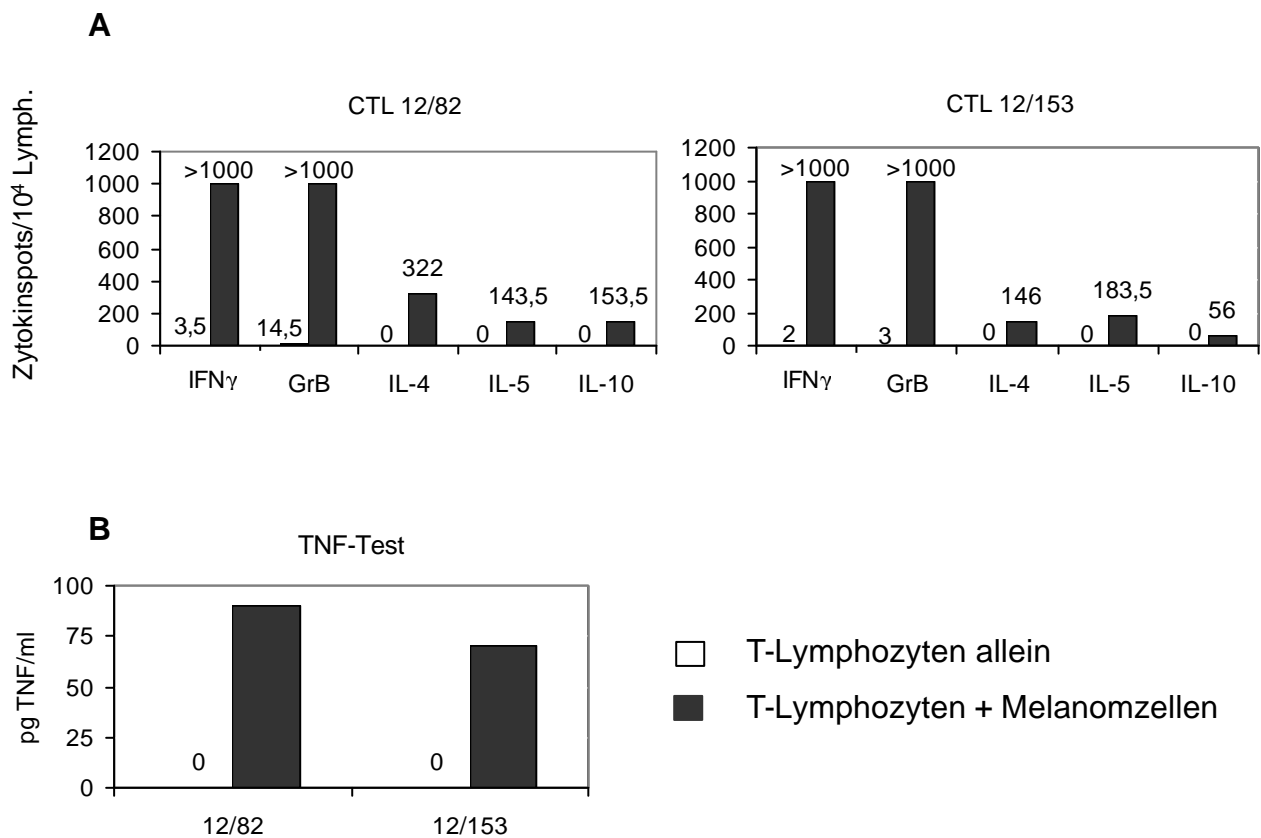


Abb. 3.1: Zytokinprofile zweier T-Zellklone. (A) Zytokin-ELISPOT-Assays mit den beiden T-Zellklonen 12/45 und 12/153. 1×10^4 Lymphozyten wurden mit 8×10^4 Melanomzellen für 20 Stunden (IFN γ und GrB) oder für 40 Stunden inkubiert (IL-4, -5, -10). (B) Das Ergebnis des gleichzeitig durchgeführten TNF-Bioassays. 1000 T-Zellen wurden allein oder zusammen mit 1×10^4 Melanomzellen für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die in den Überstand abgegebene Menge TNF gemessen. Grundlage für die Messung war eine Eichkurve, die durch die Titration von rekombinantem TNF erhalten wurde. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

T-Zellklon	IFN γ -ELISPOT-Assay [Zytokinspots/1000 Lymphozyten]		GrB-ELISPOT-Assay [Zytokinspots/1000 Lymphozyten]	
	Spontanfreisetzung	Antigenabhängige Freisetzung	Spontanfreisetzung	Antigenabhängige Freisetzung
12/14	2	446	115	482
12/45	0	517,5	4,5	342
12/82	0,5	438	19	410
12/92	0,5	406	20,5	437
12/112	0,5	437	3,5	180,5
12/118	3	27	33,5	30,5
12/153	3	490,5	10,5	268,5
12/160	11	311	7,5	250

Tabelle 3.1: IFN γ - und „Granzyme B“-Freisetzung von acht MZ7-CTL-Klonen gegen die autologe Melanomzelllinie. Je 1000 T-Zellen wurden allein oder zusammen 50.000 Melanomzellen für 20 Stunden inkubiert. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Um den Erkennungsnachweis durch ELISPOT-Assays zu optimieren, wurde die Kinetik der Freisetzung verschiedener Zytokine in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur letzten Restimulation bestimmt. **Abbildung 3.2** zeigt die Analysen für zwei T-Zellklone. Die Ergebnisse der Tests zeigten, dass bereits an Tag 4 nach einer Restimulation die Spontanfreisetzung von IFN γ und GrB durch die T-Zellen gering, die Sekretion der Zytokine bei Antigenkontakt jedoch hoch war. Die IFN γ -Freisetzung ließ allerdings mit weiterem zeitlichen Abstand von der Restimulation schnell nach, während die antigenabhängige GrB-Freisetzung stabil blieb. Bei früherem Einsatz der T-Zellen nach einer Stimulation waren die Daten nicht einheitlich. Es kam sowohl vor, dass T-Zellen an Tag zwei oder drei nach der Stimulation sehr viel Zytokin spontan sezernierten als auch, dass sie auch bei Antigenkontakt kaum Zytokin freisetzten (Daten nicht gezeigt). Die bevorzugte Methode wurde in allen nachfolgenden Tests der IFN γ -ELISPOT-Assay. Die T-Zellen wurden in der Regel an Tag vier oder fünf nach Restimulation mit den Tumorzellen eingesetzt.

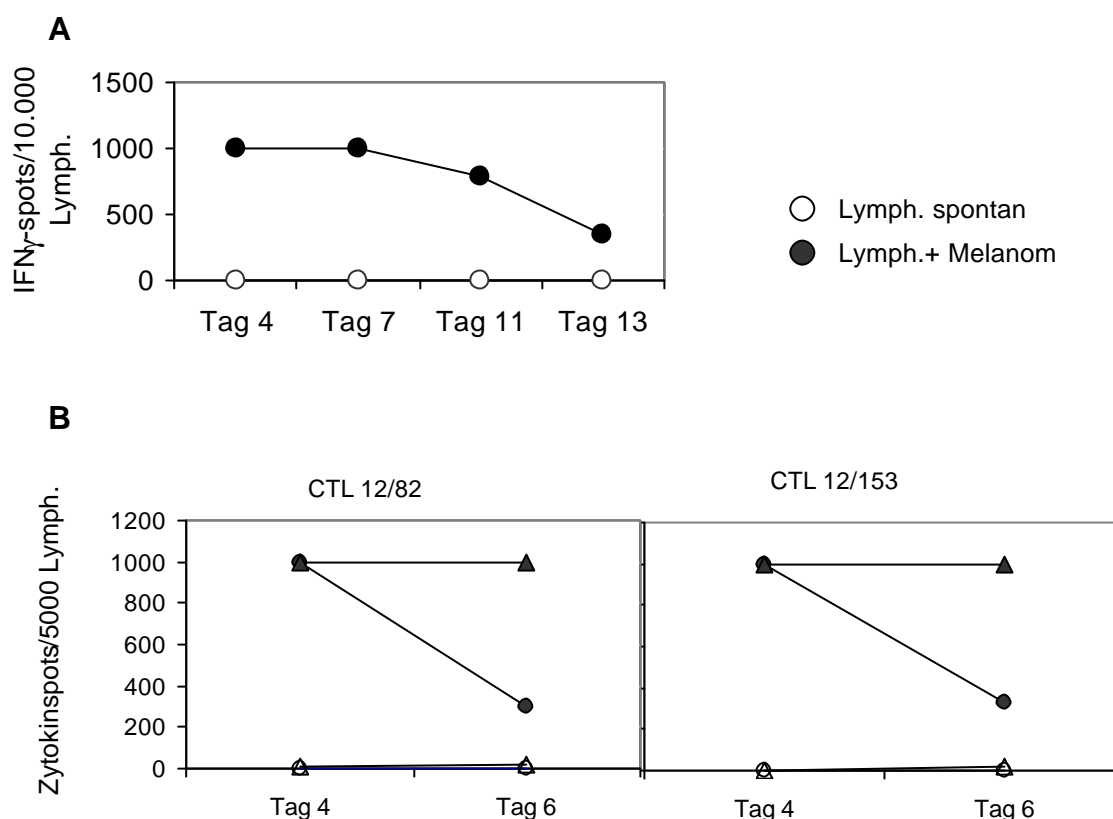


Abbildung 3.2: Antigenabhängige Zytokinfreisetzung durch T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Restimulation. (A) T-Zellklon 12/82 im IFN γ -ELISPOT-Assay zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Restimulation. Je 1×10^4 T-Zellen wurden pro Testeinheit einer Elispotplatte allein oder zusammen mit 8×10^4 Melanomzellen für 20 Stunden inkubiert. (B) Die T-Zellklone 12/82 und 12/153 wurden gleichzeitig in einem IFN γ - (● ○) und einem GrB-ELISPOT-Assay (▲ △) getestet. 5×10^3 T-Zellen pro TE einer Elispotplatte wurden allein (offene Symbole) oder mit 8×10^4 Melanomzellen (geschlossene Symbole) inkubiert. Nach 20 Stunden wurden die Tests entwickelt. Der Wert 1000 (oft auch >1000) wurde stets angegeben, wenn die automatische Auswertung die Spots nicht mehr zählen konnte. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

3.1.2 Anti-HLA-Antikörperblockade in ELISPOT-Assays

CD8⁺ T-Zellen erkennen Peptidantigene, die über MHC I-Moleküle präsentiert werden. Die Suche nach T-zellerkannten Tumorantigenen mittels cDNA-Expressionsklonierung wird dadurch erleichtert, dass die HLA-Restriktion der T-Zellen bekannt ist. Aus der Blockade der T-Zellreaktivität gegen die Tumorzellen mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen einzelne HLA-Moleküle oder Gruppen von HLA-Molekülen kann die HLA-Restriktion der T-Zellen ermittelt werden. Eine kleine Gruppe von Anti-HLA-Antikörpern (**Tabelle 2.1**) wurde in Lysetests und TNF-Tests erfolgreich in Blockadetests eingesetzt (pers. Mitteilung M. Fatho). Die Eignung der Antikörper für die T-Zellblockade im ELISPOT-Assay sollte getestet werden.

Im Melanommodell MZ7 wurden die HLA-cDNA-Sequenzen von *HLA-A*03011* (Protein bezeichnet als HLA-A3.1), *HLA-A*2601* (HLA-A26.1), *HLA-B*07021* (HLA-B7.2), *HLA-B*3801* (HLA-B38.1) und *HLA-Cw*1203* (HLA-Cw12.3) kloniert (siehe 2.1.15). Alle MHC \uparrow -restringierten T-Zellen sollten durch den Antikörper *W6/32* blockierbar sein, da er ein gemeinsames Epitop aller MHC \uparrow -Allele erkennt. HLA-A3.1-restringierte T-Zellen sollten nur durch *W6/32* und *GAP-A3* (HLA-A3-spezifisch) blockiert werden. HLA-A26.1-restringierte T-Lymphozyten sollten nur durch *W6/32* und *B1.23.2* blockiert werden. Der Antikörper *B1.23.2* erkennt ein gemeinsames Epitop aller HLA-B- und HLA-C-Moleküle sowie einer Subgruppe von HLA-A-Proteinen, zu der auch HLA-A26 gehört. HLA-B7.2-restringierte T-Zellen sollten zusätzlich zu den Antikörpern *W6/32* und *B1.23.2* durch *SFR8-B6* inhibiert werden, der ein Epitop einer Subgruppe von HLA-B-Allelen (Bw6-Epitop) erkennt, zu der HLA-B7.2 gehört. HLA-B38.1-, HLA-Cw7 und HLA-Cw12.3-restringierte T-Zellen sollten durch *W6/32* und *B1.23.2* blockiert werden (siehe auch Literaturangaben in **Tab. 2.1**). Das serologisch nachgewiesene HLA-Cw7 konnte, wie erwähnt, nicht kloniert werden.

Verschiedene T-Zellklone aus dem Modell MZ7 wurden in IFN γ -ELISPOT-Assays mit den genannten Antikörpern getestet. Die **Abbildung 3.3** zeigt das Ergebnis für den T-Zellklon 12/45. Weil die IFN γ -Produktion des CTL-Klones gegen die Melanomzellen durch Zugabe der Antikörper *W6/32*, *B1.23.2* und *SFR8-B6* blockiert wurde, musste der CTL-Klon HLA-B7.2-restringiert sein. In **Tabelle 3.2** sind Ergebnisse weiterer IFN γ -ELISPOT-Assays mit Antikörperblockaden für andere T-Zellklone zusammengefasst. Darin wurde auch ein HLA-A3-restringierter CTL-Klon mit bekannter Spezifität getestet, so dass die Funktionalität des *GAP-A3* Antikörpers belegt wurde (CTL-Klon 9/318). Von den überprüften Klonen konnte nur dem T-Zellklon 12/112 keine HLA-Restriktion zugeordnet werden. Der Klon war mit den Antikörpern *W6/32* und *B1.23.2* blockierbar, mit dem *SFR8-B6* jedoch eindeutig nicht. Er könnte daher durch HLA-A26.1, HLA-B38.1, HLA-Cw12.3 oder HLA-Cw7 restringiert sein. Unter Einbeziehung der Daten weiterer Blockadeexperimente wurden insgesamt fünf HLA-B7.2-restringierte T-Zellklone identifiziert: CTL 7/16, CTL 12/45, CTL 12/82, CTL 12/153 und CTL 12/160 (Daten nicht gezeigt). Ein CTL-Klon wurde identifiziert, der HLA-A3.1 restringiert ist, aber nicht das in diesem Modell charakterisierte, über HLA-A3.1 präsentierte SIRT2^{P182L}-Antigen erkennt (CTL 12/14). Für die CTL-Klone 12/112 und 12/134 konnte die HLA-Restriktion nicht geklärt werden.

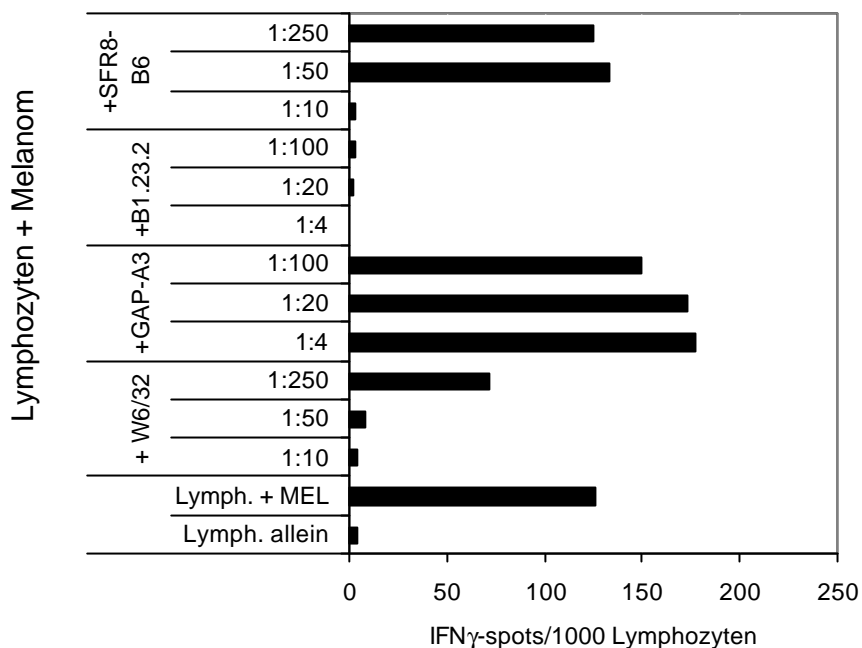


Abb. 3.3: HLA-Antikörperblockade des T-Zellklons 12/45 gegen die autologen Melanomzellen im IFN γ -ELISPOT-Assay. 1000 T-Zellen/Testeinheit wurden allein oder mit 3×10^4 Melanomzellen mit und ohne Antikörper für 20 Stunden inkubiert. Die Stammlösungen der links aufgeführten Antikörper hatten Konzentrationen zwischen 0,5 mg/ml und 2 mg/ml. Lediglich der SFR8-B6 Antikörper, ein Ascitesantikörper, hatte eine Konzentration von über 3 mg/ml. Die Verdünnungsstufen der Antikörper sind angegeben. Schlussfolgerungen siehe Text. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Klon-bezeichnung	Lymph. spontan	Lymph. + Melanom	Lymph. + Melanom +				gefolgerte Restriktion
			W6/32 (α MHC I)	GAP-A3 (α HLA-A3)	B1.23.2 (α Aw19, B, C)	SFR8-B6 (α Bw6)	
7/16	5	77	3,5	99,5	3	6,5	HLA-B7.2
9/318	8,5	188,5	2,5	8,5	157	108	HLA-A3.1
12/14	0,5	264,5	6	109	297	203,5	HLA-A3.1
12/112	2	85,5	3	86	6,5	114,5	?
12/153	0,5	215	3	237,5	1,5	7	HLA-B7.2

Tab. 3.2: HLA-Antikörperblockade weiterer MZ7 T-Zellklone gegen die Melanomzelllinie im IFN γ -ELISPOT-Assay. 1000 T-Zellen/Testeinheit wurden jeweils, wie in **Abb. 3.3** gezeigt, getestet. Es wurden die Ansätze mit den höchsten Antikörperkonzentrationen aufgeführt. Gezählt wurden IFN γ -spots pro 1000 Lymphozyten. Schlussfolgerungen siehe Text. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

3.1.3 Funktionalität kryokonservierter tumorreaktiver T-Zellpopulationen unmittelbar nach dem Auftauen

Permanent kultivierte T-Zellpopulationen unterliegen im Verlauf ihrer Kultur nicht kontrollierbaren Schwankungen. Auch wenn die äußeren Bedingungen für die Kulturen weitgehend konstant gehalten werden, kommt es zu wechselhaftem Proliferationsverhalten und zu Inkonstanz in der Funktionalität. Dies führt insbesondere in solchen Tests zu Schwierigkeiten, bei denen konstante Reaktivität von T-Zellen zur Erreichung einer reproduzierbaren und möglichst hohen Sensitivität gefordert wird, wie z. B. beim „Screening“ von cDNA-Banken mit tumorreaktiven T-Zellen. Es wurde daher versucht, durch Kryokonservierung großer Mengen von T-Zellen zu einem Zeitpunkt optimaler Funktionalität, direkt einsetzbare Effektor-T-Zellpopulationen herzustellen. Dazu wurden T-Zellen antigenabhängig stark expandiert und an Tag 3 oder 4 nach einer abschließenden Restimulation mit Tumorzellen portioniert eingefroren. Aliquots der eingefrorenen T-Zellen wurden aufgetaut, für ein zwei oder drei Tage in Kulturmedium mit IL-2 (250 IU/ml) inkubiert und dann in einen IFN γ -ELISPOT-Assay gegen die autologen Melanomzellen eingesetzt. Wie in **Abbildung 3.4** für den CTL-Klon 12/153 exemplarisch gezeigt, reagierten die T-Zellen zu jedem Zeitpunkt nach dem Auftauen spezifisch nur gegen den Tumor. Die optimale Reaktivität wurde jedoch an Tag zwei nach dem Auftauen erreicht.

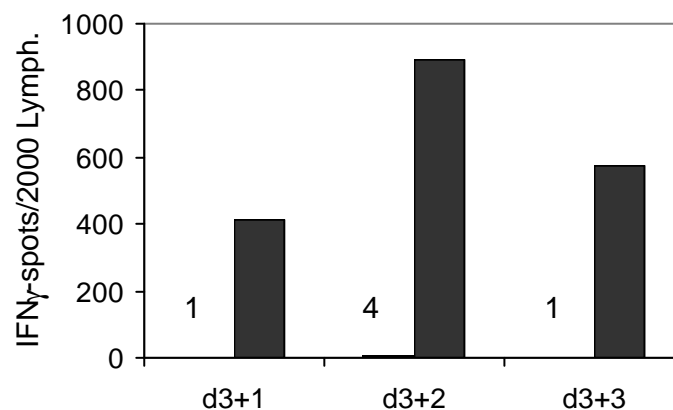


Abb. 3.4: Funktionsüberprüfung tumorreaktiver T-Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach dem Auftauen. Gezeigt ist ein IFN γ -ELISPOT-Assay mit dem T-Zellklon 12/153 gegen die autologe Melanomzelllinie. Die an Tag drei nach der Restimulation mit Tumorzellen eingefrorenen T-Zellen wurden aufgetaut und einen (d3+1), zwei (d3+2) und drei (d3+3) Tage später getestet. Jeweils 2000 T-Zellen/Testeinheit wurden allein (□) oder zusammen mit 5×10^4 Melanomzellen (■) für 20 Stunden inkubiert. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

In weiteren Experimenten zeigte sich, dass die Reaktivität der T-Zellen im Test besser war, wenn IL-2 in der für die Restimulation üblichen Konzentration (250 IU/ml) zugegeben wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Konstanz in der Reaktivität solcher T-Zellen zeigt die **Abbildung 3.5**. Hier wurde am Beispiel des T-Zellklons 12/82 gezeigt, dass nicht nur die Reaktivität gegen die autologe Tumorzelle in mehreren unabhängigen Versuchen vergleichbar blieb, sondern auch die hier ausnahmsweise auftretende Spontanfreisetzung von IFN γ durch den T-Zellklon. Solche Spontanfreisetzungen durch „ready to use“-Lymphozyten wurden insgesamt sehr selten beobachtet. Die nachfolgend aufgeführten Untersuchungen wurden mit eingefrorenen Effektorpopulationen durchgeführt, die nach dem Auftauen für zwei Tage in IL-2-haltigem Medium kultiviert wurden.

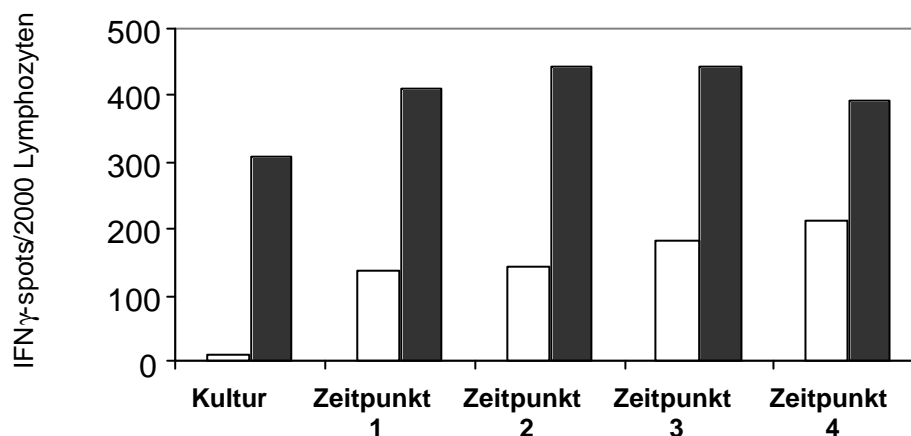


Abb. 3.5: Konstanz der Reaktivität eingefrorener T-Zellpopulationen. Gezeigt ist eine Zusammenfassung mehrerer IFN γ -ELISPOT-Assays, die im Abstand von mehreren Monate nach dem Einfrieren der T-Zellen (CTL 12/82) durchgeführt wurden. 1000 Lymphozyten/Testeinheit wurden allein (\square) oder zusammen mit 5×10^4 Melanomzellen (\blacksquare) in einen IFN γ -ELISPOT-Assay eingesetzt. Die T-Zellen wurden an Tag drei nach der Restimulation eingefroren und jeweils an Tag zwei nach dem Auftauen eingesetzt. Die Reaktivität der eingefrorenen T-Zellen wurde mit der von T-Zellen aus einer laufenden Kultur des selben CTL-Klones verglichen. Diese T-Zellen wurden an Tag vier nach der Restimulation eingesetzt. Die Zeitpunkte 1 bis 4 lagen mehrere Monate auseinander. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

3.2 Generierung und Testung tumorreaktiver MLTCs im Modell MZ7

3.2.1 Analyse der Spezifität bereits etablierter MLTCs mit Hilfe von ELISPOT-Assays

Für die Suche nach T-zellerkannten Epitopen von Tumorantigenen im Melanommodell MZ7 standen bereits zu Beginn der Arbeit verschiedene T-Zellpopulationen zur Verfügung. Aus peripheren Blutlymphozyten (PBL) der Melanompatientin MZ7, die in verschiedenen Jahren kryokonserviert wurden, konnten durch die Stimulation mit autologen Melanomzellen in MLTCs (gemischte Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen) folgende T-Zellresponderpopulationen generiert und getestet werden: MLTC 7 (aus Blut von 1990), MLTC 9 (1989), MLTC 10 (1992), MLTC 11 (1992) und MLTC 12 (1992). Alle MLTCs waren aus peripheren Blutlymphozyten angesetzt worden und im Verlauf der Kultur die CD8⁺ T-Zellen isoliert und weitergeführt worden (MiniMACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Die T-Zellkulturen bestanden danach in der Regel zu mehr als 95 % aus CD8⁺ T-Zellen (pers. Mitteilung M. Fatho). Funktionelle Tests wurden ausschließlich mit CD8⁺-T-Zellen durchgeführt. Aus den MLTCs wurden verschiedentlich T-Zellklone im Grenzverdünnungsverfahren etabliert. Das einzige zuvor aus diesem Modell identifizierte Tumorantigen, SIRT2^{P182L}, war mit einem CTL-Klon, der aus der MLTC 9 hervorgegangen war, mit Hilfe des TNF-Bioassays durch cDNA-Expressionsklonierung isoliert worden (T. Wölfel, M. Fatho, D. Ruf, C. Wölfel pers. Mitteilungen). Durch die Anwendung des ELISPOT-Assays wurde es möglich, nicht nur T-Zellklone, sondern auch nichtklonale T-Zellpopulationen auf Reaktivität gegen transfizierte Tumorantigene zu testen. Solche Populationen hätten in TNF-Bioassays hohen Hintergrund verursacht. Da aus der MLTC 12 eine Reihe gut wachsender T-Zellklone mit hoher spezifischer Reaktivität gegen die Melanomzelllinie hervorgegangen waren, wurde zunächst diese MLTC im IFN γ -ELISPOT-Assay gegen bekannte Tumorantigene getestet. COS-7-Transfektanten, die in Einzeltransfektionen mit cDNA für acht bekannte Tumorantigene, jeweils kombiniert mit 5 klonierten HLA-Allelen der Patientin MZ7, kotransfiziert waren, wurden als Stimulatorzellen eingesetzt. Damit sollte getestet werden, ob sich in einer T-Zell-Mischpopulation zumindest zeitweise Reaktivitäten gegen bekannte Antigene zeigen. Bei den Antigenen handelte es sich um vier sogenannte „Cancer-Testis“-Antigene (MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3 und MAGE-4), drei Melanozyten-Differenzierungsantigene (MelanA/MART1, Tyrosinase und gp100) sowie das oben schon erwähnte, punktmutierte Individualantigen SIRT2^{P182L}, das als Positivkontrolle dienen sollte, weil es im Modell MZ7 identifiziert wurde. Wie die **Abbildung 3.6** zeigt, reagierten die T-Zellen der MLTC 12

spezifisch gegen die Melanomzellen ohne spontan oder gegen COS-7-Zellen IFN γ freizusetzen. Die meisten Transfektanten wurden ebenfalls nicht erkannt. Transfektanten, die gp100 und HLA-B7.2 exprimierten, wurden sehr gut erkannt. Daneben bestanden auch schwache Reaktivitäten gegen COS-7-Zellen, die Tyrosinase/HLA-A26.1 und SIRT2^{P182L}/HLA-A3.1 präsentierten.

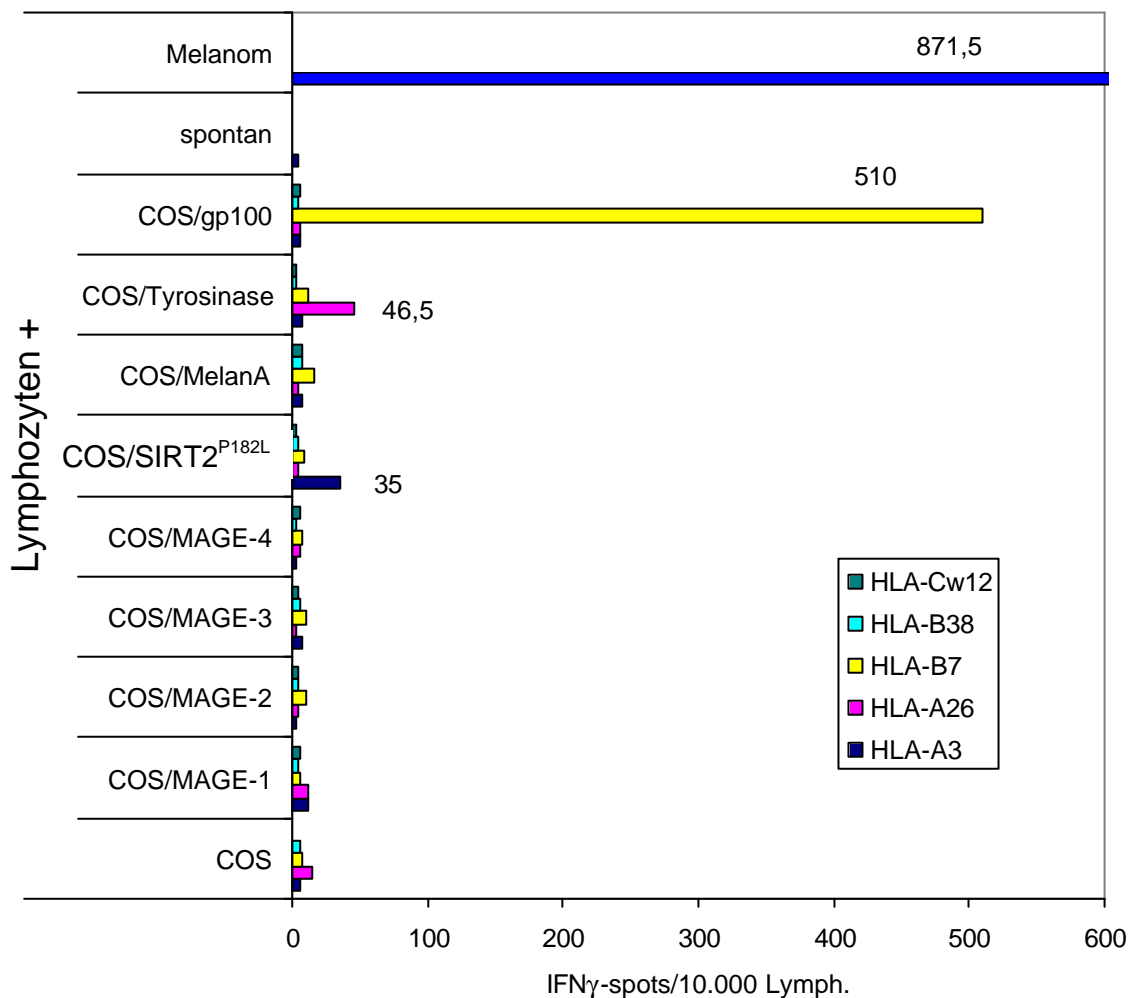


Abb. 3.6: *Reaktivität der MLTC 12 gegen acht bekannte Tumorantigene.* Die MLTC war an Tag 40 eingefroren worden, danach aufgetaut, restimuliert und an Tag 4 in den IFN γ -ELISPOT-Assay eingesetzt worden (10.000 Lymphozyten/TE). Als Stimulatorzellen wurden COS-7-Zellen (20.000/TE), kotransfiziert mit acht bekannten Tumorantigenen (links aufgeführt) zusammen mit den HLA-Allelen (farbig kodiert) aus dem Modell, eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob einer der aus der MLTC 12 hervorgegangenen T-Zellklone eines der drei erkannten Antigene im jeweiligen HLA-Kontext erkannte. Die CTL-Klone 12/45, 12/82, 12/153, 12/160 sowie 7/16 waren durch HLA-B7.2-restringiert, wie aus Antikörper-Blockadeexperimenten hervorging (**Abb. 3.3** und **Tab. 3.2**). Damit waren die Klone Kandidaten für die Erkennung des gp100/HLA-B7.2-Antigens. Die CTL-Klone 12/112 und 12/134 waren möglicherweise HLA-A26.1 restringiert und der Klon 12/14 war HLA-A3.1-restringiert (**Kap. 3.1.2**, **Tab. 3.2**). Diese drei Klone erkannten daher eventuell Tyrosinase/HLA-A26.1 und SIRT2^{P182L}/HLA-A3.1. Über die Testung der T-Zellklone hinaus wurden drei weitere MLTCs auf das Vorkommen von Reaktivität gegen die drei Antigene überprüft. Die Daten sind in **Tabelle 3.3** zusammengefasst. Fünf T-Zellklone aus zwei MLTCs (MLTC 12, MLTC 7), nämlich die CTL-Klone 12/45, 12/82, 12/153, 12/160 und 7/16, reagierten mit COS-7-Transfektanten, die gp100/HLA-B7.2 exprimierten. Sie waren demnach gegen ein gp100-Peptid gerichtet, das über HLA-B7.2 präsentiert wurde. Diese Klone wurden für die Identifizierung des Peptidepitops herangezogen (siehe **Kap. 3.3**). Die Klone 12/14 und 12/112 erkannten keines der transfizierten Antigene. Der CTL-Klon 12/134 sezernierte nur wenig IFN γ und wurde daher in einem TNF-Test auf Reaktivität gegen die beschriebenen Antigene getestet (Daten nicht gezeigt). Auch mit diesem Klon wurde keine Erkennung festgestellt.

T-Zellen	HLA-Restriktion	Lymph. spontan	Lymph. + Melanom	COS/HLA-A3.1	COS/HLA-A26.1	COS/HLA-B7.2	COS/A3.1/SIRT2 ^{P182L}	COS/A26.1/Tyrosin.	COS/B7.2/gp100
12/14	HLA-A3	1	420	0	-	-	0	-	-
12/45	HLA-B7	5	374	1	2	36	4,5	3,5	498
12/82	HLA-B7	0	342,5	1	4	11	3,5	2	348,5
12/112	HLA-??	3	242	3	1	1	2,5	3	3,5
12/153	HLA-B7	1	280	0	2	10	4	2,5	461
12/160	HLA-B7	1	428,5	2	0	1	1,5	0,5	456
7/16	HLA-B7	1	471	-	2	2	-	3	201
MLTC 9	-	1	160	6	2	4	24	3	2
MLTC 10	-	1	278	4	3	3	3	5	6
MLTC 11	-	1	> 1000	1	1	1	2	3	1

IFN γ -Spots/ingesetzte Lymphozyten

Tab. 3.3: Erkennung von transfizierten Tumorantigenen durch verschiedene T-Zellpopulationen. Gezeigt ist ein IFN γ -ELISPOT-Assay mit transfizierten COS-7-Zellen als Stimulatorzellen. Die COS-7-Zellen exprimierten die oben aufgeführten Antigene. Die T-Zellklone wurden mit 1000-2000 Zellen/Testeinheit eingesetzt, die MLTCs mit 1×10^4 Zellen/TE. Hervorgehobene Werte kennzeichnen die Erkennung von Transfektanten. Die Tabelle fasst zwei Transfektionen und ELISPOT-Assays zusammen. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Von den bis dahin getesteten MLTCs erkannte nur die MLTC 9 das SIRT2^{P182L}-Antigen über HLA-A3.1, wenn auch schwach (**Tab. 3.3**). Die Erkennung war zu erwarten, da der T-Zellklon, mit dem das Antigen gefunden wurde, aus dieser MLTC stammte. Die MLTCs 10 und 11 erkannten keines der transfizierten Antigene trotz hoher Reaktivität mit den Melanomzellen. Das war für die MLTC 11 überraschend, da sie aus PBL des gleichen Einfrierzeitpunkts wie die, aus denen die MLTC 12 generiert wurde, angesetzt worden war. Allerdings waren die Melanomzellen, mit denen die MLTC 11 stimuliert wurde, mit IFN γ vorbehandelt worden. IFN γ hat pleiotrope Effekte auf eine Reihe von Zellen, zu denen die Hochregulation bestimmter HLA-Moleküle sowie die Bildung des sogenannten Immunoproteasoms gehören. Das Immunoproteasom unterscheidet sich vom konstitutiven zellulären Proteasom durch den Austausch bestimmter Untereinheiten [101]. Immunoproteasomen nutzen bei der Degradation ubiquitiniertes zytoplasmatisches Protein andere Schnittstellen in der Aminosäuresequenz, weshalb andere Peptide aus Proteinen generiert und präsentiert werden. Für einige Tumorantigene, z. B. Melan-A/MART-1, war bereits gezeigt worden, dass ein immunogenes Peptid vom Immunoproteasom nicht prozessiert wird [101]. Daher wurde untersucht, ob die IFN γ -Behandlung von MZ7-Melanomzellen die Erkennung durch die gp100-spezifischen T-Zellklone vermindert. Dies hätte die fehlende Erkennung durch die MLTC 11 erklärt. Für den Test wurden Melanomzellen für sechs, vier oder zwei Tage vor dem IFN γ -ELISPOT-Assay in Anwesenheit von 100U rhIFN γ /ml Medium kultiviert. Das Medium wurde täglich erneuert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Melanomzellen eingesetzt. Die Erkennung der Tumorzellen durch den T-Zellklon 12/45 ist in **Abbildung 3.7** dargestellt. Es wurde keine Reduktion der Erkennung der unterschiedlich lang mit IFN γ -behandelten Tumorzellen durch die 12/45-Lymphozyten festgestellt. Somit scheint die Bildung des gp100/HLA-B7.2-Peptids in MZ7-Melanomzellen auch durch das Immunoproteasom zu erfolgen.

