

Generierung und Charakterisierung von spezifischen T-Zell-Antworten gegen Pilz- und Tumorantigene

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Dominik Maurer
aus Tübingen
vorgelegte
DISSERTATION
2008

Tag der mündlichen Prüfung

12.12.2008

Dekan: Professor Dr. Hanspeter Mallot

1. Berichterstatter: Professor Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter: Professor Dr. Hans-Georg Rammensee

meiner Familie

1	<u>ALLGEMEINE EINFÜHRUNG</u>	7
1.1	DAS IMMUNSYSTEM	8
1.2	MHC-MOLEKÜLE UND ANTIGENPROZESSIERUNG	11
1.2.1	MHC-I	12
1.2.2	MHC-II	15
1.3	T-ZELLPOPULATIONEN	17
1.3.1	DER T-ZELLREZEPTOR	18
1.3.2	KOREZEPTOREN	22
1.3.3	ENTWICKLUNG, SELEKTION UND HOMÖOSTASE NAIVER T-ZELLEN	23
1.4	T-ZELLEN UND ANTIGENERKENNUNG	26
1.4.1	TCR-SIGNALTRANSDUKTION	26
1.4.2	ERSTER ANTIGENKONTAKT DER T-ZELLE	26
1.4.3	T-ZELLAVIDITÄT	29
1.4.4	T-ZELL-KOMPETITION	30
1.4.5	ZYTOTOXISCHES T-ZELLGEDÄCHTNIS	31
1.4.6	MECHANISMEN DER TOLERANZ	33
1.5	DAS IMMUNSYSTEM UND TUMORERKRANKUNGEN	36
1.5.1	TUMORANTIGENE	36
1.5.2	<i>TUMORESCAPE</i> -MECHANISMEN	38
1.6	TUMOR-ASSOZIIERTE ANTIGENE	39
1.6.1	SPAG4 (HUMAN SPERM ASSOCIATED ANTIGEN 4)	39
1.6.2	VEGF (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A)	41
1.7	RELEVANTE PATHOGENE BEI IMMUNSUPPRIMIERTEN	45
1.7.1	ASPERGILLUS FUMIGATUS	45
1.8	THEORIE DER VERWENDETEN METHODEN	48
1.8.1	ISOLIERUNG VON PBMCS	48
1.8.2	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	48
1.8.3	NACHWEIS VON ANTIGENSPEZIFISCHEN T-ZELLEN	51
1.8.4	SYNTHESE VON MHC-I-TETRAMEREN	57
1.8.5	<i>IN VITRO</i> STIMULATION VON ANTIGENSPEZIFISCHEN T-ZELLEN	60
1.9	ZIELSETZUNG DER DOKTORARBEIT	64
2	<u>MATERIALIEN UND METHODEN</u>	66
2.1	MATERIALIEN	66
2.1.1	VERBRAUCHSMATERIALIEN	66
2.1.2	GERÄTE	66
2.1.3	PUFFER UND LÖSUNGEN	68
2.1.4	PEPTIDE	69
2.2	METHODEN	73
2.2.1	WERKZEUGE ZUR ARBEIT MIT ANTIGENSPEZIFISCHEN ZELLEN	73
2.2.2	ZELLKULTUR	81
2.2.3	ANALYSE ANTIGENSPEZIFISCHER T-ZELLEN	92

3	<u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	106
3.1	SPAG4	106
3.1.1	SPAG4-EPITOPVORHERSAGE	106
3.1.2	HERSTELLUNG VON PEPTID/MHC-KOMPLEXEN	108
3.1.3	DIE CD8 ⁺ T-ZELL-GEWINNUNG	108
3.1.4	<i>IN VITRO</i> GENERIERUNG VON SPAG4-SPEZIFISCHEN CD8 ⁺ T-ZELLEN	109
3.1.5	FUNKTIONALE ANALYSEN DER SPAG4-SPEZIFISCHEN CD8 ⁺ T-ZELLEN.	113
3.2	VEGF	128
3.2.1	HERSTELLUNG VON PEPTID/MHC-KOMPLEXEN	128
3.2.2	DIE CD8 ⁺ T-ZELL-GEWINNUNG	128
3.2.3	<i>IN VITRO</i> GENERIERUNG VON SRFGGAVVR-SPEZIFISCHEN CD8 ⁺ T-ZELLEN	129
3.2.4	FUNKTIONALE ANALYSEN DER SRFGGAVVR-SPEZIFISCHEN CD8 ⁺ T-ZELLEN.	134
3.3	ASPERGILLUS FUMIGATUS	141
3.3.1	AUSWAHL DER ANTIGENE	141
3.3.2	IMMUNOGENITÄTSANALYSE DER GEPOOLTEN PEPTIDE	143
3.3.3	IMMUNOGENITÄTSANALYSE EINZELNER PEPTIDE.	149
3.3.4	POLYFUNKTIONALE CHARAKTERISIERUNG DER IDENTIFIZIERTEN T-ZELL-EPITOPE	151
4	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	162
5	<u>SUMMARY</u>	163
6	<u>APPENDIX</u>	164
6.1	ABKÜRZUNGEN	164
6.2	REFERENZEN	167
6.3	DANKSAGUNG	207
6.4	LEBENS LAUF	209

1 Allgemeine Einführung

Die Immuntherapie ist eine der potentiellen Behandlungsformen bei Krebs und Infektionen in immunsupprimierten Patienten. Dabei soll die immunologische Abwehr als Waffe gegen den Krebs oder Infektionen benutzt werden. Schon Paul Ehrlich nahm an, dass Krebszellen vom Immunsystem eliminiert werden können. Dies ist der Grundgedanke für die Immunosurveillance-Theorie, die besagt, dass die im Körper laufend entstehenden Krebszellen eigentlich durch das Immunsystem angegriffen und zerstört werden. Bei Versagen des Immunsystems, zum Beispiel weil es „abgelenkt“ durch eine Virusinfektion war, entsteht Krebs. Der Krebs wird vom Immunsystem durch diverse Erkennungsmechanismen, deren Änderungen in oder auf Krebszellen im Vergleich zu Normalzellen zugrunde liegen, erkannt. Dies macht sich die Immuntherapie mit T-Zellen zu nutze. T-Zellen sind in der Lage tumor- oder pathogenspezifische Proteinfragmente aus dem Zellinnern zu erkennen. Die HLA-Moleküle zeigen diese veränderten Proteinfragmente auf der Oberfläche von pathogenbefallenen Zellen und Krebszellen. Nachdem ein solches spezifisches Proteinfragment (Peptid) als mögliches Epitop durch massenspektrometrische Verfahren und/oder Genexpressionsanalysen mit anschließender Epitopvorhersage identifiziert und *in vitro* eine spezifische sowie funktionale T-Zellreaktion ausgelöst werden konnte, gibt es die Möglichkeit dieses Proteinfragment dem Patienten direkt als peptidbasierte Vakzine zu impfen. Auch eine *in vitro* Aktivierung und Expansion von autologen T-Zellen, die dieses Epitop erkennen, mit anschließender Zurückführung in den Patienten (adoptiver Transfer) ist möglich.

1.1 Das Immunsystem

Der Mensch ist in seiner Umwelt unzähligen Krankheitserregern (Pathogenen), die seine Gesundheit gefährden, ausgesetzt - dazu gehören Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Unerlässliche Voraussetzung für das Überleben ist ein effektives Abwehrsystem, das eine Besiedlung und Schädigung des Körpers durch Pathogene verhindert.

Die Gesamtheit der Abwehrmechanismen wird als Immunsystem bezeichnet. Das Immunsystem besteht aus humoralen und zellulären Komponenten; dabei versteht man unter humoralen Faktoren lösliche Proteine wie z.B. Antikörper.

Zentrale Organe des Immunsystems sind das Knochenmark, in dem alle Vorläufer von Immunzellen entstehen und dort zum Teil auch reifen, sowie der Thymus, in welchem die T-Lymphozyten reifen. Zu den peripheren lymphatischen Geweben, in denen die Aktivierung der Lymphozyten durch Antigenkontakt erfolgt, zählen Schleimhäute, Lymphknoten und die Milz.

Man unterscheidet abgesehen von mechanischen Barrieren, wie die Haut und die Schleimhäute, folgende Abwehrmechanismen des Immunsystems:

- Die erste Barriere gegen Pathogene stellt das angeborene oder nichtadaptive Immunsystem dar, welches alle Komponenten des Immunsystems umfasst, die im Laufe des individuellen Lebens in ihrer Spezifität konstant bleiben. Es ist zu keiner antigenspezifischen Anpassung fähig, stattdessen kann es schnell auf eine Vielzahl verbreiteter Pathogen-assoziiertes molekularer Strukturen (PAMPs) reagieren. Auf diese Weise wird dem Organismus Zeit zur Aktivierung der adaptiven Immunität gegeben, die die Krankheitserreger vollständig eliminieren soll. Zu der nichtadaptiven Immunität gehören humorale Komponenten (Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine, usw.) und zelluläre Bestandteile (Phagozyten, NK-Zellen, Mastzellen, Granulozyten, Dendritische Zellen, usw.). Aber auch Unterklassen von B- und T-Zellen, wie die B-1 B-Zellen

und die $\gamma:\delta$ T-Zellen, werden zu der angeborenen Immunität gerechnet, da sie ein sehr eingeschränktes Repertoire an Rezeptoren verwenden.

- Die adaptive Immunität umfasst B- und T-Lymphozyten, die ein riesiges Spektrum an Antigenen erkennen können. Grund hierfür ist die Entstehungsweise der B- und T-Zell-Rezeptoren durch genetische Rekombination. Sie weisen daher ein enormes Repertoire verschiedener Spezifitäten auf. Um nun die Unterscheidung von fremd und eigen sicherzustellen, was ein elementares Funktionsprinzip des Immunsystems darstellt, werden die durch genetische Rekombination zufällig entstandenen Rezeptoren während der Lymphozytenentwicklung auf Antigenerkennung und Nicht-Erkennung körpereigener Strukturen selektiert. Die dabei übrig gebliebenen Zellen patrouillieren durch die peripheren lymphatischen Organe auf der Suche nach den spezifischen Antigenen, durch deren Erkennung sie aktiviert werden. Man spricht in diesem Zusammenhang von dem Prinzip der klonalen Selektion.
 - Antikörper bilden den humoralen Arm der adaptiven Immunität, der sich gegen gefährliche Stoffe außerhalb von Zellen richtet. Jeder B-Lymphozyt trägt seine spezifischen Antikörper an der Zelloberfläche. In dem Fall, dass dieser Antikörper an ein extrazelluläres Pathogen oder Toxin bindet, wird die B-Zelle zur Antikörperproduktion angeregt. Die ausgeschütteten Antikörper neutralisieren gefährliche Toxine (Neutralisation), lagern sich an Antigene an (Opsonisierung), markieren sie dadurch für den Abbau durch Phagozyten und aktivieren das Komplementsystem und die Natürlichen Killerzellen.
 - Die zelluläre Bekämpfung der adaptiven Immunität wird von T-Zellen gebildet und sorgt für eine Eliminierung von Krankheitserregern, die sich in Körperzellen aufhalten und für Antikörper folglich unerreichbar sind. Erkennt eine zytotoxische

T-Zelle ($CD8^+$ T-Zelle) ihr spezifisches Peptid auf einem MHC-I Molekül einer antigenpräsentierenden Zelle, vermehrt sie sich und tötet infizierte Zellen ab. T-Helferzellen ($CD4^+$ T-Zellen) erkennen auf MHC-II Molekülen der APCs präsentierte Peptide. Diese stammen von extrazellulären Erregern oder intrazellulären Erregern im vesikulären Kompartiment. Während T_H1 -Zellen durch Zytokinproduktion Phagozyten aktivieren und der zellulären Immunantwort assistieren, wirken T_H2 -Zellen auf die aktivierten antikörperproduzierenden B-Zellen und unterstützen somit die humorale Immunantwort.

Das besondere Merkmal des adaptiven Immunsystems bildet das immunologische Gedächtnis – aus aktivierten B- und T-Zellen entstehen neben anderen Zelltypen auch Gedächtniszellen, die bei erneuter Infektion eine viel schnellere und effektivere Antwort hervorrufen können.

Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität sind die Dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen als antigenpräsentierende Zellen (APCs). APCs nehmen Pathogene auf, verarbeiten sie, wandern zu den Lymphknoten und präsentieren Peptid-Fragmente der Pathogene auf den MHC-Molekülen an ihrer Zelloberfläche, die von den Zellen der adaptiven Immunität erkannt werden können.

1.2 MHC-Moleküle und Antigenprozessierung

Jede T-Zelle kann mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors ein spezifisches Peptid erkennen. Aber nicht in freier Form. Das Peptid wird von der T-Zelle nur erkannt, wenn es auf einem MHC-Molekül (*Major Histocompatibility Complex*) präsentiert wird. Dazu müssen die Pathogenantigene zunächst in der Zelle zu Peptiden prozessiert und dann auf MHC-Molekülen gebunden an die Zelloberfläche transportiert werden (Jensen, 1999). Dieser Vorgang wird als Antigenprozessierung bezeichnet.

Die MHC-Moleküle wurden wegen ihrer wichtigen Rolle bei der Abstoßung von Transplantaten entdeckt. Menschliche MHC-Moleküle werden auch HLA-Moleküle (*Human Leukocyte Antigen*) genannt. Bei MHC-Molekülen handelt es sich um membranständige Glykoproteine. Die MHC-Moleküle sind stark polygen und höchst polymorph, was bedeutet, dass jeder Mensch mehrere MHC-Gene gleicher Funktion besitzt, von denen es Hunderte verschiedener Varianten in der Gesamtbevölkerung gibt. Es gibt zwei grundlegend verschiedene Arten von MHC-Molekülen, die sich sowohl durch Struktur als auch Funktion unterscheiden:

- Die MHC-I-Moleküle, welche auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden und Peptide aus intrazellulären Proteinen präsentieren.
- Die MHC-II-Moleküle, welche nur auf APCs und Thymusepithelzellen vorkommen und die Peptide entweder aus extrazellulären Proteinen oder von Proteinen aus intrazellulären Vesikeln präsentieren.

Neben den MHC-I- und MHC-II-Molekülen, die auch als klassische MHC-Moleküle bezeichnet werden, gibt es verschiedene, nichtklassische MHC-Moleküle. Diese sind weitaus weniger polymorph, binden zum Teil keine Peptide und erfüllen nicht immer eine immunologische Funktion (Maenaka and Jones, 1999; Braud et al., 1999; Ehrlich and Lemonnier, 2000; Alfonso and Karlsson, 2000).

Dank der Bioinformatik ist es mittlerweile möglich eine Vorhersage potentieller Liganden für ein bestimmtes Allel aus den

Aminosäuresequenzen beliebiger Proteine zu machen, was in dieser Arbeit mit der Datenbank SYFPEITHI erfolgte (Rammensee et al., 1999).

1.2.1 MHC-I

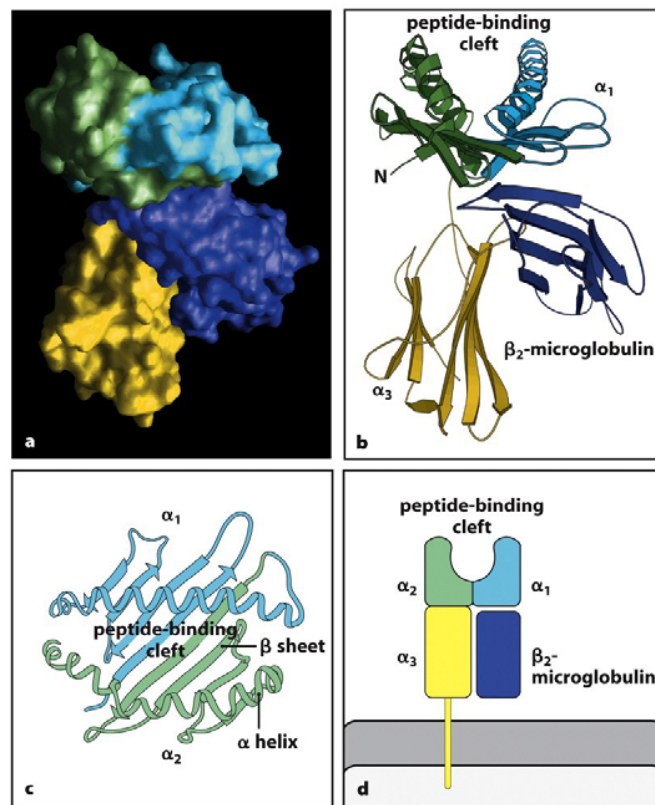


Figure 3-15 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abbildung 1.1: Die Raumstruktur eines MHC-I-Moleküls. © 2008 Garland Science

- a** Moleküloberfläche
- b** Bänderdiagramm
- c** Aufsicht auf die Bindungsfurche
- d** Schematische Darstellung

Die heterodimeren MHC-I-Moleküle gehören zur Immunglobulin-Familie und bestehen aus einer α -Kette sowie einem nicht kovalent assoziierten β_2 -Mikroglobulin. Die α -Kette besteht aus drei extrazellulären Immunglobulindomänen (α_1 bis α_3) und verfügt über eine Transmembrandomäne. Die beiden membrandistalen Domänen (α_1 und

α 2) bilden eine Furche (Bjorkman et al., 1987), in der Peptide mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren binden können, vergleiche Abbildung 1.1 (Bouvier and Wiley, 1994). Dabei nimmt das Peptid eine gestreckte Form in der Furche ein (Madden et al., 1993). Die Affinität der MHC-Peptidbindung hängt von der Aminosäuresequenz des Peptids ab (Falk et al., 1991). Die Wechselwirkungen der Peptidenden mit der Furche sind bei den verschiedenen MHC-I-Molekülen immer gleich, d.h. die Aminosäuren der Furche sind an diesen Stellen invariant. Die MHC-I-Moleküle besitzen jedoch hochpolymorphe Anker-Aminosäuren, wodurch verschiedene Peptidmotive gebunden werden können. Jedes MHC-I-Molekül kann Peptide binden, die das bestimmte „Peptidmotiv“ aufweisen (Falk et al., 1991; Rammensee et al., 1993). Aufgrund der exakt definierten Position der Peptide in den geschlossenen Furchen der MHC-I-Moleküle konnten mittlerweile die Peptidmotive vieler MHC-I-Moleküle aufgeklärt werden (Parker et al., 1994).