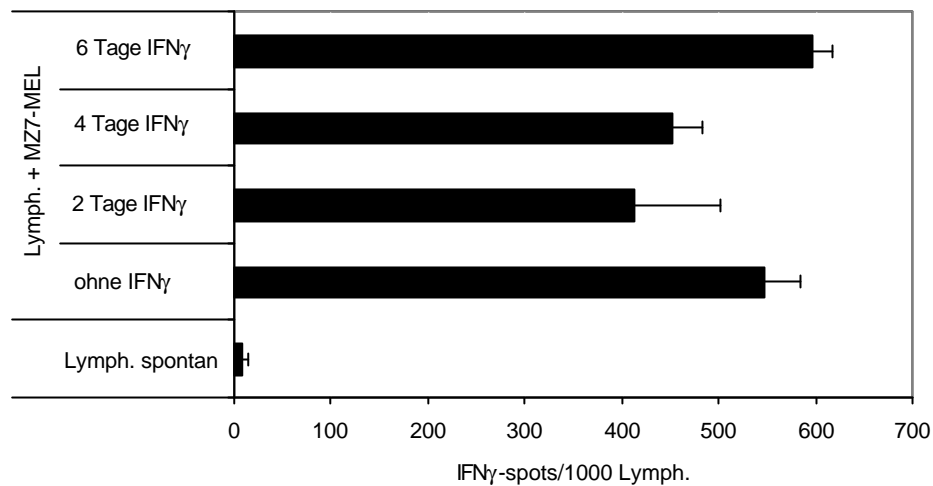


Abb. 3.7: Prozessierung des gp100/HLA-B7.2-Peptids nach IFN γ -Vorbehandlung der MZ7-Melanomzellen. Gezeigt ist die Erkennung der Melanomzellen, die verschieden lang mit IFN γ vorbehandelt wurden, durch den T-Zellklon 12/45 im IFN γ -ELISPOT-Assay. 1000 Lymphozyten und 30.000 Melanomzellen wurden pro Testeinheit eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen

3.2.2 Generierung und Testung neuer tumorreaktiver T-Zellpopulationen

Um die antigenabhängige Expansion von T-Zellantworten in *in vitro* mit Tumorzellen stimulierten MLTCs besser verstehen zu lernen, wurden neue MLTCs generiert. Sechs MLTCs wurden gleichzeitig geführt und getestet. Je eine MLTC wurde mit PBL von 1988, 1989, 1990 und 1992 angesetzt. Diese Lymphozyten wurden wöchentlich mit unbehandelten Melanomzellen stimuliert. Zusätzlich wurden mit Lymphozyten von 1990 und 1992 zwei weitere MLTCs etabliert, die mit IFN γ -vorbehandelten Melanomzellen stimuliert wurden (100 IUrhIFN γ /ml, jeweils vier Tage vor der Restimulation zu den Tumorzellen gegeben). Diese PBL waren vom gleichen Einfrierdatum wie die T-Zellen, die mit unbehandelten Melanomzellen stimuliert wurden. Alle MLTCs wurden wöchentlich restimuliert, indem 1×10^6 Lymphozyten zusammen mit 1×10^5 letal bestrahlten Melanomzellen in je eine Kultureinheit einer 24-Lochplatte gegeben wurden. Als T-Zellwachstumsfaktor wurde das Lymphokin IL-2 (250 IU/ml) dazugegeben. **Tabelle 3.4** zeigt das Wachstum der Kulturen in den ersten drei Wochen bis zur Isolation der CD8⁺-T-Zellen. Für jede MLTC wurden 1×10^7 PBL aufgetaut, gewaschen und in Kultur genommen. Die Ausbeuten an lebenden Zellen waren unterschiedlich, so dass die MLTCs mit verschiedenen PBL-Ausgangszahlen gestartet wurden. Die MLTCs waren in den ersten drei Wochen der Kultur unterschiedlich stark expandierbar. Die MLTC mit der geringsten Expansionsrate (MLTC 17) hatte sich nach den

drei ersten Stimulationen um den Faktor 15 vermehrt, die MLTC mit der stärksten Proliferation (MLTC 16) um den Faktor 70 (**Tab. 3.4**). An Tag 21, unmittelbar vor der dritten Restimulation mit Tumorzellen, wurden die CD8⁺ T-Zellen isoliert (MiniMACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Der Anteil der CD8⁺ T-Zellen in den einzelnen MLTCs an den Gesamt-PBL lag zwischen 14 und 23,3 % (**Tab.3.4**).

MLTC	PBL von	Ausgangszahl PBL [§]	PBL nach drei Stimulationen [§]	Anzahl CD8 ⁺ T-Zellen (Tag 21) [§]	% CD8 ⁺ T-Zellen (Tag 21)
MLTC 13	1988	3,4	115 (34x) [§]	25,5	22,2
MLTC 14	1989	1,8	108 (60x) [§]	15,3	14,2
MLTC 15	1990	6,5	306 (47x) [§]	57	18,6
MLTC 16	1990*	4,4	305 (69x) [§]	71	23,3
MLTC 17	1992	5,4	80 (15x) [§]	11,2	14
MLTC 18	1992*	4,2	175 (42x) [§]	34,5	19,7

[§] Angaben in Millionen;

* Stimulatorzellen wurden mit IFN γ vorbehandelt;

[§] Multiplikator der Zellvermehrung nach drei Stimulationen ;

Tab.3.4: Generierung neuer tumorreaktiver MLTCs. Aus Lymphozyten der Patientin MZ7, die zu vier verschiedenen Zeitpunkten eingefroren worden waren, wurden sechs neue MLTCs angesetzt, um die antigenabhängige Expansion tumorspezifischer T-Zellen zu untersuchen. Stimulatorzellen für die MLTCs 13, 14, 15 und 17 waren unbehandelte Melanomzellen. Die MLTCs 16 und 18 wurden mit Melanomzellen stimuliert, die mit IFN γ vorbehandelt wurden. Die Lymphozyten für die MLTCs 15 und 16 sowie die für die MLTCs 17 und 18 waren vom gleichen Einfrierzeitpunkt.

Die isolierten CD8⁺ T-Zellen wurden anschließend mit Melanomzellen restimuliert, indem zu 1 x 10⁶ CD8⁺ T-Zellen/Kultureinheit einer 24-Loch-Platte 1 x 10⁵ bestrahlte Tumorzellen und 2 x 10⁵ bestrahlte Zellen der CD8-negativen Fraktion der Lymphozyten gegeben wurden. Die übrigen CD8-negativen Zellen wurden in Aliquots eingefroren und nach Auftauen und Bestrahlung in jede zukünftige Stimulation als sogenannte „feeder“-Zellen mit in die Kultur gegeben. Vier Tage nach der Stimulation (Tag 21+4) wurden alle 6 MLTCs gegen COS-7-Zellen im IFN γ -ELISPOT-Assay getestet, die mit cDNAs bekannter Tumorantigene und mit den HLA I-Allelen der Patientin MZ7 transfiziert waren. Das gleiche Experiment wurde danach im Abstand von je zwei Wochen noch zweimal durchgeführt (Tag 36+4 und Tag 50+4). Die Ergebnisse der IFN γ -ELISPOT-Assays sind in **Abbildung 3.8** zusammengefasst. Bis auf eine Ausnahme wurden in den drei Experimenten die gleichen Antworten wie im ursprünglichen Versuch mit der MLTC 12 gefunden (**siehe Abb. 3.6**). Die Ausnahme war die Reaktivität der MLTCs 15 und 16 gegen COS-7-Zellen, die mit

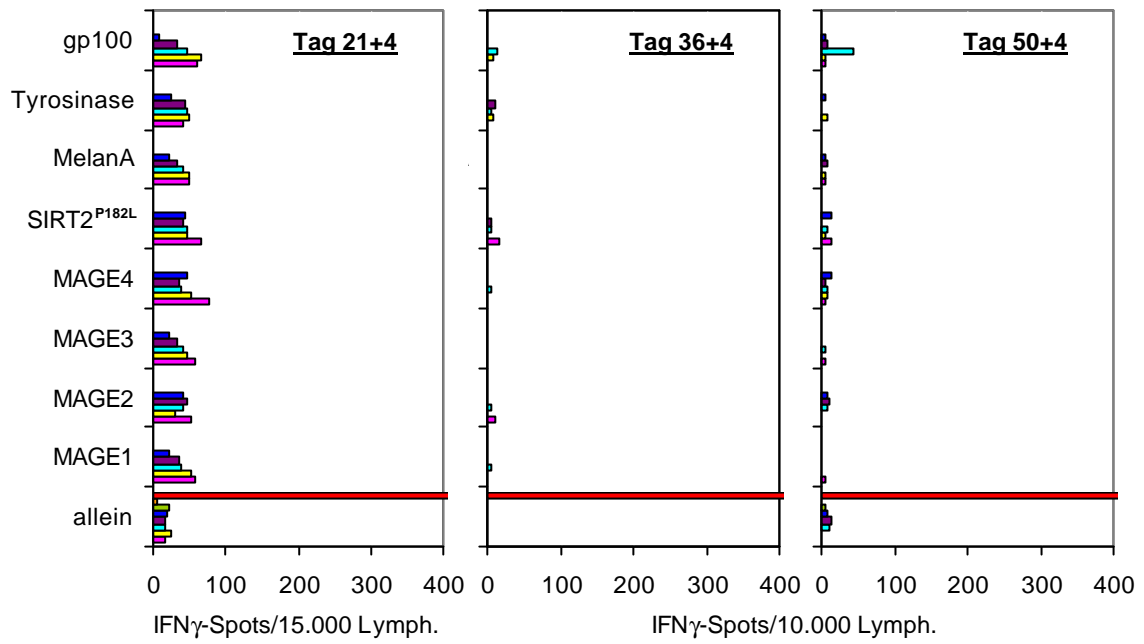
Tyrosinase und HLA-B38.1 transfiziert waren. Diese Antwort war allerdings nur zum frühen Zeitpunkt (Tag 21+4) zu messen (**Abb. 3.8 C,D**) und verschwand danach vollständig. In den neuen MLTCs setzten sich unterschiedliche Antworten teilweise passager durch. Nur in der MLTC 18 setzte sich eine Antwort gegen Tyrosinase/HLA-A26.1 durch (**Abb. 3.8 F**). In allen MLTCs entwickelte sich jedoch starke Reaktivität gegen die Melanomzellen. Die Spontanfreisetzung von IFN γ war bei allen MLTCs gering. Auch wurden COS-7-Zellen, die „mock“-transfiziert oder nur mit den HLA-cDNAs transfiziert waren, kaum erkannt. Nur in der MLTC 17 entwickelte sich eine ab Tag 36 messbare Reaktivität gegen COS-7-Zellen, die allein mit *HLA-A*03011* transfiziert waren (**Abb. 3.8 E**).

Die Antworten, die in den einzelnen MLTCs entstanden, sahen aus wie folgt:

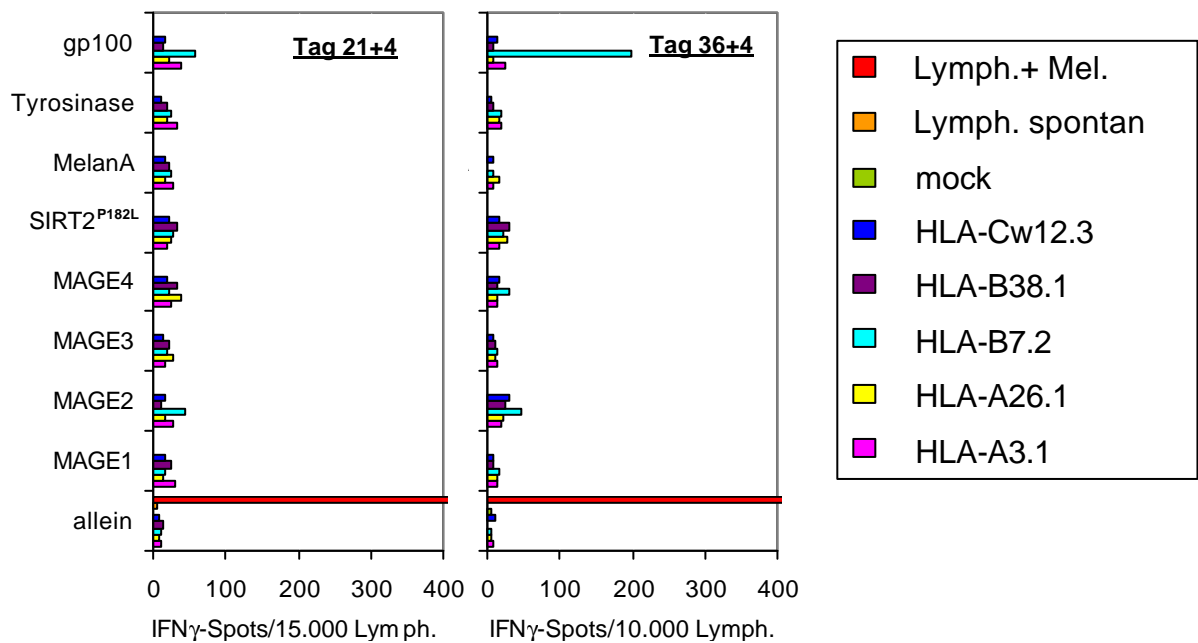
- In der MLTC 13 entwickelte sich im Verlauf der Zeit lediglich eine schwache Antwort gegen gp100/HLA-B7.2 (Tag 50+4, **Abb. 3.8 A**).
- Die MLTC 14 zeigte an Tag (36+4) gute Reaktivität gegen gp100/HLA-B7.2 (**Abb. 3.8 B**). Der Hauptteil der MLTC wurde an Tag 28 eingefroren und der weiter stimulierte Anteil wuchs nach Tag 40 nicht mehr. Darum wurde kein Test an Tag (50+4) durchgeführt.
- Die MLTCs 15 und 16 waren aus PBL des gleichen Einfrierdatums generiert worden. Beide entwickelten die gleichen Antworten unabhängig davon, dass die MLTC 16 mit IFN γ -vorbehandelten Tumorzellen stimuliert wurde. Beide entwickelten Reaktivität gegen SIRT2^{P182L}/HLA-A3.1, die allerdings im Laufe der Zeit nachließ. Eine geringe gp100/HLA-B7.2-Antwort war ebenfalls in beiden MLTCs zu sehen. Zusätzlich war in beiden MLTCs an Tag (21+4) die bereits erwähnte Tyrosinase/B38.1-Reaktivität vorhanden, die danach nicht mehr festgestellt wurde und auch in keiner der anderen MLTCs detektiert wurde (**Abb. 3.8 C,D**).
- MLTC 17 war die T-Zellpopulation, die am schlechtesten zu expandieren war (**Tab. 3.4**). Sie entwickelte darüber hinaus unspezifische Reaktivität gegen Peptide, die über HLA-A3.1 präsentiert wurden. Dies zeigte sich darin, dass COS-7-Zellen, die nur mit *HLA-A*03011* transfiziert waren, erkannt wurden. Daneben fielen keine weiteren Antworten auf (**Abb. 3.8 E**).
- Nur in der MLTC 18, angesetzt aus den PBL vom gleichen Einfrierdatum wie für die MLTC 17, entstand eine Tyrosinase/HLA-A26.1-Antwort, die durch die wöchentlichen Restimulationen anstieg. Sonst wurde keine Antwort gegen die bekannten Tumorantigene beobachtet (**Abb. 3.8 F**).

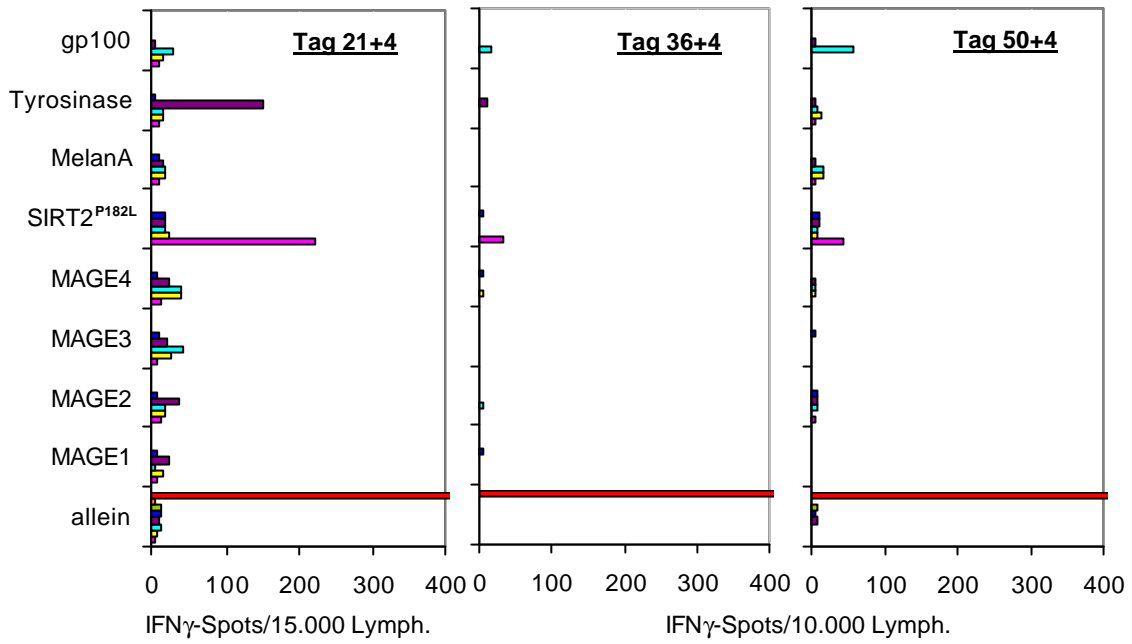
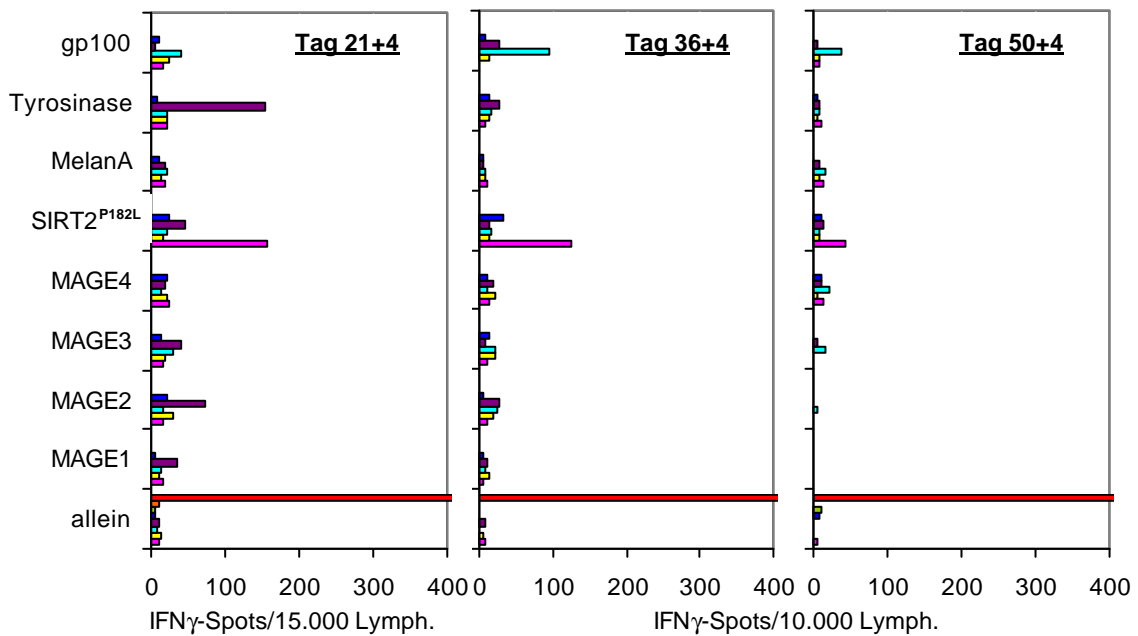
Da sich die MLTC 18 stark expandieren ließ und die Frequenz der T-Zellen gegen Tyrosinase anstieg, konnte mit diesen T-Zellen das erkannte Tyrosinasepeptid identifiziert und darüber hinaus ein neues Melanomantigen identifiziert werden (siehe unten).

A: MLTC 13

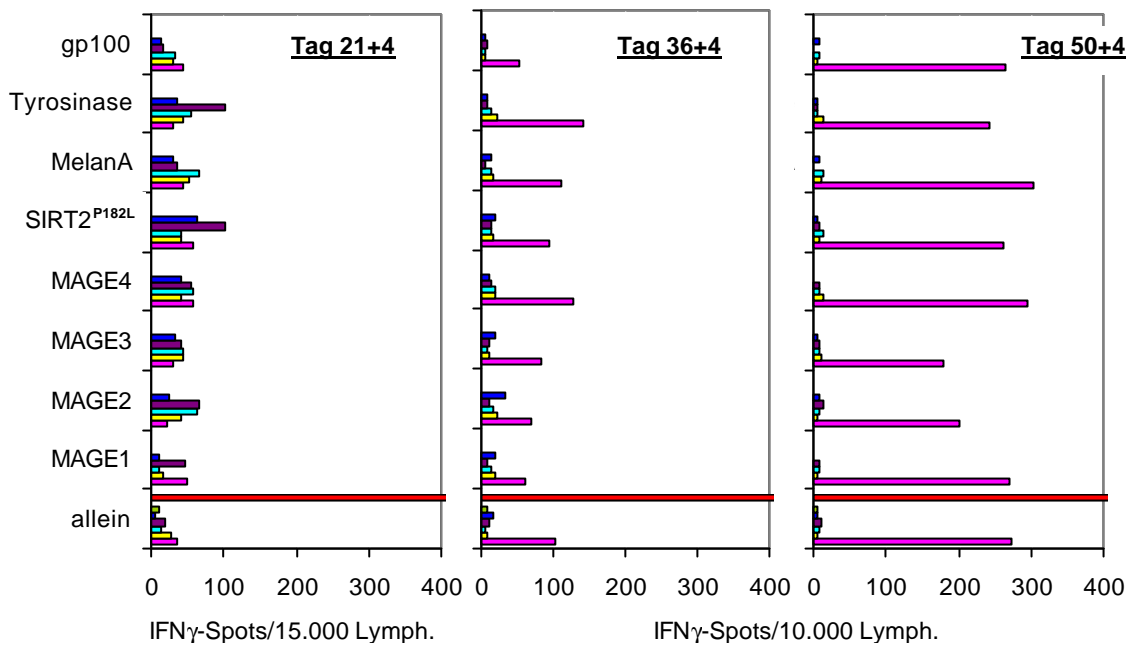


B: MLTC 14



C: MLTC 15**D: MLTC 16**

E: MLTC 17



F: MLTC 18

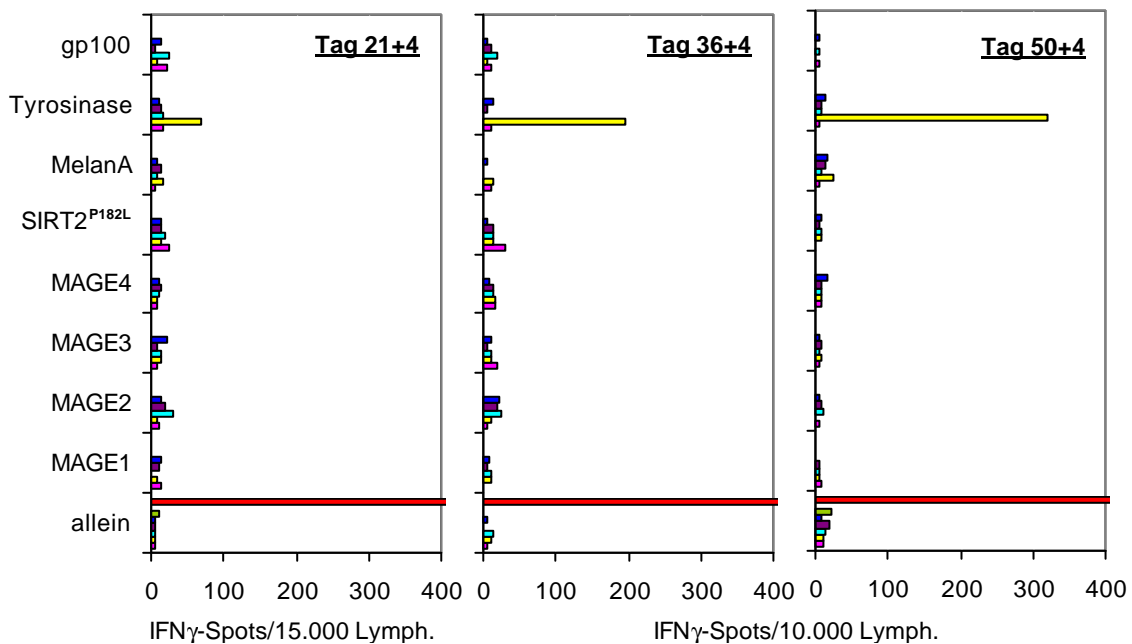


Abb. 3.8: Entstehung und Verlauf antigenspezifischer T-Zellantworten in sechs gleichzeitig kultivierten, mit Melanomzellen stimulierten MLTCs. Gezeigt ist die Zusammenfassung von drei IFN γ -ELISPOT-Assays (an Tag 21+4, Tag 36+4 und Tag 50+4) mit den sechs MLTCs als Effektorpopulationen, stimuliert mit COS-7-Transfektanten, die mit cDNA der links aufgeführten Tumorantigene sowie den farbig kodierten HLA-cDNAs kotransfiziert waren. Die eingesetzten Lymphozytenzahlen sind angegeben. Die Ergebnisse werden im Text erläutert. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

3.3 Charakterisierung eines neuen T-zellerkannten Peptids aus dem Melanozyten-Differenzierungsantigen gp100

In **Abschnitt 3.2.1** wurde gezeigt, dass in der MLTC 12 Reaktivität gegen das Antigen gp100/HLA-B7.2 expandiert war (**Abb. 3.6**). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass fünf bereits etablierte T-Zellklone diese Spezifität aufwiesen (**Tab. 3.3**). Mit Hilfe dieser Klone sollte die peptidkodierende Region auf der cDNA eingegrenzt werden. Aus der kleinsten erkannten Region sollten HLA-B7.2-bindende Peptide synthetisiert und getestet werden, um das optimale Peptid für die T-Zellen zu identifizieren.

3.3.1 Eingrenzung der peptidkodierenden Region auf der gp100-cDNA

Die gp100-cDNA-Fragmente wurden durch PCR amplifiziert und anschließend in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-HisTOPO kloniert. Dafür wurde ein sense-Primer verwendet, der den natürlichen ATG-Translationsstart enthielt. Dieser gp100-s1-Primer wurde in verschiedenen PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen antisense-Primern kombiniert, die auf der gp100-cDNA in 3'→5'-Richtung eingerückt waren und in die Stop-Codons eingebaut wurden (gp100-as1 bis gp100-as7, **Kap. 2.1.18**). Als „template“ für die PCR-Reaktionen wurde ein Plasmid (gp100-pB7/Neo) verwendet, das den kompletten ORF von gp100 enthielt und freundlicherweise vom Ludwig Institut für Krebsforschung (LICR, Brüssel, Belgien) zur Verfügung gestellt wurde. **Abbildung 3.9** zeigt schematisch die angewendete Fragmentierungsstrategie. Die Fragment-Klone wurden nach den eingesetzten antisense-Primern bezeichnet. Die Klone wurden sequenziert, um die Orientierung der Inserts zu überprüfen und PCR-Artefakte auszuschließen. Überprüfte Klone wurden zusammen mit der *HLA-B*07021*-cDNA in COS-7-Zellen transfiziert und die Transfektanten auf Erkennung durch gp100-spezifische T-Zellklone getestet (**Abb. 3.10**). Im ersten Schritt (**Abb.3.9 A**) wurde der ORF von gp100 in drei Fragmente unterteilt. Das kleinste Fragment gp100-as1 war 735 bp (Pos. 4739), das mittlere Fragment gp100-as2 1470 bp (Pos. 4-1474) lang und das längste Fragment gp100-as3 enthielt den kompletten ORF (2003 bp, Pos. 4-2007). Von diesen drei Fragmenten wurde neben dem Kontrollplasmid gp100-pB7/Neo und einem aus der Melanomzelllinie MZ7-MEL klonierten Fragment, das ebenfalls den kompletten ORF enthielt (gp100-Mel-s1), nur das gp100-as3-Fragment erkannt (**Abb. 3.10 A**).

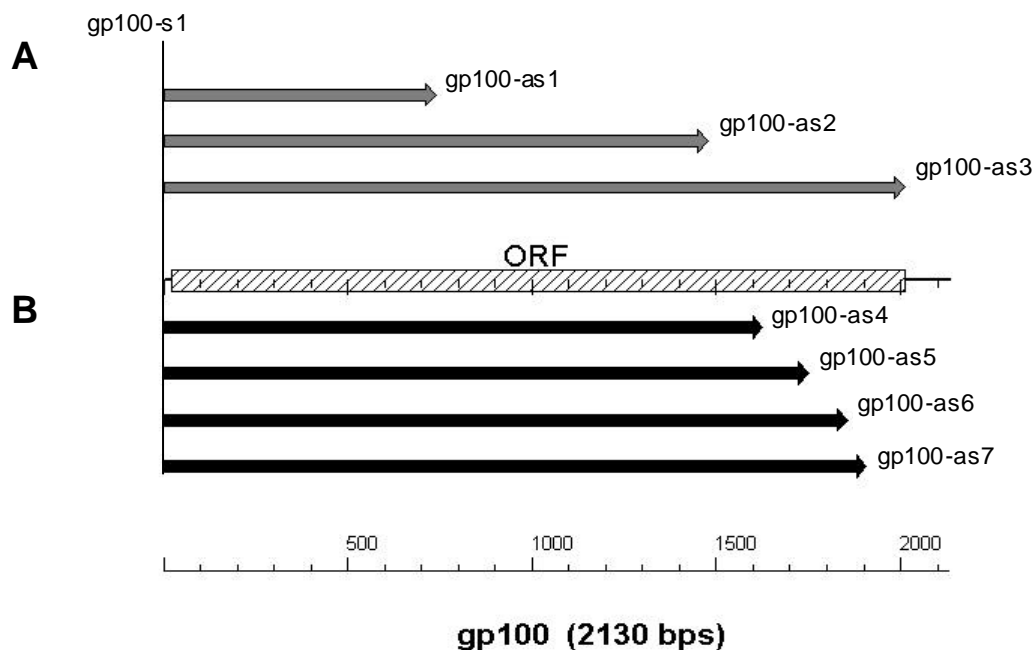


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der Fragmentierung der gp100-cDNA zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region. Die Pfeile repräsentieren PCR-Produkte, die anschließend in einen Expressionsvektor kloniert wurden. (A) Im ersten Schritt wurde die gp100 cDNA in drei Fragmente unterteilt, von denen nur das längste (gp100-as3) erkannt wurde (**Abb. 3.10 A**). (B) Die erkannte Region wurde weiter fragmentiert und die Fragmente erneut getestet (**Abb. 3.10 B**).

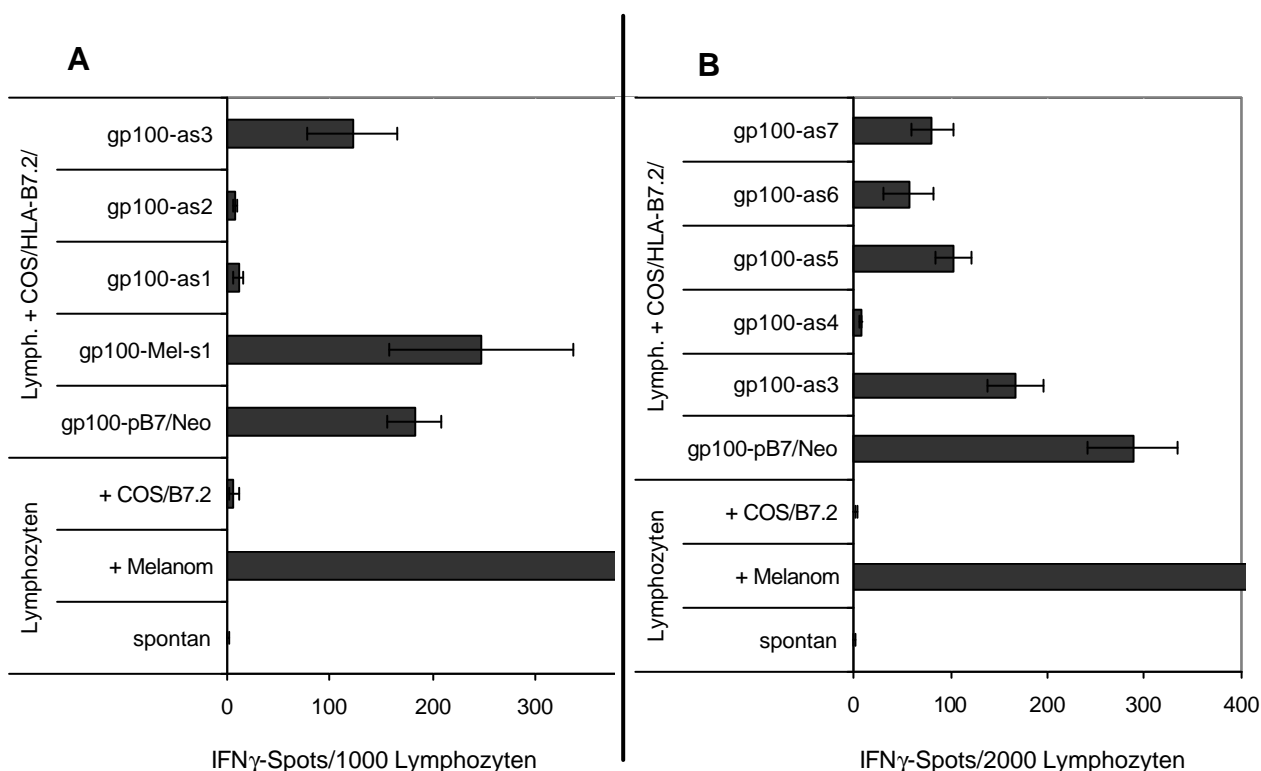


Abb. 3.10: Erkennung der gp100-Fragmente durch den T-Zellklon 12/45. Gezeigt sind zwei IFN γ -ELISPOT-Assays mit COS-7-Transfektanten als Stimulatorzellen. (A) Erkennung der COS-7-Zellen, welche die gp100-Fragmente gp100-as1, -as2 und -as3 zusammen mit HLA-B7.2 exprimierten. (B) Erkennung der gp100-Fragmente gp100-as4-7 durch den T-Zellklon. In beiden Tests wurden die Melanomzellen so heftig erkannt, dass die IFN γ -Spots nicht ausgewertet werden konnten (> 800 Spots). Die Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

Daraus wurde geschlossen, dass das gesuchte Peptid durch die 3'-terminalen ca. 500 bp kodiert wurde. Dieser Bereich wurde in vier weitere Subfragmente unterteilt (gp100-as4 bis – as7, **Abb. 3.9 B**) und diese mit dem gleichen T-Zellklon auf Erkennung getestet (**Abb. 3.10 B**). Der T-Zellklon 12/45 erkannte die Fragmente gp100-as5 (Pos. 4-1747), gp100-as6 (Pos. 4-1854) und gp100-as7 (Pos. 4-1905), jedoch nicht gp100-as4 (Pos. 4-1623). Daraus war zu folgern, dass die peptidkodierende Region auf der gp100-cDNA zwischen Pos. 1623 und 1747 liegen musste. Damit war die peptidkodierende Region im Protein auf 42 Aminosäuren (124 Nukleotide) eingeschränkt.

3.3.2 Identifizierung des T-zellerkannten, über HLA-B7.2 präsentierten gp100-Peptidepitops

Für die Identifizierung von Kandidatenpeptiden aus der durch molekularbiologische Methoden eingegrenzten Region von gp100 wurden im Internet frei verfügbare Programme verwendet (siehe **2.2.13**). Die aus der erkannten cDNA-Region deduzierte Aminosäuresequenz wurde dabei nach Bindungsmotiven für HLA-B7.2 in neun und zehn Aminosäuren langen Peptiden untersucht (Nonamere und Dekamere). Die 15 Peptide mit den höchsten Bindungswerten aus beiden Algorithmen wurden synthetisiert und auf Erkennung durch die gp100-spezifischen T-Zellklone überprüft. Die Peptide wurden auf die autologen MZ7-EBV-B-Zellen geladen und diese zusammen mit den T-Zellklonen in einen IFN γ -ELISPOT-Assay eingesetzt. **Tabelle 3.5** fasst das Ergebnis für vier T-Zellklone und die zunächst 15 synthetisierten Peptide zusammen. Das Peptid gp100-14 mit der Sequenz SPGCQPPAQ wurde von allen vier getesteten T-Zellklonen erkannt. Um zu überprüfen, ob dieses Peptid das optimale Peptid für die T-Zellen ist, wurden Varianten von dem Peptid (überlappende Nonamere und Dekamere) synthetisiert und getestet (siehe **2.1.19**, gp100-16, -17, -18, -19). Zwei Peptide wurden darüber hinaus bestellt, konnten aber wiederholt nicht synthetisiert werden (gp100-20 und gp100-21, **2.1.19**). Auch die neuen Peptide wurden im IFN γ -ELISPOT-Assay getestet (**Abb. 3.11 A**). Dabei wurde mit den Peptiden gp100-16 (SSPGCQPPA) und gp100-18 (SSPGCQPPAQ) die höchste Reaktivität der T-Zellklone erzielt. Nach Titration der beiden Peptide wurde das nonamere gp100-16 bei niedriger Peptidkonzentration jedoch etwas besser erkannt (**Abb. 3.11 B**). Das gleiche Ergebnis wurde mit einem weiteren T-Zellklon erzielt (Daten nicht gezeigt). Daher wurde Peptid gp100-16 nachfolgend als das optimale Peptid für die T-Zellklone angesehen. Anschließend wurde ein Lysetest mit dem T-Zellklon 12/45 und gp100-16-beladenen und chromierten antigenpräsentierenden Zellen durchgeführt, um zu testen, bis zu welcher

Peptidkonzentration der CTL lytisch ist (**Abb. 3.12 A**). Außerdem wurde die Lyse autologer Melanomzellen durch den T-Zellklon demonstriert (**Abb. 3.12 B**).