Die Polygenie und der Polymorphismus des MHC sorgen für ein breites Spektrum an verschiedenen Peptidbindungstaschen und gewährleisten so die zuverlässige Erkennung möglichst vieler Pathogene. Für die α -Kette gibt es drei Gene (HLA-A, -B, -C). Jeder Mensch exprimiert deswegen mindestens drei verschiedene HLA-Moleküle. Da aber auch die Kodominanz der beiden elterlichen Allele berücksichtigt werden muss, werden bis zu sechs verschiedene HLA-Moleküle exprimiert. Dank des hohen Polymorphismus der drei Gene der α -Kette steigt die Zahl der HLA-Allele stetig: Im Juni 2008 waren im Menschen 649 HLA-A-, 1029 HLA-B- und 350 HLA-C-Allele bekannt (www.anthonynolan.org.uk/HIG/).

Die auf den MHC-I-Molekülen gebundenen Peptide stammen aus zellulären Proteinen. Ausgediente und fehlgefaltete Proteine werden zunächst ubiquitinyliert und dann durch das Proteasom verdaut (Schubert et al., 2000a; Schubert et al., 2000b; Yewdell and Bennink, 2001). Das Proteasom ist ein im Zytosol und der Kernmatrix lokalisierter tonnenförmiger Multienzymkomplex (Pamer and Cresswell, 1998). Nach dem Verdau im Proteasom, werden die entstandenen Peptide durch Aminopeptidasen

verkürzt (Kloetzel, 2004) und schließlich über den TAP (Transporter associated with antigen processing) unter ATP-Verbrauch in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert (Neefjes et al., 1993; Albring et al., 2004). Im ER-Lumen werden mit Hilfe des Chaperons Calnexin die schwere Kette und das β_2 -Mikroglobulin assoziiert und über das Chaperon Tapasin im Komplex mit Calreticulin an TAP gebunden (Ortmann et al., 1997). Die vom TAP transportierten Peptide werden an das MHC-I übertragen, welches erst jetzt seine korrekte Faltung einnimmt. Über den regulären Exozytoseweg für Membranproteine gelangen die MHC-I/Peptidkomplexe an die Oberfläche und repräsentieren dort das Expressionsmuster der jeweiligen Zelle. Die Bindung der Peptide ist für eine stabile korrekte Konformation der MHC-I-Moleküle essentiell. Fehlt in einer Zelle ein funktioneller TAP, so exprimieren diese Zellen keine stabilen MHC-Moleküle an der Zelloberfläche, sondern transportieren diese zurück ins Zytosol, wo sie abgebaut werden (Hughes et al., 1997).

Theoretisch wäre eine Präsentation exogener Antigene auf MHC-I-Molekülen einer Zelle nicht möglich. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es dennoch zur Präsentation nicht zelleigener Antigene auf MHC-I-Molekülen von APCs kommt. Es ist bestimmten Zellen also möglich, exogenes Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren. Diesen Vorgang bezeichnet man als *Cross-presentation* (Heath and Carbone, 2001; Bevan, 2006). Die *Cross-presentation* ist essentiell für die Induktion von $CD8^+$ -T-Zell-Antworten gegen Tumorantigene sowie gegen Pathogene, die die APCs nicht direkt infizieren (Le et al., 2003; Schulz et al., 2005; Schroder and Bowie, 2005; Winau et al., 2006). Es ist nicht genau bekannt, auf welchen Wegen das Antigen aus den Endosomen schließlich auf die MHC-I-Molekülen gelangt (Groothuis and Neefjes, 2005).

1.2.2 MHC-II

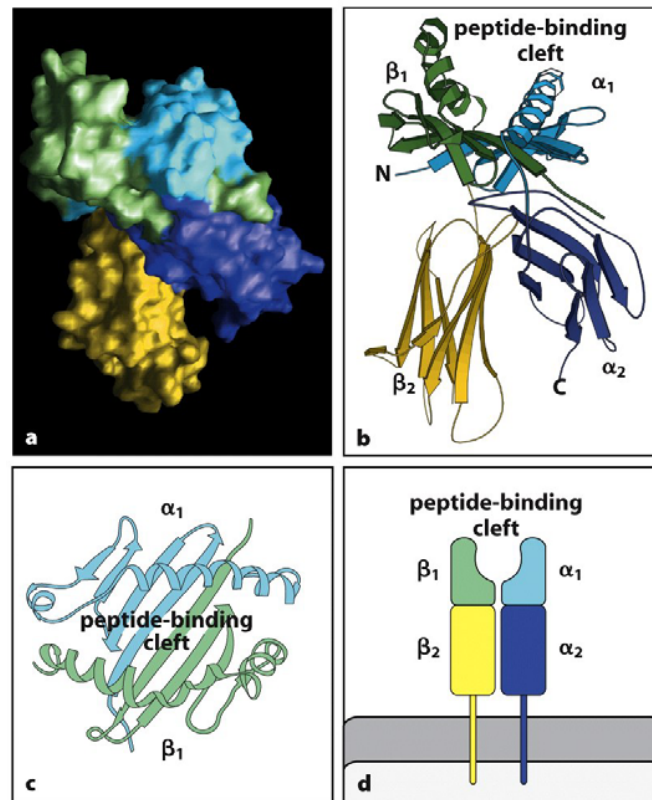


Abbildung 1.2: Die Raumstruktur eines MHC-II-Moleküls. © 2008 Garland Science

- a** Moleküloberfläche
- b** Bänderdiagramm
- c** Aufsicht auf die Bindungsfurche
- d** Schematische Darstellung

Die MHC-II-Moleküle werden hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Zellen (Dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen) exprimiert. Die Struktur dieser Moleküle ähnelt insgesamt sehr der der MHC-I-Moleküle, jedoch besteht sie aus zwei polymorphen membrandurchspannenden Ketten, der α - und der β -Kette, mit jeweils zwei extrazellulären Immunglobulindomänen. Die beiden membrandistalen Domänen (α_1 und β_1) bilden analog zu den MHC-I-Molekülen eine peptidbindende Furche, vergleiche Abbildung 1.2. Im Gegensatz zu MHC-I-Molekülen ist die peptidbindende Furche an beiden Seiten offen, dies erlaubt das Binden

von längeren Peptiden bis zu einer Größe von etwa 20 Aminosäureresten. Die auf den MHC-II-Molekülen präsentierten Peptide entstammen dem endosomalen Verdau aus pino- oder phagozytierten Proteinen und Organismen. Die Proteine werden dabei im Phagolysosom von sauren Proteasen und Cathepsinen zu Peptiden verdaut. Diese binden an MHC-II-Moleküle und werden schließlich auf die Zelloberfläche transportiert (Pieters, 1997; Chapman, 2006). Diese Prozessierung der exogenen Antigene findet, im Gegensatz zum MHC-I-Prozessierungspfad, im selben Kompartiment statt wie die Peptidbeladung. MHC-II- α -Kette und MHC-II- β -Ketten werden direkt in das ER synthetisiert und zusammen mit der trimeren invarianten Kette (Ii, *invariant chain*) in das MHC-II-Beladungskompartiment transportiert. Dort wird das MHC-II-assoziierte Invariante-Kettenpeptid (CLIP, class II-associated invariant chain peptide), ein Teil der invarianten Kette, welches die peptidbindende Furche besetzt, durch das später präsentierte Peptid ersetzt. Dieser Austausch wird reguliert und katalysiert durch HLA-DM und HLA-DO (Moron et al., 2004). Auch intrazelluläre Peptide können auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden (Chicz et al., 1993). Autophagie ist bei dieser Prozessierung involviert (Dengjel et al., 2005). Als Autophagie wird der Abbau intrazellulärer Komponenten in Lysosomen bezeichnet.

Die MHC-II-Peptidkomplexe dienen der Erkennung durch T-Helferzellen (Th) und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Aktivierung verschiedener Zellen des Immunsystems. Die klassischen MHC-II-Gene im Menschen werden HLA-DR, -DP und -DQ genannt. Im Juni 2008 waren im Menschen 3 HLA-DRA-, 640 HLA-DRB-, 126 HLA-DPA1-, 128 HLADPB1-, 34 HLA-DQA-1 und 91 HLA-DQB1-Allele bekannt (www.anthonynolan.org.uk/HIG/).

1.3 T-Zellpopulationen

Die am häufigsten vorkommende T-Zellpopulation stellen die so genannten $\alpha\beta$ -T-Zellen dar. Der Name gründet auf der Expression des antigenspezifischen Rezeptors, der aus einer α - und einer β -Kette besteht. T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen durch Interaktion des TCR mit einem Komplex aus einem MHC-Protein und einem Peptid (Garboczi et al., 1996a). Die $\alpha\beta$ -T-Zellen werden aufgrund der Expression der Oberflächenantigene CD4 und CD8 weiter unterschieden.

Die CD8-positiven Zellen, die zytotoxischen T-Zellen (CTLs) greifen virusinfizierte und entartete körpereigene Zellen direkt an und töten sie ab.

Die CD4 positiven Zellen, die so genannten Helferzellen, werden klassisch in zwei Untergruppen unterteilt. Die T_H1 -Zellen sezernieren Interleukin 2 (IL-2), Interferon- γ (IFN γ) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) und aktivieren somit Makrophagen (Stout and Bottomly, 1989; Munoz-Fernandez et al., 1992). T_H1 -Zellen unterstützen zudem die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (Andreasen et al., 2000). $Th2$ -Zellen aktivieren B-Zellen (Parker, 1993). Sie produzieren hauptsächlich die Interleukine 4, 5 und 13, und forcieren somit die Antikörperproduktion (Croft and Swain, 1991).

Die Differenzierung einer naiven Helferzelle in den jeweiligen Subtyp hängt unter anderem vom Zytokinmilieu während deren Aktivierung ab (Mosmann and Coffman, 1989). IL-12 aus Makrophagen oder Dendritischen Zellen und IFN γ aus zytotoxischen T-Zellen oder natürlichen Killerzellen (NK) begünstigen die Entstehung von T_H1 -Zellen. Findet die Aktivierung dagegen in Gegenwart von IL-4 statt, so entstehen bevorzugt $Th2$ -Zellen (O'Garra and Arai, 2000).

Neben den klassischen T_H1 - und T_H2 -Zellen kennt man inzwischen auch die $Th3$ -Zellen, diese haben suppressive Funktion. Sie werden anhand der Produktion von IL-10 beziehungsweise TGF- β in zwei Subpopulationen, die

Tr1- (IL-10) und Th3- (TGF- β) Zellen weiter unterteilt (Faria and Weiner, 2005). Neben diesen suppressiven T-Zellpopulationen treten die so genannten natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) auf.

Die Familie der Helferzellen wurde vor kurzem um eine Gruppe erweitert. Die Th17-Zellen stellen eine Subpopulation der Th2-Zellen dar. Ihre Differenzierung hängt von IL-25 ab, detaillierte Informationen über die Funktion und die Relevanz der Th17-Population liegen noch nicht vor, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Zellen bei der Antwort gegen Pilz- und Parasiten-Befall eine bedeutende Rolle spielen (Tato et al., 2006; Tato and O'Shea, 2006; Owyang et al., 2006; Bettelli et al., 2006; Zhou et al., 2008).

Neben den $\alpha\beta$ -T-Zellen kennt man die $\gamma\delta$ -T-Zellen. Der TCR dieser Zellen setzt sich aus einer γ - sowie einer δ -Kette zusammen. Die Rezeptoren der $\gamma\delta$ -T-Zellen sind weitaus weniger divers als die der $\alpha\beta$ -T-Zellen. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen, unter anderem Lipide und Nukleotide. Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -T-Zellen finden sich die $\gamma\delta$ -T-Zellen hauptsächlich in peripheren Geweben und nur selten in lymphatischen Organen (Hayday et al., 2000). Ferner konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen auch als APCs fungieren können (Moser and Brandes, 2006).

1.3.1 Der T-Zellrezeptor

Mit Hilfe des T-Zellrezeptors sind die T-Zellen in der Lage, MHC-gebundene Peptide auf der Oberfläche anderer Zellen zu erkennen (Zinkernagel and Doherty, 1974). Bindet der T-Zellrezeptor an seine spezifische Peptid-MHC-Kombination, löst er eine Signalkaskade in der T-Zelle aus.

Bei dem T-Zellrezeptor handelt es sich strukturell um ein Heterodimer aus einer ca. 50 kDa schweren α - und einer ca. 39 kDa schweren β -Kette (Garboczi et al., 1996b). Neben diesem T-Zellrezeptor ist auch noch ein anders strukturierter $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor bekannt. Der $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor

ähnelt einem membrangebundenen Fab-Fragment eines Antikörpers. Bei diesen Ketten (α und β -Kette) handelt es sich um Glykoproteine, die durch ihre carboxyterminalen Enden in der Zellmembran verankert sind. Jede Kette besteht aus zwei extrazellulären Domänen, die zu den variablen und konstanten Domänen der Immunglobuline homolog sind. Zusätzlich werden die beiden Ketten auch durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten (siehe Abbildung 1.3).

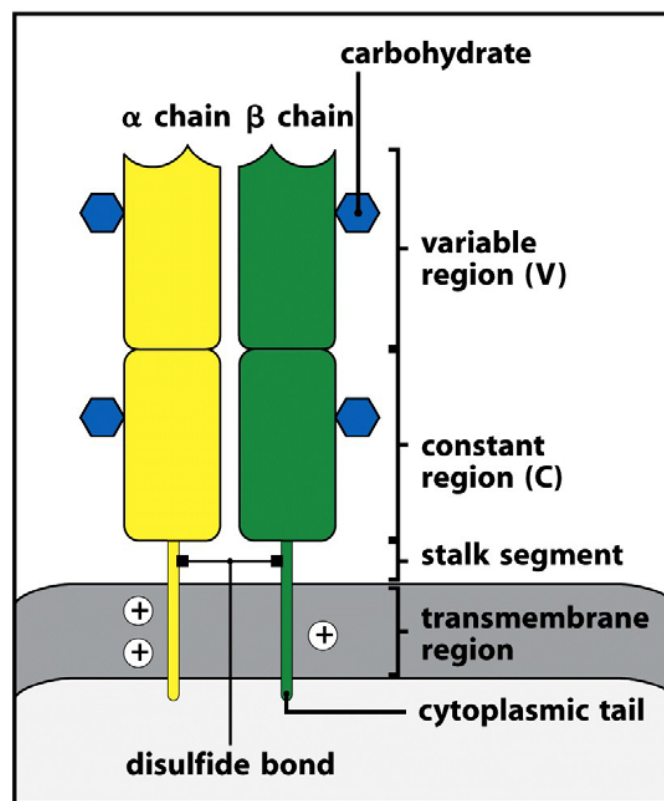


Figure 3-12 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des T-Zellrezeptors. © 2008 Garland Science

Die variablen Regionen (V-Regionen) der α - und β -Kette bilden zusammen die Bindungsfurche und sind somit zuständig für die Bindung des MHC-Peptidantigens. Codiert wird die V-Region der α -Kette durch genomische V- (V = variabel) und J- (J = *joining*) Elemente und die der β -Kette durch genomische V-, D- (D = *diversity*) und J- Elemente (Davis and Bjorkman,

1988). In der T-Zellentwicklung werden die V-Regionen durch Umlagerung dieser Gensegmente gebildet. Durch beliebige Kombination der verschiedenen Segmente sowie durch zufälliges Einfügen beziehungsweise Entfernen einzelner Nukleotide zwischen den Segmenten erreicht wird eine theoretische Gesamtdiversität von ca. 10^{18} erreicht. Die somatische Rekombination wird vor allem durch einen Enzymkomplex aus RAG1 und RAG2 (recombination activating genes) vermittelt (Shinkai et al., 1992; Rowen et al., 1996). Der gesamte Prozess der Genumordnung hat zum Ziel, ein großes Spektrum an unterschiedlichen T-Zellrezeptoren zu generieren und ähnelt stark der Bildung von Antikörpergenen aus verschiedenen Gensegmenten. Im Gegensatz zur Hypermutation in den B-Zellen findet eine Mutation der TCRs reifer T-Zellen nicht statt.

Es gibt nur ein C_α -Gen und zwei C_β -Gene, die für die konstanten Regionen (C-Regionen) des T-Zellrezeptors codieren, sie sind homolog zueinander und weisen keine funktionellen Unterschiede auf. Sie sind nicht an der Erkennung des Peptid/MHC-Komplexes beteiligt sind.

Die Diversität rekombinanter TCRs ist auf einige CDRs (CDR = *complementarity determining regions*) zurückzuführen. CDR1, CDR2, CDR3 bei α - und β -Kette sowie HV4 bei der β -Kette (Garcia et al., 1998; Ding et al., 1998). Die hauptsächlichen Wechselwirkungen des T-Zellrezeptors mit dem Peptid/MHC-Komplexe finden durch die Schleife CDR3 statt, welche die variabelste aller Schleifen ist. Die CDR1- und CDR2-Schleifen zeigen eine weniger ausgeprägte Diversität, da sie zum größten Teil mit den weniger variablen MHC-Molekülen wechselwirken.

Die TCRs der CD4- und CD8-T-Zellen haben denselben Ursprung, die Spezifität der TCRs für MHC-I- beziehungsweise MHC-II-Moleküle ergibt sich also lediglich aus der Varianz der CDRs. Sowohl α - als auch β - Kette des TCR verfügen lediglich über sehr kurze, funktionslose intrazelluläre Domänen. Zur Transduktion eines Signals sind also weitere membranständige Komponenten nötig. So sind die α - und β -Ketten des TCR mit sechs weiteren Molekülen zum TCR-Komplex assoziiert. Die

invarianten akzessorischen Ketten CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ bilden zusammen den CD3-Komplex, der für die Oberflächenexpression des T-Zellrezeptors und die Signalweiterleitung ins Zellinnere verantwortlich ist. Für eine optimale Expression und Signalweiterleitung ist allerdings die ζ -Kette erforderlich, die ein Homodimer bildet, welches über Disulfidbrücken verbunden ist (siehe Abbildung 1.4).