T-Zellklon	7/16	12/45	12/153	12/82
Spontanfreisetzung	0,5	1	1,5	0
+ Melanom	957,5	659,5	727	500,5
+ EBV-B ohne Peptid	19	1,5	28	2
+ EBV-B + LPSPACQLV	3,5	4,5	0,5	2,5
+ EBV-B + AQLRCQPVL	4	2	1	3,5
+ EBV-B + QPVLPSAC	4,5	5,5	2	6
+ EBV-B + VLPSPACQL	4,5	2,5	2	2,5
+ EBV-B + KGGSGTYCL	5	3,5	0,5	2
+ EBV-B + GTYCLNVSL	6	1,5	2	3
+ EBV-B + VSLADTNSL	4	3,5	0,5	2
+ EBV-B + SLAVVSTQL	6,5	1	1,5	1
+ EBV-B + CQLVLHQIL	3	7	0	3
+ EBV-B + AVVSTQLIM	10	5	1	2,5
+ EBV-B + GCQPPAQRL	2	2,5	1	1
+ EBV-B + QPPAQRLCQ	2,5	1,5	1,5	2,5
+ EBV-B + PSPACQQLVL	7	1,5	3	2,5
+ EBV-B + SPGCQPPAQ	862	574	832	295
+ EBV-B + SPACQLVHL	4	2	1,5	1

Tab. 3.5: Erkennung von gp100-Peptiden durch vier gp100/HLA-B7.2-spezifische T-Zellklone. In den gezeigten IFN γ -ELISPOT-Assay wurden je 2000 T-Zellen/Testeinheit eingesetzt. Diese wurden mit je 75.000 EBV-B-Zellen stimuliert, die jeweils mit 100 μ g/ml (\approx 100 μ M) der angegebenen Peptide beladen wurden. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

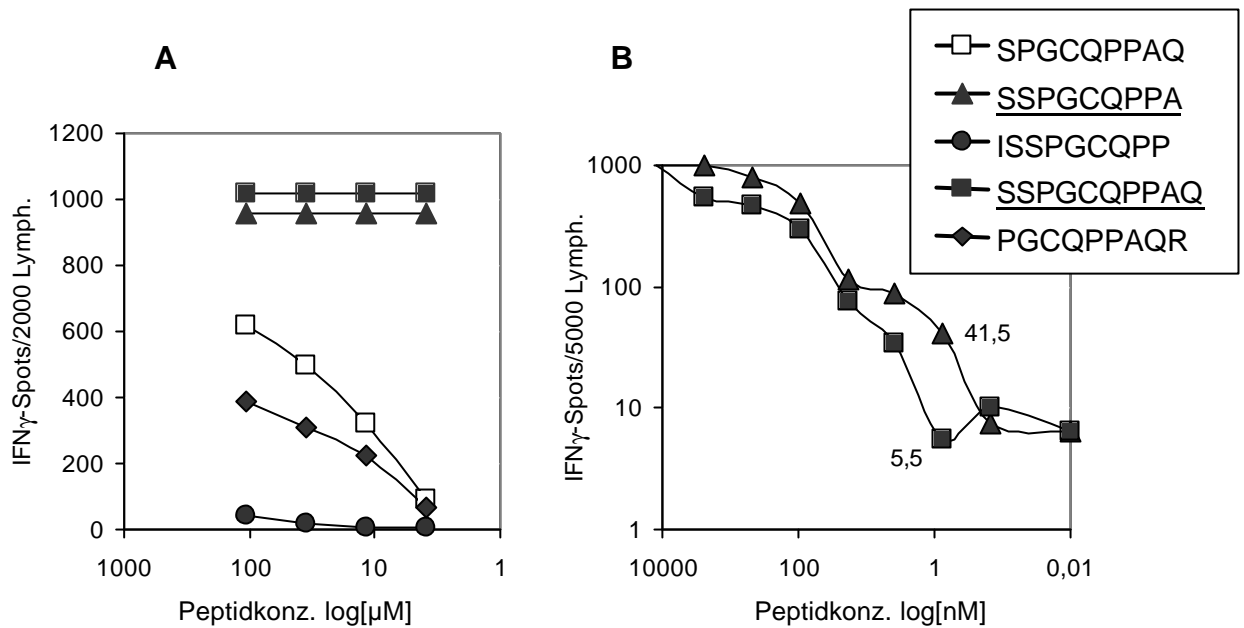


Abb. 3.11: Identifizierung des optimal erkannten synthetischen Peptids für den T-Zellklon 12/45. (A) Über die ersten 15 gp100-Peptide hinaus (**Tab. 3.5**) wurden weitere Peptide im IFN γ -ELISPOT-Assay getestet, um das optimale Peptid für den T-Zellklon zu identifizieren. (B) IFN γ -ELISPOT-Assay zur Testung, ob das Peptid SSPGCQPPA oder SSPGCQPPAQ von CTL 12/45 besser erkannt wird. In beiden Tests wurden autologe EBV-B-Zellen als peptidbeladene Stimulatorzellen eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

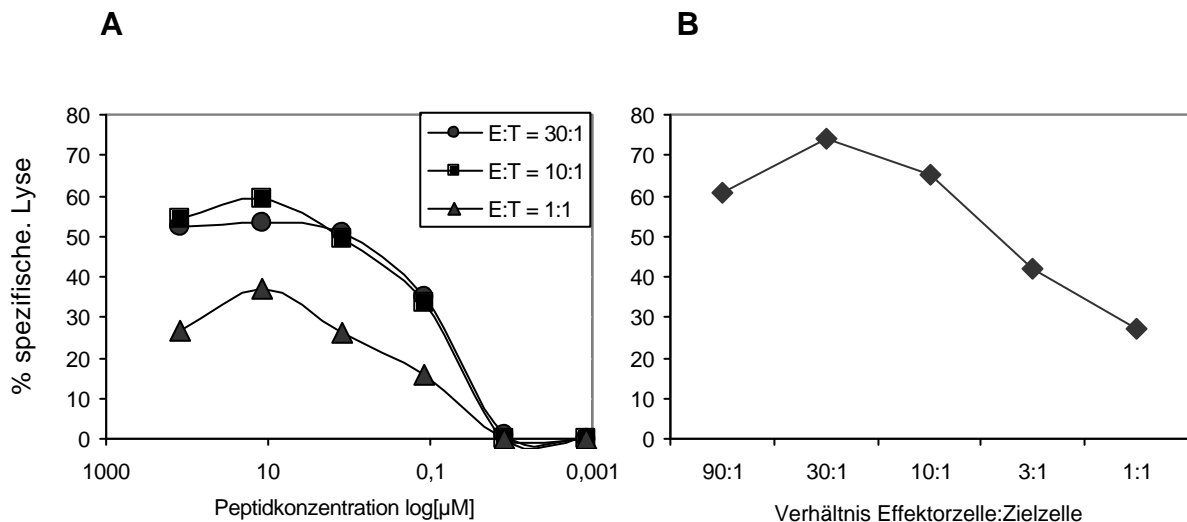


Abb. 3.12: Lysetests mit dem gp100-spezifischen T-Zellklon 12/45. (A) 2000 EBV-B-Zellen wurden mit Na(51 Cr)O $_4$ vorinkubiert, gewaschen, mit verschiedenen Konzentrationen gp100-16-Peptids beladen und mit den T-Zellen bei den angegebenen Effektorzell- zu Zielzell-Verhältnissen getestet. (B) Lyse der autologen Melanomzellen durch CTL 12/45 bei den gezeigten Effektorzell- zu Zielzell-Verhältnissen. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

3.4 Identifizierung des über HLA-A26.1 präsentierten Tyrosinase-Peptids

In der MLTC 18 stieg die Reaktivität gegen ein über HLA-A26.1 präsentiertes Peptid aus dem melanosomalen Enzym Tyrosinase im Verlauf der Kultur an (NCBI-Datenbankeintrag: M27160; Experiment siehe **Abb. 3.8 F**). Da die Frequenz der Tyrosinase/HLA-A26.1-spezifischen T-Zellen in der späten MLTC hoch genug erschien, wurde versucht, mit dieser Massenkultur das erkannte Peptid zu identifizieren. Hierzu wurde die gleiche Versuchsstrategie angewendet wie für die Identifizierung des gp100-Peptids (**Kap. 3.3.1**). Allerdings existierten bereits Tyrosinase-cDNA-Fragmente im Expressionsvektor pcDNA1, die in früheren Experimenten zur Eingrenzung zweier peptidkodierender Regionen von Tyrosinase erfolgreich eingesetzt worden waren [55]. Die Fragmente und der cDNA-Klon *123.B2C11*, der den kompletten ORF von Tyrosinase enthält, wurden zusammen mit *HLA-A*2601* in COS-7-Zellen kotransfiziert und mit den MLTC 18-Lymphozyten im IFN γ -ELISPOT-Assay auf eine Erkennung getestet (**Abb. 3.13**). Zunächst wurden die überlappenden Fragmente Ab-A (Pos. 1-611) und Ab-B (Pos. 427-1134) verglichen. Zusätzlich wurde ein von 5' verkürztes Subfragment von Ab-A, Ab-A2.4.1 (Pos. 52-611) getestet (**Abb. 3.13 A**, grau gemusterte Pfeile). Diesem Fragment fehlte im Vergleich zu Fragment Ab-A die Sequenz für ein bereits bekanntes T-zellerkanntes Peptid aus einem anderen Melanommodell, das „leader-Peptid“ von Tyrosinase [55]. Von diesen Fragmenten wurden beide Ab-A-Fragmente erkannt, das Ab-B-Fragment jedoch nicht (**Abb. 3.13 B**). Die Ab-A-Region auf der Tyrosinase-cDNA wurde weiter fragmentiert, kloniert und gleichermaßen getestet. Dabei war das kleinste Fragment, das noch Erkennung hervorrief, Ab-A5 (Pos. 1-387). Ein noch kleineres Fragment, Ab-A4 (Pos. 1-283), wurde nicht mehr erkannt (**Abb. 3.13 A, B**; schwarze Pfeile in **A**). Der Vollängen-Klon *123.B2C11* wurde stets erkannt (gestreifter Pfeil in **Abb. 3.13 A**). Daraus wurde geschlossen, dass die peptidkodierende Region zwischen Position 283 und 387 auf der cDNA kodiert werden musste (in **Abb. 3.13 A** im ORF schwarz dargestellt). Die gefolgerte Region im Protein (Aminosäuren 94-129) wurde sicherheitshalber etwas vergrößert, um auch kodierte Peptide aus den Randbereichen der erkannten cDNA zu berücksichtigen. Danach bestand die weiter untersuchte Aminosäuresequenz aus 54 Aminosäuren (siehe Anhang 2). Diese Sequenz wurde durch die oben erwähnten Algorithmen auf Bindungsmotive für HLA-A26.1 untersucht und die 10 Peptide, welche die besten Bindungswerte aufwiesen, wurden synthetisiert (**Kap. 2.1.19**). Das Peptid Tyros-3 QCSGNFMGF (Pos. 90-98) wurde von den MLTC 18-Lymphozyten auf den autologen EBV-B-Zellen im IFN γ -ELISPOT-Assay erkannt (**Abb. 3.14**).

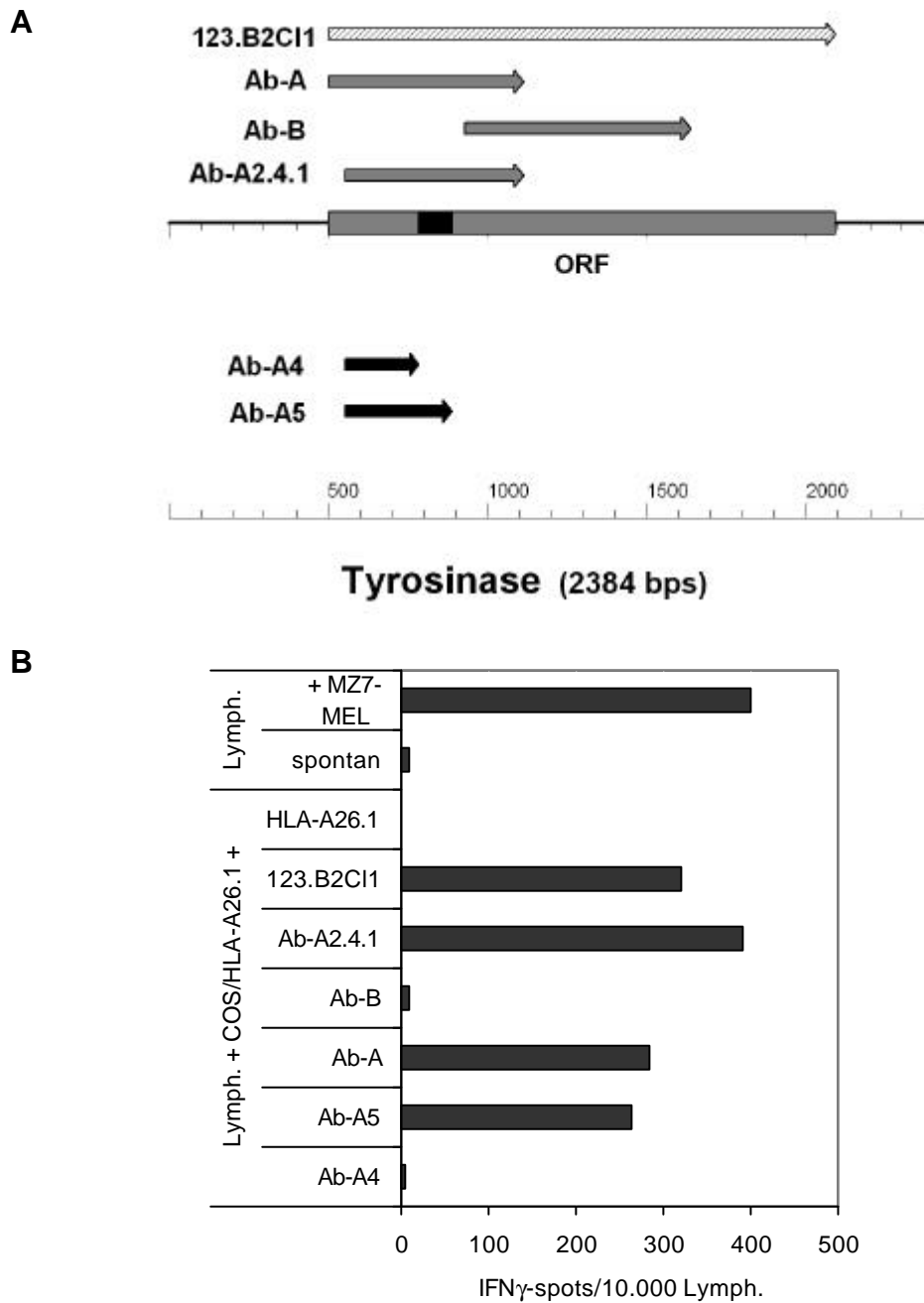


Abb. 3.13: Fragmentierungsstrategie der Tyrosinase-cDNA und Erkennung der klonierten Fragmente durch die MLTC 18. (A) Fragmentierungsstrategie des ORF von Tyrosinase. Die durch die Pfeile repräsentierten cDNA-Fragmente wurden in Expressionsvektoren kloniert, sequenziert und mit HLA-A*2601-cDNA in COS-7-Zellen kotransfiziert. (B) IFN γ -ELISPOT-Assay mit der MLTC 18 auf Erkennung der COS-7-Transfektanten. Die erkannte cDNA-Region ist im oberen Schema schwarz dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Ausgehend von Peptid Tyros-3 wurden überlappende Peptide synthetisiert und getestet, um die genaue Spezifität der T-Zellen zu ermitteln. Dabei wurde ein weiteres Peptid, CQCSGNFMGF (Tyros-14, Pos. 89-98), identifiziert, das etwas schlechter erkannt wurde als das Tyros-3-Peptid (**Abb. 3.15**). Ein weiteres Peptid, [N-acetyl]-QCSGNFMGF, wurde nicht erkannt (Daten nicht gezeigt). Dieses Peptid war zusätzlich synthetisiert worden, weil nach Angaben der Peptidsyntheseabteilung von Sigma-Genosys ein hoher Prozentsatz der mit Glutamin beginnenden Peptide *in vivo* acetyliert vorliegt (persönliche Mitteilung durch Mitarbeiter von Sigma-Genosys).

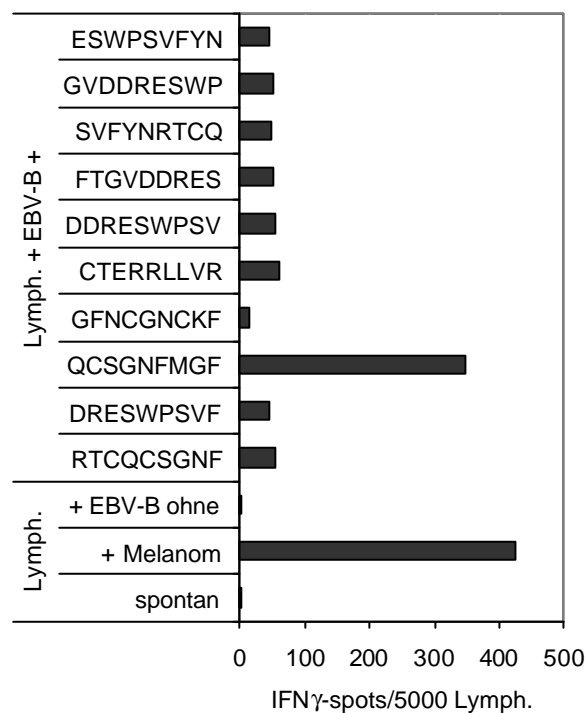


Abb. 3.14: Testung synthetischer Peptide aus Tyrosinase mit der MLTC 18. IFN γ -ELISPOT-Assay mit autologen EBV-B-Zellen als antigenpräsentierenden Zellen. Die EBV-B-Zellen wurden mit 100 μ g/ml Peptid beladen und mit der MLTC 18 (5000 Lymphozyten/Testeinheit) getestet. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

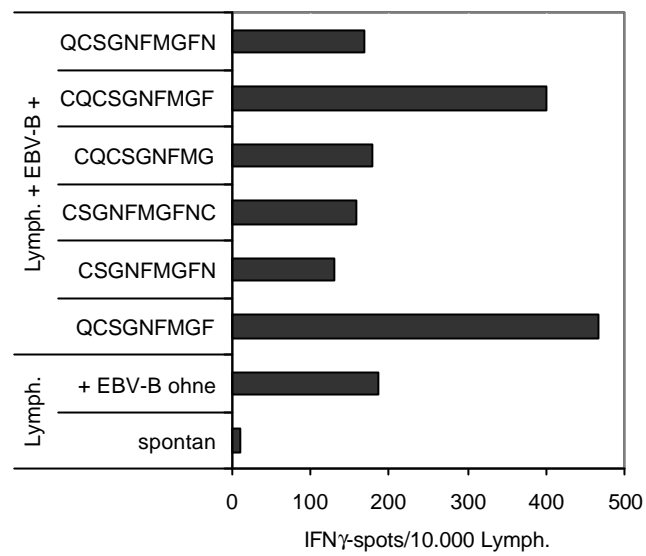


Abb. 3.15: Ermittlung des optimal erkannten Tyrosinasepeptids. IFN γ -ELISPOT-Assay mit MLTC 18-Lymphozyten als Effektorzellen und MZ7-EBV-B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen. Die EBV-B-Zellen wurden mit 100 μ g/ml des jeweiligen Peptids beladen und mit den T-Zellen koinkubiert. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

3.5 Charakterisierung eines neuen T-zellerkannten Melanomantigens

Die MLTC 18 zeigte neben der Reaktivität gegen Tyrosinase/HLA-A26.1 keine Antworten gegen andere der zur Verfügung stehenden bekannten Tumorantigene (**Abb. 3.8 F**). Zwischen 50 und 80% der eingesetzten T-Zellen reagierten in verschiedenen IFN γ -ELISPOT-Assays gegen die autologe Melanomzelllinie (Daten nicht gezeigt). Die Frequenz gegen das Tyrosinase/HLA-A26.1-Peptid lag dagegen bei circa 3-5 %. Darüber hinaus war die Reaktivität der T-Zellen gegen das Melanom mit dem anti-HLA-A3-Antikörper *GAP-A3* (anti-HLA-A3.1) blockierbar (**Abb. 3.16**). Der im gleichen ELISPOT-Assay getestete gp100/HLA-B7.2-reaktive T-Zellklon 12/45 diente als Kontrolle für die Spezifität und Funktionalität der Antikörper. Der CTL-Klon wurde vollständig durch die Antikörper *W6/32* (anti-MHCI), *B1.23.2* (anti-HLA-A26.1, -B7.2, -B38.1, -Cw12, -Cw7) und *SFR8-B6* (anti-HLA-B7.2) blockiert, nicht jedoch durch *GAP-A3*. Die MLTC 18 wurde dagegen nur durch *W6/32* und *GAP-A3* blockiert (**Abb. 3.16**). Da die MLTC 18 sich schnell expandieren ließ und ein großer Teil nach der fünften Stimulation (Tag 28+4) für den direkten Gebrauch eingefroren werden konnte, erschien die Population geeignet für die Suche nach einem neuen Tumorantigen, das über HLA-A3.1 präsentiert wird. Für alle nachfolgend beschriebenen Tests wurden Aliquots der T-Zellen aufgetaut, zwei Tage in AIM V-Medium mit IL-2 inkubiert und in die ELISPOT-Assays eingesetzt.

Versuchsansatz	Antikörper	T-Zellklon 12/45 (anti-gp100/HLA-B7.2)	MLTC 18
T-Zellen spontan	ohne		
T-Zellen + MZ7-MEL	ohne		
T-Zellen + MZ7-MEL	<i>W6/32</i>		
T-Zellen + MZ7-MEL	<i>B1.23.2</i>		
T-Zellen + MZ7-MEL	<i>SFR8-B6</i>		
T-Zellen + MZ7-MEL	<i>GAP-A3</i>		

Abb. 3.16: Antikörperblockade der MLTC 18. IFN γ -ELISPOT-Assay mit Antikörperblockade. 5000 Lymphozyten der MLTC 18 wurden pro Testeinheit mit 30.000 Melanomzellen mit und ohne Antikörper kokubiert. CTL 12/45 (1000 Lymphozyten/TE) diente als Kontrolle für die Antikörperblockade. Alle Ansätze wurden doppelt bestimmt.

3.5.1 Identifizierung eines neuen tumorassoziierten Antigens durch cDNA-Expressionsklonierung: *GPNMB*^{mutiert}

Für die Durchmusterung der MZ7-Melanom-cDNA-Bank nach T-zellerkannten Tumorantigenen wurde die Bank in cDNA-Pools zu 100 Klonen je Testeinheit einer Mikrotiterplatte aufgeteilt. Insgesamt wurden 24 Mikrotiterplatten mit fertig präparierten cDNAs im Expressionsvektor pcDNA1/Amp bereitgestellt (**Kap. 2.2.10, S. 47**). Für das „Screening“ mit der MLTC 18 wurden die 100er-Pools von 20 cDNA-Platten mit Hilfe von SuperFect™ in COS-7-Zellen transfiziert (entspricht 2×10^5 cDNA-Klonen). Je 20.000 COS-7-Zellen/Testeinheit (TE) wurden mit durchschnittlich 100 ng/TE Tumor-cDNA und 100 ng/TE *HLA-A*03011*-cDNA kotransfiziert (siehe **Kap. 2.2.9**). Am nächsten Tag wurden 10.000 T-Zellen/TE der MLTC 18 auf die COS-Transfektanten gegeben und im IFN γ -ELISPOT-Assay auf Erkennung der Transfektanten getestet. Insgesamt wurden 13 100er-Pools erkannt. Vier positiv getestete 100er-Pools, darunter auch Pool #656 (**Abb.3.17 A**), wurden verkleinert, indem die als Glycerolstocks eingefrorenen Bakterien neu ausgestrichen wurden und diesmal die Kolonien zu je 40 Pools mit jeweils 10 Kolonien zusammengefasst, über Nacht inokuliert und daraus die Plasmide präpariert wurden. Die Plasmide der 10er-Pools wurden wiederum transfiziert und mit den T-Zellen getestet. Unter den insgesamt fünf erkannten 10er-Pools war auch der Pool #656.14 (**Abb.3.17 B**). Aus diesem Pool wurden 200 einzelne Klone präpariert, die auf die gleiche Art getestet wurden. Auf diese Weise wurde ein cDNA-Klon identifiziert (#656.14.A6), der nach Kotransfektion mit *HLA-A*03011* in COS-7-Zellen eine starke Antwort der MLTC 18 hervorrief (**Abb. 3.17 C**). Durch Ansequenzierung des cDNA-Klons mit dem T7-Vektorprimer und anschließendem Datenbank-Vergleich wurde die Sequenz als Teil des Gens für das Glycoprotein NMB (*GPNMB*) identifiziert (GeneCard: <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?GPNMB&search=GPNMB&suff=txt>). Das Gen wurde 1995 beschrieben [102]. Es wird in Melanomen mit geringem Metastasierungspotential exprimiert. Eine Zusammenfassung über die Identifizierung der *GPNMB*-cDNA durch cDNA-Expressinsklonierung gibt **Abb. 3.17**.

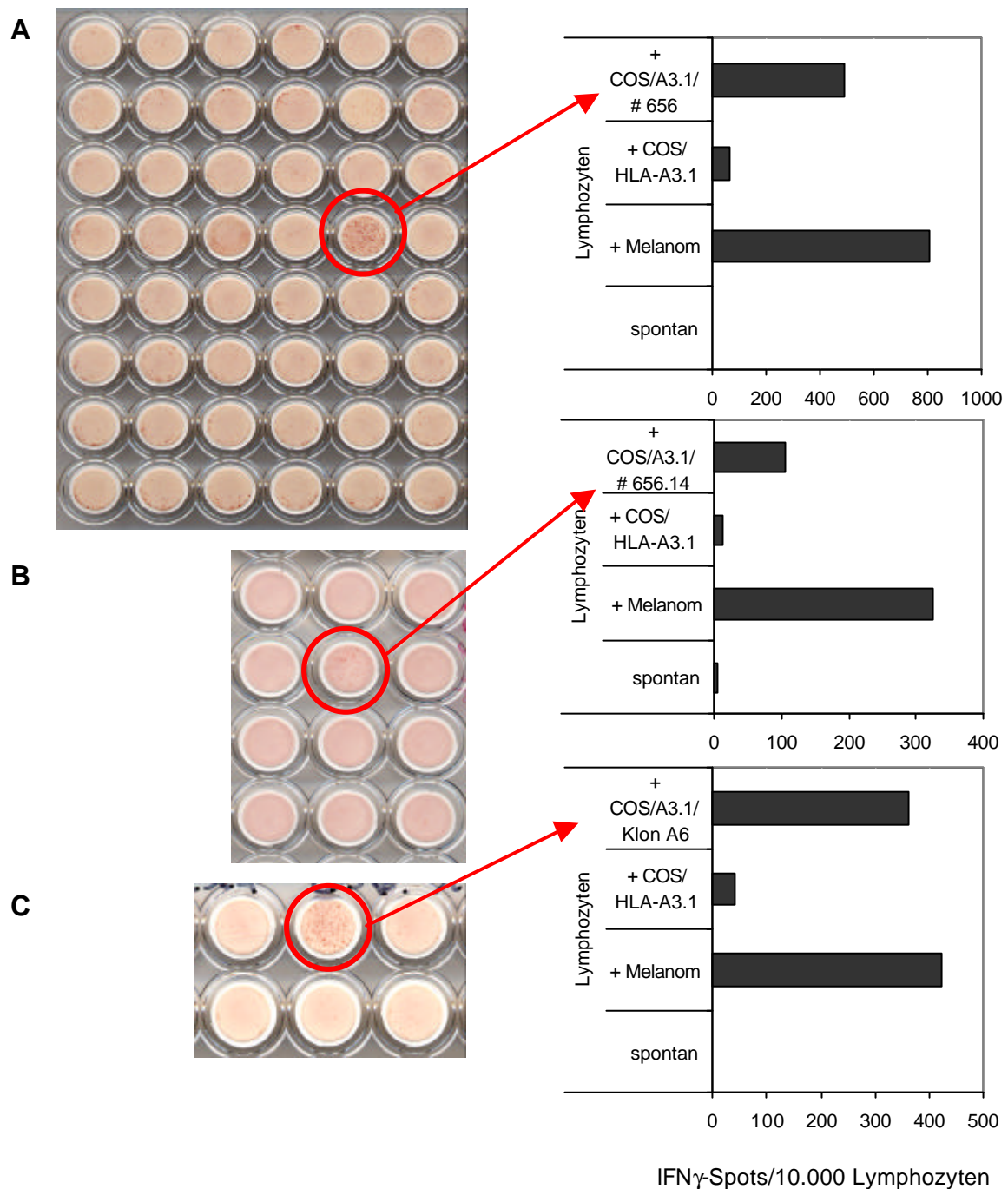


Abb. 3.17: Identifizierung eines T-zellerkannten cDNA-Klons aus der MZ7-MEL cDNA-Bank durch cDNA-Expressionsklonierung mit Hilfe der MLTC 18. (A) Ausschnitt aus der ELISPOT-Platte mit den getesteten 100er-Pools #601-696 und dem Ergebnis des Pools #656 im Vergleich zu den Kontrollen. (B) Ausschnitt der ELISPOT-Platte mit den getesteten 10er-Pools, die aus Pool #656 hergestellt wurden und Ergebnis des Pools #14 im Vergleich zu den Kontrollen. (C) Ausschnitt aus der ELISPOT-Platte mit den getesteten Klonen, hergestellt aus dem 10er-Pool #656.14. Das Ergebnis für #656.14.A6 (Klon A6) ist gezeigt. Für die Kontrollen mit den Melanomzellen wurden 1000 (A) und 500 (B, C) Lymphozyten eingesetzt.

3.5.2 Eine Punktmutation generiert ein T-zellerkanntes Melanomantigen: GPNMB^{G181D}

Die komplette Sequenzierung des 1608 bp langen Inserts des *GPNMB*-cDNA-Klons ergab, dass 618 bp homolog zur veröffentlichten *GPNMB*-cDNA waren, während der Rest keinerlei Homologien dazu aufwies (NCBI-Accession-Nr. für *GPNMB*-cDNA: NM_002510). Durch Datenbanksuchen wurde ein humangenomischer BAC-Klon (RG271G13, NCBI-Acc.-Nr.: AC005082) gefunden, der das komplette *GPNMB*-Gen enthielt. Darauf konnte die fehlende Sequenz identifiziert werden. Die ersten 616 bp der *GPNMB*-cDNA enthielten die Sequenzinformationen der Exons 1 bis 4 des *GPNMB*-Gens, gefolgt von einem Teil des Intron 4 (komplette Sequenz des Klons in Anhang 3). An der Exon 4/Intron 4-Grenze wurde eine Punktmutation gefunden, welche die Donor-Spleißstelle 5'-TGGTTG-3' (Intronsequenz kursiv dargestellt) des Introns zu 5'-TGATTG-3' verändert, wodurch wahrscheinlich das Spleißen dieses Introns verhindert wird (**Abb. 3.18 A**). Überraschend war, dass die Melanomzellen auch eine Spleißvariante des nichtmutierten *GPNMB*-Allels mit dem Intron 4 exprimieren (als *GPNMB/INT4* bezeichnet). Dies wurde durch die Sequenzierung eines RT-PCR-Produktes aus Melanom-cDNA mit einem Exon 3/Intron 4-Primerpaar gezeigt (**Abb. 3.18 B**, Primer siehe **2.1.18**). Das PCR-Produkt konnte nicht aus einer Kontamination mit genomischer DNA entstanden sein, da ein großes Intron (Intron 3, 2578 bp) hätte mitamplifiziert werden müssen. Durch die Sequenzierung von PCR-Produkten aus genomischer DNA von Melanomzellen und MZ7-EBV-B-Zellen mit einem Exon 4/Intron 4-Primerpaar wurde gezeigt, dass die Mutation tumorspezifisch ist (**Abb. 3.18 C, D**). In den EBV-B-Zellen wird *GPNMB* nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt).

Im Intron 4 von *GPNMB*^{mutiert}, ab Position 1372 des Klons A6, wurden typische Polyadenylierungs-Signalsequenzen (AATAAA) und kurze poly(A)₁₂₋₂₄-Sequenzabfolgen gefunden (siehe Anhang 3). Durch diese Poly-A-Sequenzen kann erklärt werden, warum die *GPNMB*-Spleißvarianten (Wildtyp und mutiert) mit Hilfe von Oligo-d(T)₁₂₋₁₈-Primern in cDNA umgeschrieben und somit Bestandteil der cDNA-Bank wurden. Auch *GPNMB/INT4*-cDNA wurde kloniert sowie ein cDNA-Fragment, das nur aus Sequenzen der Exons 1-4 bestand (**Abb. 3.19 A**). Beide Klone wurden in COS-7-Zellen transfiziert und auf Erkennung durch die MLTC 18 im IFN γ -ELISPOT getestet. Sie wurden nicht erkannt (**Abb. 3.19**). Danach war es naheliegend, dass das von den T-Zellen erkannte Peptid die durch die Mutation ausgetauschte Aminosäure enthält.

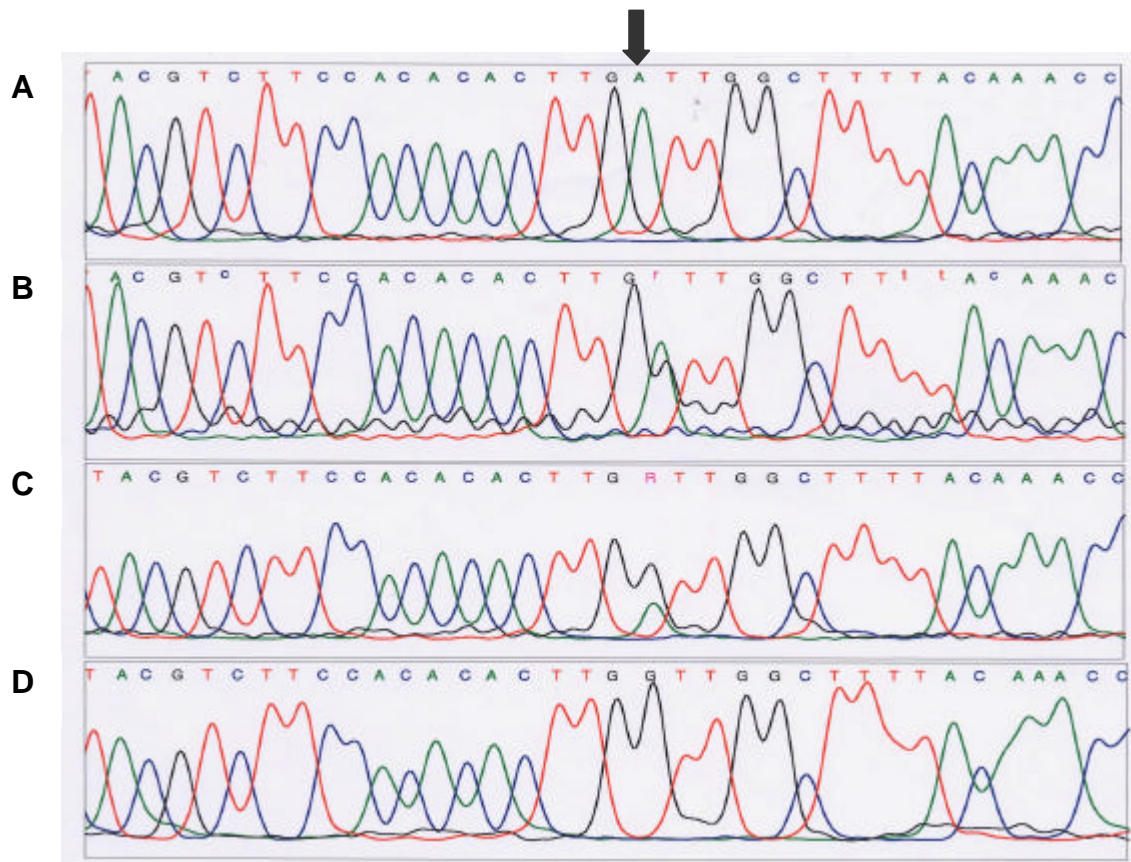


Abb. 3.18: Sequenzierung des GPNMB-cDNA-Klons #656.14.A6 und der GPNMB-PCR-Produkte. (A) Sequenzausschnitt aus dem Exon 4/Intron 4-Übergang von #656.14.A6. (B) Der gleiche Sequenzausschnitt aus einem RT-PCR-Produkt von MZ7-Melanom-RNA. (C, D) Der gleiche Sequenzausschnitt aus einem PCR-Produkt von genomischer DNA aus den Melanomzellen (C) und aus autologen EBV-B-Zellen (D).