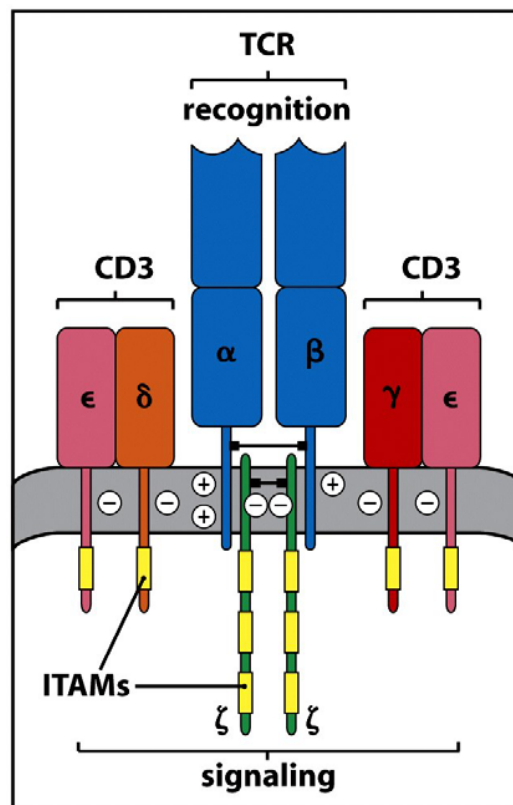


Figure 6-10 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des T-Zellrezeptorkomplexes. © 2008 Garland Science

Die CD3-Proteine besitzen je eine extrazelluläre immunglobulinähnliche Domäne und ein einzelnes intrazelluläres Signalmotiv, das ITAM (*immunoreceptor tyrosine – based activation motif*) genannt wird. Jede ζ -Kette besitzt drei intrazelluläre ITAMs. Die ITAMs ermöglichen die flexible Signalgebung des T-Zellrezeptors (Kersh et al., 1998).

1.3.2 Korezeptoren

Die meisten reifen T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche zusätzlich die Korezeptoren CD4 oder CD8, die an konservierte Bereiche von MHC-Molekülen binden. Helferzellen exprimieren den CD4-Korezeptor, zytotoxische T-Zellen den CD8-Korezeptor (Janeway, Jr., 1992). Die entsprechenden membranständigen Korezeptoren binden sowohl an den TCR als auch an das jeweilige MHC-Molekül und erhöhen damit die Bindungsstärke des TCR an den MHC/Peptid-Komplex bis zu einem Faktor von 100. Die Bindung des Korezeptors an das MHC-Molekül ist prinzipiell vom gebundenen Peptid unabhängig.

CD4 ist ein Monomer und aus vier Domänen (D1-D4) aufgebaut. Die beiden dicht gepackten membrandistalen Domänen (D1 und D2) sind über ein kurzes, flexibles Verbindungsstück an die, ebenfalls dicht gepackten, membranständigen Domänen gebunden. Die zytosolische Domäne ermöglicht die Interaktion mit der Lck-Kinase. Die D1-Domäne bindet an die β_2 -Domäne des MHC-II-Moleküls.

CD8 ist ein aus einer α - und einer β -Kette aufgebauter Heterodimer. Neben der heterodimeren Form tritt CD8 jedoch auch als α - α -Homodimer auf (Gao et al., 1997). Jede Kette besteht aus einer Immunglobulin-domäne, die über eine lange Polypeptidkette mit der Transmembrandomäne verbunden ist. Die zytosolische Domäne der α -Kette ermöglicht die Interaktion mit der Lck-Kinase. CD8 bindet vermutlich über die α -Kette an die α_3 -Domäne des MHC-I (Zamoyska, 1998).

1.3.3 Entwicklung, Selektion und Homöostase naiver T-Zellen

Die T-Zellentwicklung beginnt im Knochenmark, von dort wandern lymphatische Vorläuferzellen in den Thymus ein, in dem die weitere Reifung stattfindet (von Boehmer, 1988). Der Thymus ist ein primäres bzw. zentrales lymphatisches Organ, welches direkt über dem Herzen lokalisiert ist. Der menschliche Thymus ist schon bei der Geburt bereits vollständig ausdifferenziert. Während der Pubertät ist die T-Zellproduktion am höchsten; danach beginnt sich der Thymus zurückzuentwickeln. Diese Thymozyten exprimieren noch keinen TCR und keinen der beiden TCR-Korezeptoren, sie werden daher als doppelt-negative Thymozyten bezeichnet (Shortman and Wu, 1996). Die Entwicklung der Thymozyten beginnt in der kortiko-medullären Grenzregion mit der Aktivierung der RAGs und somit mit der somatischen Rekombination der TCR-Gene. Zunächst wird die β -TCR-Kette aus einem V-, einem D- und einem J-Segment rekombiniert. Zeigt sich diese in einem, zusammen mit einer prä-TCR- α -Kette (pT α), zusammengefügt prä-TCR funktionell wird die somatische Rekombination zunächst eingestellt und die Zelle teilt sich einige Male. Hieran schließt sich die Rekombination der α -Kette an je einem V- und einem D-Segment an. Die Expression eines funktionsfähigen TCRs erlaubt die weitere Entwicklung des Thymozyten. Sollte die α -Kette nicht funktionsfähig sein, werden die RAGs erneut aktiviert. Es kommt solange zur Rekombination bis eine funktionelle α -Kette gebildet wird. Geschieht dies nicht innerhalb von etwa vier Tagen, stirbt die Zelle (Starr et al., 2003a).

Noch während der Rekombination der α -Kette beginnen die Thymozyten den CD4- sowie den CD8-Korezeptor auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Die Zellen werden dementsprechend als doppelt positive Thymozyten bezeichnet (MacDonald et al., 2001). Im Folgenden schließen sich positive und negative Selektion an. Diese Vorgänge gewährleisten die Erkennung der MHC-Moleküle durch die TCRs (positive Selektion) sowie die

Eliminierung selbst-reaktiver T-Zellen (negative Selektion). Die Vorgänge der positiven und negativen Selektion werden von nicht-hämatopoetischen Thymusepithelzellen („TEC´s“, *Thymic Epithelial Cells*) und mesenchymalen Fibroblasten sowie von Makrophagen und Dendritischen Zellen vermittelt (Starr et al., 2003b). Die positive Selektion findet im Kortex statt (Amsen and Kruisbeek, 1996). Bindet der TCR nicht an einen Komplex aus einem MHC-Molekül und einem körpereigenen Antigen, führt dies zum Absterben der Zellen durch „Vernachlässigung“ („*Death by Neglect*“). Überstehen die Thymozyten die positive Selektion wandern sie in die kortiko-medullären Region ein. Hier werden fast alle körpereigenen Antigene unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors AIRE (Derbinski et al., 2005; Anderson et al., 2005) ektopisch exprimiert. Bindet ein Thymozyt mit zu hoher Affinität einen Komplex aus MHC-Molekül und Selbst-Peptid, wird Apoptose induziert und die Zelle stirbt. Dieser Mechanismus verhindert also die Reifung autoreaktiver T-Zellen. Schätzungen zufolge überstehen lediglich etwa zwei Prozent aller Thymozyten die Selektionsvorgänge. Die Zellen exprimieren fortan nur noch einen der beiden Korezeptoren und verlassen den Thymus nach etwa 3 Wochen als reife, naive T-Zellen (Shortman et al., 1990; Surh and Sprent, 1994).

Nach dem Verlassen des Thymus zirkulieren die naiven T-Zellen durch Blut- und Lymphsystem, dabei findet der Übertritt vom Blut in die Lymphe in den Lymphknoten statt. Die T-Zellen verlassen dabei durch die Venolen des Lymphknotens (*high endothelial venules*, HEV) den Blutkreislauf. Der Durchtritt durch die HEVs wird vor allem durch L-Selektin (CD62L) (Ahmadzadeh et al., 2001) auf den T-Zellen und dessen Ligand PNAd (peripheral node addressin) auf den HEVs vermittelt (Berg et al., 1991). Für eine vollständige Zirkulation benötigen die naiven T-Zellen etwa 12 bis 18 h (Sprent, 1973).

In der Peripherie überleben naive T-Zellen einige Jahren im Menschen. Abgestorbene naive T-Zellen werden zum Teil durch im Thymus neu gebildete Zellen ersetzt. Die Homöostase wird zudem durch die Teilung

naiver T-Zellen gewährleistet. Die Teilung naiver T-Zellen findet in geringem Umfang statt, es teilen sich weniger als 20 % der naiven T-Zellen in einem Zeitraum von fünf Wochen homöostatisch (Tough and Sprent, 1994). Die Homöostase gewährleistet, dass nicht zu viele T-Zellen am Leben gehalten werden müssen, jedoch ein ausreichend diverser Pool an naiven T-Zellen erhalten bleibt. Die T-Zellen müssen folglich proliferieren, wenn ihre Zahl zu gering wird, beziehungsweise nicht weiter expandieren, wenn sie in ausreichender Zahl vorhanden sind. Entsprechende Signale müssen also die homöostatische Proliferation der T-Zellen regulieren. Es hat sich gezeigt, dass sowohl Zytokine als auch TCR-Signale die Homöostase der T-Zellen beeinflussen. So benötigen naive T-Zellen zum Überleben in der Peripherie MHC/Selbstpeptid-TCR-Wechselwirkung. (Tanchot et al., 1997; Rooke et al., 1997; Kirberg et al., 1997; Brocker, 1997; Nesic and Vukmanovic, 1998; Witherden et al., 2000). Die T-Zellen konkurrieren dabei um Bindungsstellen an MHC/Selbstpeptid-Komplexen was eine übermäßige Vermehrung einzelner T-Zellspezifitäten unterbindet und somit die Vielfalt der TCR-Spezifität garantiert. Weiterhin inhibieren monoklonale, naive T-Zellen die Proliferation von T-Zellen gleicher Spezifität, während transgene naive T-Zellen unterschiedlicher Spezifität sich gegenseitig nicht beeinflussen (Troy and Shen, 2003). Entsprechend ließ sich zeigen, dass die Homöostase naiver T-Zellen von der Menge des vorhandenen Selbstpeptids abhängt (Ge et al., 2001). Die Größe der gesamten, polyklonalen T-Zellpopulationen wird wahrscheinlich über Zytokine reguliert. Naive T-Zellen exprimieren große Mengen an IL-7-Rezeptor (IL-7R). Experimente mit blockierenden IL-7- und IL-7R-Antikörpern zeigten, dass IL-7 ein limitierender Faktor der homöostatischen Proliferation naiver T-Zellen ist (Schluns et al., 2000).

1.4 T-Zellen und Antigenerkennung

1.4.1 TCR-Signaltransduktion

Die spezifische Erkennung eines Peptid/MHC-Komplexes durch den TCR-Komplex der T-Zelle führt zur Ansammlung („Cluster“-Bildung) mehrerer Rezeptoren und zur Phosphorylierung der ITAMs des TCR-Komplexes. Dies führt schließlich zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (nuclear factor κ B), NFAT (nuclear factor of activated T cells) und AP-1 (Activator protein 1) sowie zur Beeinflussung der Polarisierung und des Migrationsverhaltens der Zelle. Eine wichtige Rolle spielen neben den TCR-Signalen die Signale der kostimulatorischen Moleküle.

1.4.2 Erster Antigenkontakt der T-Zelle

Die naiven T-Zellen, deren Name daraus resultiert, dass diese noch keinen Antigenkontakt erfahren haben, rezirkulieren zwischen Lymphe und Blut und patrouillieren so durch die peripheren lymphatischen Organe auf der Suche nach Antigenen (Picker, 1994). In den peripheren lymphatischen Organen treffen sie auf professionelle APCs und durchmustern auf diese Art regelmäßig die von ihnen präsentierten Peptide (Banchereau and Steinman, 1998b). Diese Kontakte sind einerseits wichtig für das Überleben der naiven T-Zellen, andererseits ist dieses permanente Durchmustern der präsentierten Peptide für eine rechtzeitige Immunantwort bei einer Infektion unerlässlich.

T-Zellen lassen sich nur durch zwei gleichzeitig vermittelte Signale aktivieren. Neben dem spezifischen Signal über den TCR erfordert die T-Zell Aktivierung ein zweites, über kostimulatorische Moleküle vermitteltes, Signal. Dieses Signal kann nur von aktivierten, professionellen APCs geliefert werden. Die Aktivierung einer naiven CD8⁺-T-Zelle zur Effektorzelle erfolgt also ausschließlich durch Makrophagen und DCs. Die Expression des CC-Chemokinrezeptors 7 (CCR7) spielt dabei eine entscheidende Rolle. Die beiden CCR7 Liganden, die Chemokine CCL19

und CCL21 werden von Stromazellen in den T-Zell-Zonen der Lymphknoten sowie vom HEV-Endothel sezerniert (Gunn et al., 1998; Randolph et al., 2005). Die Expression von CCR7 auf naiven T-Zellen (Sallusto et al., 1999) und APCs (Jang et al., 2006) sorgt für die Kolokalisation von T-Zellen und APCs in den Lymphknoten und ermöglicht somit die Interaktion der beiden Zelltypen (Viola et al., 2006).

Präsentiert nun eine APC das für einen T-Zellklon spezifische Antigen, so bildet sich initial ein stabiler ternärer TCR:MHC/Peptid-Komplex. Daraus resultiert die Bildung einer so genannten immunologischen Synapse (Lee et al., 2002b). Hierbei findet im Zentrum der Synapse eine Ansammlung des TCR-Komplexes, des Korezeptors und des CD28-Moleküls statt. Im Bereich um das Zentrum finden sich große Mengen an LFA-1 (Monks et al., 1998; Grakoui et al., 1999; Krummel and Davis, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass nur etwa zehn spezifische Antigen/MHC-Komplexe auf einer APC ausreichen um eine vollständige Aktivierung der T-Zelle zu vermitteln (Irvine et al., 2002). Unklar ist, wie lange eine Interaktion zwischen APC und T-Zellen dauern muss, um in einer vollständigen Aktivierung der T-Zelle zu resultieren, verschiedene Publikationen geben hierfür Werte zwischen 2 und 24 Stunden an (van Stipdonk et al., 2001; Kaech and Ahmed, 2001).

Erkennt nun eine naive T-Zelle ein Peptid („Signal 1“ genannt) auf einer antigenpräsentierenden Zelle, tritt eine von zwei Möglichkeiten ein:

1. Das erkannte Peptid ist ein körpereigenes, hierbei handelt es sich meist um ein Peptid auf einer Gewebezelle oder unreifen APC, die keine aktivierenden bzw. kostimulatorischen Moleküle exprimieren. Dies hat zur Folge, dass die T-Zelle entweder anerg (d.h. inaktiv) oder apoptotisch, da nur das „Signal 1“ für eine Aktivierung nicht ausreichend ist, wird. Mit Hilfe dieses Mechanismus, siehe *Mechanismen der Toleranz*, werden autoreaktive T-Zellen davon abgehalten, den Körper zu schädigen (Guerder et al., 1994).

2. Das erkannte Peptid ist ein körperfremdes. In diesem Fall wurde die APC durch den Kontakt mit dem Pathogen höchstwahrscheinlich zur Expression von kostimulierenden Molekülen (z.B. CD80 und CD86) aktiviert, die auch „Signal 2“ genannt werden (Lenschow et al., 1996). In diesem Fall wird die T-Zelle zur Vermehrung und zur Ausbildung ihrer Effektorfunktionen angeregt (Mempel et al., 2004).

Die Aktivierung der T-Zelle bewirkt zunächst die Produktion von autokrin wirkendem Interleukin-2 (IL-2). Die Wirkung des IL-2 wird durch die erhöhte Expression der IL-2R α -Kette (CD25) erhöht. Die α -Kette bildet zusammen mit den konstitutiv exprimierten, niederaffinen β - und γ -Ketten den hochaffinen IL-2 Rezeptor. Das IL-2 regt die Zelle über mehrere Tage hinweg zu zwei bis drei Zellteilungen pro Tag an.

Etwa vier bis fünf Tage nach der Aktivierung entwickeln sich die Effektorzellen. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die Zellen CTLA-4 (CTL activation associated protein 4) zu exprimieren. Dieses Protein hemmt die Aktivierung, indem es CD80/86 mit deutlich höherer Affinität als CD28 bindet, im Gegensatz zu diesem aber kein stimulatorisches Signal vermittelt. Die entstandenen Effektorzellen unterscheiden sich durch verschiedene Oberflächenmarker von den naiven T-Zellen. So können sie an der, durch proteolytische Spaltung induzierten, Reduktion der CD62L-Expression erkannt werden (Chao et al., 1997; Galkina et al., 2003; Smalley and Ley, 2005). Die Expression von Aktivierungsmarkern erhöht sich. CD25, CD69 und CD154 zählen zu den frühen Aktivierungsmarkern, sie werden bereits kurz nach der Aktivierung hochreguliert (Zimmermann et al., 1999; Xu and Song, 2004). Mit zunehmender Lebensdauer dagegen steigt die CD44-Expression der Effektorzelle (Zimmerman et al., 1996). Darüber hinaus ist die TCR-Expression auf Effektorzellen im Vergleich zu naiven T-Zellen leicht erniedrigt (Liu et al., 2000).

Zudem produzieren zytotoxische T-Zellen Perforin (bilden Membranporen in den Zielzellen) und Granzym B (Serinproteasen, die Enzymkaskaden

initiiieren, die zur Apoptose führen) und speichern diese in Granula (Henkart, 1994). Diese Proteine vermitteln, ebenso wie der Oberflächenmarker CD95L (FasL), die zytotoxische Funktion der CTLs (Russell and Ley, 2002). Der Fas-Ligand bindet an das Oberflächenmolekül Fas auf den Zielzellen, wodurch Caspasen aktiviert werden, die wiederum Apoptose auslösen. Des Weiteren produzieren aktivierte zytotoxische T-Zellen eine Reihe von Zytokinen; die wichtigsten sind TNF α , TNF- β und IFN γ . TNF α und TNF- β können über den TNF-Rezeptor bei der Tötung von Zielzellen mitwirken. Außerdem bewirken sie, wie besonders auch IFN γ , eine Aktivierung von Makrophagen.

Das Wanderungsverhalten der T-Zellen ändert sich mit der Aktivierung drastisch, während die Wanderung der naiven T-Zellen darauf ausgerichtet ist, das Zusammentreffen mit APCs in den lymphatischen Organen zu gewährleisten, sollen aktivierte T-Zellen in peripheren Geweben auf potentielle Zielzellen treffen und ihre Effektorfunktionen ausüben.

1.4.3 T-Zellavidität

Die Bindungsstärke zweier Moleküle wie beispielsweise dem TCR und dem MHC/Peptid-Komplex wird über die Affinität definiert. Erfolgt eine Bindung über mehrere Einzelbindungen, wie z. B. zwischen CTL und APC, so reicht die Affinität zur Beschreibung der Bindung nicht aus. Um multivalente Bindungen zu beschreiben wird die so genannte Avidität, die als Produkt aus der Affinität und der Anzahl der Bindungen definiert ist, verwendet. Die Avidität der T-Zellen wird im Allgemeinen über die Funktionalität der Zellen definiert, und daher auch häufig als funktionelle Avidität bezeichnet. Hochavide T-Zellen reagieren bereits auf sehr geringe Mengen an Antigen, während niederavide T-Zellen höhere Peptidkonzentrationen benötigen, um aktiviert zu werden. Entsprechend lassen sich *in vitro* T-Zelllinien unterschiedlicher Avidität generieren, diese unterscheiden sich meist in der Affinität des TCR (Walter et al., 2003; Alexander-Miller, 2005).

Die Avidität der T-Zellen beeinflusst sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Aktivierung der T-Zellen sowie deren Effektorfunktionen. (Valitutti et al., 1995; Valitutti et al., 1996; Auphan-Anezin and Schmitt-Verhulst, 2001; Labrecque et al., 2001; Auphan-Anezin et al., 2003; Faroudi et al., 2003).

1.4.4 T-Zell-Kompetition

Obwohl ein in den Körper eingedrungener Erreger eine Vielzahl verschiedener Antigene mit sich bringt, ist die T-Zellantwort stets auf einige wenige, so genannte immundominante Antigene begrenzt (Zinkernagel and Doherty, 1979; Yewdell and Bennink, 1999; Kedzierska et al., 2005). Verschiedene Effekte sind für diese Immunodominanz verantwortlich. Es kommen Unterschiede bei der Expression der Antigene, in der Antigenprozessierung und schließlich der Antigenpräsentation zum Tragen (Eisenlohr et al., 1992; Sette et al., 1994; Deng et al., 1997b; Yewdell and Bennink, 1999; Chen et al., 2000; La Gruta et al., 2006). Diese Effekte scheinen nicht allein die Immunodominanz zu verursachenden. Die Kompetition verschiedener T-Zellklone untereinander könnte ebenso Einfluss auf die Form der entstehenden Antwort haben (Wolpert et al., 1998; Grufman et al., 1999a; Grufman et al., 1999b). Zudem nimmt mit wiederholten Infektionen die Avidität der Effektorzellen zu, so dass sich bei jeder Antwort die Zellen mit der höchsten Avidität gegen die Zellen niedrigerer Avidität durchzusetzen scheinen. (Savage et al., 1999; Rees et al., 1999; Busch and Pamer, 1999). Die hochaffinen T-Zellen konkurrieren um die APCs (Kedl et al., 2000), reduzieren die Menge des Antigens und unterbinden somit die Expansion der niederaviden T-Zellen (Kedl et al., 2002).

Widersprüchliche Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen lassen die Frage, ob T-Zellen unterschiedlicher Spezifität ebenfalls um APCs konkurrieren, offen (Probst et al., 2003; Willis et al., 2006).

1.4.5 Zytotoxisches T-Zellgedächtnis

Nach erfolgreicher Beseitigung einer Infektion in durchschnittlich sieben und zehn Tagen bleiben von der ursprünglichen Effektorpopulation lediglich etwa fünf Prozent der Zellen erhalten. Diese verbleibenden antigenspezifischen Zellen können über einen langen Zeitraum hinweg im Blut- oder Lymphkreislauf überleben. Treffen sie erneut auf Zellen, die ihr spezifisches Antigen präsentieren, können sie diese Zellen direkt beziehungsweise nach kurzer Reaktivierungsphase eliminieren und somit eine erneute Infektion unterbinden.

Das Immunsystem kann sich also an den entsprechenden Erreger „erinnern“, weshalb diese Zellen als Memory- oder Gedächtniszellen bezeichnet werden (Murali-Krishna et al., 1998). Nach wiederholter Infektion mit einem bekannten Pathogen tragen die Gedächtniszellen den Großteil der spezifischen Immunantwort, weil sie, im Gegensatz zu naiven T-Zellen, keinen Kostimulus zur Aktivierung benötigen und viel schneller zu proliferieren beginnen (Cho et al., 1999; Veiga-Fernandes et al., 2000; Rogers et al., 2000). Da die Gedächtniszellen in größerer Zahl mit derselben Spezifität zur Verfügung stehen als naive T-Zellen, findet das Zusammentreffen mit infizierten Zellen schneller und häufiger statt. Allen Effektor- und Gedächtniszellen ist gemein, dass sie viel CD44 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Nach der Effektorphase findet man ausschließlich CD44 hochexprimierende Gedächtniszellen, diese lassen sich phänotypisch in zwei Gruppen unterteilen: Effektorgedächtniszellen (T_{EM}) und Zellen des zentralen Gedächtnisses (T_{CM}) (Kundig et al., 1996; Kuhober et al., 1996a; Bachmann et al., 1997). Die beiden Populationen der Gedächtniszellen werden anhand ihrer Expression der CD62L-, CD45RA- und CCR7-Moleküle unterschieden. Diese Moleküle bestimmen die Verteilung der Zellen auf die Peripherie beziehungsweise den Blut- und Lymphkreislauf. Die Zellen des zentralen Gedächtnisses ($CCR7^+, CD62L^+, CD45RA^-$), exprimieren, analog den naiven T-Zellen ($CCR7^+, CD62L^+, CD45RA^+$), CCR7 und CD62L, aber nicht CD45RA. Sie

zeigen also ein ähnliches Wanderungsverhalten und zirkulieren über die HEVs in Blut und Lymphe. Die Effektorgedächtniszellen ($CCR7^+$, $CD62L^+$, $CD45RA^-$) sind dagegen eher in der Peripherie zu finden (Kuhober et al., 1996b). Sie zeigen zytotoxische Aktivität und produzieren IFN γ . Im Gegensatz dazu sind die Zellen des zentralen Gedächtnisses, entsprechend ihrer Funktion, in der Lage, IL-2 zu produzieren, sie zeigen allerdings keine zytotoxische Aktivität und produzieren kein IFN γ (Reinhardt et al., 2001; Masopust et al., 2001). Einige Studien legen die Vermutung nahe, dass sich die bisher bekannten Gedächtnispopulationen in weitere Subpopulationen aufspalten. (de Bree et al., 2005; Baars et al., 2005). Es gibt beispielsweise Effektorgedächtniszellen die CD45RA exprimieren (T_{EMRA}). Diese Zellen sollen auch ohne antigenspezifische Stimulation den Status einer Gedächtniszelle erworben haben (Geginat et al., 2003).

Es scheint sich schon früh in der T-Zellantwort zu entscheiden, welche Zellen zu Gedächtniszellen differenzieren (Marzo et al., 2005; Kaech et al., 2003). Es ist anzunehmen, dass Faktoren während der Aktivierungsphase der T-Zellen Einfluss auf die Gedächtnisbildung haben. So kommt die Avidität der T-Zellen als ausschlaggebende Größe in Frage: Hochbeziehungsweise niederavide T-Zellen könnten zu Gedächtniszellen differenzieren (Busch and Pamer, 1999; Fasso et al., 2000; Savage et al., 1999; Kedl et al., 2002). Ebenso könnte der Zeitpunkt der Aktivierung, und dementsprechend auch der Aktivierungszustand der APCs und die Menge des vorhandenen Antigens Einfluss auf die Differenzierung der Zellen haben (Williams et al., 2006). Aber die Auswahl der Gedächtniszellen könnte auch rein stochastisch erfolgen (Blattman et al., 2000; Sourdive et al., 1998). Es ist noch nicht geklärt, welche Faktoren die Entstehung der Gedächtnisantwort beeinflussen (Lefrancois and Marzo, 2006).

Betrachtet man speziell die Entstehung der $CD8^+$ -Gedächtnisantwort, so tritt hier das Problem der $CD4$ -Hilfe auf. Es wurde gezeigt, dass zur Entstehung funktioneller CTL-Gedächtniszellen die Gegenwart von $CD4^+$ -

Zellen essentiell ist. Während die primäre CTL-Antwort betreffend ihrer Funktionalität von der Gegenwart der CD4⁺-Zellen unabhängig ist, zeigen CTL-Gedächtniszellen aus CD4^{-/-}-Mäusen eine deutlich schlechtere Sekundärantwort als Zellen aus Wildtyp-Mäusen (Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003). Die Gegenwart der CD4⁺-Zellen ist dabei allerdings lediglich während der primären Aktivierungsphase von Bedeutung. So zeigen in Wildtypmäusen aktivierte CTLs eine normale Sekundärantwort in CD4^{-/-}-Mäusen (Shedlock and Shen, 2003).

Die Interaktion der CD4⁺- mit der CD8⁺-Zelle ist nicht gänzlich geklärt. Die Tatsache, dass CD8⁺-T-Zellen kein MHC-II exprimieren schließt eine direkte Interaktion der Zellen aus. Daher wird eine indirekte Interaktion über die APC angenommen, unabhängig davon, ob die CD4⁺-Zelle dabei direkt auf die CD8⁺-Zelle wirkt (Keene and Forman, 1982) oder der Effekt über die APC vermittelt wird (Lafferty and Cunningham, 1975; Ridge et al., 1998). In jedem Fall spielt die Interaktion des CD40L auf der CD4⁺-Zelle mit dem CD40-Molekül eine entscheidende Rolle (Noelle, 1996; Borrow et al., 1996; Grewal and Flavell, 1998). CD40 wird sowohl auf APCs (Banchereau et al., 1994), als auch auf CD8⁺-T-Zellen (Bourgeois et al., 2002) exprimiert. Es wurde gezeigt, dass sich die CD40L:CD40-Interaktion mit monoklonalen Antikörpern mimikrieren lässt (Ridge et al., 1998; Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998; Rudolf et al., 2008b).

1.4.6 Mechanismen der Toleranz

Die eigentlich wichtigste Leistung des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen. Zum einen wird die Bekämpfung von Pathogenen ermöglicht, auf der anderen Seite wird eine Schädigung des eigenen Körpers verhindert. Als Toleranz wird das neutrale Verhalten des Immunsystems gegenüber körpereigenen Antigenen bezeichnet. Unterschieden wird zwischen der zentralen Toleranz und der peripheren Toleranz.

Die zentrale Toleranz resultiert aus den Selektionsvorgängen während der T-Zellentwicklung im Thymus, siehe 1.3.3. Es sollten also keine autoreaktiven T-Zellen in die Peripherie entlassen werden. Dieses System ist jedoch nicht absolut zuverlässig. Es werden schwach selbstreaktive T-Zellen in die Peripherie entlassen, um durch einen ausreichend diversen T-Zellpool die zuverlässige Erkennung von Pathogenen zu gewährleisten. Deshalb müssen die Mechanismen der peripheren Toleranz die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen kontrollieren.

So werden Selbst-Antigene aufgrund sehr geringer Expressionsmengen oder der Expression in Bereichen, die den Zellen des Immunsystems nicht zugänglich sind (so genannte immunprivilegierte Stellen), einfach von dem zellulären Immunsystem ignoriert. Kommt es dagegen zur Erkennung eines Selbst-Antigens in der Peripherie, so besteht zum einen die Möglichkeit, dass die T-Zellen das Antigen erkennen, aber keinen adäquaten Kostimulus erhalten und so anerg, d.h. inaktiviert werden. Auf der anderen Seite können die T-Zellen durch große Mengen an präsentiertem Antigen überaktiviert werden und absterben, siehe 1.4.2.

Neben diesen sehr schlecht steuerbaren Toleranzmechanismen stellen die so genannten regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) den wohl wichtigsten und effektivsten Mechanismus der peripheren Toleranz dar. Die T_{reg} sind in der Lage die Aktivierung von $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen zu hemmen und somit die Induktion einer Autoimmunantwort zu unterdrücken, beziehungsweise abzuschwächen (Gershon and Kondo, 1971; Sakaguchi et al., 1995b; Shevach, 2002). Bei den meisten bisher beschriebenen T_{reg} handelt es sich um $\alpha\beta$ - $CD4^+$ -T-Zellen. Da über $\alpha\beta$ - $CD8^+$ - T_{reg} lediglich vereinzelte Berichte vorliegen (Shevach, 2006) beschränken sich die folgenden Beschreibungen auf die $CD4^+$ - T_{reg} . Die T_{reg} -Population lässt sich aufgrund der Abstammung der Zellen in zwei Gruppen unterteilen. So zirkulieren im naiven Organismus die natürlich vorkommenden T_{reg} . Sie entstehen im Thymus (Itoh et al., 1999; Seddon and Mason, 2000) und lassen sich anhand der konstitutiven Expression des CD25-Moleküls identifizieren, sie machen etwa zehn Prozent aller $CD4^+$ -T-Zellen in der Peripherie aus

(Sakaguchi et al., 1995a). Weitere Analysen zeigten, dass der Transkriptionsfaktor FoxP3 essentiell für die Entstehung der T_{reg} ist (Hori et al., 2003) und nur etwa 90 % der T_{reg} CD25 hoch exprimieren (Fontenot and Rudensky, 2005). Zudem konnte GITR als weiterer Oberflächenmarker für natürlich vorkommende T_{reg} identifiziert werden (McHugh et al., 2002). Neben den natürlich vorkommenden T_{reg} kennt man induzierte T_{reg}, diese entstehen aus naiven CD4⁺-T-Zellen in der Peripherie. Man unterscheidet dabei TGF- β -produzierende T_{H3}-Zellen von IL-10-produzierenden T_{r1}-Zellen (Chen et al., 1994).

1.5 Das Immunsystem und Tumorerkrankungen

1.5.1 Tumorantigene

Die Expression einiger Gene in Tumoren ist quantitativ und qualitativ verschieden von der in normalen Körperzellen, dies spiegelt sich auch in der Präsentation von Peptiden auf den MHC-Molekülen wider. Um eine gerichtete Immunreaktion zu erzeugen, müssen zunächst so genannte Tumorantigene identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Antigene, die mehr oder weniger nur von Tumorzellen, nicht aber auf normalen Körperzellen exprimiert werden. Besonderes Augenmerk wird dabei auf tumorassoziierte T-Zell-Epitope gelegt, gegen die sich eine zytotoxische T-Zellantwort erzeugen lässt. Solche T-Zell-Epitope wurden bereits 1988 bei Mäusen entdeckt (De Jong et al., 1988). Einige Jahre später wurden sie auch beim Menschen beschrieben (van der Bruggen et al., 1991).

Es sind inzwischen einige tumorassoziierte T-Zell-Epitope bekannt (Renkvist et al., 2001; Novellino et al., 2005). Diese lassen sich aufgrund diverser Unterschiede in verschiedene Klassen einteilen (Stevanovic, 2002b; Michael and Pandha, 2003):

- Cancer/Testis Antigene (van der Bruggen et al., 1991; Scanlan et al., 2002; Scanlan et al., 2004);
- Differenzierungsantigene (Coulie et al., 1994; Pantel et al., 1995);
- Durch Mutation entstandene Antigene (Robbins et al., 1996);
- Antigene, die in Tumoren überexprimiert oder selektiv präsentiert werden (Fisk et al., 1995; Brossart et al., 1999);
- Virale Tumorantigene (Ressing et al., 1995; Gottschalk et al., 2005).

Zur Identifizierung von Tumorantigenen und T-Zell-Epitopen kommen verschiedene Techniken zum Einsatz (Rosenberg, 1999; Weinschenk et al., 2002; Stevanovic, 2002a; Singh-Jasuja et al., 2004). Beispielsweise wird von tumorreaktiven T-Zellen ausgegangen, von denen aus die Epitope von Tumorantigenen und auch die Tumorantigene selbst ermittelt werden

können. Eine andere Möglichkeit besteht in der Elution und chromatographischen Auftrennung der Peptide von Tumorzellen bzw. von den daraus isolierten MHC-Molekülen. Die Identifizierung erfolgt dann durch massenspektrometrische Analyse der Peptide (Cox et al., 1994). Ist ein Peptid identifiziert, kann auf der Basis der Microarray-Technik eine Genexpressionsanalyse des Ursprungsproteins des Peptids durchgeführt werden.

Tumorantigene lassen sich aber auch über Methoden charakterisieren, die nicht von tumorspezifischen T-Zellen ausgehen. Dafür werden im Rahmen der Reversen Immunologie HLA-Liganden vorhergesagt und daraufhin synthetisiert (Viatte et al., 2006). Es gibt mehrere bioinformatische Programme, die Vorhersagen von Epitopen aus Antigenen für verschiedene HLA-Allele anbieten, unter anderem SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999) oder BIMAS/HLA_Bind (Parker et al., 1994). Vorhersagen sollten auch proteasomale Vorgänge (Nussbaum et al., 2001) und den Transport in das endoplasmatische Retikulum berücksichtigen (Peters et al., 2003). Diese drei Punkte werden in einem kürzlich veröffentlichten Vorhersagealgorithmus kombiniert (Tenzer et al., 2005). Diese daraufhin synthetisch erzeugten Peptide werden zur *in vitro*-Generierung von T-Zellen genutzt, die gegen das vorhergesagte Epitop gerichtet sind (Celis et al., 1994c; Wentworth et al., 1995). Richten sich diese erzeugten T-Zellen auch gegen intakte Tumorzellen, war der Ansatz erfolgreich (Lee et al., 1999). In der Praxis werden auch Peptide eingesetzt, die tatsächlich auf MHC-Molekülen von Tumoren präsentiert werden (Celis et al., 1994b; Weinschenk et al., 2002; Weinzierl et al., 2008).