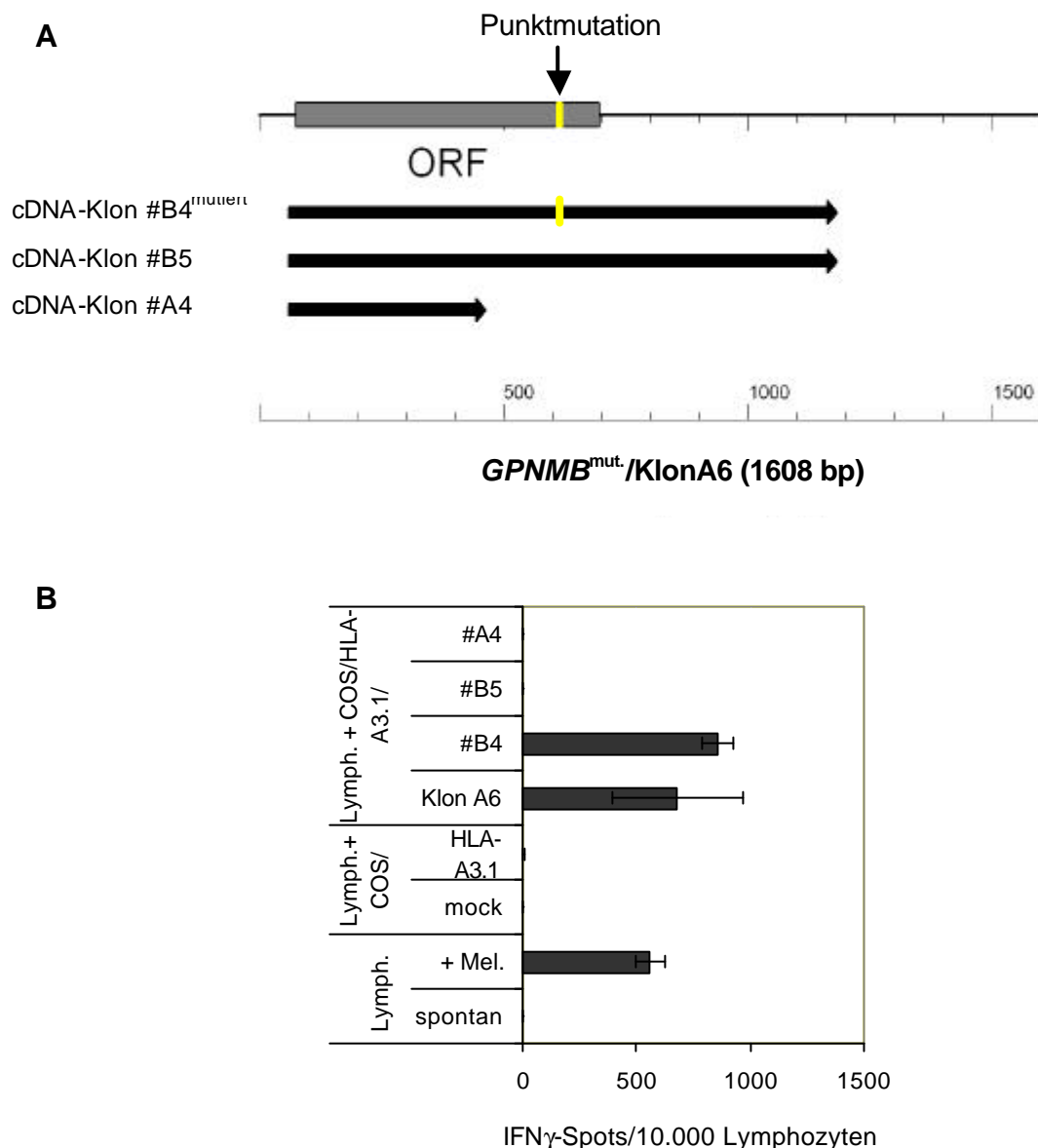


Abb. 3.19: Eingrenzung der peptidkodierenden Region von *GPNMB*^{mutiert} auf die Region um die Punktmutation. (A) Schematische Darstellung von PCR-Fragmenten aus *GPNMB*^{mutiert} (Klon A6) und *GPNMB/INT4* zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region. Die Fragmente A4 (nur Exonsequenzen), B4 (*GPNMB*^{mutiert}) und B5 (*GPNMB/INT4*) wurden aus Melanom-cDNA amplifiziert, kloniert und sequenziert. (B) IFN γ -ELISPOT-Assay mit der MLTC 18 gegen COS-7-Zellen, die mit *HLA-A*03011* und den links aufgeführten cDNAs transfiziert waren. Die Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

Der offene Leserahmen von *GPNMB*^{mutiert} kodiert für 206 Aminosäuren, von denen 25 der Intronsequenz zuzuordnen sind. Die Punktmutation verändert das Codon GGT zu GAT (Pos. 541-543 ab ATG), wodurch an Position 181 des Proteins Asparaginsäure (D) statt Glycin (G) eingebaut wird. Mit Hilfe der oben vorgestellten Peptidvorhersageprogramme (2.2.13) wurden im Bereich der ausgetauschten Aminosäure Peptide mit Bindungsmotiven für HLA-

A3 gesucht. Dadurch wurde ein Dekapeptid identifiziert, das mit beiden Programmen hohe Bindungswerte erzielte: TLDWLLQTPK. Das Peptid wurde synthetisiert und von der MLTC 18 auf autologen EBV-B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen im IFN γ -ELISPOT-Assay erkannt (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurden weitere überlappende Peptide synthetisiert und getestet, um die genaue Spezifität der T-Zellen zu ermitteln (siehe 2.1.19). Darunter war auch das Wildtyp-Peptid TLGWLLQTPK aus GPNMB/INT4. Der folgende ELISPOT-Assay mit diesen Peptiden zeigte, dass nur das schon bekannte Dekapeptid (TLDWLLQTPK) von der MLTC 18 erkannt wurde (**Abb. 3.20**). Das alterierte Protein wird im Folgenden als GPNMB^{G181D} bezeichnet.

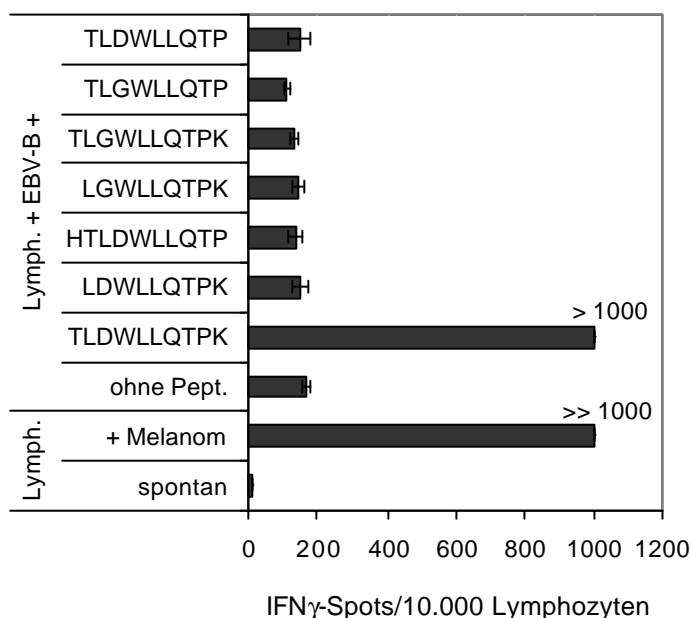


Abb. 3.20: Erkennung von überlappenden Peptiden aus dem Bereich der ausgetauschten Aminosäure aus GPNMB^{G181D} durch die MLTC 18. Gezeigt ist ein IFN γ -ELISPOT-Assay mit den MLTC 18-Lymphozyten als Effektorzellen und peptidbeladenen autologen EBV-B-Zellen als Stimulatorzellen. Die EBV-B-Zellen wurden mit je 100 μ g/ml der aufgeführten Peptide beladen. Die Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

3.5.3 Erkennung von GPNMB^{G181D} durch unabhängig generierte MLTCs

Bei der bisherigen Spezifitätsanalyse von MLTC-Responderlymphozyten wurden Reaktivitäten gegen die Differenzierungsantigene gp100 in Assoziation mit HLA-B7.2 und Tyrosinase in Assoziation mit HLA-A26.1 sowie gegen das durch eine Punktmutation alterierte SIRT2 (SIRT2^{P182L}) in Assoziation mit HLA-A3.1 gefunden (**Kap. 3.2, Abb. 3.8**). In keiner der 6 MLTCs kamen alle drei Antworten gemeinsam vor. Die Antworten waren auf verschiedene MLTCs verteilt. Die Tyrosinase/A26.1-Antwort entstand sogar nur in der MLTC 18 (**Abb. 3.8 F**). Daraus wurde gefolgert, dass die Antworten zufällig entstanden waren. In Kenntnis von Antigen GPNMB^{G181D} wurde überprüft, wie häufig sich eine dagegen gerichtete T-Zellantwort in verschiedenen MLTCs entwickelt hatte. Da zu dem Zeitpunkt das TLDWLLQTPK-Peptid noch nicht identifiziert war, wurde die Frage in einem COS-7-Transfektionsexperiment geklärt (**Abb. 3.21**). COS-7-Zellen wurden mit *HLA-A*03011* und *GPNMB^{mutiert}* (Klon A6) kotransfiziert und in einem IFN γ -ELISPOT-Assay auf Erkennung durch fünf unabhängige MLTCs getestet. Die MLTCs wurden zusätzlich zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur getestet. Alle getesteten MLTCs erkannten GPNMB^{G181D} mit hoher Frequenz. Allerdings war die Frequenz reaktiver T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultur verschieden. In der MLTC 18, mit der das Antigen kloniert wurde, nahm die Frequenz im Laufe der Zeit ab. In den MLTCs 15 und 16 nahm die Frequenz zwischen Tag 28 und Tag 50 zu. Danach fiel die Frequenz wieder ab. In der MLTC 13 blieb die GPNMB^{G181D}-Antwort über fünf Stimulationen gleichbleibend hoch. Die MLTC 14 konnten nur an Tag 43 getestet werden und hatte zu dem Zeitpunkt hohe Reaktivität gegen das Antigen (**Abb. 3.21**). Von den ursprünglich sechs generierten MLTCs (**Kap. 3.2.2**) wurde die MLTC 17 nicht getestet, weil sie starke Reaktivität gegen COS-7-Zellen aufwies, die nur mit *HLA-A*03011* transfiziert waren (**Abb. 3.8 E**).

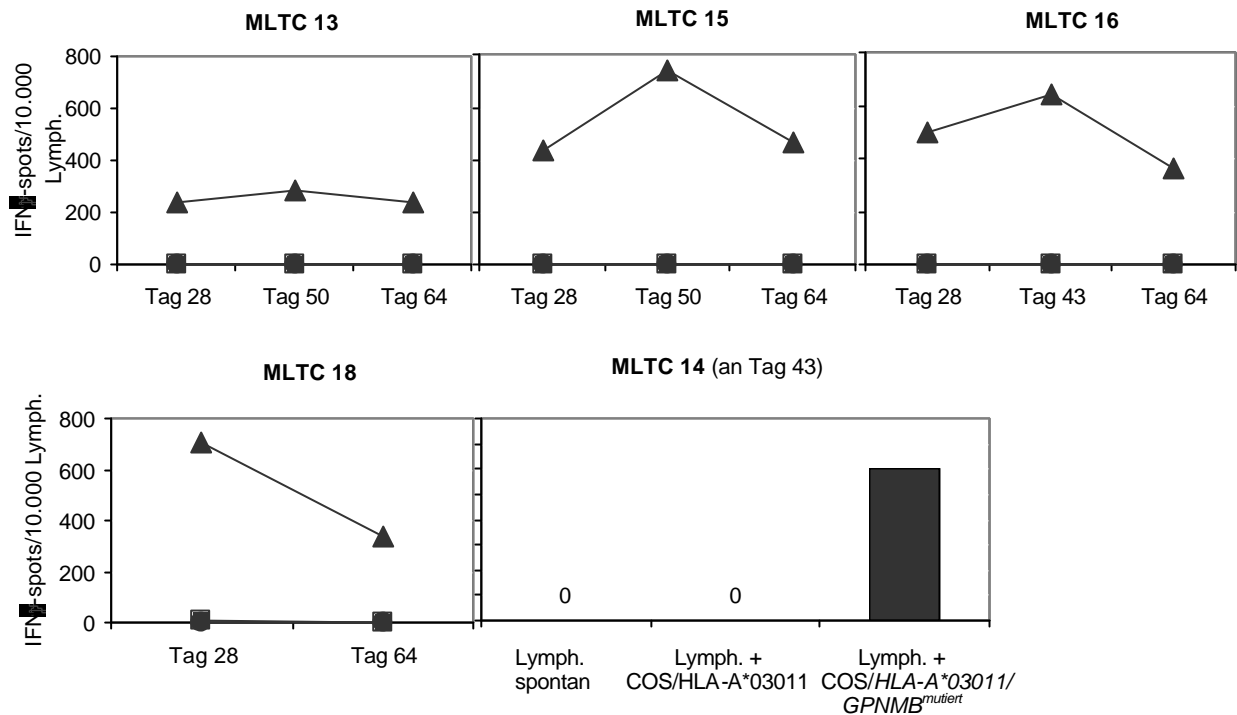


Abb. 3.21: Erkennung von $GPNMB^{mutiert}/HLA-A*03011$ -Transfektanten durch unabhängige MLTCs. Für den IFN γ -Elispot-Assay wurden je 10.000 Lymphozyten mit transient transfizierten COS-7-Zellen inkubiert. Gezeigt sind die Testansätze Lymphozyten mit COS/HLA-A*03011 (—■—) und Lymphozyten mit COS/HLA-A*03011/ $GPNMB^{mutiert}$ (—▲—). Keine der MLTCs sezernierte spontan IFN γ und die Reaktivität gegen die Melanomzellen war mit jeder MLTC so hoch, dass die Spots durch die automatische Auswertung nicht erfasst werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

3.5.4 Expression von $GPNMB^{mutiert}$ und/oder $GPNMB/INT4$ in verschiedenen Tumoren

Im **Kapitel 3.5.2** wurde gezeigt, dass die MZ7-Melanomzelllinie zwei Spleißvarianten von $GPNMB$ exprimiert, die als $GPNMB^{mutiert}$ und $GPNMB/INT4$ bezeichnet wurden. Um zu überprüfen, ob $GPNMB^{G181D}$ (kodiert von $GPNMB^{mutiert}$) ein individualspezifisches Antigen ist oder ob die Punktmutation auch in anderen Tumoren vorkommt, wurden verschiedene Tumorzelllinien durch RT-PCR überprüft. Die Punktmutation zerstört eine BstXI-Restriktionsschnittstelle, so dass durch Verdau der PCR-Produkte ein Hinweis auf das Vorliegen der Mutation zu erhalten war. Nicht verdaute und einige verdaute PCR-Produkte wurden sequenziert. Dadurch sollte die Methode überprüft und das eventuelle Vorhandensein der Mutation abgesichert werden. Die **Abbildung 3.22** gibt einen schematischen Überblick über die Lage der eingesetzten PCR-Primer sowohl für die Amplifikation von $GPNMB^{mutiert}$ (und $GPNMB/INT4$) (**Abb. 3.22 A**) als auch der komplett

gespleißten cDNA (**Abb. 3.22 B**, Sequenzen der Primer in **Kap. 2.1.18**). Eventuelle Verwechslungen der PCR-Produkte von ungespleißter cDNA mit Produkten von genomischer DNA oder von cDNA, die von unreifer *GPNUMB*-RNA stammte, wurden durch die Auswahl der Primerpaare verhindert (**Abb. 3.22 C**). Das Vorkommen von *GPNUMB^{mutiert}* bzw. *GPNUMB/INT4* wurde mit einem Exon 3/Intron 4-Primerpaar (nmb-449s/nmb-876as) überprüft. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 427 bp (PCR1, **Abb. 3.22 A**). Die vollständig gespleißte *GPNUMB*-cDNA wurde mit Exon 3/Exon 6-Primern (nmb-449s/nmb-960as) nachgewiesen, das PCR-Produkt war 563 bp lang (PCR3, **Abb. 3.22 B**).

Zunächst wurden einige im Labor verfügbare Zelllinien durch RT-PCR überprüft. Acht Melanomzelllinien, zwei Pankreaskarzinomzelllinien und zwei EBV-transformierte B-Zelllinien wurden auf die Expression von *GPNUMB^{mutiert}* bzw. *GPNUMB/INT4* und vollständig gespleißtes *GPNUMB* getestet. Zur Kontrolle der PCR mit der jeweiligen cDNA wurde ein Fragment von *b-Aktin* amplifiziert. Die EBV-B-Zellen und die Pankreaskarzinomzellen sowie eine Melanomzelllinie waren generell negativ für *GPNUMB*-Expression, aber positiv für *b-Aktin*. Die sieben übrigen Melanome waren positiv für *b-Aktin*, *GPNUMB* und *GPNUMB^{mutiert}* bzw. *GPNUMB/INT4* (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden die gleichen Expressionsanalysen in fünf als Frischmaterial, direkt nach der Operation kryokonservierten Melanomen, durchgeführt (**Abb. 3.23**). Vier der Tumore waren Primärmelanome, einer eine Hautmetastase. Alle fünf waren positiv für *GPNUMB^{mutiert}* bzw. *GPNUMB/INT4* sowie *GPNUMB* (**Abb. 3.23**). Weiterhin wurden 99 Melanome (von Dr. F. Brasseur, Ludwig-Institut für Krebsforschung, Brüssel/Belgien zur Verfügung gestellt) und 23 Nierenzellkarzinome (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Barbara Seliger, III. Med. Klinik, Universität Mainz) getestet, wobei beide Gruppen nur auf *GPNUMB^{mutiert}* bzw. *GPNUMB/INT4* getestet wurden. 84 Melanome (85%) und 7 Nierenzellkarzinome (30%) waren positiv für *GPNUMB^{mutiert}* und/oder *GPNUMB/INT4* (Daten nicht gezeigt). Alle Melanome und Nierenzellkarzinome waren positiv für *b-Aktin*. Durch BstXI-Verdau der RT-PCR-Produkte und/oder Sequenzierung wurde gezeigt, dass keine der *GPNUMB*-positiven Zelllinien oder Gewebe die Mutation trug (Daten nicht gezeigt). Das Antigen *GPNUMB^{G181D}* war demnach für das Melanom MZ7-MEL spezifisch.

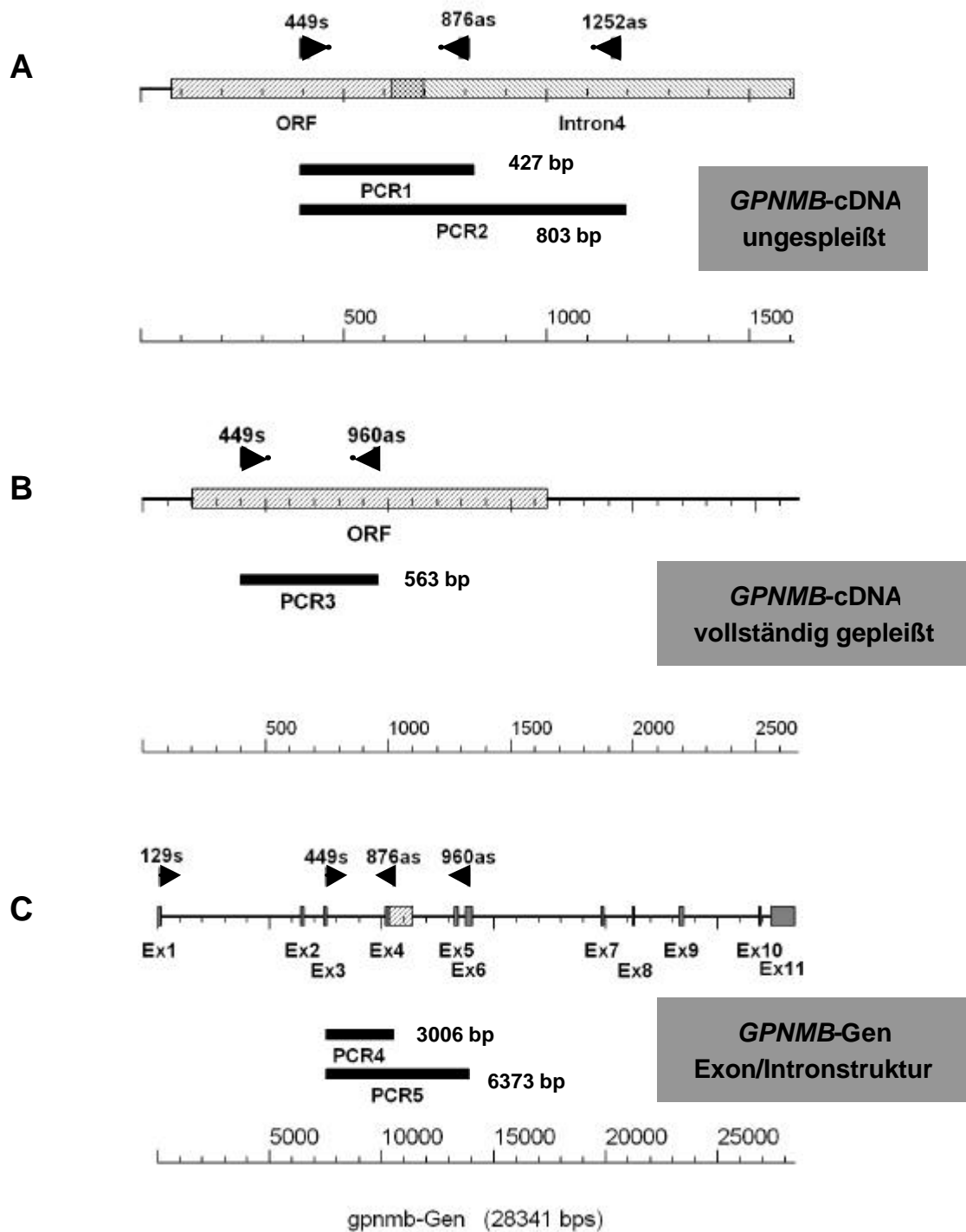


Abb. 3.22: Schematische Darstellung der PCR-Produkte von GPNMB mit den verwendeten Primern auf Intron 4-ungespleißter cDNA (A), der vollständig gespleißten cDNA (B) und von genomischer DNA (C). Die Sequenzen der Primer sind in **Kap. 2.1.18** nachzulesen. Die Länge der bei Amplifikation von genomischer DNA zu erwartenden PCR-Fragmente ist angegeben (PCR4, PCR5, C). Das PCR-Produkt PCR4 konnte von MZ7-MEL-genomischer DNA amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

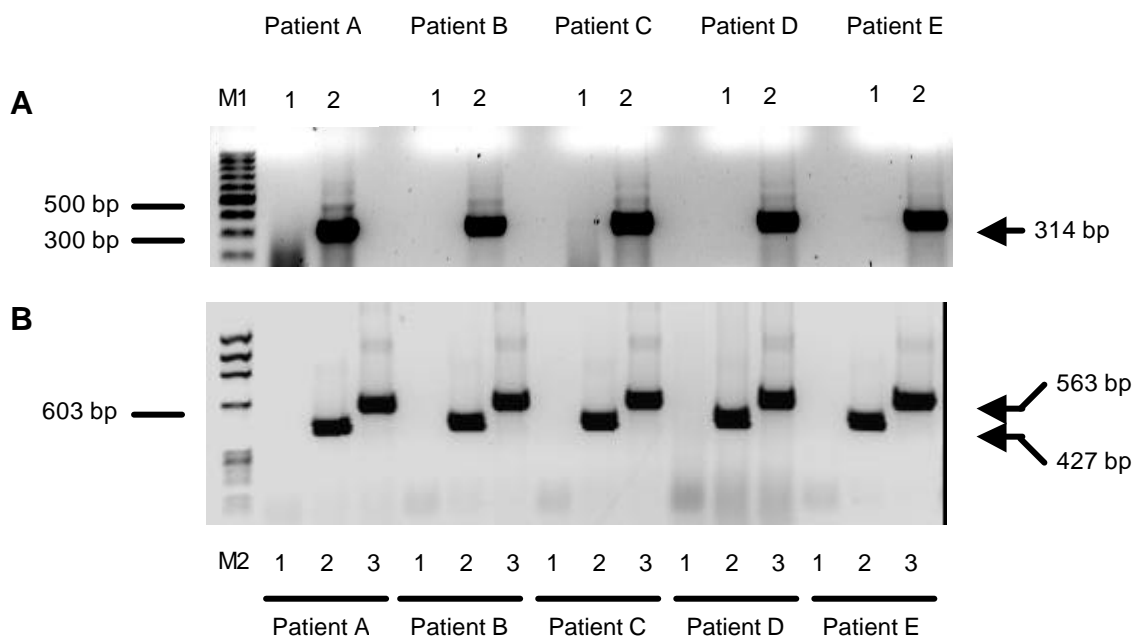


Abb. 3.23: Expression von *GPNMB* in fünf unterschiedlichen nativen Melanomen. Die Melanome, vier Primärtumore und eine Hautmetastase, wurden direkt nach der chirurgischen Entfernung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bis zur RNA-Isolation bei -70 °C aufbewahrt. Gesamt-RNA wurde aus dem unter flüssigem Stickstoff aufgebrochenen Gewebe isoliert und mit Oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben. Die Lage der Primer für die PCR-Reaktionen ist in **Abb. 3.22**, die Sequenzen der Primer sind in **Kap. 2.1.18** aufgeführt.

Legende:

A: *b-Aktin*-PCR

Spur1: H₂O-Kontrolle

Spur2: *b-Aktin*-Produkt

B: *GPNMB*-PCR

Spur1: Kontrolle ohne Reverse Transkriptase

Spur2: *GPNMB/INT4*-PCR-Produkt

Spur3: gespleißtes *GPNMB*-PCR-Produkt

M1: 100 bp-Leiter (Hybaid/AGS)

M2: Biosizer V (Hybaid/AGS)

Die Ergebnisse zeigten, dass viele Melanome und einige Nierenzellkarzinome *GPNMB/INT4* exprimierten. Dies wurde durch Datenbanksuchen bestätigt. Unter der „Accession“-Nummer AAH11595 ist in der PubMed-Datenbank des NCBI ein Protein eingetragen, dessen Sequenz zu 100 % homolog zur Aminosäuresequenz des hier vorgestellten *GPNMB/INT4* ist. Die cDNA zu diesem Protein wurde aus einem melanotischen Melanom isoliert. In EST-Datenbanken („expressed sequence tags“) konnten mehr als 300 ESTs für *GPNMB* aus verschiedenen Geweben gefunden werden (siehe Unigene cluster Hs. 82226, http://telethon.bio.unipd.it/GETProfiles/Cardiac_Muscle/ESTs/Hs.82226.html). Es gab

jedoch nur vier ESTs aus dem Exon 4/Intron 4-Sequenzbereich. Diese kamen aus folgenden Bibliotheken: „Uterus“ (db EST-Eintrag: AI093418), „Haut“ (db EST-Eintrag: BE276143, keine normale Haut, sondern melanotisches Melanom), „Lunge“ (db EST: BE551378, unter „tissue type“ wird „carcinoid lung“ angegeben) und einer mehrfach substrahierten und normalisierten Bibliothek aus insgesamt 21 Geweben (db EST-Eintrag: AW294873; einige der „Gewebe“ wurden überprüft, alle waren Tumoren). Auch die Suche in SAGE- („serial analysis of gene expression“) Datenbanken ergab höhere Expressionsraten von *GPNUMB* hauptsächlich in Tumorzelllinien, dabei wurden die höchsten Expressionsraten in Glioblastomzelllinien ermittelt.

Zusammengenommen deuteten die Ergebnisse auf ein Vorkommen von *GPNUMB/INT4* hauptsächlich in Tumorzellen verschiedener Histologien hin, insbesondere aber in Melanomen. Über die Untersuchung der *GPNUMB/INT4*-Expression in zusätzlichen Tumoren hinaus, sollte die Expression möglichst auch in verschiedenen Normalgeweben überprüft werden. Wenn sich dabei herausstellt, dass die Expression auf Tumorgewebe beschränkt ist, könnte *GPNUMB/INT4* als diagnostischer Marker für Melanome und eventuell andere Tumoren dienen.

4 Diskussion

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung neuer T-zellerkannter Tumorantigene in dem gut charakterisierten Melanom-Modell MZ7. Als Voraussetzungen dafür waren eine Melanomzelllinie, kryokonservierte PBL (periphere Blutlymphozyten), einige MLTCs (Gemischte Lymphozyten-Tumorzellkulturen) und aus diesen hervorgegangene T-Zellklone, die Reaktivität gegen die Tumorzellen aufwiesen, gegeben. Weiterhin waren eine cDNA-Bank aus der Melanomzelllinie in einem eukaryontischen Expressionsvektor hergestellt und 5 der 6 MHC-Klasse I Allele in Expressionsvektoren kloniert worden. In dem Modell war bereits ein T-zellerkanntes Antigen charakterisiert worden, das als $SIRT2^{P182L}$ bezeichnet wurde, weil es von einem punktmutierten *SIRT2* kodiert wird. Die Punktmutation führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 182: Leucin wird statt Prolin eingebaut. *SIRT2* ist ein humanes Homologes zum *Sir2*-Gen der Hefe (*SIR*: „silent information regulator“ [92;103-107]). Ein Peptid um die ausgetauschte Aminosäure (KIFSEVTLK) wurde von einer Reihe von T-Zellklonen aus den MLTCs 9 und 12 erkannt (zur Publikation in Vorbereitung). Von 34 Klonen aus der MLTC 9 erkannten 24 (70 %) $SIRT2^{P182L}/HLA-A3.1$ und von 31 Klonen aus der MLTC 12 erkannten 15 (48 %) das Antigen. Das deutete auf eine prominente Stellung des Antigens in einer möglichen Hierarchie der Tumorantigene in diesem Modell, zumindest unter den T-Zellantworten hin, die klonal in permanenter Kultur etabliert wurden (diskutiert unter 4.5). Die Reaktivität der $SIRT2^{P182L}$ -reaktiven T-Lymphozytenklone gegen die Melanomzellen war durch den HLA-A3-spezifischen Antikörper *GAP-A3* blockierbar. Die Tatsache, dass weitere T-Zellklone zwar ebenfalls HLA-A3.1 restringiert, aber nicht gegen $SIRT2^{P182L}$ gerichtet waren und darüber hinaus T-Zellklone identifiziert wurden, die nicht durch HLA-A3.1 restringiert waren, ließ die Erwartung zu, weitere Antigene aus der Melanom-cDNA-Bank klonieren zu können (Tab. 3.2).

4.1 Identifizierung T-zellerkannter Antigene durch cDNA-Expression in COS-7-Zellen

Für die Identifizierung von Peptidantigenen auf menschlichen Tumoren, die von T-Zellen erkannt werden können, werden verschiedene Strategien verfolgt. Die meisten Tumorantigene wurden durch cDNA-Expressionsklonierung entdeckt (zum Beispiel [35;54;56;58;65;68;108]) und die Peptide, für die sie kodieren, wurden durch die Expression

von cDNA-Fragmenten eingegrenzt und charakterisiert (z. B. [55;65;71]). Wenige andere Arbeitsgruppen versuchten, natürlich prozessierte Peptide von den HLA-Molekülen der Zellen zu eluieren und diese durch HPLC (High Performance Liquid Chromatography) aufzutrennen. Danach wurden die Peptidfraktionen mit tumorspezifischen CTL auf Erkennung getestet. In seltenen Fällen lag ausreichend Material einer erkannten Peptidfraktion vor, so dass das Peptid direkt sequenziert werden konnte. In den meisten Fällen war allerdings so wenig Peptid vorhanden, dass die Sequenz über Tandemmassenspektrometrie untersucht wurde. Durch Datenbankvergleiche wurde dann versucht, das peptidkodierende Gen zu identifizieren [5;42;109-111].

Eine weitere Strategie zur Identifizierung von Tumorepitopen besteht in der sogenannten „Reversen Immunologie“. Hierbei wird nicht von tumorreaktiven T-Zellen ausgegangen, mit deren Hilfe versucht wird, Antigene zu identifizieren. Es wird im Gegenteil von Kandidatenantigenen ausgegangen, von denen tumorspezifische Expression oder Überexpression bekannt ist. Durch Stimulation mit diesen Antigenen wird versucht, T-Zellen gegen sie zu generieren. Die genaue Spezifität der T-Zellen wird anschließend ermittelt. Zum Beispiel wurden MAGE-A1-reaktive T-Zellklone generiert, indem CD8⁺ T-Zellen gesunder Spender mit autologen antigenpräsentierenden Zellen stimuliert wurden, die mit antigenkodierenden viralen Konstrukten transduziert waren. Dabei wurden von Stimulation zu Stimulation andere virale Konstrukte, welche die Antigen-cDNA enthielten, verwendet, damit die Immunität gegen Virusepitope die gegen MAGE-A1 gerichteten Antworten nicht unterdrücken konnte. Anschließend wurde versucht, die T-zellerkannten Peptide zu identifizieren. Überlappende Peptide (aus jeweils 16 Aminosäuren) wurden auf antigenpräsentierende Zellen geladen und mit den T-Zellklonen auf Erkennung getestet. Erkannte Peptide wurden mit Hilfe der unter 2.2.13 aufgeführten Internetprogramme, die bei Peptiden aus neun und zehn Aminosäuren nach den sogenannten Ankeraminosäuren für die Peptidbindungsgrube des betrachteten HLA-Allels suchen, überprüft. Über diesen Ansatz wurde eine Reihe T-zellerkannter MAGE-A1-Peptide, präsentiert über verschiedene HLA-Moleküle, identifiziert [47].

Andere Arbeitsgruppen generierten T-Zellen gegen Peptide aus Kandidatenantigenen durch die Stimulation von PBL oder CD8⁺ T-Zellen mit den Peptiden selbst. Die Peptide wurden durch die oben erwähnten Programme aus den Kandidatenantigenen identifiziert. Um aus der großen Anzahl der an ein HLA-Molekül möglicherweise bindenden Peptide die Identifizierung der natürlich prozessierten Peptide zu erleichtern, versuchen die Programme zusätzlich zur Identifizierung der Ankeraminosäuren anhand weiterer Aminosäurereste die Bindungskapazität der Peptide an ein betrachtetes HLA-Molekül vorherzusagen. Im Falle des Epitopvorhersageprogramms *SYFPEITHI* der Universität Tübingen [112] stützt sich die Motivsuche auf Daten aus Sequenzierungen von natürlich prozessierten Peptiden, die von

HLA-Molekülen eluiert wurden. Außerdem werden publizierte Peptide berücksichtigt. Über ein Punktesystem werden alle Peptide eines Proteins danach beurteilt, ob sie Ankeraminoacids, Hilfsanker oder bevorzugte Reste für die Peptidbindungsgrube eines betrachteten HLA-Proteins aufweisen. Dabei bekommen optimale Ankeraminoacids 15 Punkte, ideale Anker 10 Punkte, alternative Anker 6–8 Punkte, Hilfsanker 4–6 Punkte und bevorzugte Reste an den übrigen Positionen 1–4 Punkte. Aminoacids mit möglicherweise negativen Eigenschaften bekommen 1–3 Punkte abgezogen. Gut bindende Peptide erreichen Werte um 30, schlecht bindende solche um 1. Mit Hilfe von *SYFPEITHI* können derzeit mit 80%-iger Zuverlässigkeit aus einer Aminoacidssequenz die an ein HLA-Molekül am besten bindenden Liganden bestimmt werden. Die natürlich prozessierten Peptide sollten unter den ersten 2 % aller möglichen Peptide eines Proteins zu finden sein. Beispielsweise sollte aus einem Protein mit 400 Aminoacidsresten, aus dem 392 Nonamere gebildet werden können, das korrekte Peptid unter den ersten 8 Kandidaten zu finden sein [112]. Das Programm der Bioinformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS) an den NIH (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; siehe 2.2.13) arbeitet ähnlich, benutzt allerdings ein anderes Punktesystem und bezieht die Dissoziationszeit der Peptide von den HLA-Molekülen mit ein. Grundlage dafür sind ebenfalls veröffentlichte Daten zu HLA-Liganden.

Durch die auf Peptidstimulation basierende Form der „Reversen Immunologie“ wurden verschiedene Peptide von bekannten Tumorantigenen entdeckt, die über unterschiedliche HLA-Moleküle präsentiert werden, wie z. B. von gp100 [113;114], MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3 [115-119], HER-2/neu [120], PRAME [45], Tyrosinase [121] oder Tyrosinase-related Protein 2 (TRP2 [122-124]). Allerdings ist die Methode kostspielig, da von teilweise über 100 synthetisierten Peptiden nur einzelne erkannt wurden [45]. Zudem gab es Berichte, dass durch die Methode *in vitro*-Artefakte generiert wurden. Zum Beispiel konnten Zaks und Rosenberg durch Impfung eines HER2/neu-Peptids bei Patienten mit HER2/neu- und HLA-A2-positivem Tumor zwar T-Zellen generieren, die peptidbeladene antigen-präsentierende Zellen erkannten. Jedoch wurden HLA-A2- und HER-2/neu-positive Tumorzellen von den T-Zellen nicht erkannt [125]. Grund dafür könnte eine zu geringe Affinität der generierten T-Zellen zu den HLA-Peptidkomplexen auf der Tumorzelle sein oder dass das verwendete HER2/neu-Peptid z. B. vom Proteasom der Tumorzellen nicht freigesetzt wurde [45;126]. Daher wird versucht, die Vorhersagegenauigkeit der Programme zu optimieren, indem putative Proteasomschnittstellen in betrachteten Proteinen in die Epitopvorhersagen einbezogen werden [127;128].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass tumorreaktive T-Zellen aus dem Blut der Melanompatentin MZ7 Peptide aus den melanosomalen Proteinen Tyrosinase und gp100 erkennen (Abb. 3.6 und 3.8). Das gp100/HLA-B7.2-Peptid und das Tyrosinase/HLA-A26.1-

Peptid wurden dadurch identifiziert, dass cDNA-Fragmente von gp100 bzw. Tyrosinase mit den entsprechenden HLA-cDNAs in COS-7-Zellen kotransfiziert und die Transfektanten anschließend auf die Erkennung durch T-Zellen überprüft wurden (Kap. 3.3 und 3.4). Aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz der kleinsten erkannten cDNA-Region wurden jeweils die Peptide mit den höchsten Werten für die Bindung synthetisiert. Peptidbeladene antigenpräsentierende Zellen wurden mit den Lymphozyten kokubiert und die Erkennung wiederum im IFN γ -ELISPOT-Assay überprüft (Abb. 3.10, 3.11 und Abb. 3.14). Selbst nach der Vorselektion der peptidkodierenden Regionen mussten 19 Peptide aus gp100 und 15 Peptide aus Tyrosinase getestet werden, um die von den T-Zellen optimal erkannten Peptide herauszufinden (Tab. 3.5, Abb. 3.11, 3.14, 3.15). Tyrosinase besteht aus 529 und gp100 aus 661 Aminosäuren (siehe Anhang 1 und 2). Nach Epitopvorhersage aus den vollständigen Proteinsequenzen hätten 35 bzw. 166 Peptide bis zur Identifizierung der hier vorgestellten Tyrosinase- bzw. gp100-Peptide synthetisiert und getestet werden müssen. Auch die Berücksichtigung der möglichen Proteasomschnittstellen hätte die Identifizierung der beiden Peptide nicht erleichtert. Programme wie z. B. *PAProC* (Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavage [127]) stützen sich auf experimentelle Daten, wonach Proteasomen die C-Termini von Peptiden, die über MHC-Moleküle präsentiert werden, generieren. Die N-Termini der Peptide werden anschließend von zytosolischen oder ER-ständigen Aminopeptidasen getrimmt [129;130]. *PAProC* bietet 3 verschiedene humane Proteasom-Wildtypvarianten zur Schnittstellenvorhersage an. Keine der Varianten hätte die Bildung der korrekten C-Termini der erkannten gp100- und Tyrosinase-Peptide vorausgesagt.

Die Anwendung der Reversen Immunologie für die Identifizierung der hier vorgestellten Tyrosinase- und gp100-Peptide wäre nicht nur aufgrund der Schwierigkeit, die Peptide vorherzusagen, problematisch gewesen. Unter den zahlreichen Peptiden aus den beiden Antigenen, welche die Epitopvorhersagen als besser bindend einstufen, hätten wahrscheinlich einige eine T-Zellantwort hervorrufen können. Eine Bedeutung dieser Peptide *in vivo* wäre allerdings zweifelhaft, da zumindest im vorliegenden Modell keine T-Zellantworten gegen andere Peptide oder peptidkodierende Regionen als die hier vorgestellten zu messen waren. Entweder werden andere Peptide nicht prozessiert und präsentiert oder es gab im Blut der Patientin keine T-Zellvorläufer, die durch andere Peptide stimuliert werden konnten.