1.5.2 *Tumorescape*-Mechanismen

Zwar werden zunehmend mehr tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene beschrieben, andererseits sind aber auch immer mehr Mechanismen bekannt, mit denen der Tumor versucht einer Entdeckung durch das Immunsystem zu entgehen, so genannte *Tumorescape*-Mechanismen (Gross and Walden, 2008).

Besonders häufig betroffen sind die MHC-I-Moleküle, von denen verschiedenste Phänotypen veränderter MHC-I-Expression beschrieben wurden (Garrido et al., 1993). So können MHC-I-Moleküle völlig fehlen, wenn z.B. entweder die β_2m -Synthese defekt ist (Benitez et al., 1998) oder die Antigenprozessierung (u.a. TAP-Transporter) gestört ist (Seliger et al., 2000). Auch das Fehlen eines MHC-Allels oder eines Haplotyps wurde beobachtet (Torres et al., 1996; Serrano et al., 2000). Zellen können zudem die Fähigkeit verlieren, unter IFN γ -Einfluss die Expression der MHC-I-Moleküle zu verstärken (Abril et al., 1996d; Dovhey et al., 2000). Schließlich können die klassischen HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Moleküle herunterreguliert sein, bei gleichzeitiger Expression von HLA-E (Marin et al., 2003). Dieses nicht-klassische MHC-Molekül kann über den NKG2a-Rezeptor NK-Zellen inhibieren. Normalerweise können NK-Zellen anhand spezifischer Rezeptoren Zellen mit herunterregulierter MHC-I-Expression erkennen und eliminieren (Moretta et al., 1996). Weitere Mechanismen, mit denen Tumorzellen T-Zell-Antworten zu umgehen versuchen, sind die verminderte Expression von Tumorantigenen (Jäger et al., 1997), Veränderungen im Apoptoseprogramm (Hahne et al., 1996), Expression inhibitorischer Zytokine (Chouaib et al., 1997) oder immunologische Ignoranz (Ochsenbein et al., 1999).

Angesichts dieser verschiedenen Möglichkeiten des Tumors, sich einer Immunantwort zu entziehen, ist es gerade mit Blick auf den häufig auftretenden Verlust der Expression eines HLA-Allels oder eines Tumorantigens umso wichtiger, möglichst viele verschiedene Tumorantigene und zugehörige T-Zell-Epitope verschiedenster HLA-

Restriktion zu finden, wenn man Tumore durch Vakzinierung zu bekämpfen versucht (Singh-Jasuja et al., 2004).

1.6 Tumor-assoziierte Antigene

1.6.1 SPAG4 (Human sperm associated antigen 4)

Das SPAG4-Protein interagiert mit dem ODF1-Protein (*Sperm tail outer dense fiber*), welches nur in den Geißeln der Spermien vorkommt. Im Verbund stützen diese Proteine die Geißel und sind somit an der Motilität des Spermiums beteiligt (Shao et al., 1999). Das Gen von SPAG4 teilt sich in 12 Exons auf und ist auf Chromosom 20 lokalisiert (Kennedy et al., 2004c).

Wir wählten dieses Antigen um zugehörige T-Zell-Epitope mehrerer HLA-Restriktion zu finden, weil das SPAG4-Protein in Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu normalem Nierengewebe und anderen nicht tumorigen Geweben überexprimiert wird, siehe Abbildung 1.5. Leider wurden bisher keine MHC-gebundenen SPAG4-Peptide auf Tumorgewebe gefunden.

In normalem Gewebe wird, bis auf den Pankreas, das SPAG4 nicht oder nur sehr gering exprimiert. Im Gegensatz dazu wird das SPAG4 in Nierenzellkarzinomgeweben (RCC) überexprimiert (unveröffentlichte Daten, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Toni Weinzierl und Dr. Oliver Schoor). Die Spezifität von SPAG4 auf Nierenzellkarzinomgeweben wird durch die Tatsache untermauert, dass SPAG4 nicht oder gering in Kolonkarzinomgeweben (CCA) exprimiert wird. Die Überexpression von SPAG4-Protein in tumorassoziierten Gewebe im Vergleich zu normalem Gewebe macht es zu einem spannenden Kandidaten für ein Tumorantigen.

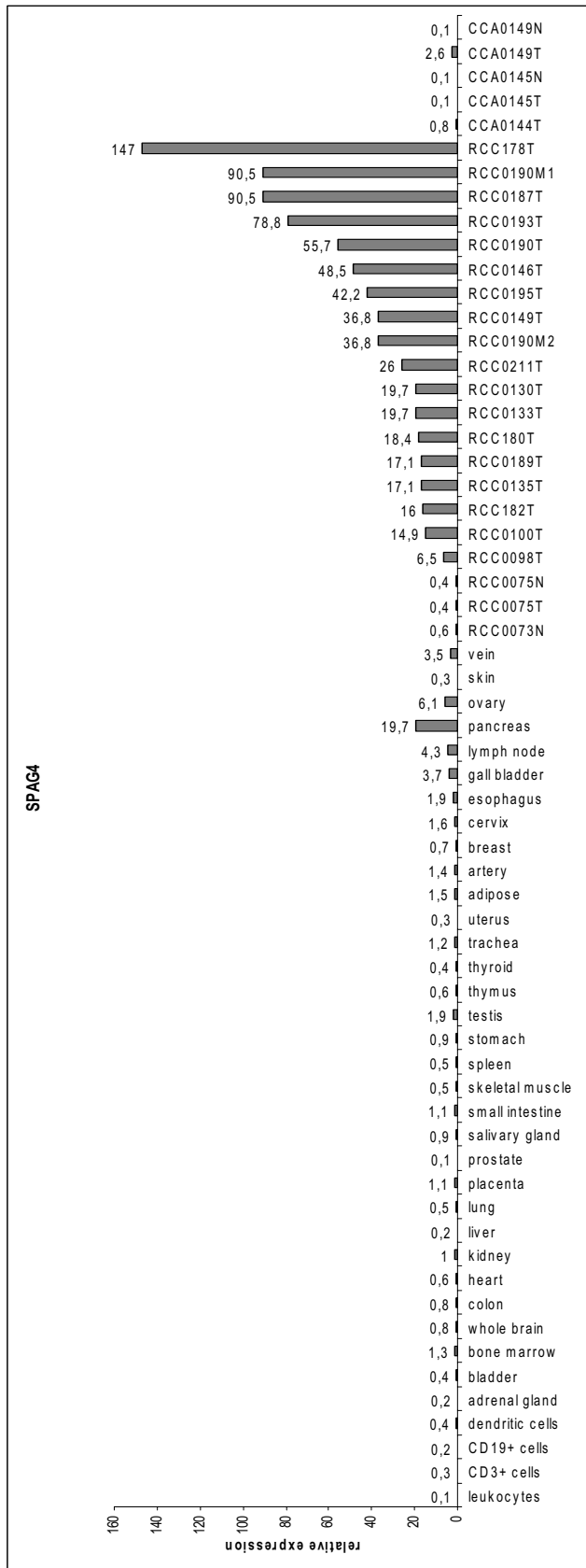


Abbildung 1.5: SPAG4-Expression in normalen Gewebe, RCC und CCA. Die Genexpressionsanalysen wurden von Toni Weinschenk und Oliver Schoor durchgeführt (unpublizierte Daten).

Neben der Expression deutet auch die Genstruktur von SPAG4 daraufhin, dass SPAG4 ein Tumormarker ist (Kennedy et al., 2004b).

In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob das SPAG4-Protein, die Sequenz ist in Abbildung 1.6 dargestellt, ein Tumorantigen ist und für eine peptidgestützte Anti-Tumortherapie verwendet werden könnte. Dafür wurden nach Epitopvorhersage mit SYFPEITHI aus SPAG4 Peptide synthetisiert und diese durch *in vitro* T-Zellstimulationen mit anschließenden funktionellen Analysen für den Einsatz als Vakzine verifiziert werden.

SPAG4: HUMAN Sperm-associated antigen 4 protein
MRRSSRPGSASSSRKHTPNFFSENSSMSITSEDSKGLRSAEPGPGEPEGRRARGPSCGEPALSA GVPGGTTWAGSSQOKPAPRSHNWQTACGAATVRGASEPTGSPVVSEEPDLLPTLDLRQEMPP PRVFKSFLSLLFQGLSVLLSLAGDVLVSMYREVCSIRFLFTAVSLLSLFLSAFWLGLLYLVSP ENEPKEMTLTSEYHERVRSQGGQLQQLQAELDKLHKEVSTVRAANSERVAKLVFQRLNEDFVRK PDYALSSVGASIDLQKTSHDYADRNTAYFWNRFSFWNYARPPTVILEPHVFPGNCWAFEGDQGG VVIQLPGRVQLSDITLQHPPPSVEHTGGANSAPRDFAVFGLQVYDETEVSLGKFTFDVEKSEIQ TFHLQNDPPAAFPKVKIQILSNWGHPRFTCLYRVRAHGVRTSEGAEGSAQGGPH

Abbildung 1.6: Aminosäuresequenz des SPAG4-Proteins (aus: swissprot-Datenbank, www.expasy.ch, Accession-Nr. Q9NPE6).

1.6.2 VEGF (Vascular endothelial growth factor A)

VEGF ist ein Mitogen, welches eine hohe Spezifität für Endothelzellen der Blutgefäße aufweist. Dieses Protein weist diverse biologische Funktionen auf, wie Angiogenese (Plouet et al., 1989; Leung et al., 1989), Anregung des Wachstums der Endothelzellen (Ferrara and Davis-Smyth, 1997) und Induktion der Expression von antiapoptotischen Proteinen, wie Bcl-2 in Endothelzellen (Gerber et al., 1998). Diese Induktion der Bcl-2-Expression wird durch die Aktivität von Matrix Metalloproteinasen (Wang et al., 2006) aufgrund von Blutgefäßverletzungen verursacht (Senger et al., 1983). VEGF ist somit in unterschiedlichste physiologische und pathologische Vorgänge, wie Bildung neuer Blutgefäße, Wundheilung und Wachstum von Tumoren involviert (Ferrara et al., 2003; Thornton et al., 2006).

Das menschliche Gen für VEGF ist in acht Exons organisiert, das durch alternatives Spleißen hauptsächlich in den vier Isoformen VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ vorkommt (Tischer et al., 1991; Ferrara et al., 1991). Mit zunehmender Länge der VEGF Isoformen steigt auch deren Bindungsaffinität zu Heparin. VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ sind stark basisch und meist an die extrazelluläre Matrix gebunden. VEGF₁₂₁ ist im Gegensatz dazu sauer, bindet kein Heparin und liegt deshalb ungebunden vor (Houck et al., 1992). Die Eigenschaften von VEGF₁₆₅ betreffend Bindungseigenschaften und pH-Wert sind unterschiedlich. Weil die Aktivität zur Stimulation der Zellteilung nach Verlust der Heparinbindenden Region abnimmt ist VEGF₁₆₅ doppelt so aktiv wie VEGF₁₂₁ (Keyt et al., 1996). Die Bioverfügbarkeit und die biologische Aktivität von VEGF₁₆₅ ist daher optimal (Carmeliet et al., 1999; Stalmans et al., 2002; Ruhrberg et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass die Translation der VEGF mRNA an zwei Startcodons beginnen kann. Die Initiation der Translation kann sowohl an dem Startcodon an Nukleotid 1039 (AUG¹⁰³⁹) als auch an einem GUC-Codon an Nukleotid 499 (GUC⁴⁹⁹). Für VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ und VEGF₁₈₉ wurde die Verwendung des GUC⁴⁹⁹ beschrieben. Nur das exakte Ausmaß der GUC⁴⁹⁹ Nutzung scheint noch nicht klar zu sein und unterscheidet sich in verschiedenen Publikationen (Tee and Jaffe, 2001; Bornes et al., 2004). Aber von einer Transkription in über 50 % der Fälle für VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ ist auszugehen.

VEGF ist ein interessantes tumorassoziiertes Antigen, da es für die Neoangiogenese dringend benötigt wird. Ein Tumor benötigt ab einer Größe von ungefähr 1 bis 2 mm³ seine eigene Blutversorgung (Folkman, 1971). Deswegen wurden verschiedene Strategien entwickelt die den Auf- und Ausbau der Blutversorgung des Tumors durch Eingreifen in die VEGF Signalwege oder durch Regulierung der sezernierten VEGF Konzentration unterbinden sollen. Einige mit VEGF interagierende Moleküle werden zurzeit in klinischen Phase-II Studien getestet. VEGF bindet an zwei Tyrosinkinaserzeptoren (VEGFR-1 und VEGFR-2), die auf den meisten Endothelzellen exprimiert werden. Durch die Bindung mit VEGF

dimerisieren die Rezeptoren und durch Autophosphorylierung erfolgt die Aktivierung des intrazellulären Signalweges (Matsumoto and Mugishima, 2006). VEGFR-1 exprimierende Zellen können selektiv durch das Toxin Gelonin, ein rekombinantes Fusionskonstrukt von VEGF₁₂₁, getötet werden (Mohamedali et al., 2006). Der wichtigere mitogene und angiogene Mediator VEGFR-2 kann durch Kinaseinhibitoren, wie Sunitinib, Sorafenib (Abril et al., 1996c; Schrader et al., 2006a; Nathan et al., 2006b), KRN951 (Nakamura et al., 2006) und AMG706 (Polverino et al., 2006) blockiert werden. Der neu entwickelte monoklonale Antikörper Bevacizumab verhindert, dass VEGF an seine Rezeptoren binden kann (Presta et al., 1997b).

Andreas Weinzierl analysierte das HLA-Ligandom von mehreren RCCs und das zugehörige autologe Normalgewebe, um potentielle Zielstrukturen für eine T-Zell basierte Immuntherapie durch massenspektrometrische Methoden zu finden (Cassileth et al., 1992; Falk et al., 2006). Dabei wurde ein Peptid gefunden, welches im Tumorgewebe sechsmal mehr exprimiert wird, als im korrespondierenden autologen Normalgewebe. Dieses Peptid mit der Sequenz: SRFGGAVVR ist HLA-B*2705 restringiert. Um das Ursursungsprotein zu identifizieren wurde eine BLAST-Analyse durchgeführt. SRFGGAVVR wurde nur in einer untranslatierten Region von VEGF im Menschen und Affen gefunden. SRFGGAVVR passt in das Leseraster der aktuellen Proteinsequenz von VEGF und kann durch das alternative CUG⁴⁹⁹ Startcodon transkribiert werden, siehe Abbildung 1.7. Durch radioaktive *in situ* hybridization (ISH) Analysen wurde gezeigt, dass VEGF mRNA in Tumorgewebe, aber nicht in Normalgewebe exprimiert wird. In mehreren Studien wurde die Expression VEGF mRNA in RCC gezeigt (Nicol et al., 1997; Jacobsen et al., 2004). Die quantitative Analyse der Expression von VEGF-Protein in RCCs ergab, dass VEGF-Protein viermal mehr im Tumor als in Normalgewebe exprimiert wird. Dies stimmt mit diversen Berichten überein, dass die VEGF-Translation unter Hypoxie erhöht ist (Stein et al., 1998).

```

- 180  LTDRQTD TAP  SPSYHLLPGR  RRTVDAAASR  GQGPEPAPGG  GVEGVGARGV
      ALKLFVQLLG  CSRFGGAVVR  AGEAEPSGAA  RSASSGREEP  QPEEGEEEE
- 80   KEEERGPQWR  LGARKPGSWT  GEAAVCADSA  PAARAPQALA  RASGRGGRVA
      RRGAEESGPP  HSPSRRGSAS  RAGPGRASET  MNFLLSWVHW  SLALLLYLHH
  20   AKWSQAAPMA  EGGGQNHHEV  VKFMDVYQRS  YCHPIETLVD  IFQEYPDEIE
      YIFKPSCVPL  MRCGGCCNDE  GLECVPTees  NITMQIMRIK  PHQGQHIGEM
  120  SFLQHnkCEC  RPKKDRARQE  KKSvRGKGKG  QKRKRKksRY  KSwSVPCGPC
      SERRKHLFVQ  DPQTCKCSCK  NTDSRCKARQ  LELNERTCRC  DKPRR

```

Abbildung 1.7: Die Sequenz SRFGGAVVR liegt in der untranslatierten Region von VEGF. Gezeigt ist die translatierte Proteinsequenz der VEGF mRNA, welche ab dem Startcodon GUC⁴⁹⁹ beginnt. (NCBI RefSeq Database ID NM_003376) Die Sequenz aus der Swissprot-Datenbank ist in fettgedruckten Buchstaben dargestellt (Accession-Nr. P15692). VEGF₁₂₁ besteht aus den grau schattierten Aminosäuren, während VEGF₁₆₅ sich zusätzlich aus den dunkelgrauen Aminosäuren zusammensetzt.

In diesem Projekt sollte dieses neu identifizierte viel versprechende Peptid SRFGGAVVR aus VEGF als T-Zell-Epitop durch T-Zellstimulationen mit anschließenden funktionellen Analysen verifiziert werden.

1.7 Relevante Pathogene bei Immunsupprimierten

1.7.1 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus wurde zu ersten Mal näher von Georg W. Fresenius im Jahr 1863 beschrieben. *Aspergillus fumigatus* ist ein humanpathogener Schimmelpilz der Gattung *Aspergillus*. Der Name stammt von lat. *fumus*, der Rauch und entstammt der rauchgrünen Farbe des Pilzes, die von einem Pigment in den Sporen verursacht wird. *Aspergillus* gehört zur Klasse der Deuteromyceten. Seine natürliche ökologische Nische ist das Erdreich wo der Pilz auf organischem Abfall wächst (Latge, 1999). Der Lebenszyklus von *Aspergillus fumigatus* ist relativ einfach. Seine sehr kleinen Sporen, auch Exosporen oder Conidien genannt haben einen Durchmesser von ca. 3 µm. Diese Sporen keimen und bilden zunächst eine einzelne Hyphe aus. Diese Hyphe verzweigt sich und wächst immer weiter zu einer Masse von Hyphen, dem Mycel. Die Hyphen haben eine Zellwand aus Polysacchariden wie Chitin, Glukan und Mannan. Dann bildet das Mycel eine Conidiophore aus, eine gießkannenförmige Zelle an der die Exosporen reifen und dann abgeschnürt werden. Es ist bisher kein sexuelles Vermehrungsstadium von *Aspergillus fumigatus* bekannt. Dieser saprophytische und thermotolerante Pilz gehört zu den verbreitetsten Spezies auf der Erde überhaupt. Die Conidien werden durch die Luft übertragen und so findet man den Pilz von der Antarktis bis zur Sahara praktisch überall. Im Durchschnitt atmet ein Mensch jeden Tag ca. 100 Conidien ein (Chazalet et al., 1998). So ist nachzuvollziehen, dass *Aspergillus fumigatus* das am häufigsten vorkommende luftübertragende Pathogen in entwickelten Ländern ist (Latge, 2001).

Aspergillus fumigatus kann drei verschiedenartige Krankheitsbilder verursachen:

- Allergien: Hier wird in gesunden Individuen vor allem Aspergilles Asthma als leichte Form oder auch eine bronchopulmonale Aspergillose, die so genannte Farmerlunge (farmers lung) ausgelöst.
- Akute Infektionen bei Individuen ohne Immunsuppression:
Vor allem Menschen mit Lungenkavernen aus vorhergegangenen Erkrankungen, aber auch gesunde Patienten können an einem Aspergillom erkranken, einem Pilzball, der sich in der Lunge einnistet.
- Akute Infektionen bei immunsupprimierten Patienten:
Bei immunsupprimierten Patienten kommt es üblicherweise zu einer tödlichen invasiven Aspergillose (Andriole, 1993). Die invasive Aspergillose ist eine häufige Sekundärinfektion bei AIDS-Patienten oder tritt bei Patienten, die durch Tumor oder nach Knochenmarktransplantation immunsupprimiert sind auf (Wald et al., 1997). Die Mortalitätsrate ist mit 50 % bis zu 80 % sehr hoch (Denning, 1996). Hierbei wachsen die Hyphen aus der Lunge in das Blut und werden so hämatogen gestreut, wo sich Metastasen im ganzen Körper entwickeln (Wiederhold et al., 2003). Jährlich sterben in Deutschland ca. 2500 Menschen mit geschwächtem Immunsystem an einer Infektion durch *Aspergillus fumigatus*.

Es werden mehrere Medikamente gegen diese Pilzinfektion eingesetzt, wie Amphotericin B, Caspofungin, Flucytosine, Itraconazole. Die Therapie mit diesen Medikamenten scheint aber nicht adäquat zu sein, da trotz starker Nebenwirkungen der therapeutische Erfolg nur mäßig ist (Safdar, 2007).

Ergebnisse aus Mausmodellen und von Patienten mit allergischer bronchopulmonaler Aspergillose belegen, dass die T-Zell-Immunität eine zentrale Rolle in der Bekämpfung dieser Krankheit spielt. Monozyten und Makrophagen sind in der Lage die Conidien von *Aspergillus fumigatus* durch Phagozytose aufzunehmen und den CD4⁺ T-Zellen zu präsentieren (Wang et al., 2001; Garlanda et al., 2002; Ibrahim-Granet et al., 2003). Es

wurde zusätzlich gezeigt, dass Monozyten Hyphen von *Aspergillus fumigatus* binden und zerstören (Diamond et al., 1983). Zudem scheint die T_H1-Antwort essentiell in der Bekämpfung und Kontrolle dieser Infektion zu sein (Romani, 1997;Grazziutti et al., 1997;Cenci et al., 1997;Cenci et al., 1999;Bozza et al., 2002). Daher liegt eine Bekämpfung dieser Infektion mittels einer peptidbasierten Vakzine, welche spezifisch gegen verschiedene Antigene von *Aspergillus fumigatus* ist, nahe. Auch der adoptive Transfer von spezifischen T-Zellen wäre als immuntherapeutischer Ansatz möglich. Für diesen immunologischen Lösungsweg ist es notwendig klinisch relevante Antigene von *Aspergillus fumigatus* zu finden. Aus diesen Antigenen wurden mit Hilfe der SYFPEITHI-Datenbank Peptide vorhergesagt und diese mittels IFN γ -ELISpot auf PBMCs von gesunden Spendern gescreent. Die T-Zellen, die spezifisch gegen die neu identifizierten *Aspergillus fumigatus* Epitope sind, wurden dann via polychromatischer FACS-Analyse auf ihr jeweils sezerniertes Zytokinmuster getestet.

1.8 Theorie der verwendeten Methoden

1.8.1 Isolierung von PBMCs

Monozyten und Lymphozyten des peripheren Blutes fasst man unter dem Begriff PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) zusammen. Weitere Bestandteile des peripheren Blutes wie Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten werden durch einen Dichtezentrifugationsvorgang abgetrennt (Ulmer et al., 1984). Um diese PBMCs zu erhalten wird heparinisiertes frisches Blut oder heparinisiertes erythrozytenabgereichertes - bzw. leukozytenangereichertes Blut verdünnt und auf die Lymphozytenseparationslösung aufgetragen. Diese Lösung ist aus dem Polysaccharid Ficoll und der iodhaltigen Verbindung Metrizamid zusammengesetzt und hat eine Dichte von 1,077 g/ml. Bei der anschließenden Zentrifugation verhalten sich die Zellen gemäß ihrer Dichte: Neben Granulozyten pelletieren nur die Erythrozyten. Thrombozyten bleiben im Plasmaüberstand. PBMCs hingegen bilden eine Interphase zwischen Ficoll und Plasma, aus der sie isoliert werden können.

1.8.2 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie, auch synonym häufig mit dem Akronym FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) bezeichnet, beruht auf der Emission von optischen Signalen von zuvor präparierten Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren. Es ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung fluoreszenzmarkierter Partikel. Die Durchflusszytometrie geht auf Wallace Coulter zurück, der bereits 1949 ein Patent zur Zählung von gelösten Partikeln anmeldete. Das Akronym FACS eigentlich irreführend, da meist keine Sortierung, sondern nur eine Messung der Eigenschaften von Zellen vorgenommen wird. FACS ist zudem eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson (BD). Neben BD gibt es jedoch eine Vielzahl anderer Hersteller von Geräten oder Reagenzien für die Durchflusszytometrie.

Die in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometer sind nachfolgend aufgelistet:

- FACS-Calibur mit Software Cell Quest oder Cell Quest Pro (Becton Dickinson)
- FACS-Canto II mit Software FACSDiva (Becton Dickinson)
- FACS LSR II mit Software FACSDiva (Becton Dickinson)
- FACS Aria Cell-Sorting System mit Software FACSDiva (Becton Dickinson)

Nur das FACS Aria hat neben der Messung von diversen Eigenschaften von Zellen noch zusätzlich die Möglichkeit die lebendigen Zellen nach diesen Eigenschaften zu sortieren.

Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert, dafür werden die in Lösung vorliegenden Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln den Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren, so genannten Photomultipliern, nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität. So streuen Granulozyten, die eine raue Oberfläche und in ihrem Inneren viele Vesikel haben, deutlich mehr Licht als die sehr glatten T-Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sidewards Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes bereits recht gut unterscheiden. Zugleich mit dem gestreuten Licht kann man im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben messen. Nur wenige Zellen emittieren per se fluoreszierendes Licht. Daher verwendet man Farbstoffe, die an bestimmte Bestandteile der Zellen binden, oder

Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Die Antikörper sind meist gegen bestimmte Oberflächenproteine (z.B. Proteine der CD-Klassifizierung; CD = Cluster of differentiation) gerichtet. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden. Bei Verwendung mehrerer Laser kann eine Vielzahl von Fluoreszenzfarben gleichzeitig gemessen werden. Zurzeit ist das LSR II, mit vier Lasern und der Möglichkeit bis zu 18 verschiedene Farben - und somit Eigenschaften von Zellen - gleichzeitig zu detektieren, das höchstentwickelte FACS-Gerät auf den Markt. Mittlerweile gibt es eine große Auswahl an Fluoreszenzkonjugaten zur Antikörpermarkierung (Perfetto et al., 2004). Die Standardfluoreszenzfarben sind FITC (Fluoresceinisothiozyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridin Chlorophyll) und APC (Allophycocyanin). Die Wahl des Fluorochroms sollte sich an der Antigendichte auf den Zellen orientieren. So hat zum Beispiel PE eine höhere Fluoreszenzintensität als FITC.

Vor jedem Messvorgang müssen die Photomultiplier in ihrer Empfindlichkeit durch Anlegen geeigneter Anodenspannungen eingestellt werden. Außerdem sollten bei Mehrfachfärbungen die Fluoreszenzkanäle aufeinander abgestimmt werden (Kompensation). Der Grund liegt darin, dass es sich bei den Emissionen der verwendeten Fluorochrome nicht um diskrete Linien, sondern um breite *Peaks* handelt, die meist von mehreren Kanälen detektiert werden können (Roederer, 2001).

1.8.3 Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen

Es gibt mehrere Möglichkeiten, antigenspezifische T-Zellen nachzuweisen:

- Es können die Effektorfunktionen von T-Zellen nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen zur Analyse verwendet werden. Die bei diesem funktionalen Nachweisprinzip verwendeten Methoden reichen von der Analyse der spezifischen Tötung von antigenpräsentierenden Zielzellen („*Chromium-Release-Assay*“, (Brunner et al., 1968a)), der Teilung von T-Zellen nach Antigenkontakt („*Proliferationsassay*“, (Lyons, 1999)) bis zur Zytokinsynthese als Folge eines Antigenkontaktes, die durch ELISpot, intra- und extrazelluläre Zytokinfärbung nachgewiesen werden kann (Sachdeva and Asthana, 2007). Die Bestimmung der Frequenz an Antigen-spezifischen T-Zellen ist mit diesen Methoden nur eingeschränkt möglich, nur die intrazelluläre Zytokinfärbung bietet die Möglichkeit durch den Nachweis mehrerer Zytokine und in Kombination mit weiteren Markern hoch sensitiv die Frequenz von antigenspezifischen Zellen zu bestimmen, bei gleichzeitiger funktionellen Charakterisierung dieser Zellen.
- Zum anderen kann man die spezifische Bindung der T-Zelle an einen Komplex aus Peptid und MHC-Molekül nachweisen. Da aber die Wechselwirkung zwischen T-Zellrezeptor und Peptid/MHC-Komplexe eine niedrigaffine ist, konnte diese Methode früher nicht realisiert werden (Matsui et al., 1994; Corr et al., 1994). Seit der Tetramerisierung von biotinylierten Peptid/MHC-Komplexen ist diese Methode jedoch durch die ausreichende Avidität von vier Wechselwirkungen zwischen T-Zellrezeptor und Peptid/MHC-Komplexe eine der wichtigsten Methoden der Immunologie geworden, nicht zuletzt deshalb, da man durch diese Methode direkt die Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen in einer Probe ermitteln kann (Altman et al., 1996).

1.8.3.1 Zytotoxitätsmessung

Die ^{51}Cr -Freisetzungsmethode zur Quantifizierung der CTL-Aktivität über die Messung der Lyse von Zielzellen wurde im Jahr 1968 erstmals beschrieben (Brunner et al., 1968b). Diese Methode eignet sich wie die kombinierte Tetramer- und intrazelluläre Zytokinfärbung für den Nachweis, dass die stimulierten CD8^+ Zellen ihr Antigen erkennen und funktional aktiv sind. Dazu wird $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ zu den Zielzellen gegeben, die Chrom in der Oxidationsstufe +VI aufnehmen können. In den Zellen wird das radioaktive Chrom zu $^{51}\text{Cr}^{3+}$ reduziert. Werden diese Zellen nun lysiert, werden Chrom-Ionen frei, die nicht wieder aufgenommen werden können. Nach einigen Stunden wird der Überstand abgenommen und auf Radioaktivität getestet. Die Vorteile dieser Methode sind ihre einfache Durchführung und der schnelle Ablauf. Die geringe Nachweisgrenze von ca. 1 % (Scheibenbogen et al., 2000a) verhindert eine Anwendung dieses Tests bei der *ex vivo* Analyse von T-Zellen, da die Frequenzen virus- oder tumorspezifischer T-Zellen im Blut fast immer deutlich darunter liegen (He et al., 1999b). Weiterer Nachteil ist die hohe benötigte T-Zellzahl. So kommt die ^{51}Cr -Freisetzungsmethode hauptsächlich nach *in vitro* Stimulationen von T-Zellen zum Einsatz. Eine alternative Methode, die mit bedeutend weniger Zellen auskommt ist der VITAL-assay. Bei dieser Methode erfolgt der Nachweis der Zelllyse über das FACS (Hermans et al., 2004).

1.8.3.2 IFN γ -ELISpot

Mit Hilfe des IFN γ -ELISpots können Interferon- γ sezernierende Zellen nachgewiesen werden, es kann mit dieser Methode die spezifische IFN γ -Produktion nach Antigenkontakt einzelner Zellen detektiert werden (Sedgwick and Holt, 1983; Czerkinsky et al., 1983). Ein Vorteil des IFN γ -ELISpots ist, dass auch Zellen, die nicht proliferationsfähig sind, in diesem Assay verwendet werden können. Die Sensitivität ist sehr hoch; die

Nachweisgrenze liegt bei circa. einer Zelle in einer Population von 10^5 Zellen (Scheibenbogen et al., 2000b). Die Analysen können ohne vorherige Stimulation direkt *ex vivo* aber auch bei zu geringer Frequenz an Vorläuferzellen nach voriger Amplifikation von diesen durchgeführt werden. Dieser Assay wurde deshalb zur Analyse des *Aspergillus fumigatus*-Immunstatus von diversen gesunden Blutspendern eingesetzt. Dadurch konnte die Fragestellung bearbeitet werden, gegen welche *Aspergillus fumigatus*-Epitope, nach Kontakt oder Infektion, T-Zellen vorhanden sind.

Das Prinzip des IFN γ -ELISpots basiert auf der spezifischen Bindung des sezernierten Zytokins (in dieser Arbeit Interferon- γ) durch immobilisierte Antikörper. Dazu wird eine ELISpot-Platte mit einem IFN γ -spezifischen Antikörper beschichtet. Die zu analysierenden PBMCs werden zugegeben und darauf die zu untersuchenden Peptide zupipettiert. APCs in der Zellpopulation können die Peptide auf MHC-Molekülen den T-Zellen präsentieren. Nun folgte eine 24 stündige Inkubationszeit während der die spezifischen T-Zellen durch das entsprechende Peptid aktiviert werden und deshalb mit der IFN γ -Sekretion beginnen. Das in der Nähe einer sezernierenden T-Zelle freiwerdende IFN γ wird von dem immobilisierten Antikörper gebunden. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen entfernt und ein enzymgekoppelter IFN γ -spezifischer Antikörper zugegeben. Dieser bindet ebenfalls an das Zytokin und kann durch das gekoppelte Enzym eine Farbreaktion katalysieren, die überall dort, wo sich IFN γ befindet, zur Ausbildung eines Farbflecks (Spot) führt. Für diese Farbreaktion genügt die Zugabe eines Substrates, welches von dem gekoppelten Enzym in einen unlöslichen Farbstoff umgewandelt wird, der am Ort seiner Entstehung präzipitiert.

Die so erzeugten Farbflecke entsprechen jeweils einer IFN γ -sezernierenden Zelle. Die Auswertung findet durch automatisierte ELISpot-Lesegeräte statt.

1.8.3.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Der intrazelluläre Zytokinnachweis bietet verglichen mit anderen Methoden des Zytokinnachweises, die einzigartige Möglichkeit, Zytokin produzierende Zellen zu phänotypisieren und somit Subpopulationen bzw. Aktivierungsstadien von Zellen zuzuordnen, ohne, dass eine zeit- und materialaufwändige Zellseparation notwendig wäre. Damit erlaubt diese Analysemerkmale sehr spezifische Aussagen zur funktionellen Aktivität und zu Differenzierungsstadien diverser Zellpopulationen. Die Färbung von Zelloberflächenantigenen (z.B: CD3, CD4 und CD8) kann ohne Probleme simultan erfolgen. T-Zellen produzieren nach Antigenkontakt diverse Zytokine. Je nach Zelltyp unterscheiden sich die Expressionsmuster der Zytokine. CTLs sezernieren IFN γ , TNF α , Perforin und Granzym B. T_H1 Zellen produzieren hauptsächlich IL-2 und IFN γ , T_H2 Zellen im Gegensatz IL-4 und IL-5. Die T_H17 Zellen geben IL-17 und TNF α ab (Knutson and Disis, 2005a; Romagnani, 2006b). Um das Expressionsmuster dieser Zytokine intrazellulär nachzuweisen ist eine Akkumulation der Zytokine im Zellinnern nötig, dafür muss die Exkretion der Zytokine verhindert werden. Dies wird erreicht indem der intrazelluläre Proteintransport mittels Brefeldin A (BFA) oder Monensin blockiert wird. BFA blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgiapparat (Klausner et al., 1992) Der Transportweg von cis- und medialen-Golgi-Zisternen zum Trans-Golgi-Netzwerk kann durch Monensin blockiert werden, wobei ER und Golgiapparat nicht verschmelzen (Rosa et al., 1992). und führt so zu einer Akkumulation von Zytokinen in Zellen. Die Zytokinproduktion kann somit in Zellen, nach intrazellulärer Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, mittels FACS gemessen werden. Prinzipiell können alle Zytokine nachgewiesen werden, sofern für den intrazellulären Nachweis geeignete Antikörperkonjugate verfügbar sind. Um eine möglichst hohe Sensitivität der intrazellulären Färbung zu gewährleisten, sollten die verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörperkonjugate aufeinander abgestimmt und optimiert werden (De

Rosa et al., 2004; Chattopadhyay et al., 2006; Mahnke and Roederer, 2007).

Ebenso wie die Produktion von Zytokinen werden nach Antigenkontakt die Expression bestimmter Aktivierungsmolekülen nach oben reguliert. Der Nachweis solcher Aktivierungsmarker, wie zum Beispiel CD154, lässt sich leicht ebenso wie eine Lebend/Totfärbung in ein vorhandenes ICS-Färbepanel implementieren (Frentsch et al., 2005; Chattopadhyay et al., 2005; Trumpfheller et al., 2008).