Die identifizierten Tyrosinase- und gp100-Peptide werden nach der HLA-Bindungsvorhersage durch die erwähnten Programme nicht unter den besser bindenden Peptiden gelistet. Das wirft die Frage nach der Effizienz der Epitopvorhersage auf. Ein Grund für eine derzeit noch ineffiziente Epitop-Vorhersage für manche HLA-Moleküle liegt darin, dass weniger Daten für das „Training“ der Programme für „seltener“ HLA-Moleküle vorliegen. Die meisten Daten liegen für HLA-A2 vor, das einen Anteil von über 40 % in

kaukasischen Bevölkerungsgruppen erreicht. Allein HLA-A2.1 kommt in manchen kaukasischen Bevölkerungsgruppen mit einem Anteil von bis zu 29 % aller HLA-A-Proteine vor (Gjertson und Terasaki, 1998 und <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/mutation.htm>). Darum liegt ein Übergewicht der veröffentlichten Tumorepitope auf HLA-A2-bindenden Peptiden, gefolgt von Liganden für andere häufigere HLA-A-Moleküle wie HLA-A1 (bis zu 26 % kaukasischer Bevölkerungsgruppen), HLA-A3 (bis zu 25 % kaukasischer Bevölkerungsgruppen) und HLA-A24 (bis zu 19 % in Kaukasiern und über 70 % in asiatischen Bevölkerungsgruppen). Aus diesem Grund wurden wahrscheinlich durch „Reverse Immunologie“ bisher vorwiegend Epitope beschrieben, die über die genannten HLA-A-Moleküle präsentiert werden (siehe Beispiele oben). Da sich, wie erwähnt, die Bindungsvorhersagen u. a. auf veröffentlichte Epitope stützen, sind vielleicht deutlich mehr mögliche Aminosäuren an Ankerpositionen für die häufigen HLA-Proteine bekannt als für seltenere. Weiterhin wäre denkbar, dass verschiedene HLA-Moleküle unterschiedlich stringent in der Auswahl der Aminosäuren für Ankerpositionen und Hilfsanker sind. Für die hier vorgestellten Peptide SSPGCQPPA (gp100/HLA-B7.2), QCSGNFMGF (Tyrosinase/HLA-A26.1), TLDWLLQTPK (GPNMB^{G181D}/HLA-A3.1) und KIFSEVTLK (SIRT2^{P182L}/HLA-A3.1) weist die Epitopvorhersage die fettgedruckten Aminosäuren als Ankeramino-säuren aus. Dabei fällt auf, dass SYFPEITHI für das Tyrosinasepeptid keine Ankeramino-säuren bestimmt. Es gibt aber für HLA-A26.1 bekannte Anker-motive, darunter Phenylalanin (F) an Position 9. (Zum Vergleich für alle besprochenen HLA-Moleküle siehe <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>, „find your motif“ und „epitope prediction“). Insgesamt sind aber wenige Liganden für HLA-A26.1 in der SYFPEITHI-Datenbank. Gleiches gilt überraschender Weise auch für HLA-A3.1. Alle bekannten HLA-A3-bindenden Liganden haben Leucin (L) oder Isoleucin (I) an Position 2 und Lysin (K) als carboxyterminale Aminosäure. Dennoch werden, vielleicht aufgrund der wenigen veröffentlichten Peptide, keine Motive festgelegt. Die vorgestellten Peptide aus SIRT2^{P182L} und GPNMB^{G181D} weisen Homologien an den Positionen 2 (I oder L) und 9 bzw. 10 (K) zu den bekannten Liganden auf.

Das T-zellerkannte gp100/HLA-B7.2-Peptid war durch die Epitopvorhersage am schwierigsten zu ermitteln. Anker-motive für HLA-B7.2-Liganden sind Prolin (P) an Position 2 und Leucin an Position 9. Bei der Hälfte der in der SYFPEITHI -Datenbank veröffentlichten Liganden für HLA-B7.2 sind aber nicht beide Kriterien erfüllt, sondern sie haben entweder ein P an Position 2 oder L an Position 9. Das hier vorgestellte gp100-Peptid (SSPGCQPPA) erfüllt keines der beiden Ankerkriterien. Eventuell könnte auch dieses Peptid dazu beitragen, dass die Definitionen der Anker-motive für HLA-B7.2 erweitert werden. Es sollte jedoch bedacht werden, dass die hier vorgestellten Peptide ausgewählt wurden, weil sie von den entsprechenden T-Zellen mit der höchsten Reaktivität erkannt wurden. Auch die anderen

veröffentlichten Peptide sind in der Regel optimale Peptide für die Erkennung durch die jeweiligen T-Zellen. Optimal erkannte Peptide müssen aber nicht unbedingt die natürlich präsentierten sein. Es wäre möglich, dass das zunächst entdeckte gp100-Peptid SPGCQPPAQ (Tab. 3.5) den natürlichen Liganden für HLA-B7.2 darstellt und die T-Zellen durch dieses Peptid auf dem Tumor stimuliert wurden. Das Peptid wird von den T-Zellen allerdings deutlich schlechter erkannt als das Peptid SSPGCQPPA (Abb. 3.11). Außerdem wurden autologe EBV-B-Zellen, die mit SPGCQPPAQ beladen wurden, im Gegensatz zu SSPGCQPPA, erst bei sehr hohen Peptidkonzentrationen (100 μ M) so gut erkannt wie die Melanomzellen (Tab. 3.5). Letztendlich kann die Frage nach dem natürlichen Liganden nur auf biochemischem Wege geklärt werden.

Die Identifizierung und Veröffentlichung weiterer Liganden sollte die Vorhersage möglicher T-Zellepitope auch für seltenere HLA-Proteine verbessern. Eine effizientere Epitopvorhersage und eine damit effektivere „Reverse Immunologie“ sollte ermöglichen, dass mehr Patienten auf ihr individuelles Antigenespektrum bezüglich der T-Zellepitope aus zum Beispiel Differenzierungsantigenen oder „Cancer/Testis“-Antigenen untersucht werden können.

Eine weitere Methode zur Identifizierung von Tumorepitopen stellt die Mimotop-Methode dar, die ebenfalls auf der Testung synthetischer Peptidbibliotheken beruht [43;44]. Kombinatorische Peptidbibliotheken werden hergestellt, auf antigenpräsentierende Zellen geladen und mit tumorspezifischen T-Zellklonen getestet. Für die Suche nach einem T-zellerkannten Mimotop aus neun Aminosäuren werden z. B. 171 (9 x 19, alle proteinogenen Aminosäuren außer Cystein) kombinatorische Peptidbibliotheken synthetisiert. In jeder Bibliothek steht eine Aminosäure an einer Position fest, alle anderen Positionen werden frei kombiniert. Durch die Testung mit einem T-Zellklon findet man so für jede Position im Nonamer eine oder mehrere für die T-Zelle relevante Aminosäure(n). Danach werden Kandidatenpeptide synthetisiert und die Erkennung durch die T-Zelle überprüft. Die Methode besteht nach Linnemann et. al. dadurch, dass für die Identifizierung eines Peptides weder Tumormaterial verbraucht werden muss, noch muss ein Tumorantigen oder die MHC-Restriktion des T-Zellklones bekannt sein [43]. Außerdem braucht der T-Zellklon nicht langlebig zu sein, da nur zwei T-Zelltests für die Auffindung des Peptids benötigt werden. Darüber hinaus kommt es vor, dass Mimotope effektivere T-Zellstimulatoren sind als die entsprechenden natürlichen Peptide. Ein Grund dafür könnte sein, dass andere Aminosäuren bessere Anker für ein HLA-Molekül sind als die des natürlichen Liganden. Andererseits kann aber genau dieser Mechanismus die Identifizierung der natürlichen Peptide durch die T-Zellen verhindern.

Zwei der in dieser Arbeit vorgestellten Peptide hätten wahrscheinlich durch die Mimotopmethode nicht identifiziert werden können. Sowohl das gp100-Peptid

(SSPGCQPPA) als auch das aus Tyrosinase (QCSGNFMGF) enthalten je einen Cysteinrest. Diese Aminosäure wird in den kombinatorischen Peptidbibliotheken nicht verwendet, weil es an Cysteinresten in Peptiden zu spontanen Modifikationen der Sulfhydrylgruppe kommen kann [121]. Cystein bildet Derivate mit Sulfhydrylgruppen anderer Biomoleküle, die von Cysteinen anderer Peptide oder z. B. von Glutathion (aus dem serumhaltigen Kulturmedium) stammen können. Eventuell sind aber die Cysteine für die Erkennung der Peptide durch die T-Zellen essentiell. Berichte, nach denen Cystein-Modifikationen in Peptiden für die T-Zellerkennung ausschlaggebend sind, unterstützen diese Vermutung [109;121;131].

Weiterhin ist die Mimotopmethode dadurch limitiert, dass keine Mimotop-Bibliotheken mit längeren Peptiden als Nonameren möglich sind [43]. Zwar kommt es häufig vor, dass ein Nonamer und ein überlappendes Dekamer vom selben T-Zellklon erkannt werden können (zum Beispiel im Falle des in dieser Arbeit vorgestellten gp100-Peptids). Manchmal wird aber ausschließlich ein Dekamer (z. B. von GPNMB^{G181D}, Abb.3.20) oder ein noch längeres Peptide erkannt [132]. Schließlich hängt diese Methode von der Etablierung von T-Zellklonen ab. Oligo- oder polyklonale MLTCs sind für die Durchmusterung der kombinatorischen Peptidbibliotheken nicht geeignet, weil die Degeneration der Antigenerkennung durch die T-Zellrezeptoren die Auffindung einzelner Aminosäuren an einzelnen Positionen behindern würde [133].

Vor kurzem wurde eine neue Methode zur Identifizierung T-zellerkannter Tumorantigene als Alternative zur cDNA-Expressionsklonierung vorgestellt [134]. Sie beruht auf der Konstruktion einer Tumor-cDNA-Bank in einem Vacciniavektor und der anschließenden Infektion autologer antigenpräsentierender Zellen mit der cDNA-Bank. Die Selektion antigenpräsentierender Zellen erfolgt durch zytotoxische T-Lymphozyten, die antigentragende Zellen lysieren und damit das Virus mit dem gesuchten Gen in den Überstand entlassen. Der Überstand wird abgeschöpft und für weitere Selektionsrunden mit neuen antigenpräsentierenden Zellen verwendet. Nach mehreren Selektionsrunden mit der gleichen T-Zellpopulation bleiben wenige Virus-Klone übrig, die für das Antigen kodieren. Auf diese Weise konnte in einem Mausmodell ein Tumorantigen identifiziert werden. Dabei handelte es sich um ein Autoantigen, das im Tumor überexprimiert wurde [134]. Die Vorteile dieser Methode liegen darin, dass eine virale Infektion antigenpräsentierender Zellen deutlich effizienter ist als die Transfektion der Zellen mit Expressionsvektoren. Außerdem kann eine Tumor-cDNA-Bank in Vacciniavektoren für verschiedene antigenpräsentierende Zellen verwendet werden. Daneben braucht für die Methode die MHC Klasse I Restriktion der T-Zellen nicht bekannt zu sein und die MHC-Moleküle müssen nicht kloniert vorliegen, da patienteneigene antigenpräsentierende Zellen verwendet werden können. Ein weiterer Vorteil besteht in der direkten Selektion positiver Klone, so dass im Vergleich zum arbeitsaufwendigen „Screening“ von cDNA-Banken durch Expressionsklonierung nicht

unzählige negative cDNA-Pools und –Klone getestet werden müssen. Schließlich erlaubt die Methode grundsätzlich den Einsatz nicht-klonaler T-Zellpopulationen, welche das aufwendige Verfahren der T-Zellklonierung überflüssig machen. Allerdings müssen die T-Zellen zytotoxisch sein, damit die Methode funktionieren kann.

Im beschriebenen Beispiel wurde mit dieser Methode innerhalb weniger Selektionsrunden ein Autoantigen identifiziert. Die für die Selektion benutzten T-Zelllinien wurden *in vivo* generiert, indem Mäuse mit Tumorzellen geimpft wurden, die durch *in vitro*-Mutagenese hergestellt worden waren. Die Ausgangszelllinie ist im Gegensatz zur erzeugten Tumorzelllinie nicht immunogen. Trotzdem scheinen die generierten T-Zelllinien fast ausschließlich gegen das gefundene Antigen gerichtet zu sein, da nach nur vier Selektionsrunden zehn Klone isoliert wurden, die alle für das gleiche immunogene Protein kodierten. Das Antigen kann aber wahrscheinlich kein immundominantes Antigen sein, weil es ein Autoantigen ist, das auch im Thymus und in der Fibroblastenzelllinie, aus der die Tumorzellen hervorgegangen sind, exprimiert wird. Die T-Zellen müssen folglich der intrathymischen Negativselektion entgangen sein und sollten damit von niedriger Affinität zu ihrem Antigen sein [135]. Dies wird durch den Befund unterstützt, dass bei den Selektionsversuchen keine „Bystander-Lyse“ durch die T-Zellen auftrat [136;137]. Die antigenunabhängige Lyse von antigenpräsentierenden Zellen durch in der Nachbarschaft antigenabhängig stimulierte, höher averse T-Zellen hätte die Identifizierung des Antigens erschweren können. Daraus ergibt sich der Verdacht, dass die Effektivität der Methode auf der besonderen Natur des Antigens und der T-Zellantwort dagegen innerhalb dieses Systems beruhen könnte.

4.2 Die Verwendung nichtklonaler T-Zellpopulationen für die Suche nach Tumorantigenen

Eine Schwierigkeit an der Suche nach T-zellerkannten Tumorantigenen durch cDNA-Expressionsklonierung war immer die Notwendigkeit der Klonierung tumorreaktiver T-Zellpopulationen. T-Zellklonierungen sind zeit-, arbeits- und materialaufwendig sowie häufig nicht erfolgreich. Der Erfolg der Klonierung unterliegt dem Zufall wobei prinzipiell eine Selektion zugunsten von T-Zellklonen stattfindet, die den Klonierungsprozess überstehen und in permanenter Kultur etabliert werden können, vielleicht weil sie besonders stabil sind oder besser als andere Klone auf die Kulturbedingungen (z. B. auf IL-2 im Kulturmedium) reagieren. Das bedeutet aber nicht, dass sie *in vivo* wichtig für eine eventuelle Tumorabstoßung sind. Durch die Erfordernis der fortlaufenden Kultivierung der T-Zellklone,

z. B. bei der Durchführung eines „Screenings“, kommt es zu methodischer Inkonstanz. Diese resultiert insbesondere aus dem schwankenden Proliferationsverhalten, welches das Wachstum der meisten T-Zellklone kennzeichnet.

Mit Hilfe von T-Zellklonen wurden bei Melanompatienten auffallend oft Epitope aus Differenzierungsantigenen oder sogenannten „Cancer/Testis“-Antigenen¹ gefunden (zur Einteilung der Melanomantigene siehe Einleitung, zum Vergleich siehe Peptid-Datenbank des LICR: <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>). Arbeiten mit Peptid-MHC-Tetrameren zeigten, dass verschiedene T-Zellklone gegen bestimmte dieser Antigene in einem Patienten vorlagen. Diese T-Zellen hatten verschiedene Aviditäten¹ und das Expansionspotential einzelner Klone variierte stark [138-140]. Zusätzlich deuten Befunde mit peptidstimulierten T-Zellen darauf hin, dass bei wiederholter Stimulation eher die hoch aviden T-Zellen verloren gehen als die niedrig aviden [141;142].

T-Zellen gegen Differenzierungsantigene, die Autoantigene sind, werden oft als niedrig- bis mediumavide eingestuft, da sie der thymischen Negativselektion entkommen sein müssen [30]. Hochavide T-Zellen gegen Autopeptide werden im Thymus deletiert [135]. Eventuell sind niedriger avide T-Zellen leichter klonierbar und in Langzeitkultur etablierbar als hochavide, so dass deshalb oftmals T-Zellen gegen Differenzierungsantigene oder solche gegen andere Antigene, aber mit ähnlicher Avidität, kloniert werden konnten.

Daher war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit für die Klonierung von Tumorantigenen durch cDNA-Expressionsklonierung kurzzeitstimulierte nichtklonale T-Zellpopulationen einzusetzen. Eventuell bestand dadurch die Möglichkeit, eine größere Vielfalt von Antigenen zu entdecken als mit langlebigen T-Zellklonen. Voraussetzung dafür war einerseits, dass innerhalb weniger Stimulationen von T-Zellen aus peripherem Blut sich tumorreaktive T-Zellen soweit durchsetzen mussten, dass die Reaktivität messbar war. Zum anderen war ein „read-out“ erforderlich, der spezifisch nur die Reaktivität dieser T-Zellen bei Antigenkontakt anzeigen konnte.

¹Avidität ist ein Ausdruck für die Erkennung von Zielzellen durch T-Zellen und stammt ursprünglich aus Hypothesen zur thymischen Selektion der T-Zellen (Janeway C. A. et. Al., Immunobiology, 5. Auflage, Churchill Livingstone-Verlag, Edinburgh). Die Avidität einer T-Zelle ist ein Maß für das Resultat aus der MHC/Peptidbindung durch den T-Zellrezeptor. Die Stärke des durch den T-Zellrezeptor vermittelten Signals und damit der Reaktivität der T-Zelle hängt dabei von der Affinität des T-Zellrezeptors für den MHC/Peptidkomplex und der Dichte gleicher Komplexe auf der Zielzelle ab. Avidität wird durch Peptidtitration in vitro ermittelt. Die Peptidkonzentration, bei der 50% der Zielzellen lysiert werden, wenn die T-Zellen in einem bestimmten Überschuss gegenüber den Zielzellen vorliegen, bestimmt die Avidität. Hochavide T-Zellen benötigen dazu Peptidkonzentrationen im picomolaren bis in den einstelligen nanomolaren Bereich hinein [143].

Aufgrund seiner hohen Sensitivität erschien der Zytokin-ELISPOT-Assay dafür geeignet zu sein. ELISPOT-Assays wurden bisher hauptsächlich für Frequenzanalysen antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut z. B. geimpfter Patienten genutzt, um die Immunantwort überprüfen zu können [93;98;144;145]. Die Sensitivität des Assays beruht darauf, dass freigesetztes Zytokin in unmittelbarer Umgebung der reagierenden T-Zelle abgefangen und danach sichtbar gemacht wird.

T-Zellklone können bei Antigenkontakt verschiedene Effektormechanismen ausführen (siehe Abb. 3.1). Als die wichtigsten antiviralen und antitumoralen Antworten werden allerdings die IFN γ - und Perforin/„Granzyme B“-Freisetzung angesehen [146-149]. IFN γ und Perforin können unabhängig voneinander oder in Zusammenarbeit Tumorwachstum oder Infektionen kontrollieren [150;151]. Die beiden Effektormechanismen werden allerdings unterschiedlich reguliert [152;153]. Bei Antigenkontakt wird IFN γ sehr schnell exprimiert und sezerniert. Nach Verschwinden des Antigens nimmt die IFN γ -Expression ab, die instabile RNA wird degradiert und dadurch die IFN γ -Freisetzung gestoppt. Perforin wird ebenfalls antigenabhängig exprimiert, wird aber auch nach Abbruch des Antigenkontaktes von den T-Zellen weiterhin gebildet und intrazellulär gelagert. Daraus resultiert, dass zytotoxische T-Zellen auch Tage nach einem Antigenkontakt noch lytisch sein können ohne dass sie IFN γ freisetzen vermögen [154]. Während derzeit für Perforin noch kein ELISPOT-Assay zur Verfügung steht, konnten IFN γ und „Granzyme B“ (GrB; der Assay wurde in der in dieser Arbeit angewendeten Form von J. Alt etabliert) an verschiedenen tumorreaktiven T-Zellklonen aus dem Modell MZ7 im ELISPOT-Assay getestet werden (siehe Tabelle 3.1). Fast alle Klone setzten antigenspezifisch IFN γ und GrB frei. Allerdings schienen auch diese beiden Zytokine unterschiedlich reguliert zu werden. Sowohl bei T-Zellklonen als auch bei nichtklonalen Lymphozytenpopulationen gab es für die antigenspezifische IFN γ -Freisetzung ein engeres Zeitfenster, in dem die T-Zellen in einen ELISPOT-Assay eingesetzt werden konnten, als für GrB. Nach einer Aktivierung der T-Zellen durch die Stimulation mit dem Tumor waren sie nach vier bis fünf Tagen in der Lage, maximal und spezifisch mit einer IFN γ -Antwort auf die erneute Präsentation ihres Antigens zu reagieren (Abb. 3.2). Danach nahm diese Reaktivität ab, obwohl die Zellen weiterhin proliferierten. GrB konnte dagegen auch mehrere Tage später noch bei Antigenkontakt freigesetzt werden, wahrscheinlich weil es wie Perforin länger exprimiert und schließlich zusammen mit Perforin in Granula gelagert wird [27]. Vielleicht ist dadurch auch der höhere Hintergrund in einigen GrB-ELISPOT-Assays mit T-Zellklonen zu erklären. Einige Klone setzten spontan viel GrB frei (Tab. 3.1), was evtl. noch eine Folge der vier Tage zuvor erfolgten Stimulation mit den Tumorzellen war. Aufgrund der stringenteren Regulation der IFN γ -Freisetzung war der IFN γ -ELISPOT-Assay

die geeignete Methode für die Messung der Reaktivität antigenspezifischer Subpopulationen in nichtklonalen MLTCs.

Wie die Versuche mit verschiedenen MLTCs gegen bekannte Tumorantigene zeigten, können sich die Spezifitäten in einer T-Zellpopulation innerhalb weniger Stimulationen ändern (Abb. 3.8). Das birgt die Gefahr, dass nach Entdeckung eines Tumorantigens mit T-Zellen einer laufenden Kultur die Antwort gegen das Antigen nach wenigen Stimulationen verschwindet. Danach könnte die Identifizierung des erkannten Peptides gefährdet sein. In klonalen T-Zellpopulationen wechselt natürlich die Spezifität nicht, jedoch wurde oft beobachtet, dass die T-Zellen von Woche zu Woche unterschiedlich stark reagierten (Daten nicht gezeigt). Ein noch größeres Problem war die Inkonstanz im Wachstumsverhalten. Darum wurde versucht, stabil reagierende T-Zellpopulationen zu generieren. Die T-Zellen wurden antigenabhängig stark expandiert und drei bis vier Tage nach einer abschließenden Restimulation mit Tumorzellen in Portionen eingefroren. Dabei wurde offensichtlich der Aktivierungszustand der T-Zellen konserviert, denn nach Auftauen und einer zweitägigen Kultur in IL-2-haltigem Medium, in Abwesenheit von Tumorzellen, reagierten die T-Zellen heftig und spezifisch auf ihr Antigen (Abb. 3.4 und 3.5). Mit solchermaßen kryokonservierten T-Zellklonen gelang es, das über HLA-B7.2 präsentierte gp100-Peptid zu identifizieren (Kap. 3.3.1). Mit Hilfe der MLTC 18, eingefroren am vierten Tag nach der Restimulation an Tag 28 der Kultur (Tag 28+4), wurde das neue Melanomantigen GPNMB^{G181D} entdeckt und das erkannte Peptid charakterisiert (Kap. 3.5). Weiterhin wurde mit der gleichen MLTC ein neues, über HLA-A26.1 präsentierte Tyrosinaseepitop beschrieben (Kap. 3.4). Da zu dem Zeitpunkt bereits bekannt war, dass die Reaktivität gegen Tyrosinase im Verlauf der Kultur anstieg, wurde ein Teil der früh eingefrorenen Population wieder aufgetaut und bis Tag 46 nach der primären Stimulation wöchentlich restimuliert. Die danach an Tag 3 eingefrorene Effektorpopulation wurde für die Charakterisierung des Tyrosinasepeptids verwendet. Unter den in früheren Jahren etablierten T-Zellklonen wurde keiner entdeckt, der das Tyrosinasepeptid über HLA-A26.1 erkannte.

4.3 Tyrosinase und gp100 als Zielantigene für therapeutische Immunisierungen gegen Melanome

Melanosomale Differenzierungsantigene wie z. B. Melan-A/MART-1, gp100 und Tyrosinase werden in humanen Melanomen häufig exprimiert [155]. Ihre Expression bleibt im Verlaufe der Erkrankung lange Zeit stabil, zumindest zeigten dies immunhistochemische Untersuchungen an Primärläsionen und Metastasen einzelner Patienten [156]. Klinisch tauchen allerdings bei fortgeschrittener Erkrankung vermehrt amelanotische Metastasen auf, die den Ausfall derjenigen Differenzierungsgene anzeigen, die an der Melaninssynthese beteiligt sind, wie z. B. Tyrosinase (pers. Mitteilung Prof. T. Wölfel). In vielen Melanompatienten werden Autoantikörper und/oder autoreaktive T-Zellen gegen Differenzierungsantigene gefunden. Insgesamt stellen die Differenzierungsantigene neben „Cancer/Testis“-Antigenen derzeit die größte Gruppe der Melanomantigene dar [30]. Dazu kommt, dass T-Zellen mit einer Spezifität für Differenzierungsantigene aus Tumorpatienten im Gegensatz zu denen aus gesunden Spendern deutliche Merkmale von Effektorzellen (genauer: „Effector/Memory“-Zellen; siehe Einleitung) zeigen [31]. Die gegen melanosomale Antigene gerichteten T-Zellen gesunder Kontrollpersonen ähneln phänotypisch dagegen eher naiven T-Zellen. Auch das spricht für aktive Immunantworten gegen Differenzierungsantigene in Melanompatienten. Daher wären gp100 und Tyrosinase geeignete Zielantigene für die Immuntherapie bei Melanompatienten. Erste Impfstudien mit T-zellerkannten Peptiden verschiedener Differenzierungsantigene zeigten, dass bei einigen Patienten klinische Antworten auftraten [50;157]. Allerdings konnten diese Antworten nicht direkt mit T-Zellantworten gegen die geimpften Antigene korreliert werden [158]. Als Beleg für die Wirksamkeit von T-Zellantworten gegen Melanozyten-Differenzierungsantigene wird das Auftreten einer Vitiligo, eine regionalen Depigmentierung der Haut, die bei Melanompatienten spontan oder nach Chemoimmuntherapie auftreten kann [159], gewertet. Die Beobachtung einer Vitiligo im Verlauf der Erkrankung oder nach Immuntherapie wird allgemein mit einer besseren Prognose für den betroffenen Patienten verbunden [30]. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass Immunisierungen mit Differenzierungsantigenen Tumormunität bewirken können, die häufig mit dem Auftreten einer Vitiligo verbunden war [160-163]. In Einzelfällen wurde aber auch Tumorprotektion ohne Vitiligo berichtet [164]. Hauptsächlich T-Zellantworten waren für auftretende Gewebedestruktionen verantwortlich. Im Menschen konnten zytotoxische T-Zellen gegen Melan-A/MART-1, Tyrosinase und gp100 in hoher Frequenz und mit hoher Avidität in Vitiligopatienten nachgewiesen werden [165]. P. D. Greenberg und Mitarbeiter berichteten von einem Fall, in dem von einer Patientin mit fortgeschrittener Melanomerkkrankung Melan-A/MART-1-reaktive T-Tellklone *in vitro*

expandiert und ihr danach reinfundiert wurden [166]. Die transferierten T-Zellen infiltrierten sowohl Tumorgewebe als auch Melanozyten enthaltendes Gewebe. Inflammatorische Hautreaktionen und eine Entzündung der vorderen Augenkammern als Ausdruck der Autoaggression gegen Melanozyten waren die Folge. Diese Erscheinungen waren selbstlimitierend, bedurften keiner spezifischen Therapie und traten bei nachfolgenden CTL-Transfusionen nicht mehr auf. Diese Befunde zeigen jedoch, dass es durch den adoptiven Transfer Melan-A/MART-1-reaktiver T-Zellen zur Induktion von Autoimmunreaktionen aufgrund konsequenter Durchbrechung oder Umgehung protektiver Toleranz kommen kann. Die Tumorerkrankung konnte während der Therapiephase stabilisiert werden. Re-Biopsien nach CTL-Transfer zeigten allerdings den Verlust der Antigenexpression in Tumorzellen, die damit als resistent gegenüber Melan-A/MART-1-reaktiven CTL anzusehen waren.

Im Melanommodell MZ7 wurden in dieser Arbeit zwei neue Peptidepitope von Differenzierungsantigenen identifiziert. Ein gp100-Peptid wird über HLA-B7.2 und ein Tyrosinasepeptid über HLA-A26.1 präsentiert. Bisher wurden gp100-Peptide beschrieben, die über HLA-A2 [58;131], HLA-A3 [114;167] und HLA-Cw8 [96] präsentiert werden. Bekannte Tyrosinasepeptide werden über HLA-A2 [55;168], HLA-A1 [131], HLA-A24 [169], HLA-B35 [170] und HLA-B44 [171] präsentiert und von T-Zellen erkannt. Es ist aus mehreren Gründen wichtig, weitere solcher Epitope zu identifizieren. Tumorzellen können spontan Antigene oder MHC-Moleküle verlieren [172]. Zumindest der Verlust einzelner HLA-Allele kann durch das Vorhandensein einer anders restringierten Antwort gegen das gleiche Differenzierungsantigen kompensiert werden. Außerdem ist nicht bekannt, welche von verschiedenen möglichen Antworten *in vivo* wichtig ist. Derzeit sind zwei über HLA-A3 präsentierte T-Zellepitope für z. B. gp100 beschrieben. Da das Melanom MZ7 gp100- und HLA-A3.1-positiv ist, wäre die Patientin MZ7 eine Kandidatin für eine Peptidvakzinierung mit diesen gp100-Peptiden gewesen. Eventuell hätte aber diese Art der Vakzinierung überhaupt keinen Sinn gehabt, weil keine bestehende Antwort restimuliert und damit verstärkt hätte werden können. Zumindest konnte in keiner MLTC zu keinem Zeitpunkt eine HLA-A3-restringierte T-Zellantwort gegen transfiziertes gp100 entdeckt werden (Kap. 3.6, Abb. 3.8). Ob durch eine Peptidvakzinierung neue T-Zellantworten aus naiven T-Zellen generiert werden können, ist fraglich.

HLA-B7 ist unter den HLA-B-Molekülen eines der häufigeren in kaukasischen Bevölkerungsgruppen (17 %). *HLA-B*07021* ist das häufigste Suballel mit einem Anteil von bis zu 13 % der HLA-B-Proteine unter Kaukasiern (nach Gjertson & Terasaki, 1998). Das zweite Differenzierungsantigen, das in der vorgestellten Arbeit identifiziert wurde, ist Tyrosinase/HLA-A26.1. HLA-A26 ist in bis zu 17 % kaukasischer Bevölkerungsgruppen, bis zu 22 % in der Population Japans und 14 % in afrikanischen Populationen vertreten [173]. Die Kenntnis zusätzlicher Antigene führt dazu, dass mehr Patienten in Vakzinierungsstudien

eingeschleust werden können und dass das zugehörige immunologische Monitoring mit größerer Genauigkeit und Aussagekraft durchgeführt werden kann.

4.4 Tumorspezifische Antigene für Immuntherapien

Wie im Kapitel zuvor bereits angedeutet, verlieren Tumore im Verlauf der Progression Antigene und entgehen so der Überwachung durch das Immunsystem [174]. Mechanismen sind einerseits der Verlust der Expression von MHC-Klasse I-Molekülen, der einzelne Allele, einen Haplotyp oder den gesamten MHC betreffen kann [175]. Andererseits können auch Tumorantigene selbst, wie z. B. Differenzierungsantigene, verloren gehen [175;176]. Tumorspezifische Antigene könnten in solchen Fällen wichtige Zielantigene für Immuntherapien sein [172]. Zu den tumorspezifischen Antigenen gehören einerseits individualspezifische Tumorantigene, also solche, die ausschließlich in dem individuellen Tumor eines Patienten exprimiert werden, in dem sie gefunden wurden, wie z. B. mutiertes *CASP-8* [68], mutiertes *HSP70-2* [94] oder mutiertes *HLA-A2* (Genprodukt *HLA-A2-R170I* [177]). Andererseits gibt es auch tumorspezifische Antigene, die in verschiedenen Tumoren eines histologischen Ursprungs (z. B. *TRP2/INT2* in Melanomen aber nicht in Melanozyten [178]) oder in Tumoren verschiedener Histologien vorkommen, nicht aber in Normalgeweben [97]. Einige sehen auch „Cancer/Testis“-Antigene als tumorspezifisch an.

Tumorspezifische Antigene entstehen häufig durch genetische Alterationen und die untypische Expression von Genen [30]. Es entstehen sogenannte Neoepitope, die in einigen Fällen von T-Zellen erkannt werden. Beschrieben sind Neoepitope, die durch Punktmutationen [65;68;94;177;179], aus alternativen Leserahmen [132;180], aus Transkripten mit kryptischen Translationsstarts [181-183], aus Transkripten von Pseudogenen [184] und von Antisense-Transkripten generiert wurden [185]. Viele dieser Antigene sollten ähnlich wie virale Antigene vom Immunsystem als „nicht-selbst“ angesehen werden. Daher dürfte keine Toleranz dagegen bestehen und sie müssten effektive Immunantworten provozieren [179]. Einige tumorspezifische Antigene sind darüber hinaus an der Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps der Tumorzellen oder der Tumorprogression beteiligt, so dass die Wahrscheinlichkeit für den Verlust des Antigens gering ist (z. B. [65], [68]).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues, über HLA-A3.1 präsentiertes Antigen beschrieben: *GPNMB*^{G181D} (Vgl. Kap. 3.5). Eine Punktmutation (Transition G zu A an Pos. 542 des ORF) an der Grenze von Exon 4 zu Intron 4 verändert eine typische Donor-Spleißstelle (Abb. 3.18 A). Dadurch wird wahrscheinlich das Intron 4 nicht aus der prä-mRNA

entfernt und aus dieser Spleißvariante (*GNMB^{mutiert}*) entsteht ein Protein, das am 3'-Ende 25 durch die Intronsequenz kodierte Aminosäuren enthält (siehe Anhang 3). Aus der Region der ausgetauschten Aminosäure (G181D) wurde ein Peptid aus zehn Aminosäuren (TLDWLLQTPK) von tumorreaktiven T-Zellen erkannt (die ausgetauschte Aminosäure ist fettgedruckt). Das entsprechende Wildtyppeptid TL**G**WLLQTPK wurde nicht erkannt (Abb. 3.20). Als nächstes war zu klären, ob auch in anderen Tumoren die Mutation nachweisbar ist und damit *GNMB^{G181D}* ein häufig exprimiertes, tumorspezifisches Antigen oder ein individualspezifisches Tumorantigen ist. RT-PCR-Analysen mit spezifischen Primern für die Spleißvariante wurden auf Gesamt-RNA einer Reihe von Tumoren durchgeführt (Kap. 3.5.4). Da die Mutation eine BstXI-Restriktionsschnittstelle zerstört, konnte *GNMB^{mutiert}*-cDNA leicht durch einen Restriktionsverdau erkannt werden. Eine *GNMB*-Spleißvariante wurde in 86 % der Melanome (darunter Melanomzelllinien und Nativmaterial; Abb. 3.23) und 30 % der Nierenzellkarzinome nachgewiesen (Kap. 3.5.4). Die Mutation wurde darunter allerdings nicht entdeckt, da die PCR-Produkte mit BstXI restringiert wurden. Nur beim Verdau des RT-PCR-Produktes aus RNA der MZ7-Melanomzelllinie blieb ein Teil unverdaut (Daten nicht gezeigt). Meistens war neben der Expression der Spleißvarianten auch die Expression der vollständig gespleißten *GNMB*-cDNA nachzuweisen. *GNMB*-Expression konnte nicht in verschiedenen untersuchten EBV-B-Zelllinien und Pankreaskarzinomzelllinien nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das deutete darauf hin, dass das Genprodukt von *GNMB^{mutiert}* (*GNMB^{G181D}*) ein individualspezifisches Tumorantigen ist.

Die RT-PCR-Analysen zeigten das Vorkommen einer nichtmutierten *GNMB*-Spleißvariante mit dem Intron 4, *GNMB/INT4*, an. Dies war zuvor bereits durch die Sequenzierung des RT-PCR-Produktes aus RNA der MZ7-Melanomzelllinie und durch den teilweisen Verdau des PCR-Produktes mit BstXI gezeigt worden. Das Melanom ist heterozygot für *GNMB*-Spleißvarianten, exprimiert also sowohl *GNMB/INT4* als auch *GNMB^{mutiert}* (Abb. 3.18 B) und die Punktmutation ist eine somatische Mutation im Melanom, da sie in genomischer DNA der autologen EBV-B-Zellen nicht vorkommt (Vergleich Abb. 3.18 C, D). Die MZ7-Melanomzelllinie, die Mehrheit der getesteten Melanome und ca. ein Drittel der überprüften Nierenzellkarzinomzelllinien exprimierten demnach die „normale“ Spleißvariante *GNMB/INT4*. Nun war zu überprüfen, ob neben *GNMB^{mutiert}* auch *GNMB/INT4* ein tumorspezifisches Antigen sein kann, indem aus den 25 durch das Intron 4 kodierten Aminosäuren weitere T-zellerkannte Peptide generiert werden. Ein *GNMB/INT4*-cDNA-Klon wurde aus MZ7-Melanomzellen kloniert, zusammen mit *HLA-A*03011* in COS-7-Zellen transfiziert und auf Erkennung durch die T-Zellen getestet. *GNMB/INT4* wurde im Gegensatz zu *GNMB^{mutiert}* nicht erkannt (Abb. 3.19). Auch mit Transfektanten, die mit *GNMB/INT4* und den vier weiteren HLA-Klasse I-Allelen aus dem Modell (*HLA-A*2601*, *HLA-B*07021*, *HLA-B*3801* und *HLA-Cw*1203*) kotransfiziert wurden, zeigten die getesteten

MLTCs keine Erkennung (Daten nicht gezeigt). Eventuell war die fehlende Erkennung dadurch zu erklären, dass *GNMB* nicht nur in Tumorzellen alternativ gespleißt wird, sondern auch in einem oder mehreren Normalgeweben, so dass immunologische Toleranz gegen Peptide, die von *GNMB/INT4* kodiert werden, besteht. Andererseits war es denkbar, dass eventuell immunogene Peptide, die aus dem Intron 4-Anteil von *GNMB/INT4* und *GNMB^{mutiert}* kodiert werden, im vorliegenden Modell eine untergeordnete Rolle spielen, weil T-Zellantworten dagegen durch dominierende Antworten gegen andere Epitope unterdrückt werden (siehe unten). Darüber hinaus wäre möglich, dass aus den 25 Aminosäuren, die durch das Intron kodiert werden, keine Peptide prozessiert werden, die an eines der HLA-Moleküle aus dem Modell binden können oder dass gegen prozessierte und präsentierte Peptide im Blut der Patientin MZ7 keine T-Zellen vorhanden waren. Dadurch war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich zu überprüfen, ob *GNMB/INT4* immunogen ist und es sich damit bei der Spleißvariante um ein verbreitetes tumorspezifisches Antigen handeln könnte.