1.8.3.4 Tetramerfärbung

Die Bindung von MHC-I-Tetrameren an CD8⁺ T-Zellen wurde nach der Einführung intensiv untersucht und stetig weiterentwickelt. So stellte man fest, dass die Bindung an T-Zellen hochspezifisch (Burrows et al., 2000), aber temperaturabhängig ist (Whelan et al., 1999). Eine wichtige Rolle spielen außerdem die CD8-Antikörper, die zur Markierung der zytotoxischen T-Zellen eingesetzt werden. Manche CD8-Antikörper verhindern eine Tetramerbindung, manche verdrängen gebundene Tetramere; es wurden aber auch CD8-Antikörper beschrieben, die eine unspezifische Tetramerbindung fördern (Daniels and Jameson, 2000; Denkberg et al., 2001). Die Nachweisgrenze der Tetramerfärbung wurde als 0,01 % von CD8-positiven Zellen aus PBMCs beschrieben (He et al., 1999a). Ein wichtiger Vorteil der Tetramerfärbung ist, dass lebende Zellen markiert und anschließend sortiert werden können, um zum Beispiel CD8⁺/Tetramer⁺ T-Zelllinien oder Klone zu generieren. Allerdings wurde auch der Nachweis inaktiver Zellen beschrieben (Nielsen et al., 2000). Die Tetramerfärbung kann mit anderen Methoden kombiniert werden, z.B. der intrazellulären Zytokinfärbung (Appay et al., 2000). Die kombinierte Tetramer- und intrazelluläre Zytokinfärbung detektiert durch den Nachweis IFN γ und die spezifische Bindung einzelner Zellen an Peptid/MHC-Tetramere die Spezifität und Aktivierung der Zellen. Erkennt eine CD8⁺ Zelle einen solchen Peptid/MHC-Komplex und wird aktiviert,

geht man davon aus, dass diese T-Zelle Zielzellen, die das erkannte Epitop präsentieren, ebenfalls erkennt und in der Lage ist, diese zu eliminieren. Großer Vorteil dieser Methode ist die geringere Menge an T-Zellen, die im Vergleich zur $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungsmethode benötigt wird, allerdings liefert die kombinierte Tetramer- und intrazelluläre Zytokinfärbung keinen direkten Zytotoxizitätsnachweis.

Weil für diese Arbeit die MHC-Tetramere von so großer Bedeutung sind sollen sie näher beschrieben werden. Die Generierung von MHC-I-Molekülen ausgehend von cDNS-Konstrukten ist eine zeitaufwändige Methode, wie die folgende Übersicht (siehe Abbildung 1.8) zeigt:

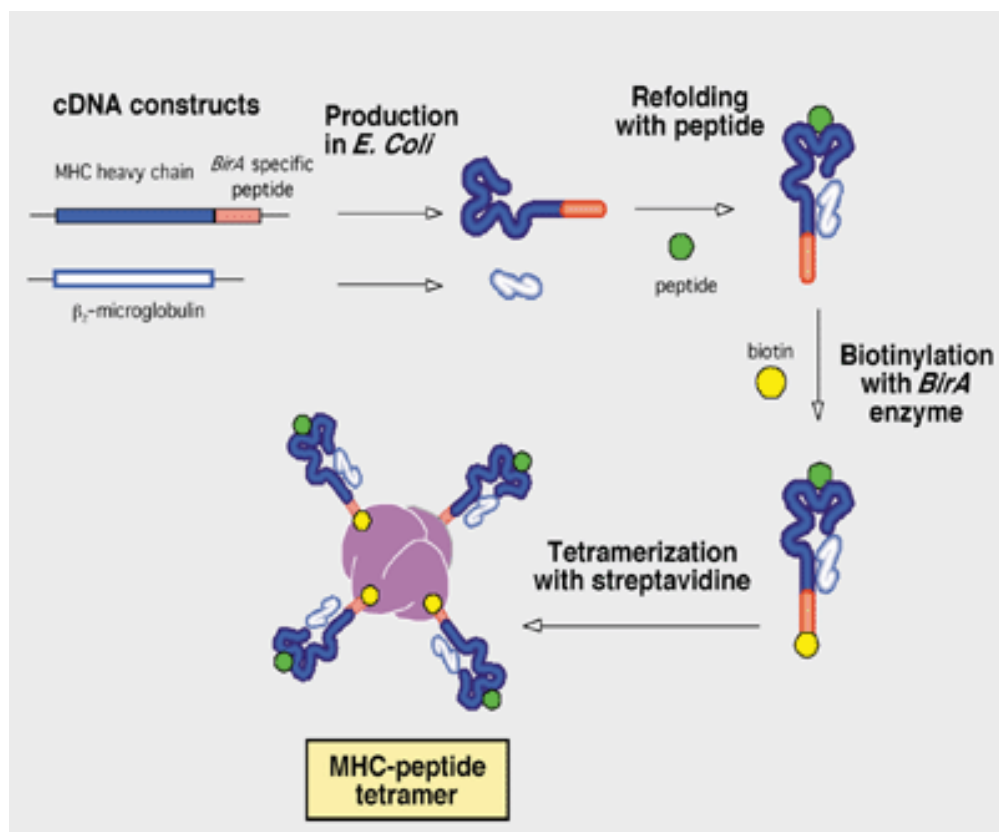


Abbildung 1.8: Die Herstellung von MHC-I-Tetrameren (Lang and Bodinier, 2001).

1.8.4 Synthese von MHC-I-Tetrameren

1.8.4.1 Aufreinigung und Rückfaltung von MHC-Molekülen

Da die Information für die dreidimensionale Struktur eines Proteins in seiner Primärsequenz enthalten ist, ist es prinzipiell möglich, denaturierte Proteine *in vitro* zu ihrer nativen Form zurückzufalten (Anfinsen et al., 1961). Sofern alle für diesen Prozess benötigten Bestandteile in Lösung vorhanden sind, trifft dies auch für Proteinkomplexe zu (Garboczi et al., 1992; Abril et al., 1996b; Clark, 1998b; Clark, 2001). Die für die MHC-I-Moleküle benötigten schweren bzw. leichten Ketten werden in mit entsprechenden Expressionsvektoren transfizierten *E. coli*-Stämmen exprimiert. Wie viele Proteine, die in *E. coli* exprimiert werden, bilden auch MHC-Moleküle in diesem Expressionssystem unlösliche Einschlusskörper (*inclusion bodies*), die aus denaturierten Proteinen bestehen. Mittels Zentrifugation können diese isoliert und in chaotropen Lösungsmitteln (z.B. 8 M Harnstoff) aufgelöst werden, um sie schließlich in geeignetem Rückfaltungspuffer nach Zugabe des Peptids *in vitro* zurückzufalten. Allerdings treten bei Rückfaltungen praktisch immer Aggregate als Nebenprodukte auf, die sich aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine bilden und deutlich sichtbar präzipitieren. Um dies so weit als möglich zu unterbinden ohne die Faltungsreaktion zu beeinträchtigen, wird Arginin als schwaches chaotropes Reagenz zugesetzt. Außerdem soll ein Redoxgleichgewicht aus reduziertem und oxidiertem Glutathion die Ausbildung von korrekten Disulfidbrücken unterstützen. Eventuell vorhandene Proteasen werden durch Autoklavieren des Faltungspuffers und Zugabe von PMSF inaktiviert. Da mittlere Konzentrationen an denaturierendem Harnstoffpuffer als für den Faltungsvorgang ungünstig beschrieben worden sind (Clark, 1998a), werden die Einschlusskörper sehr rasch zugegeben, d.h. unter starkem Rühren in den Faltungspuffer injiziert.

Die entstandenen Peptid/MHC-Komplexe werden durch Gelfiltration von Aggregaten, freiem β_2 -Mikroglobulin und Bestandteilen des Rückfaltungspuffers getrennt und darauf durch die BirA-Ligase biotinyliert.

1.8.4.2 Gelfiltration

Die Auftrennung von Molekülen bei der Gelfiltration ist aufgrund von Größenunterschieden möglich. Der Trennvorgang findet durch eine mit Gelmatrix gefüllte Säule statt. Die Gelmatrix besteht aus vernetzten Polymeren und bildet dadurch Poren. Die für diese Arbeit verwendete Säule enthielt Dextran, das kovalent an quervernetzte Agarosekügelchen gebunden war.

Das Prinzip der Trennung beruht auf der Zugänglichkeit der Poren für kleine Moleküle. Während große Moleküle nicht in der Lage sind, in die Poren zu gelangen, ist dies für kleinere Moleküle möglich, dadurch werden sie zurückgehalten. Folglich haben kleine Moleküle eine niedrigere Flussgeschwindigkeit als große Moleküle und verlassen die Säule zu einem späteren Zeitpunkt. Die Protein-enthaltenden Fraktionen können nun durch UV-Spektroskopie detektiert und aufgefangen werden.

1.8.4.3 Biotinylierung mittels BirA

BirA, eine Biotin-Protein-Ligase aus *E. coli*, katalysiert die Ausbildung einer Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Biotins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes innerhalb folgender 15 Aminosäuren langen Erkennungssequenz des Enzyms: GLNDIFEAQKIEWHE (Schatz, 1993;Beckett et al., 1999).

1.8.4.4 Proteinbestimmung durch den Bradford-Test

Beim Bradford-Test, die zurzeit empfindlichste Methode zur Proteinbestimmung, wird eine Lösung aus Coomassie-Brilliantblau G-250, Phosphorsäure und Ethanol zur Proteinbestimmung verwendet (Koppelman et al., 2004). Der Proteinnachweis beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Coomassie-Farbstoffs im Sauren von 465 nm zu 595 nm. Der Quotient der Absorptionen bei 590 und 450 nm wird gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichgeraden, die durch Standards bekannter Konzentrationen ermittelt worden ist, gewonnen (Löffler and Kunze, 1989).

1.8.4.5 Multimerisierung mittels Streptavidin

Avidin (aus dem Hühnerei) und Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*), beides Biotin-Bindeproteine, weisen jeweils vier Bindungsstellen für Biotin auf, das mit sehr hoher Affinität gebunden wird. Die Bindungskonstante von 10^{15} M^{-1} ist extrem stark. Diese Wechselwirkung nutzt man aus, um biotinylierte Proteine mittels Streptavidin oder Avidin zu tetramersieren. Streptavidin und Avidin neigen dazu, über hydrophobe Wechselwirkungen unspezifisch an Zelloberflächen zu binden. Da Streptavidin eine geringere unspezifische Bindung an Zelloberflächen zeigt als Avidin, das zusätzlich über Glykanketten an Zelloberflächen binden kann, wurde in dieser Arbeit ausschließlich Streptavidin (ca. 60 kDa) verwendet. Kommerziell sind diverse Streptavidin-Fluorochrom-Konjugate erhältlich. Die bei dieser Arbeit verwendeten Streptavidin-Fluorochrom-Konjugate sind Streptavidin-PE (R-Phycoerythrin, 240 kDa, Anregung bei 480 nm, Emission bei 575 nm) und Streptavidin-APC (Allophycocyanin, 104 kDa, Anregung bei 650 nm, Emission bei 660 nm).

1.8.5 *In vitro* Stimulation von antigenspezifischen T-Zellen

1.8.5.1 Peptid-beladene Dendritische Zellen

Die Dendritischen Zellen wurden 1974 von Ralph Steinman in lymphoiden Organen entdeckt und verdanken ihren Namen vor allem den vielen Dendriten, die sie ausbilden (Steinman et al., 1974). Sie sind die potentesten antigenpräsentierende Zellen des adaptiven Immunsystems. DCs nehmen eine Sonderstellung als Mittler zwischen erworbener und adaptiver Immunität ein. Sie besitzen so genannte *pattern recognition receptors* (PRRs), mit denen sie Tumorzellen, virusinfizierte Zellen, bakterielle DNS und andere PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) erkennen können. Folge ist die Produktion von IFN- α , TNF und IL-1 und die Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen. Unreife DCs befinden sich normalerweise in nichtlymphatischem Gewebe wie z.B. die Langerhans-Zellen in der Haut und sind spezialisiert auf Endozytose und Antigen-Prozessierung. Die Antigen-Aufnahme erfolgt über Mikro- und Makropinozytose und über rezeptorvermittelte Endozytose. Die für die T-Zell-Aktivierung so wichtigen kostimulatorischen Moleküle exprimieren sie in diesem Stadium kaum. Erst eine Aktivierung durch Stimuli wie Pathogene, LPS, bakterielle DNS und Gewebsschädigung führt zur chemokinvermittelten Migration ins lymphatische Gewebe, zu morphologischen Veränderungen und zum Verlust ihrer endozytischen Fähigkeit. Sie spezialisieren sich nun auf die Antigen-Präsentation über MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Moleküle sowie auf das Priming von T-Zellen. Dies erfolgt durch eine Hochregulation nach Antigenkontakt von MHC Klasse II-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 und T-Zell-Adhäsions-Molekülen wie CD48 und CD58 sowie durch Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie z.B. Interleukin-12, TNF α und Chemokinen. Reife DCs sind hochspezialisierte T-Zell-Aktivatoren. Während im klassischen Modellversuch der Transplantationsabstoßung für die gemischte Leukozytenreaktion (mixed leukocyte reaction, MLR)

normalerweise gleiche Mengen Donor- und Akzeptorleukozyten gemischt werden müssen, reicht eine DC aus, um 100-3000 T-Zellen zu aktivieren (Banchereau and Steinman, 1998a).

Peptid-beladene Dendritische Zellen eignen sich vorzüglich T-Zellen *in vitro* zu aktivieren (Melief, 1989). Die Gewinnung von DCs lässt sich allerdings nur schlecht standardisieren. Durch CD14⁺-MACS oder Adhärenzschrift gewonnene Monozyten werden mit IL-4 und GM-CSF behandelt. Die daraus differenzierten unreifen DCs anschließend mit LPS gereift und anschließend mit Peptid-beladen. Die Ausbeute und Qualität der auf diese Weise gewonnenen DCs schwankt sehr und ist vom Spender abhängig.

1.8.5.2 Artificielle antigenpräsentierende Zellen

Die artifiziiellen antigenpräsentierenden Zellen (aAPCs) ermöglichen es unter genau definierten Bedingungen, zytotoxische T-Zellen *in vitro* sowohl zu aktivieren, als auch die aktivierten Zellen darauf weiter zu expandieren. Dies ist durchaus auch mit aktivierten, differenzierten autologen DCs möglich, doch deren Gewinnung ist sehr zeitaufwändig und die Zahl der gewonnenen DCs pro Spender variiert sehr stark. (Latouche and Sadelain, 2000a). Deshalb wurden in dieser Arbeit hauptsächlich mit Hilfe von aAPCs expandierte antigenspezifische CTLs gewonnen. Diese spezifischen CTLs können zum einen sowohl für adoptiven Transfer in Krebspatienten verwendet werden (Dudley et al., 2002), aber zum anderen können mit dieser Methode auch vorhergesagte T-Zell-Epitope auf ihre Immunogenität hin überprüft werden (Celis et al., 1994a). Diverse aAPC-Systeme sind daher entwickelt worden. Folgende Systeme nutzen intakte Zellen als Grundbaustein:

- Mit Peptid/MHC-Monomeren beladene B-Zellen (Savage et al., 2004).

- Mit Expressionsvektoren für MHC-Moleküle und kostimulatorische Moleküle transfizierte Mausfibroblasten (Latouche and Sadelain, 2000b).
- Mit Expressionsvektoren für MHC-Moleküle und kostimulatorische Moleküle transfizierte Insektenzellen (Guelly et al., 2002).

Am besten sind die Stimulationsbedingungen mit synthetischen aAPCs zu kontrollieren (Chang, 2006;Butler et al., 2007). Mit Hilfe der bei dieser Arbeit verwendeten Beads, die mit MHC und einen 1:3-Gemisch von anti-CD28 und 4-1BBL (beides kostimulatorische Moleküle) beladen wurden, können CD8⁺ T-Zellen mit vorherbestimmter Avidität expandiert werden (Walter et al., 2003;Rudolf et al., 2008a). Für eine effiziente Stimulation sind die kostimulatorischen Moleküle von großer Bedeutung.

CD28, verwandt mit den Immunglobulinen, ist ein Rezeptor für ein kostimulierendes Signal (Signal 2), welches neben dem durch MHC:TCR-Bindung erzeugten Signal 1 hauptverantwortlich für die Aktivierung naiver T-Zellen ist. CD28 bindet an CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) (Harris and Ronchese, 1999).

4-1BB wird zur TNF-Rezeptorfamilie gezählt. Einige Mitglieder dieser Rezeptorfamilie werden mit kostimulatorischer Wirkung in Verbindung gebracht und können wegen der im Verlauf der T-Zell-Aktivierung unterschiedlichen Expressionsmuster unterteilt werden:

- CD27 wird auf naiven T-Zellen schwach aber konstitutiv exprimiert und innerhalb von 24 h nach Aktivierung der T-Zelle induziert (Borst et al., 1989). Da CD27 erst nach der T-Zell-Aktivierung stärker exprimiert wird und sein Ligand CD70 erst induziert werden muss, folgert man, dass CD27 ein Signal ist, welches während der klonalen Expansion wirkt (de Jong et al., 1991; Gravestien et al., 1993). Die Blockierung der CD27-CD70-Wechselwirkung verhindert die Proliferation und Zytokinproduktion (Hintzen et al., 1995). So vermehren sich CD27⁺ Zellen zunächst normal, aber nach ca. 3 Tagen zunehmend schlechter (Hendriks et al., 2000). CD27 könnte daher eine Rolle bei der primären Proliferation der T-Zelle innehaben, entweder durch antiapoptotische Wirkung oder durch Beeinflussung des Zellzyklus (Croft, 2003b).
- 4-1BB (Pollok et al., 1995), CD30 (Ellis et al., 1993) und ihre Liganden haben meist erst nach 2-4 Tagen ihre maximale Expression erreicht (Shanebeck et al., 1995; Gilfillan et al., 1998; Futagawa et al., 2002). Diese Interaktionen scheinen essentiell zu sein, um die T-Zell-Antwort aufrecht zu erhalten (Croft, 2003a). Die Blockierung von 4-1BBL vermindert durch Apoptose die Zahl von Effektorzellen ab ca. 5 Tagen nach der Aktivierung deutlich (Cooper et al., 2002). 4-1BBL beeinflusst anscheinend durch die Vermittlung antiapoptotischer Signale das Überleben der generierten Effektorzellen positiv (Lee et al., 2002a). Weniger genau erforscht ist die Funktion von CD30. CD30 wird bevorzugt in T_H2-Zellen exprimiert (Del et al., 1995; Nakamura et al., 1997). Nachdem CD8⁺ antigenspezifische Zellen in CD30Ligand-defiziente Mäuse transferiert worden sind, proliferierten die Effektorzellen nicht und es entwickelten sich nur wenige Gedächtnis-T-Zellen. Es ist möglich, dass CD30 ähnlich wie 4-1BB wirkt (Podack et al., 2002; Nishimura et al., 2005).