SAGE- und EST-Daten, die über die *GNMB*-Expression in den Datenbanken verfügbar sind, unterstützen die Möglichkeit einer weitgehend tumorspezifischen Expression von *GNMB/INT4* (Kap. 3.5.4). Das vollständig gespleißte Genprodukt von *GNMB* wird in einigen Normalgeweben exprimiert (siehe Unigene cluster Hs.82226, im Internet unter der Adresse <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?GNMB&search=GNMB&suff=txt> zu erreichen). Die wenigen ESTs aus dem Exon 4/Intron 4-Bereich von *GNMB/INT4* wurden aber nur in cDNA-Banken gefunden, die zumindest teilweise aus Tumorzelllinien hergestellt wurden, darunter Nierenzellkarzinomlinien und Melanomlinien. Unter der „Accession“ BC011595.1 ist in der PubMed-Datenbank des NCBI eine cDNA-Sequenz veröffentlicht, die aus einem melanotischen Melanom isoliert wurde und die zu der hier als *GNMB/INT4* bezeichneten Sequenz bis auf zwei Unterschiede identisch ist. Die Datenbanksequenz enthält an Position 390 des ORF ein A anstelle eines G in der *GNMB/INT4*-Sequenz (Anhang 3). Der Unterschied führt zu keinem Aminosäureaustausch. Außerdem ist die cDNA-Sequenz aus der Datenbank länger, da sie mit einer Poly-(A)₁₂₂-Sequenz endet. Mit diesem Datenbank-cDNA-Klon sind über „UniSTS“ zwei weitere cDNA-Sequenzen verknüpft, die mit dem 3'-Bereich der *GNMB/INT4*-Klone weitgehend übereinstimmen. Ein Klon (AA059347) stammt aus einer Cornea-cDNA-Bank, der zweite (AI583562) aus einer cDNA-Bank aus einem Pankreaskarzinom. Insgesamt wurden in Datenbanken cDNA-Sequenzen aus dem Exon 4/Intron 4-Bereich von *GNMB* in unterschiedlichen Tumoren wie Melanom, Nierenzellkarzinom, Pankreaskarzinom und Lungenkarzinom sowie in den Normalgeweben Uterus und Cornea gefunden. Um entscheiden zu können, ob *GNMB/INT4*-Expression auf Tumoren und diese beiden

immunprivilegierten Gewebe beschränkt ist, müssen Expressionsanalysen in möglichst allen Normalgeweben durchgeführt werden.

Die Erstbeschreibung von GPNMB durch Weterman et. al. [102] deutet eine mögliche Tumorsuppressorfunktion des Proteins an. Die Autoren subtrahierten cDNA-Banken aus Melanomzelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotential und isolierten Klone, die differentiell exprimiert werden. Sie identifizierten *GPNMB*-Transkripte in Melanomzelllinien mit niedrigem Metastasierungspotential, konnten aber die Expression in aggressiveren Linien nicht finden. Darüber hinaus konnte in Mausmodellen das Wachstum *GPNMB*-transfizierter, aggressiver Tumorlinien im Vergleich zur Parentalzelllinie gebremst werden. Für Northern-Blots benutzten die Autoren das Vollängen-Transkript von *GPNMB* aus 2349 bp als Sonde. Dadurch ist es vorstellbar, dass unter den verwendeten Hybridisierungsbedingungen das hier vorgestellte alternative Spleißprodukt (*GPNMB/INT4*) nicht gefunden wurde. Die Sequenz aus den Exons 1-4 besteht aus nur 546 bp. Danach folgen ca. 1000 bp aus dem Intron 4, an welche die verwendete Sonde nicht hybridisieren konnte. Eventuell konnten die Autoren deshalb eine möglicherweise im Verlauf der Progression der Tumore auftretende Verschiebung der Genprodukte zugunsten der Spleißvarianten nicht entdecken. Als mögliches Tumorsuppressorgen könnte *GPNMB* im Verlauf der Entartung der Tumorzellen durch ineffektives Spleißen inaktiviert werden. Für das Tumorsuppressorprotein p16 (*CDKN2A*) z. B. sind unterschiedlichste Mechanismen, die zur Inaktivierung führen, in Melanomen beschrieben. Allerdings gehört alternatives oder ineffektives Spleißen nicht dazu [186-188]. Eventuell ist die Menge intakten GPNMB-Proteins für seine suppressive Wirkung entscheidend, welche durch alternatives oder ineffektives Spleißen verändert werden könnte. In der Literatur sind mehrere analoge Fälle dokumentiert. Zum Beispiel wird „Melastatin“ (*MLSN1*), ein mögliches Tumorsuppressorgen in pigmentierten Melanomen, durch alternatives Spleißen inaktiviert. Nur das vollständige „Melastatin“ scheint die Tumorsuppressorfunktion ausführen zu können. Die Vollängen-cDNA kommt aber zusammen mit alternativ gespleißten, kürzeren Isoformen sowohl in normalen Melanozyten als auch in Melanomzellen vor. Im Verlauf der Dedifferenzierung und Metastasierung verschwindet das Vollängen-Produkt, die kürzeren Formen bleiben [189]. Ein zweites Beispiel ist BIN1 [190], ein Tumorsuppressorprotein, das in seiner „Normalform“ die maligne Transformation von Zellen durch verschiedene Onkogene, z. B. c-Myc, unterdrücken kann. Das ubiquitär exprimierte *BIN1* wird in Melanomen spezifisch dadurch ausgeschaltet, dass eine Spleißvariante mit einem neuronenspezifischen Exon gebildet wird. Das Protein hat in Neuronen eine andere Funktion als in den übrigen Geweben [190]. *MLSN1*- und *BIN1*-alternative Spleißvarianten werden in Normalgeweben exprimiert. Die Spleißvarianten enthalten keine nichtgespleißten Introns, sondern *MLSN1* verliert Exonsequenzen, die für seine Funktion wichtig sind und *BIN1* verändert seine Funktion durch die Insertion eines

gewebespezifischen Exons. Daher ist nicht zu erwarten, dass diese Genprodukte immunogen sein können. Gegen ein möglicherweise tumorspezifisches GPNMB/INT4, dessen carboxyterminalen Aminosäuren durch ein dazugewonnenes Intron kodiert werden, könnte es sowohl MHC-Klasse I- als auch -Klasse II-restringierte T-Zellantworten geben.

Die gegen GPNMB^{G181D} gerichtete T-Zellantwort wurde *in vitro* innerhalb relativ kurzer Zeit (5 Wochen) sehr stark expandiert. Die Antwort war, im Gegensatz zu den Antworten gegen die beiden gefundenen Differenzierungsantigene gp100 und Tyrosinase sowie dem ebenfalls punktmutierten SIRT2^{P182L}, in verschiedenen MLTCs reproduzierbar (Abb. 3.21). Allerdings wurde das Antigen in einem gut charakterisierten Modell gefunden, das über viele Jahre etabliert wurde. Für viele Patienten, auch wenn sie sich noch in einem frühen Stadium ihrer Erkrankung befinden, dauert die Identifizierung von tumorspezifischen Antigenen derzeit noch zu lange, um sie therapeutisch einsetzen zu können. Wann immer in menschlichen Tumormodellen T-zellerkannte Tumorantigene identifiziert wurden, war eine etablierte Tumorzelllinie zur Stimulation von T-Zellen und als Quelle der cDNA-Bank und der HLA-cDNA verfügbar. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das zeitaufwendige T-Zellklonierungsverfahren nicht notwendig ist, wenn sich in MLTCs nach wenigen Stimulationen dominante Antworten durchsetzen können. Der ELISPOT-Assay ist der geeignete Test, antigenspezifische T-Zellen in einer polyklonalen MLTC zu entdecken. Für die Herstellung einer Tumor-cDNA-Bank könnte in Zukunft auf die Etablierung einer Tumorzelllinie verzichtet werden, wenn z. B. operiertes Tumorfriechgewebe zur Herstellung der Bank verwendet werden kann. Die Tumoranteile im Frischgewebe müssten allerdings mit Hilfe von Pathologen sicher identifiziert werden. Aus der cDNA-Bank könnten im Bedarfsfall individuelle HLA-Allele amplifiziert und kloniert werden, wenn sie nicht bereits aus anderen Modellen zur Verfügung stehen. Einzig für die Stimulation der T-Zellen der Patienten gibt es derzeit noch keine überzeugende Alternative zur Tumorzelllinie. Denkbare Alternativen sind vorhanden, funktionieren bisher allerdings nur in Einzelfällen und schlecht reproduzierbar. Zum Beispiel können autologe Dendritische Zellen mit Tumormaterial beladen oder transfiziert werden und zur Stimulation von T-Zellen benutzt werden. Als Tumormaterial wurden bisher Tumor-DNA [193] oder -RNA [194-199] sowie Tumorysate [157;200;201] oder apoptotische Tumorzellen [11] benutzt. Dabei hat allerdings die Verwendung von Tumorysaten oder apoptotischen Zellen den Nachteil, dass für die Gewinnung des Materials viele Tumorzellen gebraucht werden, die ohne Tumorzellkultur kaum erhalten werden können. Ein nahezu ideales Werkzeug könnte ein Expressionsvektorsystem sein, mit dem sowohl Dendritische Zellen als auch COS-7-Zellen oder 293 T-Zellen transfiziert werden können. In ein solches Vektorsystem würde die Tumor-cDNA-Bank konstruiert. Dendritische Zellen eines Tumorpatienten würden mit der Bank transfiziert und die Transfektanten würden zur Stimulation autologer PBL eingesetzt. Nach Expansion der T-Zellen kann eine

Funktionsüberprüfung im IFN γ -ELISPOT-Assay, ebenfalls mit DC-Transfektanten als antigenpräsentierende Zellen, erfolgen. Eine reaktive T-Zellpopulation könnte als „ready to use“-Effektorpopulation eingefroren werden und in Aliquots wieder aufgetaut und zur Durchmusterung der cDNA-Bank, transfiziert in COS-7-Zellen oder 293-T-Zellen, verwendet werden. Geeignete Expressionsvektorsysteme mit ausreichender Breite an infizierbaren Zelltypen könnten virale Systeme sein. Smith et. al. verwendeten z. B. ein Vacciniavirus, um eine Tumor-cDNA-Bank zu konstruieren [134]. Allerdings besteht bei der T-Zellstimulation mit infizierten Zellen das Risiko, dass T-Zellantworten gegen den Virus-Anteil des Vektors entstehen. Alternativ könnte ein Expressionsvektorsystem benutzt werden, mit dem COS-7-Zellen und 293 T-Zellen gut transfiziert werden können und das gleichzeitig gut geeignet ist für die *in vitro*-Transkription. Dann könnten DCs mit *in vitro* transkribierter RNA transfiziert und zur Stimulation von T-Zellen benutzt werden. Mit diesen T-Zellen wäre, wie oben beschrieben, die Suche nach Tumorantigenen aus der gleichen cDNA-Bank möglich. Die DC-Transfektion mit *in vitro*-transkribierter RNA ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung [202].

4.5 Welches sind die relevanten Tumorabstoßungsantigene?

In der vorliegenden Arbeit wurden im Melanommodell MZ7 drei neue T-Zellerkannte Antigene vorgestellt. Ein Antigen war bereits zuvor charakterisiert worden: SIRT2^{P182L}. Die Antigene sind zwei Melanozyten-Differenzierungsantigene und zwei punktmutierte, tumorspezifische Antigene. Für drei untersuchte „Cancer-Testis“-Antigene und ein weiteres Differenzierungsantigen (die MAGE-Antigene und Melan-A/MART-1, Abb. 3.8) konnten in keinem Experiment T-Zellantworten nachgewiesen werden. Für Melan-A/MART-1 war dieser Befund nachvollziehbar, weil andere Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass aus dem Protein nur wenige Epitope prozessiert und erkannt werden, darunter vor allem ein immundominantes, das über HLA-A*0201 präsentiert wird [61;71;203].

Für eine effektive therapeutische Immunisierung gegen Tumore sollten Antigene verwendet werden, für die eine heftige, möglichst tumorspezifische Antwort zu erwarten ist. Bei Melanomen mag das Auftreten von Autoimmunantworten gegen Differenzierungsantigene in Form einer Vitiligo noch akzeptabel sein und Differenzierungsantigene sind derzeit bevorzugte Zielantigene in Vakzinierungsstudien (siehe oben). Jedoch könnten Antworten gegen Differenzierungsantigene bei anderen „immunogenen“ Tumoren, wie z. B. Nierenzellkarzinomen, schwerwiegende Folgen haben. Darum wären tumorspezifische Antigene, wie z. B. Peptide aus strukturell alterierten Proteinen, vorzuziehen.

Punktmutationen können auf verschiedene Weise eine Erkennung durch das T-Zellsystem herbeiführen. Eine Punktmutation kann dazu führen, dass ein Peptid überhaupt erst von der Antigenprozessierungsmaschinerie der Zelle generiert und präsentiert wird. Das scheint für einige der „Minor Histocompatibility Antigens“ (mHag) der Fall zu sein, die mit der sogenannte GvHD („graft versus host disease“) und dem GvL- („graft versus leukemia“) Effekt in Zusammenhang gebracht werden, die gemeinsam oder unabhängig insbesondere bei CML-Patienten nach Transplantation von HLA-identischem Knochenmark auftreten [204-206]. Gelegentlich generiert eine Punktmutation eine HLA-Ankerposition (man spricht von einem Aggretop) im Peptid oder die ausgetauschte Aminosäure stabilisiert eine Ankerposition [207;208]. Durch beide Mechanismen können dem Immunsystem Peptide präsentiert werden, die es noch nie gesehen hat und gegen die demzufolge keine Toleranz bestehen kann. Sie sollten genauso als fremd betrachtet werden wie z. B. virale Epitope und entsprechend immunogen sein. Andererseits kann eine durch Punktmutation ausgetauschte Aminosäure direkt von einem T-Zellrezeptor innerhalb eines Peptids erkannt werden. Dann wird das Wildtyp-Peptid ebenfalls prozessiert und präsentiert, aber vom Immunsystem nicht oder deutlich schlechter erkannt. Welche Auswirkung die jeweilige Punktmutation in den beiden Antigenen, die bisher im Melanommodell MZ7 gefundenen wurden, $SIRT2^{P182L}$ und $GPNMB^{G181D}$, auf Prozessierung und HLA-Präsentation hat, wurde bisher nicht ermittelt. Für beide Antigene wurde allerdings gezeigt, dass die Wildtyp-Peptide im sogenannten „shift assay“ mit einer prozessierungsdefizienten, aber HLA-A3-positiven Zelllinie (T2-A3), genauso gut an HLA-A3.1 binden wie die zugehörigen mutierten Peptide (Daten nicht gezeigt). Während die T-Zellklone gegen das Peptid aus $SIRT2^{P182L}$ (KIFSEVTLK) jedoch das Wildtyppeptid (KIFSEVTPK) und auch COS-7-Zellen, die mit dem Wildtypallel von $SIRT2$ transfiziert wurden, schwach erkennen (pers. Mitteilung M. Fatho), wird das $GPNMB$ -Wildtyppeptid (TLGWLLQTPK i. Vgl. zu TLDWLLQTPK) von der MLTC 18 nicht erkannt (Abb. 3.20). $SIRT2$ -Wildtyp wurde allerdings von den T-Zellklonen immer deutlich schlechter erkannt als $SIRT2^{mutiert}$. Analoge Situationen existieren auch für andere punktmutierte Antigene, wie z. B. mutiertes HSP-70-2-Antigen [94]. Die wenn auch marginale Erkennung durch die $SIRT2^{P182L}$ -reaktiven T-Zellklone zeigt, dass das Wildtyppeptid prozessiert wird. Wie oben erwähnt, bindet auch das $GPNMB$ -Wildtyppeptid an HLA-A3.1 (Daten nicht gezeigt), ob es aber prozessiert wird, ist unklar. Gegen transfiziertes $GPNMB/INT4$ gab es keinerlei Erkennung durch die MLTC 18 (Abb. 3.19). Die T-Zellantwort war stringent auf das dekamere mutierte Peptid fokussiert. Selbst die dazu passenden möglichen nonameren Peptide (TLDWLLQTP und LDWLLQTPK) mit der ausgetauschten Aminosäure wurden nicht erkannt (Abb. 3.20).

Einige T-Zellantworten gegen derzeit bekannte Tumorantigene sind sowohl gegen ein Nonapeptid als auch gegen ein entsprechendes Dekapeptid gerichtet. Dies gilt im

vorliegenden Modell auch für die Antworten gegen gp100 (erkannte Peptide: SSPGCQPPA und SSPGCQPPAQ; Abb. 3.11) und Tyrosinase (erkannte Peptide: QCSGNFMGF UND CQCSGNFMGF, Abb. 3.15). Aber auch weitere Beispiele sind bekannt, wie z. B. für CDK4^{R24C} (ACDPHSGHFV und KACDPHSGHFV wurden von HLA-A2-restringierten CTL erkannt [65]) und Melan-A/MART-1 (EAAGIGILTV und AAGIGILTV wurden von HLA-A2-restringierten CTL erkannt [61;71]). Diese Stringenz in der GPNMB^{G181D}-Antwort und die Tatsache, dass die Antwort in jeder getesteten tumorreaktiven MLTC verbreitet war (Abb. 3.21), lassen vermuten, dass das GPNMB^{G181D}-Epitop ein immundominantes Antigen in diesem Modell sein kann. Es ist vorstellbar, dass stringendere Erkennung auch höheren Schutz vor Autoreaktivität bedeutet und der ist bei dominanten Immunantworten wichtig. In jeder der getesteten MLTCs setzte sich die Reaktivität gegen GPNMB^{G181D} durch, während die Antworten gegen die anderen Antigene (SIRT2^{P182}, gp100 und Tyrosinase) nur in einzelnen MLTCs nachgewiesen wurden (Abb. 3.8, Abb. 3.21). Auch die Frequenz der GPNMB^{G181D}-spezifischen T-Zellen in den MLTCs im Vergleich zur Gesamtzahl der tumorreaktiven Lymphozyten war sehr hoch (Abb. 4.1).

Immundominanz wurde bisher hauptsächlich in Tiermodellen an primären T-Zellantworten im Falle akuter viraler Infektionen untersucht. Dabei ging es um die Frage, welche Antigene aus einem komplexen fremden Pathogen dominante T-Zellantworten hervorrufen können [209]. Untersuchungen gibt es aber auch zu sekundären Antworten, also „Memory“-Antworten, die von antigenerfahrenen T-Zellen hervorgebracht werden. Darunter fallen, neben viralen Modellen, auch Untersuchungen zu antitumoralen Antworten und Antworten gegen Histokompatibilitätsantigene. Allerdings müssen die Antworten gegen Tumoren, bedingt durch Selbst-Toleranz, als stark eingeschränkt betrachtet werden [209].

Die Immunogenität eines Antigens hängt im wesentlichen von der Antigenpräsentation, vom T-Zellrepertoire und von Regulationsmechanismen auf der T-Zellseite ab. Ob ein Antigen präsentiert werden kann, hängt von seiner Bildung, also der proteolytischen Freisetzungsrates aus dem Protein, dem oft durch Chaperone beeinflussten Transport zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem TAP („transporter associated with antigen presentation“) –abhängigen Transport ins ER ab. Dabei weist TAP Spezifität für bestimmte C-terminale Aminosäuren auf. Danach wird der Peptidvorläufer (aus 8 – 16 Aminosäuren) N-terminal auf die passende Größe für die Peptidbindungsgrube des HLA-Moleküls, für das es bestimmt ist, zurechtgeschnitten und bei Vorliegenden passender Ankeraminosäuren sowie „Hilfsanker“ an das HLA-Molekül gebunden. Der trimolekulare Komplex aus HLA-Molekül mit Peptid und β 2-Mikroglobulin (auch als „leichte Kette“ des HLA-Moleküls bezeichnet) wird an die Zelloberfläche transportiert. Hier wird er unter Umständen viele Stunden präsentiert, abhängig u. a. von der Stabilisierung durch das Peptid [209-213]. Zusätzlich können das Zytokinmilieu sowie die Kombination der gleichzeitig präsentierten HLA-Moleküle die

Antigenpräsentation beeinflussen. Zumindest wurde in Mausmodellen beobachtet, dass die Präsentation eines bestimmten HLA-Moleküls die eines anderen unterdrücken konnte [214;215].

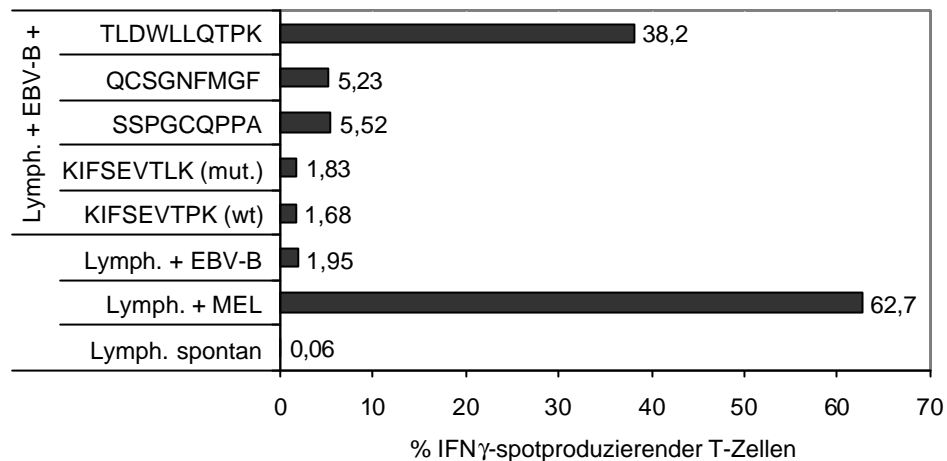


Abb. 4.1: Frequenz reaktiver T-Zellen gegen die vier Antigene aus dem Melanommodell MZ7 in der MLTC 18. Ergebnisse eines IFN γ -ELISPOT-Assays mit der MLTC 18 (Tag 28+4) als Effektorpopulation und mit peptidbeladenen autologen EBV-B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen (APC). Die APC wurden mit ca. 100 μ g/ml der jeweiligen Peptide vorinkubiert und dann im IFN γ -ELISPOT-Assay mit den T-Zellen getestet. Die eingesetzte T-Zellzahl wurde der zu erwartenden Reaktivität für jedes Antigen angepasst: gegen APC ohne Peptid, APC mit SIRT2^{P182L}-Peptid (wt: KIFSEVTPK und mutiert: KIFSEVTLK), gp100-Peptid (SSPGCQPPA) und Tyrosinase-Peptid (QCSGNFMGF) wurden 10.000 Lymphozyten eingesetzt; gegen GPNMB^{G181D}-Peptid (TLDWLLQTPK) wurden 2000 Lymphozyten und gegen das Melanom wurden 1000 Lymphozyten eingesetzt.

Aus allen Faktoren zusammen ergibt sich die Anzahl der pro Zelle präsentierten Peptid/HLA-Komplexe, die von T-Zellen erkannt werden können. Manche T-Zellen benötigen viele Peptid/MHC-Komplexe pro Zelle, um eine Aktivierung zu erfahren; andere benötigen (statistisch) nur eine Kopie [216;217]. An diesem Punkt setzt die T-zelluläre Basis der Immundominanz an, die von manchen Autoren als „Immunodomination“ bezeichnet wird [209;218;219]. T-Zellen gegen in der Regel wenige dominante Epitope setzen sich gegenüber T-Zellen gegen subdominante Epitope durch [210]. Die subdominanten Epitope werden aber alle prozessiert und präsentiert. Dabei spielt sowohl die T-Zellvorläuferfrequenz im Blut gegen ein Antigen eine Rolle als auch funktionelle Unterschiede zwischen T-Zellen. Meistens sind dominante T-Zellen hochavide, d. h. sie lysieren ihre Zielzellen bei geringsten Antigenkonzentrationen. Hochavide T-Zellen dominieren andere, indem sie die APC

schneller lysieren als niedrig avide und es dadurch bei limitierter Anzahl von APC gar nicht erst zur Aktivierung subdominanter T-Zellen kommt [143]. Andere Arbeiten zeigten, dass immundominante T-Zellen schneller proliferieren und Vorteile in Effektorfunktionen haben. Beispiele dafür sind intrazellulär gelagertes, präformiertes Perforin oder Expression von Oberflächenmolekülen, die den Kontakt zwischen T-Zelle und APC erleichtern [219;220]. Schneller proliferierende T-Zellen haben ebenfalls Kompetitions Vorteile um limitierte APC als langsamer wachsende, sei es um von der APC freigesetzte Zytokine oder um die Oberflächen der APC sowie um vorhandenen Raum [221]. Auch eine direkte Suppression der subdominanten durch dominante T-Zellen wird diskutiert („bystander suppression“ [220]).

Im hier beschriebenen Melanommodell wurde festgestellt, dass T-Zellantworten gegen bekannte Melanomantigene, in verschiedenen gleichzeitig angesetzten MLTCs, eher zufällig entstehen (siehe Kap. 4.2). Da alle diesbezüglich getesteten MLTCs (MLTCs 13, 14, 15, 16, 17, 18) mit der gleichen Tumorzelllinie zum gleichen Zeitpunkt stimuliert wurden, kann dieser Befund nicht mit Unterschieden in der Antigenexpression der APC zusammenhängen. Eher könnte es sein, dass in den verschiedenen PBL, die zu verschiedenen Zeitpunkten über insgesamt vier Jahre abgenommen wurden, die Frequenzen der gegen die verschiedenen Antigene gerichteten T-Zellen unterschiedlich waren. Dieser Frage wird derzeit durch ELISPOT-Experimente mit frisch aus PBL isolierten CD8-positiven T-Zellen nachgegangen. Andererseits könnte aber auch ein Immundominanzeffekt durch z. B. GPNMB^{G181D}-reaktive T-Zellen („immunodomination“) verantwortlich sein, indem die T-Zellen Aktivierung und Wachstum anderer T-Zellen mit unterschiedlicher Spezifität unterdrücken. Zusätzlich können, z. B. bei Vergleich der Antworten in der MLTC 18 gegenüber der Reaktivität gegen das Melanom, noch weitere Spezifitäten gegen andere vielleicht dominante Antigene vermutet werden (Abb. 4.1). Der Immundominanzeffekt durch eine oder mehrere dominante Spezifitäten könnte insbesondere durch die *in vitro*-Situation entscheidend sein, da im Vergleich zur *in vivo*-Situation die APC (Melanomzellen) limitierend sein können. *In vivo*, bei Vorhandensein größerer Tumormassen, können vielleicht alle Antworten eher erhalten werden als *in vitro*, da pro Restimulation wöchentlich nur 10 % Tumorzellen im Vergleich zur Anzahl der T-Zellen eingesetzt werden. Entweder die schneller proliferierenden und/oder höher aviden T-Zellen könnten die Kulturen dominieren. Dabei kann die Unterdrückung der einen oder anderen subdominanten Antwort zufällig sein, obwohl geeignete Frequenzen im peripheren Blut vorhanden waren.

Der Grund für die Dominanz der GPNMB^{G181D}-reaktiven T-Zellen gegenüber den anderen Antworten könnte darin liegen, dass das erkannte Peptid ein Neoepitop ist und damit ein „stärkeres“ Antigen als die anderen. Worin liegt dann aber der Unterschied zu der anderen gegen ein punktmutiertes Antigen gerichteten T-Zellantwort aus diesem Modell, gegen SIRT2^{P182L}, welche sich in keiner MLTC durchsetzte, im Gegenteil nicht einmal in

jeder MLTC zu messen war (Abb. 3.8)? Denkbar wäre, dass es auch gegen Neoepitope subdominante T-Zellantworten gibt, z. B. aufgrund niedriger Affinität des Peptids zum HLA-Molekül und daraus resultierend geringer Stabilität des Peptid/MHC-Komplexes an der Zelloberfläche. Die T-Zellen gegen SIRT2^{P182L} könnten niedrig affine T-Zellrezeptoren besitzen und von niedriger Avidität sein. Dagegen spricht allerdings, dass T-Zellkone gegen SIRT2^{P182L} wiederholt aus verschiedenen MLTCs gegen die Melanomzelllinie isoliert und in Langzeitkultur etabliert wurden und dass die CTL in Lysetests mit peptidbeladenen antigenpräsentierenden Zellen, in denen das Peptid titriert wurde, noch in Konzentrationsbereichen lysierten, die CTL mit hoher Avidität erreichen (pers. Mitteilung T. Wölfel und M. Fatho). Darüber hinaus stabilisierte das von den T-Zellen erkannte Peptid in „shift assays“ das HLA-A3-Molekül genauso gut wie ein als Positivkontrolle mitgetestetes HIV-Peptid, das als gut an HLA-A3 bindendes Peptid bekannt ist (pers. Mitteilung W. Herr und SYFPEITHI „Epitope Prediction“; Daten nicht gezeigt). Diese HLA-Stabilisierung wäre für ein schlecht bindendes Peptid nicht zu erwarten. Eine hypothetische alternative Erklärung wäre, dass das SIRT2^{P182L}-Peptid im Gegensatz zum GPNMB^{G181D}-Peptid für das Immunsystem kein Fremdartigen ist. Es könnte sein, dass das Wildtyppeptid von SIRT2 (KIFSEVTPK) in mehreren Normalgeweben, insbesondere auch im Thymus präsentiert wird und nur wenige T-Zellen der Negativselektion entkommen sind, deren T-Zellrezeptoren eine ausreichend niedrige Affinität gegenüber diesem Peptid aufweisen. Durch die Veränderung des Peptids an einer Aminosäureposition (P→L an Pos. 182) wird die Affinität des T-Zellrezeptors vielleicht stark erhöht, so dass eine hohe Avidität der T-Zelle gegenüber dem HLA/Peptid-Komplex resultiert. Ein Argument dafür wäre die oben bereits erwähnte Erkennung der transfizierten Wildtyp-cDNA durch die SIRT2^{P182L}-reaktiven T-Zellen, die zumindest andeutet, dass das Wildtyppeptid natürlich prozessiert werden kann. Das GPNMB^{G181D}-Peptid könnte vielleicht immunogener sein, wenn kein zum erkannten Peptid vergleichbares Wildtyppeptid prozessiert würde und darauf deutet möglicherweise hin, dass die Wildtyp-cDNA (*GPNMB/INT4*) von den GPNMB^{G181D}-reaktiven T-Zellen nicht einmal schwach erkannt wird (Abb. 3.19). Analog zur Situation bei der Präsentation vieler viraler Peptide könnte ein breiteres Repertoire hochavidier T-Zellen gegen das GPNMB^{G181D}-Peptid gerichtet sein [222]. Ob das GPNMB-Wildtyppeptid prozessiert wird, war in dieser Arbeit nicht zu klären.

An der Abbildung 4.1 fällt auf, dass in der MLTC 18 durchaus Reaktivität gegen das gp100-Peptid (SSPGCQPPA) nachzuweisen ist. Diese Reaktivität konnte jedoch gegen transfizierte COS-7-Zellen nicht gemessen werden (Abb. 3.8). Eine unterschiedliche Transfektionseffizienz der COS-7-Zellen ist unwahrscheinlich, weil pro Experiment COS-7-Zellen für sechs MLTCs gleichzeitig und mit einem Transfektionsansatz („Mastermix“) für jedes Antigen präpariert wurden und in anderen MLTCs die gp100-Reaktivität zu messen

war (Kap. 3.2.2). Daher ist es möglich, dass funktionelle Unterschiede zwischen T-Zellen verschiedener Spezifitäten die Erkennung transfizierter COS-7-Zellen erlauben oder nicht. Dabei müssen die funktionellen Unterschiede nicht in der Erkennung des Antigens selbst liegen, sondern können z. B. Vor- oder Nachteile in Zell-Zellkontakteigenschaften sein [219]. Im Gegensatz zu den Peptidversuchen, in denen Antigensättigung erreicht ist (Abb. 4.1), sind in den COS-7-Experimenten die antigenexprimierenden Zellen limitiert. Schätzungsweise werden pro Transfektionsexperiment 10 – 30 % der COS-7-Zellen transfiziert, also bis zu 6000 COS-7-Zellen pro Testeinheit. Im Vergleich dazu sind bei den Peptidtestungen 75.000 antigenpräsentierende Zellen pro Testeinheit vorhanden. Eventuell können T-Zellen mit Vorteilen in Zell-Zellkontakteigenschaften, die zusätzlich in hoher Frequenz in der MLTC vertreten sind, um die Oberfläche der COS-7-Zellen konkurrieren, auch wenn diese das für sie relevante Antigen nicht exprimieren. Natürlich kommt es dann zu keiner Effektorfunktion dieser T-Zellen. Aber sie verhindern damit auch die Antigenerkennung durch in niedrigeren Frequenzen vertretene T-Zellen. Erst wenn eine gewisse Schwellenfrequenz an monospezifischen T-Zellen in einer oligo- oder polyklonalen MLTC erreicht ist, werden vielleicht – hier am Beispiel von gp100 – COS-7-Transfektanten erkannt. Vergleichbares könnte natürlich auch für T-Zellantworten gegen weitere Antigene gelten, für die in dieser Arbeit keine Reaktivitäten nachgewiesen wurden (Kap. 3.2.2).

Welche der bisher identifizierten Tumorantigene prinzipiell in der Lage sind, Ziel einer Tumorabstoßungsreaktion zu sein, ließ sich durch diese Arbeit nicht feststellen. In murinen Tumormodellen wurde gezeigt, dass ausschließlich hochavide T-Zellen gegen Tumorantigene den metastasierten Tumor bekämpfen können [223]. Auch aus viralen Modellen ist gut belegt, dass im Fall einer Infektion die hochaviden, schnell proliferierenden immundominanten T-Zellen die Beseitigung der Viren besser bewältigen als niedrig avide [224]. Allerdings kann diese Aufgabe oft von subdominanten Antworten dann übernommen werden, wenn das dominante Epitop entfernt oder subdominante Epitope allein präsentiert werden [219;220].

Es ist bisher selten gelungen, hochavide T-Zellen aus dem Blut von Patienten zu isolieren. Wenn dies gelungen ist, basieren diese Ergebnisse auf klonierten T-Zellen und auf der Markierung und Sortierung mit Peptid-MHC-Tetrameren [138]. In dieser Arbeit wurde versucht, zumindest diejenigen T-Zellantworten, die zuerst in einer stimulierten MLTC aus peripherem Blut entstehen und expandiert werden, zu erklären. Die reaktiven T-Zellen wurden nicht isoliert, sondern ihre Reaktivität in der oligo- oder polyklonalen MLTC mit einem geeigneten Testsystem gemessen. Ob diese zuerst expandierten T-Zellen höhere Avidität besitzen als daraus stabil in Langzeitkultur etablierbare T-Zellklone, muss noch überprüft werden. Jedoch war die GPNMB^{G181D}-Antwort in verschiedenen MLTCs im Gegensatz zu den Antworten gegen die beiden gefundenen Differenzierungsantigene und sogar zur

Antwort gegen SIRT2^{P182L} reproduzierbar (3.21). Außerdem wurden bei Vorliegen mehrerer Reaktivitäten in einer MLTC deutlich höhere Frequenzen reaktiver T-Zellen gegen GPNMB^{G181D} gefunden als gegen die anderen Antigene (Abb. 4.1 und Vergleich Abb. 3.8 mit Abb. 3.21).

4.6 Die fortgesetzte Suche nach T-zellerkannten Tumorantigenen

Das Ludwig Institut für Krebsforschung veröffentlicht eine Liste der derzeit bekannten T-zellerkannten Tumorantigene (<http://www.cancerimmunity.org/statics/databases.htm>). Auf der Liste sind ungefähr 50 verschiedene Tumorantigene verzeichnet, die von MHC Klasse I-restringierten T-Zellen erkannt werden. Einige davon kodieren für mehrere Epitope, die über verschiedene HLA-Moleküle präsentiert werden. Es stellt sich die Frage nach der Notwendigkeit der Identifizierung weiterer Tumorantigene, da das Arsenal an bereits verfügbaren, therapeutisch einsetzbaren Tumorantigenen recht umfangreich erscheint. Dem könnte man entgegen, dass bisher nicht geklärt ist, ob und welche Antigene tatsächlich eine Tumorabstoßung vermitteln können.

Die Mehrzahl der bekannten Tumorantigene wurde mit Hilfe von T-Zellklonen entdeckt, die aus PBL oder Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) der Tumorpatienten generiert wurden. TIL sind in der Regel oligoklonal und enthalten CTL-Klone gegen Antigene unterschiedlicher Kategorien [6;207]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch den Einsatz eines geeigneten Testsystems, dem Zytokin-ELISPOT-Assay, auf die Klonierung von CTL aus tumorreaktiven MLTCs verzichtet werden kann, da die Reaktivität von T-Zellen mit Spezifität gegen ein gegebenes Antigen innerhalb der poly- oder oligoklonalen MLTC nachgewiesen wurde. Die Beweggründe, dies zu versuchen, waren einerseits praktischer Natur, da CTL-Klonierungen zeit- und materialaufwendig sind. Diese Tatsache ist mitverantwortlich dafür, dass die Suche nach neuen Tumorantigenen bisher nur in ausgewählten Modellen durchgeführt werden konnte. Andererseits ist unklar, ob die Selektion der CTL-Klone, die in Langzeitkultur etabliert werden können, überwiegend Zufallsereignissen unterliegt oder ob alle etablierten CTL-Klone Eigenschaften gemeinsam haben, welche die permanente Kultur ermöglichen. Dies bedeutet jedoch nicht, dass Klone mit diesen Eigenschaften relevant für die Tumorbekämpfung sind. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere T-Zellklone, die besagte(n) Selektionsvorteil(e) nicht haben, wichtig sind. Daraus resultierte die Hypothese, durch das „Screening“ nach neuen Tumorantigenen mit Hilfe von tumorreaktiven MLTCs, die nur über einen relativ kurzen Zeitraum stimuliert wurden, evtl. andere Antigene entdecken zu können als die, welche mit

CTL-Klonen gefunden wurden. Auf den ersten Blick wird diese Hypothese durch die Entdeckung der GPNMB^{G181D}-Antwort unterstützt. Die T-Zellantwort unterscheidet sich von den anderen drei bisher in diesem Modell gefundenen Antworten darin, dass sie reproduzierbar dominant ist (siehe oben). Es ist jedoch bisher in zwei Klonierungsversuchen nicht gelungen, GPNMB^{G181D}-spezifische CTL-Klone in permanenter Kultur zu etablieren (Daten nicht gezeigt). In der Literatur wurden keine Untersuchungen darüber gefunden, welche Eigenschaften CTL-Klone aufweisen müssen, um *in vitro* dauerhaft expandiert werden zu können.

Aus Tiermodellen ist bekannt, dass im Falle einer akuten Infektion *in vivo* das Immunsystem geradezu überschwemmt wird von klonal expandierten antigenspezifischen Effektor-CTL. Nach Entfernung aller virusinfizierten Zellen sterben zwischen 90-99 % aller Effektor-T-Zellen innerhalb weniger Tage ab, um das Gleichgewicht des Immunsystems wiederherzustellen. Nur ein geringer Anteil der Effektoren entwickelt sich zu „Memory“-Zellen, die einen lebenslangen Schutz vor dem selben Pathogen gewährleisten [225;226]. Übertragen auf die permanente *in vitro*-Kultur von klonalen CTL wäre demnach zunächst zu fordern, dass eine „Memory“-Antwort etabliert und aufrechterhalten werden kann. Terminale Effektoren wären nach gängiger Vorstellung nur kurzlebig. Wiederum Daten aus Tiermodellen zeigen, dass für die Entstehung und die Aufrechterhaltung von „Memory“-T-Zellen die Menge an verfügbaren antigenpräsentierenden Zellen, die Intensität der T-Zellrezeptor-Peptid/MHC-Interaktion und/oder das Zytokinmilieu wichtig sind. Bei limitierter Anzahl antigenpräsentierender Zellen können diese lysiert werden, bevor „Memory“-Zellen entstehen können. Die T-Zellen, die keinen T-Zellrezeptor/Antigen-Kontakt herstellen können, gehen zugrunde, weil wichtige antiapoptotische Signale ausbleiben [226]. Andererseits wird vermutet, dass aktive Mechanismen an der Deletion der Effektorpopulation gegen Ende der Immunreaktion beteiligt sind. Autolyse oder „Bystander-Lyse“ der T-Zellen werden wahrscheinlich durch die gleichen Effektormechanismen ausgelöst, die für die Lyse der infizierten oder transformierten Zielzellen verantwortlich sind, nämlich Perforin, IFN γ und TNF [137;227-230]. Eventuell erreichen die T-Zellen nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen ein Entwicklungsstadium, in dem sie gegen die selbst exprimierten Lysemechanismen weniger resistent sind. Unter Bedingungen chronischer T-Zellrezeptorstimulationen verstärkt sich die Perforin-abhängige Autolyse von CTL [228;229]. Daraus könnte resultieren, dass erst gar keine „Memory“-Zellen generiert werden können, wenn bei Vorliegen z. B. hoher Virendosen die T-Zellantwort sich erschöpft, bevor alle virusbefallenen Zellen abgetötet wurden [226]. Andere konnten zeigen, dass der Grad der Auto-/"Bystanderlyse“ am Ende einer Immunreaktion mit dem Reaktionsvermögen der CTL-Klone zusammenhängt. Je höher die Affinität der T-Zellrezeptor-Peptid/MHC-Interaktion

eines CTL-Klones, desto stärker das T-Zellrezeptorsignal und desto höher der Anteil der apoptotischen Zellen gegen Ende der Reaktion [231].

Insbesondere für die Zytokine IL-15 und IL-2 wird ein Einfluss auf die Generierung und das Überleben von „Memory“-Zellen angenommen. Bei CD8⁺ „Memory“-T-Zellen ist IL-15 für die antigenunabhängige Proliferation, auch als homöostatische Proliferation bezeichnet, *in vitro* und *in vivo* wichtig [226]. IL-15 bindet an den IL-15 Rezeptor auf der T-Zelle, der aus der IL-15R α -Kette, der IL-2R β -Kette (CD122) und einer γ -Kette (CD132), die Bestandteil mehrerer Interleukin-Rezeptoren ist, besteht [232]. Im „Memorypool“ existieren neben CD122-hochexprimierenden Zellen auch solche, die den Teilrezeptor kaum exprimieren. Das bedeutet, dass letztere CTL eventuell andere Signale benötigen als IL-15 oder dass IL-15 allein nicht ausreicht, um den „Memorystatus“ zu etablieren. Zum Beispiel wird diskutiert, dass IL-4 CD122 hochregulieren kann [226]. Auch IL-2, oft allgemein als T-Zellwachstumsfaktor bezeichnet, werden direkte Einflüsse auf Generierung und Aufrechterhaltung von „Memory“-Zellen zugeschrieben [226;233]. Daten aus Tiermodellen zeigen, dass IL-2 als Gegenspieler zu IL-15 für das Überleben von CTL agieren kann. Insbesondere bei wiederholt restimulierten CTL kann IL-2 die antigenabhängige Apoptose verstärken und dadurch die Entstehung von „Memory“-Zellen verhindern [233]. Die Etablierung und Kultivierung aller klonalen CTL-Langzeitkulturen, mit deren Hilfe Tumorantigene entdeckt wurden, geschah in Anwesenheit hoher IL-2-Dosen. Das bedeutet, dass für diese CTL der beschriebene IL-2-Einfluss kaum gelten konnte. Dies weist darauf hin, dass andere CTL mit den gleichen oder anderen Spezifitäten unter den standardisierten Kulturbedingungen möglicherweise nicht isoliert expandiert werden können. Daher besteht Hoffnung, mit Hilfe von MLTCs tatsächlich tumorreaktive T-Zellantworten anderer Qualität entdecken zu können, als die, welche durch T-Zellklone bisher gefunden wurden.

4.7 Einordnung der Arbeit in aktuelle Konzepte der Tumorummunologie

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem zytotoxischen (CD8⁺) Arm der T-zellulären Immunantwort gegen ein malignes Melanom. In den letzten Jahren wurden jedoch auch einige Peptidpitope, die von tumorreaktiven CD4⁺ T-Helferzellen erkannt werden, charakterisiert. CD4⁺ T-Zellen erkennen MHC Klasse II-präsentierte Antigene und orchestrieren sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten [30]. Gegen Antigene praktisch aller bisher identifizierten Tumorantigenkategorien wurden auch CD4-Antworten gefunden [32;34;110;234;235]. Ergebnissen aus Tiermodellen und vorläufigen Daten aus humanen Systemen zufolge ist die Stabilität und Effektivität einer zytotoxischen Antwort von

der Hilfe durch CD4⁺ T-Zellen abhängig [3]. T-Helferzellen regulieren T-zellvermittelte Tumormunität in Mausmodellen sowohl qualitativ als auch quantitativ. Durch Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie z. B. IL-2, können CD4⁺ T-Helferzellen CD8⁺ T-Zellantworten amplifizieren. Andererseits können andere Zytokine CD8⁺ T-Zellen zu höherer IFN γ -Produktion, Avidität und anhaltender Aktivierung stimulieren [236]. Daneben wurden vor kurzem T-Zellen beschrieben, die T-Zellantworten herunterregulieren können. Auch diese Regulatorischen T-Zellen kommen aus dem CD4⁺-Kompartiment [237].

Im hier beschriebenen Melanommodell MZ7 wurden bisher keine CD4⁺ T-Zellantworten untersucht. Jedoch wurde die T-Zellhilfe dadurch berücksichtigt, dass die im Verlaufe der Arbeit generierten MLTCs aus peripheren Blutlymphozyten angesetzt wurden und nicht aus vorher isolierten CD8⁺ T-Zellen. Zusätzlich wurden nach der Isolation der CD8⁺ T-Zellen (nach vier Stimulationen mit dem Tumor) die restlichen Zellen bestrahlt und als „feeder-Zellen“ weiterhin in die T-Zellkultur dazugegeben, um den Effekt der T-Zellhilfe solange wie möglich zu erhalten (Kap. 3.2.2).

Im Gegensatz zu den meisten anderen soliden Tumoren exprimieren viele Melanome MHC Klasse II-Gene, eine Eigenschaft, die sonst hämatopoetischen Zellen, insbesondere professionellen antigenpräsentierenden Zellen, vorbehalten ist. Die Melanomzelllinie MZ7 exprimiert spontan wenig MHC Klasse II-Gene, kann aber durch IFN γ -Vorbehandlung zu hoher Expression angeregt werden (Daten nicht gezeigt). Daher wäre es denkbar, in diesem Modell in Zukunft auch CD4-Antworten mit Hilfe von CD4⁺ MLTCs, die gegen IFN γ -vorbehandelte Melanomzellen generiert wurden, zu untersuchen. Vorversuche wurden bereits durchgeführt, indem CD4⁺ T-Zellen aus der CD8-negativen Fraktion der in dieser Arbeit generierten MLTCs isoliert und gegen 29 Aminosäuren lange Peptide getestet wurden. Die 29-mere wurden dazu auf autologe EBV-B-Zellen oder reife DCs geladen und im ELISPOT-Assay auf Erkennung durch die CD4⁺ T-Zellen überprüft. Die langen Peptide stammten aus SIRT2^{P182L} und GPNMB^{G181D} und enthielten die ausgetauschte Aminosäure an zentraler Position. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die ausgetauschte Aminosäure an jeder Position eines denkbaren prozessierten 15-mers (eine typische Peptidlänge für die Präsentation durch MHC II-Moleküle) liegen konnte. Da diese Versuche keine Erkennung durch die CD4⁺ T-Zellen zeigten, wurden die Daten nicht aufgeführt. Ob aus den Vorläuferpeptiden nicht die richtigen Peptide freigesetzt wurden, die CD4⁺ T-Zellen vielleicht andere dominante Antigene erkennen oder die T-Zellen im Moment der Testung vielleicht nicht in der Lage waren zu reagieren, wurde nicht geklärt.

Neben der T-Zellhilfe für die zytotoxischen T-Zellen haben CD4⁺ T-Helferzellen auch profunde Effekte auf B-Zellen. Das Feld der antikörpervermittelten Antitumortherapie ist seit dem Aufkommen monoklonaler Antikörper vor ca. 25 Jahren rasch fortgeschritten. Fünf Antikörper sind für Antitumortherapien zugelassen und 10 weitere in Phase III-Studien oder

weiter [238]. Bei diesen Antikörpern handelt es sich allerdings um monoklonale Mausantikörper, die chimerisiert oder humanisiert wurden. Die Suche nach antikörpererkannten Tumorantigenen im Serum von Tumorpatienten wird durch SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) vertreten. SEREX ist eine Form des „high throughput screenings“ und nutzt das Serum von Tumorpatienten für die Identifizierung von IgG-Antikörper-erkannten, in *E. coli* rekombinant hergestellten Antigenen [39]. Inzwischen wurden über 2000 Tumorantigene von verschiedensten Tumoren durch SEREX identifiziert (persönliche Mitteilung von Ö. Türeci). Aber während mit Hilfe der SEREX-Methode verschiedentlich Antigene gefunden wurden, die zuvor mit Hilfe von T-Zellen beschrieben wurden, gibt es nur ein Antigen, NY-ESO-1, das durch SEREX identifiziert und später T-zelluläre Antworten dagegen charakterisiert wurden [33;39-41;51;239].

Das Produkt des in dieser Arbeit vorgestellten alternativ gespleißten *GPNMB*, *GPNMB/INT4*, wäre eventuell ein Kandidat für ein antikörpererkanntes Tumorantigen. Das vollständig gespleißte *GPNMB* kodiert für ein Transmembran-Glykoprotein. Das *GPNMB/INT4*-Genprodukt hat die Transmembrandomäne verloren und, wie erwähnt, 25 Aminosäuren am carboxyterminalen Ende gewonnen (Anhang 3). Theoretisch wäre es möglich, dass das neue Protein sezerniert wird oder aus nekrotischen Tumorzellen in die Tumorumgebung und in den Blutkreislauf freigesetzt wird. Eventuell entstehen dadurch Antikörperantworten, mit deren Hilfe der Krankheitsverlauf gemessen werden kann.

Die Identifizierung von Tumorantigenen ist die Grundlage für eine mögliche therapeutische Immunisierung von Tumorpatienten. Allerdings existieren für eine erfolgreiche therapeutische Immunisierung gegen Tumoren einige Hindernisse. So sind menschliche Tumoren, im Gegensatz zu experimentell erzeugten Tiertumoren, zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung in der Regel lange etabliert und hatten Zeit und Gelegenheit, ihre Mikroumgebung zu beeinflussen [240]. Es wurde beobachtet, dass Tumoren auch in Gegenwart von T-Zellantworten weiterwachsen können. Derzeit ist nicht geklärt, welche Mechanismen dazu führen [3]. Eine Reihe von Faktoren werden angenommen, welche die T-Zellantwort limitieren können. Viele der T-Zellen, die im Tumor selbst gefunden wurden, waren CD8⁺ T-Zellen, die das sie umgebende Tumorgewebe nicht zerstörten. Diese Untätigkeit könnte daraus resultieren, dass sie keine Hilfe durch CD4⁺ T-Helferzellen bekamen [3;30]. Andererseits wurden aus Tumoren auch reaktive CD8⁺ T-Zellen isoliert (TIL). Für diese CTL wird angenommen, dass sie nicht in ausreichendem Maß expandierbar, zu wenig reaktiv oder Produzenten der falschen Effektormechanismen sowie zu wenig lytisch waren. Zum Vergleich fanden sich zum Beispiel bei einem Patienten mit infektiöser Mononukleose EBV-reaktive CTL, die bis zu 40 % der zirkulierenden CD8⁺ T-Zellen ausmachen konnten [3]. Der inhibitorische Einfluss der eigentlich für die Prävention von

Autoimmunreaktionen zuständigen CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen auf T-Zellantworten gegen Tumorantigene wird ebenfalls diskutiert [3;237;241;242]. Aber auch auf der Tumorseite existieren Mechanismen, die eine T-Zellantwort verhindern oder unterdrücken können. Dazu zählen das Fehlen von kostimulatorischen Molekülen, Antigenverlust, aber auch aktive Prozesse, wie z. B. die Sekretion immunsuppressiver Faktoren wie TGF- β (transforming growth factor- β) [3;243]. Darüber hinaus wird diskutiert, ob eine effektive T-Zellantwort durch starkes Tumorwachstum erschöpft werden kann und ob von T-Zellen produzierte Faktoren das Tumorwachstum fördern könnten [244].

5 Zusammenfassung

Die Kenntnis immunogener Tumorantigene ist Grundlage für die rationale Entwicklung immunologisch orientierter Therapieverfahren. In der vorliegenden Arbeit wurden im autologen Melanommodell MZ7 drei neue T-zellerkannte Tumorantigene vorgestellt. Während nahezu alle bisher beschriebenen Tumorantigene mit Hilfe von T-Zellklonen (CTL) entdeckt wurden, die aus tumorreaktiven MLTCs (gemischte Lymphozyten/Tumor-Zellkulturen) generiert worden waren, wurde in dieser Arbeit versucht, wenige Wochen stimulierte MLTCs direkt zur Antigen suche zu verwenden. Als sensitives Nachweissystem wurde der IFN γ -ELISPOT-Assay eingesetzt. Die Motivation dazu waren einerseits praktische Erwägungen, da CTL-Klonierungen material- und zeitaufwendig sind. Andererseits wurde vermutet, dass die Etablierung von CTL-Klonen in Langzeitkultur neben Zufallsprozessen auch Selektionsprozessen unterliegt, die CTL mit bestimmten Eigenschaften favorisieren. Eventuell eröffnete sich durch den Einsatz der MLTCs die Möglichkeit, Antigene zu entdecken, die mit Hilfe permanent kultivierter CTL aus den MLTCs nicht gefunden würden.

Um beispielsweise Schwankungen im Proliferationsverhalten und in Effektorfunktionen permanent kultivierter T-Zellen zu umgehen, wurden für die Versuche in dieser Arbeit in Portionen eingefrorene T-Zellen verwendet, die zuvor zu ausreichender Menge expandiert worden waren. Es ließ sich zeigen, dass durch die Kryokonservierung der T-Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt nach einer Restimulation mit den Tumorzellen der Aktivierungszustand der T-Zellen konserviert wurde, und dass die T-Zellen nach dem Auftauen in ELISPOT-Assays ohne wesentliche Einbußen spezifisch auf einen erneuten Antigenkontakt reagierten.

Bei der Testung von mehreren, unabhängig generierten MLTCs gegen bekannte Tumorantigene wurden T-Zellantworten gegen gp100/HLA-B7.2, Tyrosinase/HLA-A26.1, SIRT2^{P182L}/HLA-A3.1 und, deutlich stärker, gegen die Melanomzelllinie festgestellt. Nachfolgend wurde mit Hilfe bereits etablierter CTL-Klone die peptidkodierende Region von gp100 über die Transfektion von gp100-Fragmenten in COS-7-Zellen eingegrenzt und anschließend ein synthetisches Peptid identifiziert, das von den CTL-Klonen erkannt wurde. Das zweite identifizierte Tumorantigen, Tyrosinase/HLA-A26.1, wurde nur in einer von sechs neu generierten, unabhängigen MLTCs entdeckt. Da keine Tyrosinase/HLA-A26.1-reaktiven CTL-Klone zur Verfügung standen, wurden die zur Eingrenzung der peptidkodierenden Region transfizierten COS-7-Zellen mit der MLTC selbst getestet. Anschließend wurde ein synthetisches Peptid identifiziert, das von der MLTC erkannt wurde.

Die Reaktivität der MLTCs gegen die Melanomzelllinie war bei weitem nicht durch die bis dahin gefundenen T-Zellantworten erklärbar. Daher wurde mit einer der MLTCs versucht, durch cDNA-Expressionsklonierung ein neues Antigen in der cDNA-Bank aus dem MZ7-

Melanom zu identifizieren. Die Reaktivität der MLTC gegen den Tumor war hauptsächlich durch einen Antikörper gegen HLA-A3 blockierbar. Daher wurde *HLA-A*03011*-cDNA für das „Screening“ kotransfiziert. Das Verfahren führte zur Identifizierung eines weiteren punktmutierten Tumorantigens: GPNMB^{G181D} (*GPNMB^{mutiert}*). Die Mutation führte dazu, dass ein Teil eines ungespleißten Introns Bestandteil der im Tumor entdeckten cDNA war. Ein aus der Exon/Intron-Region kodiertes synthetisches Peptid mit der ausgetauschten Aminosäure wurde von der MLTC deutlich erkannt. Durch RT-PCR-Analysen wurde im MZ7-Melanom, in fast allen getesteten weiteren Melanomen sowie in einem Teil der überprüften Nierenzellkarzinome eine Variante der *GPNMB*-cDNA entdeckt, in der ebenfalls das erwähnte Intron enthalten war, ohne dass die Mutation vorlag (*GPNMB/INT4*). Diese Spleißvariante wurde nicht in EBV-B-Zelllinien und anderen Tumorzelllinien gefunden.

Zusätzlich zu dem bereits zuvor charakterisierten Tumorantigen SIRT2^{P182L} wurden drei weitere T-zellerkannte Antigene im Melanommodell MZ7 identifiziert. T-Zellreaktivität gegen das Antigen GPNMB^{G181D} entwickelte sich, im Gegensatz zu den anderen Antigenen, in allen getesteten MLTCs. Dies spricht für eine immunologische Dominanz des Antigens im Melanommodell MZ7. Die Tatsache, dass das „stärkste“ Antigen mit Hilfe einer MLTC identifiziert wurde, bietet die Aussicht, evtl. weitere dominante Antigene mit dem Verfahren identifizieren zu können. Die Verwendung von kurzzeitstimulierten MLTCs anstelle von permanent kultivierten CTL-Klonen stellt einen ersten Schritt auf dem Weg zur Beschleunigung der Suche nach Tumorantigenen dar. Die Verfahrensbeschleunigung ist die Voraussetzung dafür, in Zukunft Antigene nicht nur in archivierten Modellen zu suchen, sondern in Patienten zu einem frühen Zeitpunkt der malignen Erkrankung. Dann bestünde die Chance, dass die Kenntnis individueller Tumorantigene in immuntherapeutische Konzepte eingeht.

6 Literaturverzeichnis

1. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA: **A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy.** *Nat. Immunol.* 2001, **2**:293-299.
2. Ada G: **The coming of age of tumour immunotherapy.** *Immunol.Cell. Biol.* 1999, **77**:180-185.
3. Rosenberg SA: **Progress in human tumour immunology and immunotherapy.** *Nature* 2001, **411**:380-384.
4. Lurquin C, Van Pel A, Mariame B, De Plaen E, Szikora JP, Janssens C, Reddehase MJ, Lejeune J, Boon T: **Structure of the gene of tum- transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells.** *Cell* 1989, **58**:293-303.
5. Smith C, Cerundolo V: **Immunotherapy of melanoma.** *Immunology* 2001, **104**:1-7.
6. Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G: **A listing of human tumor antigens recognized by T cells.** *Cancer Immunol.Immunother.* 2001, **50**:3-15.
7. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T: **Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.** *Science* 1999, **285**:727-729.
8. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI: **Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells.** *J. Exp. Med.* 2000, **191**:661-668.
9. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T: **Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells.** *Nat. Immunol.* 2001, **2**:255-260.
10. Kelly JM, Darcy PK, Markby JL, Godfrey DI, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ: **Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection.** *Nat.Immunol.* 2002, **3**:83-90.
11. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N: **Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs.** *Nature* 1998, **392**:86-89.
12. Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB: **Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8 $^{+}$ T cells.** *Nat.Immunol.* 2001, **2**:1010-1017.
13. Nelson DJ, Mukherjee S, Bundell C, Fisher S, van Hagen D, Robinson B: **Tumor progression despite efficient tumor antigen cross-presentation and effective "arming" of tumor antigen-specific CTL.** *J.Immunol.* 2001, **166**:5557-5566.
14. Ochsenbein AF, Sierro S, Odermatt B, Pericin M, Karrer U, Hermans J, Hemmi S, Hengartner H, Zinkernagel RM: **Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction.** *Nature* 2001, **411**:1058-1064.

15. Singh-Jasuja H, Toes RE, Spee P, Munz C, Hilf N, Schoenberger SP, Ricciardi-Castagnoli P, Neefjes J, Rammensee HG, Arnold-Schild D, Schild H: **Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis** *J. Exp. Med.* 2000, **191**:1965-1974.
16. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P: **Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells**. *Nat.Med.* 1999, **5**:1249-1255.
17. Gallucci S, Matzinger P: **Danger signals: SOS to the immune system**. *Curr.Opin.Immunol.* 2001, **13**:114-119.
18. Atkins MB, Kunkel L, Sznol M, Rosenberg SA: **High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update**. *Cancer J.Sci.Am.* 2000, **6 Suppl 1**:S11-S14.
19. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B: **Tumor antigens recognized by T cells**. *Immunology Today* 1997, **18**:267-268.
20. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A: **Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions**. *Nature* 1999, **401**:708-712.
21. Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, Rizzardi GP, Fleury S, Lipp M, Forster R, Rowland-Jones S, Sekaly RP, McMichael AJ, Pantaleo G: **Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes** *Nature* 2001, **410**:106-111.
22. Lanzavecchia A, Sallusto F: **Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells**. *Science* 2000, **290**:92-97.
23. Iezzi G, Scheidegger D, Lanzavecchia A: **Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo**. *J. Exp. Med.* 2001, **193**:987-993.
24. Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, von Andrian UH: **Migratory properties of naive, effector, and memory cd8(+) t cells** *J.Exp.Med.* 2001, **194**:953-966.
25. Lanzavecchia A, Sallusto F: **Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination**. *Nat.Immunol.* 2001, **2**:487-492.
26. Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C, McLean A, Rocha B: **Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo**. *Nat.Immunol.* 2000, **1**:47-53.
27. Kam CM, Hudig D, Powers JC: **Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors**. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, **1477**:307-323.
28. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, van Lier RA: **Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells** *J. Exp. Med.* 1997, **186**:1407-1418.
29. Waldmann V, Bock M, Jackel A, Deichmann M, Dockendorff K, Naher H: **[Pathogenesis of malignant melanoma. Molecular biology aspect]**. *Hautarzt* 1999, **50**:398-405.

30. Houghton AN, Gold JS, Blachere NE: **Immunity against cancer: lessons learned from melanoma.** *Curr. Opin. Immunol.* 2001, **13**:134-140.
31. Dunbar PR, Smith CL, Chao D, Salio M, Shepherd D, Mirza F, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Evans A, Russell-Jones R, Harris AL, Cerundolo V: **A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response.** *J. Immunol.* 2000, **165**:6644-6652.
32. Chaux P, Vantomme V, Stroobant V, Thielemans K, Corthals J, Luiten R, Eggermont AM, Boon T, van der Bruggen P: **Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes** *J. Exp. Med.* 1999, **189**:767-778.
33. Jager E, Jager D, Karbach J, Chen YT, Ritter G, Nagata Y, Gnjjatic S, Stockert E, Arand M, Old LJ, Knuth A: **Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma.** *J. Exp. Med.* 2000, **191**:625-630.
34. Wang RF, Wang X, Rosenberg SA: **Identification of a novel major histocompatibility complex class II-restricted tumor antigen resulting from a chromosomal rearrangement recognized by CD4(+) T cells.** *J. Exp. Med.* 1999, **189**:1659-1668.
35. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T: **A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.** *Science* 1991, **254**:1643-1647.
36. Seed B, Aruffo A: **Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1987, **84**:3365-3369.
37. Karttunen J, Sanderson S, Shastri N: **Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1992, **89**:6020-6024.
38. De Plaen E, Lurquin C, Lethe B, van der Bruggen P, Brichard V, Renauld JC, Coulie P, Van Pel A, Boon T: **Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes.** *Methods* 1997, **12**:125-142.
39. Sahin U, Türeci Ö, Pfreundschuh M: **Serological identification of human tumor antigens.** *Current Opinion in Immunology* 1997, **9**:706-716.
40. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ: **A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1997, **94**:1914-1918.
41. Gnjjatic S, Nagata Y, Jager E, Stockert E, Shankara S, Roberts BL, Mazzara GP, Lee SY, Dunbar PR, Dupont B, Cerundolo V, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ: **Strategy for monitoring T cell responses to NY-ESO-1 in patients with any HLA class I allele.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2000, **97**:10917-10922.

42. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CLJ: **Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines.** *Science* 1994, **264**:716-719.
43. Linnemann T, Tumenjargal S, Gellrich S, Wiesmuller K, Kaltoft K, Sterry W, Walden P: **Mimotopes for tumor-specific T lymphocytes in human cancer determined with combinatorial peptide libraries.** *Eur. J. Immunol.* 2001, **31**:156-165.
44. Gundlach BR, Wiesmuller KH, Junt T, Kienle S, Jung G, Walden P: **Determination of T cell epitopes with random peptide libraries.** *J. Immunol. Methods.* 1996, **192**:149-155.
45. Kessler JH, Beekman NJ, S.A., Verdijk P, van Veelen PA, A.M., Vissers DC, ten Bosch GJ, Kester MG, Sijts A, Wouter DJ, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ: **Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis.** *J. Exp. Med.* 2001, **193**:73-88.
46. Lucas S, De Plaen E, Boon T: **MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression.** *Int. J. Cancer* 2000, **87**:55-60.
47. Chaux P, Luiten R, Demotte N, Vantomme V, Stroobant V, Traversari C, Russo V, Schultz E, Cornelis GR, Boon T, van der BP: **Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1.** *J. Immunol.* 1999, **163**:2928-2936.
48. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T: **The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1996, **93**:7149-7153.
49. De Backer O, Arden KC, Boretti M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars CS, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, Van den EB, Boon T, van der BP: **Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis.** *Cancer Res.* 1999, **59**:3157-3165.
50. Jäger E, Chen Y-T, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ, Knuth A: **Simultaneous Humoral and Cellular Immune Response against Cancer-Testis Antigen NY-ESO-1: Definition of Human Histocompatibility Leucocyte Antigen (HLA)-A2-binding Peptide Epitopes.** *J. Exp. Med.* 1998, **187**:265-270.
51. Jager E, Nagata Y, Gnjatich S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jager D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A: **Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2000, **97**:4760-4765.
52. Jager E, Stockert E, Zidianakis Z, Chen YT, Karbach J, Jager D, Arand M, Ritter G, Old LJ, Knuth A: **Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events.** *Int. J. Cancer* 1999, **84**:506-510.
53. Soussi T: **p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review.** *Cancer Res.* 2000, **60**:1777-1788.

54. Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, De Plaen E, Lethe B, Coulie P, Boon T: **The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas.** *J. Exp. Med.* 1993, **178**:489-495.
55. Wölfel T, Van Pel A, Brichard V, Schneider J, Seliger B, Meyer zum Büschenfelde KH, Boon T: **Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes** *Eur.J.Immunol.* 1994, **24**:759-764.
56. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP: **A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas.** *J. Exp. Med.* 1994, **180**:35-42.
57. Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR, Appella E, Rosenberg SA: **Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes** *J. Exp. Med.* 1994, **180**:347-352.
58. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Sakaguchi K, Appella E, Yannelli JR, Adema GJ, Miki T, Rosenberg SA: **Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1994, **91**:6458-6462.
59. Bakker AB, Schreurs MW, de Boer AJ, Kawakami Y, Rosenberg SA, Adema GJ, Figdor CG: **Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes.** *J. Exp. Med.* 1994, **179**:1005-1009.
60. Pittet MJ, Valmori D, Dunbar PR, Speiser DE, Lienard D, Lejeune F, Fleischhauer K, Cerundolo V, Cerottini JC, Romero P: **High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals.** *J. Exp. Med.* 1999, **190**:705-715.
61. Romero P, Gervois N, Schneider J, Escobar P, Valmori D, Pannetier C, Steinle A, Wolfel T, Lienard D, Brichard V, Van Pel A, Jotereau F, Cerottini JC: **Cytolytic T lymphocyte recognition of the immunodominant HLA-A*0201-restricted Melan-A/MART-1 antigenic peptide in melanoma.** *J. Immunol.* 1997, **159**:2366-2374.
62. van der Burg SH, de Cock K, Menon AG, Franken KL, Palmén M, Redeker A, Drijfhout J, Kuppen PJ, van der Vliet A, Erdile L, Tollenaar RA, Melief CJ, Offringa R: **Long lasting p53-specific T cell memory responses in the absence of anti-p53 antibodies in patients with resected primary colorectal cancer.** *Eur. J. Immunol.* 2001, **31**:146-155.
63. Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, Van Baren N, Baurain JF, DeSmet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T, Coulie PG: **Characterization of an Antigen That Is Recognized on a Melanoma Showing Partial HLA Loss by CTL Expressing an NK Inhibitory Receptor.** *Immunity* 1997, **6**:199-208.
64. Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM: **The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes** *Immunity* 1999, **10**:673-679.

65. Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E, DePlaen E, Hankeln T, Meyer zum Büschenfelde KH, Beach D: **A p16INK4a-Insensitive CDK4 Mutant Targeted by Cytolytic T Lymphocytes in Human Melanoma.** *Science* 1995, **269**: 1281-1284.
66. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC: **Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma.** *Nat.Genet.* 1996, **12**:97-99.
67. Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bombled J, Spatz A, Stoppa-Lyonnet D, Benard J, Bressac-de Paillerets B: **Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group.** *Hum.Mol.Genet.* 1998, **7**:209-216.
68. Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P: **A CASP-8 Mutation Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes on a Human Head and Neck Carcinoma.** *J.Exp.Med.* 1997, **186**:785-793.
69. Clark RE, Dodi IA, Hill SC, Lill JR, Aubert G, Macintyre AR, Rojas J, Bourdon A, Bonner PL, Wang L, Christmas SE, Travers PJ, Creaser CS, Rees RC, Madrigal JA: **Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein.** *Blood* 2001, **98**:2887-2893.
70. Yotnda P, Garcia F, Peuchmaur M, Grandchamp B, Duval M, Lemonnier F, Vilmer E, Langlade-Demoyen P: **Cytotoxic T cell response against the chimeric ETV6-AML1 protein in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *J.Clin.Invest.* 1998, **102**:455-462.
71. Schneider J, Brichard V, Boon T, Meyer zum Büschenfelde K, Wolfel T: **Overlapping peptides of melanocyte differentiation antigen Melan-A/MART-1 recognized by autologous cytolytic T lymphocytes in association with HLA-B45.1 and HLA-A2.1.** *Int. J. Cancer* 1998, **75**:451-458.
72. Lemmonier FA, Rebai N, Le Boutellier PP, Malissen B, Caillol DH, Kourilsky FM: **Epitopic Analysis of Detergent-Solubilized HLA Molecules by Solid-Phase Radioimmunoassay.** *Journal of Immunological Methods* 1982, **54**:9-22.
73. Zinszner H, Masset M, Bourge JF, Colombani J, Cohen D, Degos L, Paul P: **Nucleotide sequence of the HLA-A26 class I gene: identification of specific residues and molecular mapping of public HLA class I epitopes.** *Hum. Immunol.* 1990, **27**:155-166.
74. Toubert A, Raffoux C, Boretto J, Sire J, Sodoyer R, Thureau SR, Amor B, Colombani J, Lemonnier FA, Jordan BR: **Epitope mapping of HLA-B27 and HLA-B7 antigens by using intradomain recombinants.** *J. Immunol.* 1988, **141**:2503-2509.
75. Yang SY, Morishima Y, Collins NH, Alton T, Pollack MS, Yunis EJ, Dupont B: **Comparison of One-Dimensional IEF-Patterns for Serologically Detectable HLA-A and B Allotypes** *Immunogenetics* 1984, **19**:217-231.
76. Trapani JA, Mizuno S, Kang SH, Yang SY, Dupont B: **Molecular mapping of a new public HLA class I epitope shared by all HLA-B and HLA-C antigens and defined by a monoclonal antibody.** *Immunogenetics* 1989, **29**:25-32.

77. Berger AE, Davis JE, Cresswell P: **Monoclonal antibody to HLA-A3.** *Hybridoma* 1982, **1**:87-90.
78. Radka SF, Kostyu DD, Amos DB: **A MONOCLONAL ANTIBODY DIRECTED AGAINST THE HLA-Bw6 EPITOPE** *The Journal of Immunology* 1982, **128**:2804-2806.
79. Parham P, Barnstable CJ, Bodmer WF: **Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens.** *J.Immunol.* 1979, **123**:342-349.
80. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A: **Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis** *Cell* 1978, **14**:9-20.
81. Gluzman Y: **SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.** *Cell* 1981, **23**:175-182.
82. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** *J. Gen. Virol.* 1977, **36**:59-74.
83. Lotze MT, Strausser JL, Rosenberg SA: **In vitro growth of cytotoxic human lymphocytes. II. Use of T cell growth factor (TCGF) to clone human T cells.** *J. Immunol.* 1980, **124**:2972-2978.
84. Kozak M: **An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs.** *Nucleic Acids Res.* 1987, **15**:8125-8148.
85. Wölfel T, Herr W, Coulie P, Schmitt U, Meyer zum Büschenfelde KH, Knuth A: **LYSIS OF HUMAN PANCREATIC ADENOCARCINOMA CELLS BY AUTOLOGOUS HLA-CLASS I RESTRICTED CYTOLYTIC T-LYMPHOCYTE (CTL) CLONES.** *Int.J.Cancer* 1993, **54**:636-644.
86. Espevik T, Nissen-Meyer J: **A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/ tumor necrosis factor from human monocytes** *Journal of Immunological Methods* 1986, **95**:99-105.
87. Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O: **Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells.** *J.Immunol.Methods* 1988, **110**:29-36.
88. De Plaen E, Lurquin C, Brichard V, van der Bruggen P, Renauld J-C, Coulie P, Szikora J-P, Wölfel T, Van Pel A, Boon T: **Cloning of genes coding for antigens recognized by cytolytic T lymphocytes** *Immunology Methods Manual* 1997, ISBN 0-12-442712-X:691-718.
89. Aruffo A, Seed B: **Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1987, **84**:8573-8577.
90. Robinson J, Waller MJ, Parham P, Bodmer JG, Marsh SG: **IMGT/HLA Database--a sequence database for the human major histocompatibility complex.** *Nucleic Acids Res.* 2001, **29**:210-213.

91. Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SG: **IMGT/HLA database--a sequence database for the human major histocompatibility complex.** *Tissue Antigens* 2000, **55**:280-287.
92. Frye RA: **Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, **260**:273-279.
93. Scheibenbogen C, Romero P, Rivoltini L, Herr W, Schmittel A, Cerottini JC, Woelfel T, Eggermont AM, Keilholz U: **Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFNgamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial.** *J. Immunol. Methods* 2000, **244**:81-89.
94. Gaudin C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F: **A hsp70-2 mutation recognized by CTL on a human renal cell carcinoma.** *J. Immunol.* 1999, **162**:1730-1738.
95. Heidecker L, Brasseur F, Probst-Kepper M, Gueguen M, Boon T, Van Den Eynde BJ: **Cytolytic T lymphocytes raised against a human bladder carcinoma recognize an antigen encoded by gene MAGE-A12.** *J. Immunol.* 2000, **164**:6041-6045.
96. Castelli C, Tarsini P, Mazzocchi A, Rini F, Rivoltini L, Ravagnani F, Gallino F, Belli F, Parmiani G: **Novel HLA-Cw8-restricted T cell epitopes derived from tyrosinase-related protein-2 and gp100 melanoma antigens.** *J. Immunol.* 1999, **162**:1739-1748.
97. Nakao M, Shichijo S, Imaizumi T, Inoue Y, Matsunaga K, Yamada A, Kikuchi M, Tsuda N, Ohta K, Takamori S, Yamana H, Fujita H, Itoh K: **Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL.** *J. Immunol.* 2000, **164**:2565-2574.
98. Herr W, Schneider J, Lohse AW, Meyer zum Büschenfelde KH, Wölfel T: **Detection and quantification of blood-derived CD8⁺ T lymphocytes secreting tumor necrosis factor α in response to HLA-A2.1-binding melanoma and viral peptide antigens.** *Journal of Immunological Methods* 1996, **191**:131-142.
99. Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM: **Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes** *Blood* 2000, **95**:231-240.
100. Dobrzanski MJ, Reome JB, Dutton RW: **Type 1 and type 2 CD8⁺ effector T cell subpopulations promote long-term tumor immunity and protection to progressively growing tumor.** *J. Immunol.* 2000, **164**:916-925.
101. Morel S, Levy F, Burlet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Kepper M, Peitrequin AL, Monsarrat B, Van Velthoven R, Cerottini JC, Boon T, Gairin JE, Van Den Eynde BJ: **Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells** *Immunity* 2000, **12**:107-117.
102. Weterman MA, Ajubi N, van Dinter IM, Degen WG, van Muijen GN, Ruitter DJ, Bloemers HP: **nmb, a novel gene, is expressed in low-metastatic human melanoma cell lines and xenografts.** *Int. J. Cancer* 1995, **60**:73-81.

103. Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, Sternglanz R: **The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2000, **97**:5807-5811.
104. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W: **Negative Control of p53 by Sir2alpha Promotes Cell Survival under Stress.** *Cell* 2001, **107**:137-148.
105. Tanner KG, Landry J, Sternglanz R, Denu JM: **Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000, **97**:14178-14182.
106. Smith JS, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, Avalos JL, Escalante-Semerena JC, Grubmeyer C, Wolberger C, Boeke JD: **A phylogenetically conserved NAD+-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000, **97**:6658-6663.
107. Vaziri H, Dessain SK, Eaton EN, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA: **hSIR2(SIRT1) Functions as an NAD-Dependent p53 Deacetylase.** *Cell* 2001, **107**:149-159.
108. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA: **Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1994, **91**:3515-3519.
109. Pierce RA, Field ED, den Haan JM, Caldwell JA, White FM, Marto JA, Wang W, Frost LM, Blokland E, Reinhardus C, Shabanowitz J, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH: **Cutting edge: the HLA-A*0101-restricted HY minor histocompatibility antigen originates from DFFRY and contains a cysteinylated cysteine residue as identified by a novel mass spectrometric technique.** *J. Immunol.* 1999, **163**:6360-6364.
110. Pieper R, Christian RE, Gonzales MI, Nishimura MI, Gupta G, Settlage RE, Shabanowitz J, Rosenberg SA, Hunt DF, Topalian SL: **Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells.** *J. Exp. Med.* 1999, **189**:757-766.
111. Schirle M, Keilholz W, Weber B, Gouttefangeas C, Dumrese T, Becker HD, Stevanovic S, Rammensee HG: **Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach.** *Eur.J.Immunol.* 2000, **30**:2216-2225.
112. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bacher OA, Stevanovic S: **SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs.** *Immunogenetics* 1999, **50**:213-219.
113. Tsai V, Southwood S, Sidney J, Sakaguchi K, Kawakami Y, Appella E, Sette A, Celis E: **Identification of subdominant CTL epitopes of the GP100 melanoma-associated tumor antigen by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells.** *J. Immunol.* 1997, **158**:1796-1802.
114. Kawashima I, Tsai V, Southwood S, Takesako K, Celis E, Sette A: **Identification of gp100-derived, melanoma-specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes restricted by HLA-A3 supertype molecules by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells.** *Int. J. Cancer* 1998, **78**:518-524.

115. Fujie T, Tahara K, Tanaka F, Mori M, Takesako K, Akiyoshi T: **A MAGE-1-encoded HLA-A24-binding synthetic peptide induces specific anti-tumor cytotoxic T lymphocytes** *Int. J. Cancer* 1999, **80**:169-172.
116. van der BP, Bastin J, Gajewski T, Coulie PG, Boel P, De Smet C, Traversari C, Townsend A, Boon T: **A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3.** *Eur. J. Immunol.* 1994, **24**:3038-3043.
117. Celis E, Tsai V, Crimi C, DeMars R, Wentworth PA, Chesnut RW, Grey HM, Sette A, Serra HM: **Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1994, **91**:2105-2109.
118. Herman J, van der BP, Luescher IF, Mandruzzato S, Romero P, Thonnard J, Fleischhauer K, Boon T, Coulie PG: **A peptide encoded by the human MAGE3 gene and presented by HLA-B44 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE3.** *Immunogenetics* 1996, **43**:377-383.
119. Tanaka F, Fujie T, Tahara K, Mori M, Takesako K, Sette A, Celis E, Akiyoshi T: **Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes with a MAGE-3-encoded synthetic peptide presented by human leukocytes antigen-A24.** *Cancer Res.* 1997, **57**:4465-4468.
120. Kawashima I, Hudson SJ, Tsai V, Southwood S, Takesako K, Appella E, Sette A, Celis E: **The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors.** *Hum. Immunol.* 1998, **59**:1-14.
121. Kittlesen DJ, Thompson LW, Gulden PH, Skipper JC, Colella TA, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Slingluff CLJ, Shabanowitz JA: **Human melanoma patients recognize an HLA-A1-restricted CTL epitope from tyrosinase containing two cysteine residues: implications for tumor vaccine development.** *J. Immunol.* 1998, **160**:2099-2106.
122. Noppen C, Levy F, Burri L, Zajac P, Remmel E, Schaefer C, Luscher U, Heberer M, Spagnoli GC: **Naturally processed and concealed HLA-A2.1-restricted epitopes from tumor-associated antigen tyrosinase-related protein-2.** *Int. J. Cancer* 2000, **87**:241-246.
123. Parkhurst MR, Fitzgerald EB, Southwood S, Sette A, Rosenberg SA, Kawakami Y: **Identification of a shared HLA-A*0201-restricted Tcell epitope from the melanoma antigen tyrosinase-related protein 2 (TRP2).** *Cancer Res.* 1998, **58**: 4895-4901.
124. Sun Y, Song M, Stevanovic S, Jankowiak C, Paschen A, Rammensee HG, Schadendorf D: **Identification of a new HLA-A(*)0201-restricted Tcell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen.** *Int. J. Cancer* 2000, **87**:399-404.
125. Zaks TZ, Rosenberg SA: **Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors.** *Cancer Res.* 1998, **58**:4902-4908.
126. Van den Eynde B, van der Bruggen P: **T cell defined tumor antigens.** *Current Opinion in Immunology* 1997, **9**:684-693.

127. Nussbaum AK, Kuttler C, Haderl KP, Rammensee HG, Schild H: **PAProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW.** *Immunogenetics* 2001, **53**:87-94.
128. Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Muller J, Schonfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H: **Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products.** *J. Exp. Med.* 2001, **194**:1-12.
129. Mo XY, Cascio P, Lemerise K, Goldberg AL, Rock K: **Distinct proteolytic processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides** *J. Immunol.* 1999, **163**:5851-5859.
130. Serwold T, Gaw S, Shastri N: **ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules.** *Nat. Immunol.* 2001, **2**:644-651.
131. Kawakami Y, Robbins PF, Wang X, Tupesis JP, Parkhurst MR, Kang X, Sakaguchi K, Appella E, Rosenberg SA: **Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles.** *J. Immunol.* 1998, **161**:6985-6992.
132. Probst-Kepper M, Stroobant V, Kridel R, Gaugler B, Landry C, Brasseur F, Cosyns JP, Weynand B, Boon T, Van Den Eynde BJ: **An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes** *J. Exp. Med.* 2001, **193**:1189-1198.
133. Mason D: **A very high level of crossreactivity is an essential feature of the Tcell receptor.** *Immunol Today* 1998, **19**:395-404.
134. Smith ES, Mandokhot A, Evans EE, Mueller L, Borrello MA, Sahasrabudhe DM, Zauderer M: **Lethality-based selection of recombinant genes in mammalian cells: Application to identifying tumor antigens.** *Nat. Med.* 2001, **7**:967-972.
135. Klein L, Kyewski B: **Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor.** *Curr. Opin. Immunol.* 2000, **12**:179-186.
136. Smyth MJ, Sedgwick JD: **Delayed kinetics of tumor necrosis factor-mediated bystander lysis by peptide-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes** *Eur. J. Immunol.* 1998, **28**:4162-4169.
137. Staeger MS, Schneider J, Eulitz M, Scholz S, Bornkamm GW, Wolfel T, Reske-Kunz AB: **Consequences of antigen self-presentation by tumor-specific cytotoxic T cells** *Immunobiology* 2000, **201**:332-346.
138. Yee C, Savage PA, Lee PP, Davis MM, Greenberg PD: **Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers.** *J. Immunol.* 1999, **162**:2227-2234.

139. Palermo B, Campanelli R, Mantovani S, Lantelme E, Manganoni AM, Carella G, Da Prada G, G.R., Romagne F, Gauthier L, Necker A, Giachino C: **Diverse expansion potential and heterogeneous avidity in tumor-associated antigen-specific T lymphocytes from primary melanoma patients.** *Eur. J. Immunol.* 2001, **31**:412-420.
140. Lim DG, Bieganowska BK, Freeman GJ, Hafler DA: **Examination of CD8+ T cell function in humans using MHC class I tetramers: similar cytotoxicity but variable proliferation and cytokine production among different clonal CD8+ T cells specific to a single viral epitope.** *J. Immunol.* 2000, **165**:6214-6220.
141. M.A., Leggatt GR, Sarin A, Berzofsky JA: **Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL.** *J. Exp. Med.* 1996, **184**:485-492.
142. M.A., Leggatt GR, Berzofsky JA: **Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1996, **93**:4102-4107.
143. Derby M, Alexander-Miller M, Tse R, Berzofsky J: **High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL.** *J. Immunol.* 2001, **166**:1690-1697.
144. Herr W, Linn B, Leister N, Wanel E, Meyer zum Büschenfelde KH, Wölfel T: **The use of computer-assisted video image analysis for the quantification of CD8⁺ T lymphocytes producing tumor necrosis factor a spots in response to peptide antigens.** *Journal of Immunological Methods* 1997, **203**:141-152.
145. Herr W, Ranieri E, Gambotto A, Kierstead LS, Amoscato AA, Gesualdo L, Storkus WJ: **Identification of naturally processed and HLA-presented Epstein-Barr virus peptides recognized by CD4(+) or CD8(+) T lymphocytes from human blood.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999, **96**:12033-12038.
146. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD: **IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.** *Nature* 2001, **410**:1107-1111.
147. Street SE, Cretney E, Smyth MJ: **Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis** *Blood* 2001, **97**:192-197.
148. Tannenbaum CS, Hamilton TA: **Immune-inflammatory mechanisms in IFN γ -mediated anti-tumor activity.** *Semin. Cancer Biol.* 2000, **10**:113-123.
149. Prevost-Blondel A, Neuenhahn M, Rawiel M, Pircher H: **Differential requirement of perforin and IFN- γ in CD8 T cell-mediated immune responses against B16.F10 melanoma cells expressing a viral antigen.** *Eur. J. Immunol.* 2000, **30**:2507-2515.
150. Berthou C, Bourge JF, Zhang Y, Soulie A, Geromin D, Denizot Y, Sigaux F, Sasportes M: **Interferon-gamma-induced membrane PAF-receptor expression confers tumor cell susceptibility to NK perforin-dependent lysis** *Blood* 2000, **95**:2329-2336.

151. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD: **Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1998, **95**:7556-7561.
152. Badovinac VP, Corbin GA, Harty JT: **Cutting edge: OFF cycling of TNF production by antigen-specific CD8+ T cells is antigen independent.** *J. Immunol.* 2000, **165**:5387-5391.
153. Slifka MK, Whitton JL: **Functional avidity maturation of CD8+ T cells without selection of higher affinity TCR.** *Nat. Immunol.* 2001, **2**:711-717.
154. Slifka MK, Rodriguez F, Whitton JL: **Rapid on/off cycling of cytokine production by virus-specific CD8+ T cells.** *Nature* 1999, **401**:76-79.
155. de Vries TJ, Fourkour A, Wobbes T, Verkroost G, Ruiter DJ, van Muijen GN: **Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions.** *Cancer Res.* 1997, **57**:3223-3229.
156. de Vries TJ, Smeets M, de Graaf R, Hou-Jensen K, Brocker EB, Renard N, Eggermont AM, van Muijen GN, Ruiter DJ: **Expression of gp100, MART-1, tyrosinase, and S100 in paraffin-embedded primary melanomas and bcoregional, lymph node, and visceral metastases: implications for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC Melanoma Cooperative Group.** *J. Pathol.* 2001, **193**:13-20.
157. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D: **Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells.** *Nat. Med.* 1998, **4**:328-332.
158. Asai T, Storkus WJ, Whiteside TL: **Evaluation of the modified ELISPOT assay for gamma interferon production in cancer patients receiving antitumor vaccines.** *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000, **7**:145-154.
159. Richards JM, Mehta N, Ramming K, Skosey P: **Sequential chemoimmunotherapy in the treatment of metastatic melanoma.** *J Clin. Oncol.* 1992, **10**:1338-1343.
160. Overwijk WW, Lee DS, Surman DR, Irvine KR, Touloukian CE, Chan CC, Carroll MW, Moss B, Rosenberg SA, Restifo NP: **Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999, **96**:2982-2987.
161. Hawkins WG, Gold JS, Dyllal R, Wolchok JD, Hoos A, Bowne WB, Srinivasan R, Houghton AN, Lewis JJ: **Immunization with DNA coding for gp100 results in CD4 T-cell independent antitumor immunity.** *Surgery* 2000, **128**:273-280.
162. Bowne WB, Srinivasan R, Wolchok JD, Hawkins WG, Blachere NE, Dyllal R, Lewis JJ, Houghton AN: **Coupling and uncoupling of tumor immunity and autoimmunity.** *J. Exp. Med.* 1999, **190**:1717-1722.
163. Colella TA, Bullock TN, Russell LB, Mullins DW, Overwijk WW, Luckey CJ, Pierce RA, Restifo NP, Engelhard VH: **Self-tolerance to the murine homologue of a tyrosinase-derived melanoma antigen: implications for tumor immunotherapy.** *J. Exp. Med.* 2000, **191**:1221-1232.

164. Bronte V, Apolloni E, Ronca R, Zamboni P, Overwijk WW, Surman DR, Restifo NP, Zanovello P: **Genetic vaccination with "self" tyrosinase-related protein 2 causes melanoma eradication but not vitiligo.** *Cancer Res.* 2000, **60**:253-258.
165. Palermo B, Campanelli R, Garbelli S, Mantovani S, Lantelme E, Brazzelli V, Ardigo M, Borroni G, Martinetti M, Badulli C, Necker A, Giachino C: **Specific cytotoxic T lymphocyte responses against Melan-A/MART1, tyrosinase and gp100 in vitiligo by the use of major histocompatibility complex/peptide tetramers: the role of cellular immunity in the etiopathogenesis of vitiligo.** *J. Invest. Dermatol.* 2001, **117**:326-332.
166. Yee C, Thompson JA, Roche P, Byrd DR, Lee PP, Piepkorn M, Kenyon K, Davis MM, Riddell SR, Greenberg PD: **Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo.** *J. Exp. Med.* 2000, **192**:1637-1644.
167. Castelli C, Mazzocchi A, Rini F, Tarsini P, Rivoltini L, Maio M, Gallino G, Belli F, Parmiani G: **Immunogenicity of the ALLAVGATK (gp100[17-25]) peptide in HLA-A3.1 melanoma patients.** *Eur. J. Immunol.* 1998, **28**:1143-1154.
168. Riley JP, Rosenberg SA, Parkhurst MR: **Identification of a New Shared HLA-A2.1 Restricted Epitope From the Melanoma Antigen Tyrosinase.** *J. Immunother.* 2001, **24**:212-220.
169. Kang X, Kawakami Y, El-Gamil M, Wang R, Sakaguchi K, Yannelli JR, Appella E, Rosenberg SA, Robbins PF: **Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A24-restricted, tumor-infiltrating lymphocytes** *J. Immunol.* 1995, **155**:1343-1348.
170. Morel S, Ooms A, Van Pel A, Wolfel T, Brichard VG, van der Bruggen P, Van Den Eynde BJ, Degiovanni G: **A tyrosinase peptide presented by HLA-B35 is recognized on a human melanoma by autologous cytotoxic T lymphocytes** *Int. J. Cancer* 1999, **83**:755-759.
171. Brichard VG, Herman J, Van Pel A, Wildmann C, Gaugler B, Wolfel T, Boon T, Lethe B: **A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes** *Eur. J. Immunol.* 1996, **26**:224-230.
172. Slingluff CL: **Targeting unique tumor antigens and modulating the cytokine environment may improve immunotherapy for tumors with immune escape mechanisms** *Cancer Immunol. Immunother.* 1999, **48**:371-373.
173. Shichijo S, Nakao M, Imai Y, Takasu H, Kawamoto M, Niiya F, Yang D, Toh Y, Yamana H, Itoh K: **A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes** *J. Exp. Med.* 1998, **187**:277-288.
174. Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Bourlond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De Greve J, Atzpodien J, Bresseur F, Coulie PG, van der Bruggen P, Boon T: **Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1.** *Int. J. Cancer* 1999, **80**:219-230.
175. Sette A, Chesnut R, Fikes J: **HLA expression in cancer: implications for T cell-based immunotherapy.** *Immunogenetics* 2001, **53**:255-263.

176. Slingluff CLJ, Colella TA, Thompson L, Graham DD, Skipper JC, Caldwell J, Brinckerhoff L, Kittlesen DJ, Deacon DH, Oei C, Harthun NL, Huczko EL, Hunt DF, Darrow TL, Engelhard VH: **Melanomas with concordant loss of multiple melanocytic differentiation proteins: immune escape that may be overcome by targeting unique or undefined antigens.** *Cancer Immunol. Immunother.* 2000, **48**:661-672.
177. Brandle D, Brasseur F, Weynants P, Boon T, Van den Eynde B: **A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma.** *J. Exp. Med.* 1996, **183**:2501-2508.
178. Lupetti R, Pisarra P, Verrecchia A, Farina C, Nicolini G, Anichini A, Bordignon C, Sensi M, Parmiani G, Traversari C: **Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP) 2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage.** *J. Exp. Med.* 1998, **188**:1005-1016.
179. Gricks CS, Rawlings E, Foroni L, Madrigal JA, Amlot PL: **Somatically mutated regions of immunoglobulin on human B-cell lymphomas code for peptides that bind to autologous major histocompatibility complex class I, providing a potential target for cytotoxic T cells.** *Cancer Res.* 2001, **61**:5145-5152.
180. Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Fitzgerald EB, Kawakami Y, Rosenberg SA: **The intronic region of an incompletely spliced gp100 gene transcript encodes an epitope recognized by melanoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes** *J. Immunol.* 1997, **159**:303-308.
181. Malarkannan S, Horng T, Shih PP, Schwab S, Shastri N: **Presentation of out-of-frame peptide/MHC class I complexes by a novel translation initiation mechanism.** *Immunity* 1999, **10**:681-690.
182. Ronsin C, Chung-Scott V, Poullion I, Aknouche N, Gaudin C, Triebel F: **A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ.** *J. Immunol.* 1999, **163**:483-490.
183. Malarkannan S, Afkarian M, Shastri N: **A rare cryptic translation product is presented by Kb major histocompatibility complex class I molecule to alloreactive T cells.** *J. Exp. Med.* 1995, **182**:1739-1750.
184. Moreau-Aubry A, Le Guiner S, Labarriere N, Gesnel MC, Jotereau F, Breathnach R: **A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma.** *J. Exp. Med.* 2000, **191**:1617-1624.
185. Van Den Eynde BJ, Gaugler B, Probst-Kepper M, Michaux L, Devuyst O, Lorge F, Weynants P, Boon T: **A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription.** *J. Exp. Med.* 1999, **190**:1793-1800.
186. Harland M, Holland EA, Ghiorzo P, Mantelli M, Bianchi-Scarra G, Goldstein AM, Tucker MA, Ponder BA, Mann GJ, Bishop DT, Newton BJ: **Mutation screening of the CDKN2A promoter in melanoma families.** *Genes Chromosomes.Cancer* 2000, **28**:45-57.

187. Matsumura Y, Nishigori C, Yagi T, Imamura S, Takebe H: **Mutations of p16 and p15 tumor suppressor genes and replication errors contribute independently to the pathogenesis of sporadic malignant melanoma.** *Arch. Dermatol. Res.* 1998, **290**:175-180.
188. Bataille V: **Genetics of familial and sporadic melanoma.** *Clin. Exp. Dermatol.* 2000, **25**:464-470.
189. Fang D, Setaluri V: **Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, **279**:53-61.
190. Ge K, DuHadaway J, Du W, Herlyn M, Rodeck U, Prendergast GC: **Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999, **96**:9689-9694.
191. Klein L, Kyewski B: **"Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity?** *J. Mol. Med.* 2000, **78**:483-494.
192. Taams LS, van Rensen AJ, Poelen MC, van Els CA, Besseling AC, Wagenaar JP, van Eden W, Wauben MH: **Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen-presenting cell.** *Eur.J.Immunol.* 1998, **28**:2902-2912.
193. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LDJ: **DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells.** *Nat. Med.* 1996, **2**:1122-1128.
194. Mitchell DA, Nair SK: **RNA transfected dendritic cells as cancer vaccines** *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2000, **2**:176-181.
195. Nair SK, Boczkowski D, Morse M, Cumming RI, Lyerly HK, Gilboa E: **Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA.** *Nat. Biotechnol.* 1998, **16**:364-369.
196. Heiser A, Dahm P, Yancey DR, Maurice MA, Boczkowski D, Nair SK, Gilboa E, Vieweg J: **Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro.** *J. Immunol.* 2000, **164**:5508-5514.
197. Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, Majumdar A, Naoe M, Lebkowski JS, Vieweg J, Gilboa E: **Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells.** *Nat. Med.* 2000, **6**:1011-1017.
198. Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Wu NZ, Dahm P, Pruitt SK, Boczkowski D, Nair SK, Ballo MS, Gilboa E, Vieweg J: **Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA.** *J. Immunol.* 2001, **166**:2953-2960.
199. Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Coleman DM, Dahm P, Vieweg J: **Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors.** *Cancer Res.* 2001, **61**:3388-3393.
200. Kurokawa T, Oelke M, Mackensen A: **Induction and clonal expansion of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from renal cell carcinoma patients after stimulation with autologous dendritic cells loaded with tumor cells.** *Int. J. Cancer* 2001, **91**:749-756.

201. Coulon V, Ravaud A, Gaston R, Delaunay M, Pariente JL, Verdier D, Scrivante V, Gualde N: **In vitro immunization of patient T cells with autologous bone marrow antigen presenting cells pulsed with tumor lysates** *Int. J. Cancer* 2000, **88**:783-790.
202. Strobel I, Berchtold S, Gotze A, Schulze U, Schuler G, Steinkasserer A: **Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes** *Gene Ther.* 2000, **7**:2028-2035.
203. Bettinotti MP, Kim CJ, Lee KH, Roden M, Cormier JN, Panelli M, Parker KK, Marincola FM: **Stringent allele/epitope requirements for MART-1/Melan A immunodominance: implications for peptide-based immunotherapy.** *J. Immunol.* 1998, **161**:877-889.
204. Perreault C, Roy DC, Fortin C: **Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones.** *Immunol. Today* 1998, **19**:69-74.
205. Brickner AG, Warren EH, Caldwell JA, Akatsuka Y, Golovina TN, Zarling AL, Shabanowitz J, Eisenlohr LC, Hunt DF, Engelhard VH, Riddell SR: **The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing.** *J. Exp. Med.* 2001, **193**:195-206.
206. Pierce RA, Field ED, Mutis T, Golovina TN, Kap-Herr C, Wilke M, Pool J, Shabanowitz J, Pettenati MJ, Eisenlohr LC, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH: **The HA-2 minor histocompatibility antigen is derived from a diallelic gene encoding a novel human class I myosin protein.** *J. Immunol.* 2001, **167**:3223-3230.
207. Kawakami Y, Wang X, Shofuda T, Sumimoto H, Tupesis J, Fitzgerald E, Rosenberg S: **Isolation of a new melanoma antigen, MART-2, containing a mutated epitope recognized by autologous tumor-infiltrating T lymphocytes** *J. Immunol.* 2001, **166**:2871-2877.
208. den Haan JM, Meadows LM, Wang W, Pool J, Blokland E, Bishop TL, Reinhardus C, Shabanowitz J, Offringa R, Hunt DF, Engelhard VH, Goulmy E: **The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism.** *Science* 1998, **279**:1054-1057.
209. Yewdell JW, Bennink JR: **Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses** *Annu. Rev. Immunol.* 1999, **17**:51-88.
210. Pion S, Christianson GJ, Fontaine P, Roopenian DC, Perreault C: **Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens.** *Blood* 1999, **93**:952-962.
211. Deng Y, Yewdell JW, Eisenlohr LC, Bennink JR: **MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL.** *J. Immunol.* 1997, **158**:1507-1515.
212. Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdell JW, Bennink JR: **Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens.** *J. Exp. Med.* 2001, **193**: 1319-1326.

213. Mo AX, van Lelyveld SF, Craiu A, Rock KL: **Sequences that flank subdominant and cryptic epitopes influence the proteolytic generation of MHC class I-presented peptides.** *J. Immunol.* 2000, **164**:4003-4010.
214. Sandberg JK, Grufman P, Wolpert EZ, Franksson L, Chambers BJ, Karre K: **Superdominance among immunodominant H2Kb-restricted epitopes and reversal by dendritic cell-mediated antigen delivery.** *J. Immunol.* 1998, **160**:3163-3169.
215. Belz GT, Stevenson PG, Doherty PC: **Contemporary analysis of MHC-related immunodominance hierarchies in the CD8+ T cell response to influenza A viruses.** *J. Immunol.* 2000, **165**:2404-2409.
216. Crotzer VL, Christian RE, Brooks JM, Shabanowitz J, Settlage RE, Marto JA, White FM, Rickinson AB, Hunt DF, Engelhard VH: **Immunodominance among EBV-derived epitopes restricted by HLA-B27 does not correlate with epitope abundance in EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines.** *J. Immunol.* 2000, **164**:6120-6129.
217. Busch DH, Pamer EG: **MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL.** *J. Immunol.* 1998, **160**:4441-4448.
218. Sherritt MA, Gardner J, Elliott SL, Schmidt C, Purdie D, Deliyannis G, Heath WR, Suhrbier A: **Effect of pre-existing cytotoxic T lymphocytes on therapeutic vaccines.** *Eur. J. Immunol.* 2000, **30**:671-677.
219. Roy-Proulx G, Meunier MC, Lantaigne AM, Brochu S, Perreault C: **Immunodomination results from functional differences between competing CTL.** *Eur. J. Immunol.* 2001, **31**:2284-2292.
220. Wolpert EZ, Grufman P, Sandberg JK, Tegnesjo A, Karre K: **Immunodominance in the CTL response against minor histocompatibility antigens: interference between responding T cells, rather than with presentation of epitopes.** *J. Immunol.* 1998, **161**:4499-4505.
221. Weidt G, Utermohlen O, Heukeshoven J, Lehmann-Grube F, Deppert W: **Relationship among immunodominance of single CD8+ T cell epitopes, virus load, and kinetics of primary antiviral CTL response.** *J. Immunol.* 1998, **160**:2923-2931.
222. Ishikawa T, Kono D, Chung J, Fowler P, Theofilopoulos A, Kakumu S, Chisari FV: **Polyclonality and multispecificity of the CTL response to a single viral epitope.** *J. Immunol.* 1998, **161**:5842-5850.
223. Zeh HJ, III, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC: **High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy.** *J. Immunol.* 1999, **162**:989-994.
224. Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Berzofsky JA: **Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996, **93**:4102-4107.
225. Goldrath AW, Bevan MJ: **Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire.** *Nature* 1999, **402**:255-262.

226. Sprent J, Surh CD: **Generation and maintenance of memory T cells** *Curr.Opin.Immunol.* 2001, **13**:248-254.
227. Alexander-Miller MA, Derby MA, Sarin A, Henkart PA, Berzofsky JA: **Supraoptimal peptide-major histocompatibility complex causes a decrease in bc1-2 levels and allows tumor necrosis factor alpha receptor II-mediated apoptosis of cytotoxic T lymphocytes** *J.Exp.Med.* 1998, **188**:1391-1399.
228. de Saint BG, Fischer A: **The role of cytotoxicity in lymphocyte homeostasis** *Curr.Opin.Immunol.* 2001, **13**:549-554.
229. Kagi D, Odermatt B, Mak TW: **Homeostatic regulation of CD8+ T cells by perforin.** *Eur.J.Immunol.* 1999, **29**:3262-3272.
230. Badovinac VP, Tvinnereim AR, Harty JT: **Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma.** *Science* 2000, **290**:1354-1358.
231. Mixer PF, Russell JQ, Morrissette GJ, Charland C, Aleman-Hoey D, Budd RC: **A model for the origin of TCR-alpha-beta+ CD4-CD8- B220+ cells based on high affinity TCR signals** *J.Immunol.* 1999, **162**:5747-5756.
232. Barclay AN, Brown MH, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG, van der Merwe PA. *The Leucocyte Antigen Facts Book.* 1997. Harcourt Brace & Company. Ref Type: Generic
233. Dai Z, Konieczny BT, Lakkis FG: **The dual role of IL-2 in the generation and maintenance of CD8+ memory T cells.** *J.Immunol.* 2000, **165**:3031-3036.
234. Kobayashi H, Kokubo T, Sato K, Kimura S, Asano K, Takahashi H, Iizuka H, Miyokawa N, Katagiri M: **CD4+ T cells from peripheral blood of a melanoma patient recognize peptides derived from nonmutated tyrosinase.** *Cancer Res.* 1998, **58**:296-301.
235. Wang RF, Wang X, Atwood AC, Topalian SL, Rosenberg SA: **Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen.** *Science* 1999, **284**:1351-1354.
236. Matsui S, Ahlers JD, Vortmeyer AO, Terabe M, Tsukui T, Carbone DP, Liotta LA, Berzofsky JA: **A model for CD8+ CTL tumor immunosurveillance and regulation of tumor escape by CD4 T cells through an effect on quality of CTL.** *J.Immunol.* 1999, **163**:184-193.
237. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH: **Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood.** *J. Exp. Med.* 2001, **193**:1285-1294.
238. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature reviews online publication*,118-129. 2001. Ref Type: Generic
239. Minev BR, Chavez FL, Dudouet BM, Mitchell MS: **Synthetic insertion signal sequences enhance MHC class I presentation of a peptide from the melanoma antigen MART-1.** *Eur J. Immunol.* 2000, **30**:2115-2124.

240. Srivastava PK: **Immunotherapy of human cancer: lessons from mice.** *Nat. Immunol.* 2000, **1**:363-366.
241. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Najj A, Caton AJ: **Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide.** *Nat.Immunol.* 2001, **2**:301-306.
242. McHugh RS, Shevach EM, Thornton AM: **Control of organ-specific autoimmunity by immunoregulatory CD4(+)/CD25(+) T cells.** *Microbes.Infect.* 2001, **3**: 919-927.
243. Gorelik L, Flavell RA: **Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells.** *Nat.Med.* 2001, **7**:1118-1122.
244. Pawelec G: **Progress in vaccination against cancer.** *Trends Mol.Med.* 2001, **7**:486-487.

7 Anhang

Anhang 1: gp100

MDLVLKRCLLHLAVIGALLAVGATKVP RNQDWLGVSRQLRTKAWN RQLYPEWTEAQR LDC
 WRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFP GSQKVLDPDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQP V
 YPQETDDACIFPDGGPCPSGSWSQKR SFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAMLG
 THTMEVTVYHRRGSR SYVPLAHSSSAFTITDQVPFSVSVSQLRALDGG NKHFLRNQPLTF
 ALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISR ALVVHTHTYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCG
 SSPVPGTTDGH RPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTT PGQAPTAEPSTTSVQVPTTEVISTAP
 VQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWV
 ETTARELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSLG PLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTL
 DIVQGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGG **LPKEACMEISSPGCQPPAQRLCQPVLP**
SPACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPLIVGILLV
 LMAVVLASLIYRRRLMKQDFSV PQLPHSSSHWLRLPRIFCSCPIGENSPLL SGQQV

Aminosäuresequenz von gp100 und Position des immunogenen Peptids. Hervorgehoben wurde die durch die Transfektion von gp100-cDNA-Fragmenten ermittelte peptidkodierende Region. Das von den T-Zellen erkannte, über HLA-B7.2 präsentierte Peptid ist unterstrichen.

Anhang 2: Tyrosinase

MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDRSPCGQLSGRGSCQNILL
SNAPLGP**QFPFTGVDDRESWPSVFYNRTC****QC****SGNFMGF****NCGNCKFGFWGPNCTE**
RRLLVRRNIFDLSAPEKDKFFAYLTLAKHTISSDYVIPIGTYGQMKNGSTPMFNDINIYDLFV
WMHYYVSMDALLGGSEIWRDIDFAHEAPAFLPWHRFLLRWEQEIQKLTGDENFTIPYWDW
RDAEKCDICTDEYMGGQHPTNPNULLSPASFFSSWQIVCSRLEEYNHQSLCNGTPEGPLRR
NPGNHDKSRTPLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDKAANFSFRNTLEGFASPLTGIADASQS
SMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLLHHAFVDSIFEQWLRRHRPLQEVEPEANAPIGHN
RESYMVPFIPLYRNGDFFISSKDLGYDYSYLQSDPDSFQDYIKSYLEQASRIWSWLLGAAM
VGAVLTALLAGLVSLLCRHKRKQLPEEKQPLLMEKEDYHSLYQSHL

Aminosäuresequenz von Tyrosinase und Position des immunogenen Peptids. Hervorgehoben wurde die durch die Transfektion von Tyrosinase-cDNA-Fragmenten ermittelte peptidkodierende Region. Das von den T-Zellen erkannte, über HLA-A26.1 präsentierte Peptid ist unterstrichen.

Anhang 3: *GPMB*^{mutiert} (cDNA-Klon 656.14.A6)

ATGGAATGTCTCTACTATTTTCTGGGATTTCTGCTCCTGGCTGCAAGATTGCCACTTGATGCCGCCAAA
 M E C L Y Y F L G F L L L A A R L P L D A A K
 CGATTTTCATGATGTGCTGGGCAATGAAAGACCTTCTGCTTACATGAGGGAGCACAATCAATTAATGGC
 R F H D V L G N E R P S A Y M R E H N Q L N G
 TGGTCTTCTGATGAAAACTGACTGGAATGAAAACTCTACCCAGTGTGGAAGCGGGGAGACATGAGGTGG
 W S S D E N D W N E K L Y P V W K R G D M R W
 AAAAATCCTGGAAGGGAGGCCGTGTGCAGGCGGTCTGACCAGTGACTCACCAGCCCTCGTGGGCTCA
 K N S W K G G R V Q A V L T S D S P A L V G S
 AATAAACATTTGCGGTGAACCTGATATTCCCTAGATGCCAAAAGGAAGATGCCAATGGCAACATAGTC
 N I T F A V N L I F P R C Q K E D A N G N I V
 TATGAGAAGAACTGCAGAAATGAGGCTGGTTTATCTGCTGATCCGTATGTTTACAACCTGGACAGCATGG
 Y E K N C R N E A G L S A D P Y V Y N W T A W
 TCAGAGGACAGTGACGGGGAAAATGGCACCGGCCAAAGCCATCATAACGTCTTCCCTGATGGGAAACCT
 Y E K N C R N E A G L S A D P Y V Y N W T A W
 TTTCTCACCCACCCCGGATGGAGAAGATGGAATTTTCATCTACGTCTTCCACACACTTGATTGGCTTTTA
 F P H H P G W R R W N F I Y V F H T L [▲] D W L L
 CAAACCCCTAAGCTTCTTCTTTACCTTCTTAAAATTTCAACCTTCTTTTTCTTACTCTATAAATGA
Q T P K L L L Y L S L K F Q P S L F L L Y N .
 GAATGATAACACAGAGAGTTAATAACAGTCACCCTGCTAACTTTCCTTAGCATGAGTGAACAGTGAGAG
 ATAAAAATGAAATCTTGGTTAACCTTGCCAAATCTCCAGGACACCGAAGAGTTAAAAAGAGAGAAAAAC
 AAAAAGATTAAGCTCTTTTTCAAAAAACAAAACCACTTAATTTTTTTCTACCTAAAACCATAACAAGA
 AAAAATGCTAACACTTATTTATTTGAATGGCACATGGAGACCGGGCATGTGGCTCACACTTGTAATCCC
 AGCACCTTGGAAAGCGGAGGCGGGTGGATCACCTGAAGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAACATG
 GTGAAGTCCCGTCCCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGGTGTGGTGGTGCACCTGTAATCCCAGC
 TACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAATCCGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGAGGAGATTGA
 GCCATTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGTGAGACTCCATCTCGAAAAACAAACAAACAAAAAAC
 AGAATGGCACATGATGAGCATTCATTGATTGATTCTTTAGTTTTTTTATGTTCTCTAAAGAATTTTTA
 AGATTTAAGAAGCATGTGCTATTTATTTGTAGGAAATCCTCAGAAAAGGTACA (AATAAA) A (AATAA
 A) AATTATCCATAATTAATACCAGAGATTATAAATGTTAATTATTATGGTGTCTTCTTGTAGTATTT
 AAGATCATTATTAAGATCACATACACATTTTTGCTTACTATCATTAGCATTGATGATATGATTTTTTT
 AATTTTTATACATTGTTTTAATGGCTGCACGATATTTATTGTGTACAAATAAAATACTACTGTTCC
 GCTTTGGTTCGACGCGCCGC

Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *GPMB*^{mutiert} und Position des immunogenen Peptids. Das von den T-Zellen über HLA-A3.1 erkannte Peptid ist unterstrichen. Die Mutation ist unterhalb durch einen (▲) gekennzeichnet. Die *GPMB/INT4*-Spleißvariante enthält ein G an der durch den Pfeil gekennzeichneten Position. Der Anteil der Intron 4-Sequenz an dem cDNA-Klon beginnt mit der Mutation und ist kursiv dargestellt. Zwei Polyadenylierungs-Signalsequenzen sind in Klammern gesetzt. Das unterstrichene G-Nukleotid in Zeile sechs ist in einem homologen Datenbank-cDNA-Klon (BC011595.1) durch ein A ausgetauscht.

8 Abkürzungsverzeichnis

APC	antigenpräsentierende Zelle
bp	Basenpaare
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'Desoxynukleosid-5'-triphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISPOT-Assay	<i>enzyme-linked immunosorbent spot assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FCS	fötales Kälberserum
gp100	Glykoprotein 100
GPNMB	(Transmembran-) Glykoprotein NMB
GPNMB ^{G181D}	GPNMB, an Pos. 181 wurde Glycin durch Asparaginsäure ersetzt
<i>GPNMB/INT4</i>	<i>GPNMB</i> -Spleißvariante mit enthaltenem Intron 4-Anteil
<i>GPNMB^{mutiert}</i>	punktmutiertes <i>GPNMB</i> -Allel
GrB	„Granzyme B“
HLA	humanes Leukozytenantigen
<i>HLA*XX.YY</i>	auf DNA-Ebene: X=Allel; Y=Subtyp
HLAX:Y	auf Proteinebene: X=Allel; Y=Subtyp
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IL	Interleukin
IFN	Interferon
Kb	Kilobasen
M	Molarität
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>

MLTC	<i>mixed lymphocyte/tumor-cellculture</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
ORF	<i>open reading frame</i>
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	<i>reverse transcriptase</i>
SIRT2	<i>silent information regulator (like)2 (sirtuin)</i>
SIRT2 ^{P182L}	SIRT2, an Position 182 wurde Prolin durch Leucin ersetzt
SV 40	<i>simian virus 40</i>
TAP	<i>transporter associated with antigen presentation</i>
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Volker Lennerz