Betrachtet man die Komplexität der Interaktionen zwischen antigenpräsentierender Zelle und zu aktivierender T-Zelle, wäre es wohl durchaus sinnvoll weitere kostimulatorische Moleküle wie CD27 und CD30 oder Interleukine wie IL-15 und IL-21 (Davis et al., 2007; Brandt et al., 2007) in das System artifizierender APCs einzubeziehen, um die Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen weiter zu erhöhen. Auch sollte darüber nachgedacht werden, ob mit unterschiedlichen Molekülen beladene aAPCs für bestimmte zu generierenden T-Zelltypen wie CTL, T_H1, T_H2 oder T_H17 entwickelt werden sollten.

1.9 Zielsetzung der Doktorarbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen T-Zellen, die spezifisch für MHC-Klasse I restringierte T-Zell-Epitope aus den zwei Nierenzellkarzinom-assoziierten Antigenen SPAG4 und VEGF sind, generiert und funktionell charakterisiert werden. Folgende Möglichkeiten der Identifizierung von immuntherapeutisch wirksamen Peptiden sollen in dieser Arbeit Anwendung finden. Das potentielle T-Zell-Epitop SRFGGAVVR aus dem Protein VEGF wurde durch massenspektrometrische Verfahren entdeckt. Dieser natürliche Ligand soll auf Eignung als T-Zell-Epitop durch Immunogenitätsanalysen getestet werden. Das SPAG4-Protein wurde durch Genexpressionsanalysen als Nierenzellkarzinom-assoziiertes Antigen eingestuft. Für die Identifizierung von SPAG4-T-Zell-Epitopen sollen durch bioinformatische Algorithmen vorhergesagte HLA-Liganden (Peptide) durch *in vitro* Generierung von spezifischen und funktionalen T-Zellen als T-Zell-Epitope verifiziert werden. Zusätzlich ist geplant durch T-Zellen vermittelte spezifische Lyse von Nierenzellkarzinomzelllinien den Nachweis zu erbringen, dass diese T-Zellepitope natürliche Liganden darstellen.

Nach dem Ansatz der Reversen Immunologie sollen mögliche MHC Klasse II restringierte T-Zell-Epitope von diversen Proteinen von *Aspergillus fumigatus* vorhergesagt auf ihre immunologische Relevanz getestet und darauf funktional charakterisiert werden. Dafür ist geplant existierende T-

Zell-Antworten diverser gesunder Blutspender gegen die vorhergesagten Peptide zu ermitteln. Die Funktionalität dieser T-Zell-Antworten soll durch intrazelluläre Zytokinfärbung näher bestimmt werden.

Die identifizierten T-Zell-Epitope könnten daraufhin immuntherapeutisch eingesetzt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Cryoröhrchen, 2 ml (Greiner)

Reaktionsgefäße (Eppendorf)

Glasflaschen (Schott)

96napf-Platten (Corning 3799)

Spritze, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml (Becton Dickinson) und Kanüle, 26G (Braun)

Sterilfilter, 0,22 µm (Corning)

Vakuumfiltrationseinheit (Stericup 500 ml bzw. Steritop 250 ml/500 ml, 0,22 µm, Millipore)

0,5 ml FACS-Röhrchen (Greiner)

5 ml FACS-Röhrchen, steril (Becton Dickinson, 352058)

15 ml Falcon-Röhrchen, 50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner bio-one)

Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml, 550 ml) (Greiner bio-one)

Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 20 µl, 2 µl) (Starlab)

MACS-Säulen: LS – max. 2×10^9 Zellen, max. 10^8 markierte Zellen (Miltenyi Biotec)

ELISpot Human IFN γ ELISpot Set (Becton Dickinson)

LUMA-Platte (Packard, Yttrium Silicate Scintillator-coated White Microplate)

2.1.2 Geräte

Dampfsterilisator I (KSG 113)

Dampfsterilisator II (Sauter 11-6-9 HS1-FD)

Densitometer GS-700 mit Software Molecular Analyst 1.4 (Biorad)

Einfrierbehälter "Cryo Freezing Container" (Nalgene)

ELISA-Reader Spectramax 340 mit Software Softmax Pro 2.1 (Molecular Devices)

ELISpot-Reader CTL Series 3B, mit Software ImageAquisition 4.5 (Cellular Technologies LTD)

FPLC-System mit Superdex 75 HiLoad Säule (26 mm Durchmesser, 60 cm Länge), Fraktionssammler und UV-Detektor (Pharmacia)

Gammazelle (Caesiumquelle, Gammacell 1000 Elite Nordion International Inc.)

Durchflusszytometer:

- FACS-Calibur mit Software Cell Quest oder Cell Quest Pro (Becton Dickinson)
- FACS-Canto II mit Software FACSDiva (Becton Dickinson)
- FACS Aria Cell-Sorting System mit Software FACSDiva (Becton Dickinson)
- FACS LSR II mit Software FACSDiva (Becton Dickinson)

Inkubatoren:

- Inkubator für Agarplatten (Heraeus B6)
- Inkubator für Gewebekulturen (Labotect 3250) mit 5 % CO₂-Begasung (Messer)
- Inkubator für Schüttelkulturen (Infors Multitron)

Lichtmikroskop (Leica DMIL)

Magnetrührer (IKA Labortechnik RCT basic)

Membran-Vakuumpumpe (Vacubrand)

N₂-Druckgasflasche (AGA Gas GmbH)

pH-Meter (Knick 765)

Rotator mit Drehteller und Klammern (Bachofer)

Flachschüttler (IKA-Vibrax-VXR)

Feinwaage im Bereich 0.01 - 2.5 g (Genauigkeit mind. 0.01 g)

Feinwaage im Bereich 1 - 1000 mg (Genauigkeit mind. 1 mg)

Schütteltisch (Heidolph Duomax 1030)

Biologische Sicherheitswerkbank der Klasse 2 (Technoflow Integra Biosciences)

TaqMan ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

Thermocycler („*Techne Genius*“, Labtech International)

Tischkühlzentrifuge (Heraeus Biofuge fresco, Heraeus Megafuge, Heraeus Megafuge, Eppendorf Centrifuge 5415R)

Mini-Tischzentrifuge (Qualitron)

UV-Spektrometer (Pharmacia Ultraspec 3000)

Vortexer (MS 1 IKA-Works, Inc.)

Wasserbad (Thermomix BM-S, Braun Biotech)
Wasserstrahlpumpe (Brand)
Zählkammer Neubauer, Tiefe 0,1mm (LO-Laboroptik)
Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus mit Rotor SS 34 und SLA 3000
Kühlschrank, auf 4 °C eingestellt
Gefrierschrank, auf -20 °C eingestellt
Gefrierschrank, auf -80 °C eingestellt
Ultraschallbad (mit Wasser gefüllt)
Pipettierhilfe für die Benutzung mit 5-25 ml serologischen Pipetten
Kalibrierte Einkanalpipetten 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 2 µl, passend zu Pipettenspitzen.
Kalibrierte Mehrkanalpipette 200 µl, passend zu Pipettenspitzen.
MACS-Magnet (Miltenyi Biotec)
Szintillationszähler (Wallac, 1450 Microbeta Plus, Liquid Scintillation Counter)

2.1.3 Puffer und Lösungen

ddH₂O: H₂O doppelt destilliert (aus Heraeus Destamat Bi 18 E) bei Bedarf sterilfiltriert mit Vakuumfiltrationseinheit oder Spritzenfilter

TBS: 20 mM Tris (Sigma), 150 mM NaCl (Merck), pH 8.0 bei Raumtemperatur mit HCl (Merck) eingestellt. Mit Vakuumfiltrationseinheit und Membran-Vakuumpumpe filtriert. Autoklaviert bei 121 °C/20'

PBS (BioWHITTAKER)

FCS/FBS (hitzeinaktiviert für 30' bei 56 °C; PAA Laboratories)

Humanserum (AB Serum, hitzeinaktiviert für 30' bei 56 °C; PAA Laboratories oder CCpro)

T-Zellmedium: RPMI 1640 + 25 mM HEPES + L-Glutamax (Gibco), 10 % hitzeinaktiviertes Humanserum, 1 % Penicillin/Streptomycin (BioWHITTAKER), 20 µg/ml Gentamycin (BioWHITTAKER), sterilfiltriert mit Vakuumfiltrationseinheit

Tetramer-Färbepuffer TSBA: 50 % PBS, 50 % hitzeinaktiviertes (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth), 0,01 % Natriumazid (Merck)

Standard-FACS-Puffer PFEA: PBS mit 2 % hitzeinaktiviertem (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth), 0,01 % Natriumazid (Merck)

BSA-FACS-Puffer PBEA (enthält kein freies Biotin): PBS mit 0,5 % BSA (Sigma A-3059), 2 mM EDTA (Roth), 0,01 % Natriumazid (Merck)

Steriler Tetramer-Färbepuffer sTSB: 50 % PBS, 50 % hitzeinaktiviertes (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth)

Steriler Standard-FACS-Puffer sPFE: PBS mit 2 % hitzeinaktiviertem (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth)

Steriler BSA-FACS-Puffer sPBE: PBS mit 0,5 % BSA (Sigma A-3059), 2 mM EDTA (Roth)

PBS+E: PBS mit 2 mM EDTA (Roth)

FACS-Fix: FACS-Puffer PFEA mit 1 % Formaldehyd (Fluka)

FACS-Clean, FACS-Rinse, FACS-Flow (Becton Dickinson)

Einfriermedium: 90 % FCS und 10 % DMSO

DMEM-Spezialmedium

^{51}Cr ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$), ($c = 5 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), (NEN Amersham Bioscience)

2.1.4 Peptide

Folgende Peptide wurden für diese Arbeit benötigt. Sie wurden nach Standard-Fmoc-Chemie von Patricia Hrستیć in der Abteilung der Molekularen Immunologie hergestellt und durch HPLC- und MS-Analyse auf Identität und Reinheit überprüft.

Für die Rückfaltung der Monomere wurden die Peptide in DMSO in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst.

Für alle Anwendungen in der Zellkultur wurden die Peptide zuerst in DMSO in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst, und daraufhin mit ddH₂O auf 1 mg/ml verdünnt.

Tabelle 2.1: SPAG4-Peptide. Diese mit Hilfe von SYFPEITHI für die angegebenen Allele vorhergesagten Peptide wurden synthetisiert.

SEQUENZ	Molmasse	Position	SYFP-Score	Allel	Referenz
LLFQGLSVL	988,60	138-146	29	HLA-A*0201	SYFPEITHI
GLLYLVSP	973,60	184-192	27	HLA-A*0201	SYFPEITHI
GPSCGEPAL	829,40	54-62	24	HLA-B*0702	SYFPEITHI

Tabelle 2.2: VEGF-Peptid.

SEQUENZ	Molmasse	SYFP-Score	Allel
SRFGGAVVR	947,53	30	B*2705

Tabelle 2.3: *Aspergillus fumigatus*-Peptide. Mit Hilfe von SYFPEITHI wurden für die angegebenen Allele Peptide vorhergesagt. Es wurden die Peptide mit den höchsten SYFPEITHI Scores und hoher Promiskuität für diverse Proteine von *Aspergillus Fumigatus* synthetisiert.

SEQUENZ	Quelle	Molmasse	Position	Allele (DRB1*...)	Interne Peptid-ID
IKNLFLLAATAVSVL	Asp f1	1571,97	4-18	-01,-04,-07,-11	60554
ATAVSVLAAPSPLDA	Asp f1	1381,75	12-26	-01,-07,-11	60555
DDHYLLEFPTFPDGH	Asp f1	1801,80	116-130	-01,-15	60557
QNGMGKDDHYLLEF	Asp f1	1665,75	110-123	-03,-04,	60562
RATWTCINQQLNPKT	Asp f1	1772,90	27-41	-04,-11	60564
PARVIYTPNKVFCG	Asp f1	1726,89	145-159	-03,-07,-11,-15	60566
KVFCGIVAHQRGNQG	Asp f1	1612,83	155-169	-11	60569
KRLLYSQAKAESNSH	Asp f1	1730,91	47-61	-04,-11	60571
LAVLLPLAAPLVATL	Asp f2	1473,95	7-21	-01,-03,-15	60575
RPTMEAVGAYDVIVN	Asp f2	1633,81	99-113	-01,-15	60577
APLVATLPTSPVPIA	Asp f2	1445,85	15-29	-01,-04,-07	70002
GAYDVIVNGDKANVL	Asp f2	1546,80	106-120	-01,-03,-04	70004
VIALAKSNGTESTHD	Asp f2	1541,77	209-223	-01,-11	70006
SETVICDRSYTTRRW	Asp f2	1871,90	146-160	-03,-04	70010
SQGYTVAGSETNTFW	Asp f2	1646,72	166-180	-04,-07	70012
NEAVELARHAKAHIL	Asp f2	1670,92	69-83	-04,-11	70014
SDLMHRLYHVPVAVGQ	Asp f2	1721,87	182-196	-04,-11,-15	70017
VTSFPIHSSCNATQR	Asp f2	1646,78	47-61	-01,-15	71003
EPVFFSWDAGAVTSF	Asp f2	1658,76	36-50	-01,-07,-15	71005
ALQYFALEAYAFDIA	Asp f2	1704,84	226-240	-01,-15	71007
AGSFSSLSGHQANVY	Chi B	1523,70	248-262	-01,-11	70022
QANVYNDTSNPLSTP	Chi B	1619,74	258-272	-03,-04	70034
WNLMAVDYAGSFSSL	Chi B	1723,76	240-254	-03,-04,-11	70035
FVLLLREVRTALDSY	Chi B	1794,00	188-202	-03,-04,-11	70038

GNNVYGCIKQLYLLK	Chi B	1724,93	108-122	-03,-04	70039
SPNFAPAASTDAGRK	Chi B	1488,73	140-154	-04,-07	70041
YRSVVYFVNWAIYGR	Chi B	1891,97	43-57	-04,-15	70043
LYAFANVRPETGEVH	Chi B	1701,85	73-87	-11,-15	70045
EHVLPDIMASYSYDA	Chi B	1709,76	338-352	-01,-03,-07	71017
VWDYKALPQAGATEH	Chi B	1684,82	325-339	-01,-04,-11,-15	71028
PRSRHVDGFGVHTF	Cat B	1757,88	237-251	-01	70048
KFHWKSLQGKASMVW	Cat B	1831,96	264-278	-01	70049
GTKLKKLDGLKVGVL	Cat B	1568,00	560-574	-01	70051
IPVFFIQDAILFPDL	Cat B	1746,96	177-191	-01,-07	70055
YGDFSNITAASFLAK	Cat B	1603,79	115-129	-01,-04	70057
HTLLWAMSGHGIPRS	Cat B	1661,85	225-239	-01,-11	70059
AWDFFSQQPSTMHTL	Cat B	1794,8	213-227	-01,-04	70061
VHTFRFVTDDGASKL	Cat B	1691,86	248-262	-01,-03,-15	70063
FVPITKLGKMQLNRN	Cat B	1758,00	338-352	-01,-03,-07,-11	70065
TRFYTDEGNFDIVGN	Cat B	1746,79	161-175	-04,-07	70068
VGVLGSVQHPGSVEG	Cat B	1420,73	571-585	-04,-11	70073
VRGVDFTEDPLLQGR	Cat B	1700,89	371-385	-04	70076
FTAPGRTTSGKLVRA	Cat B	1560,87	456-470	-07,-11	70078
FVRFSTVAGSRGSSD	Cat B	1571,77	137-151	-11,-15	70079
TDDFANDLKEGLRTF	Cat B	1740,83	704-718	-03	71047
SHELIAGAASFAGMK	cipC	1488,74	26-40	-01	70107
TKGLDEADKIRARRH	cipC	1764,97	76-90	03,-04,-11,-15	70116
HREVYGERRHESSL	cipC	1840,89	12-26	-04,-11	70118

Tabelle 2.4: Peptide aus viralen oder Tumorantigenen, die als T-Zell-Epitope beschrieben wurden und als Positivkontrollen dienten.

SEQUENZ	Quelle	Allel	Position	Referenz
NLVPMVATV	HCMV pp65	HLA-A*0201	495-503	(Solache et al., 1999)
TPRVTGGGAM	HCMV pp65	HLA-B*0702	417-426	(Wills et al., 1996)
RIPHERNGFTVL	HCMV pp65	HLA-B*0702	265-275	(Weekes et al., 1999)
ELAGIGILTV	Melan-A	HLA-A*0201	26-35	(Valmori et al., 1998)
KTSLYNLRRGTALA	EBNA1_EBV	HLA-DRB1	514-527	(Khanna et al., 1995)
PGPLRESIVCYFMVFLQTHI	EBNA1_EBV	HLA-DRB1	551-570	(Paludan et al., 2002)
HPTFTSQYRIQGKLE	HCMV pp65	HLA-DRB11	366-380	(Nastke et al., 2005)
KPGKISHIMLDVAFTSH	HCMV pp65	HLA-DR	283-299	(Nastke et al., 2005)
SEHPTFTSQY	HCMV pp65	HLA-B*44	364-373	(Nastke et al., 2005)
LPLKMLNIPSINVH	HCMV pp65	HLA-DRB1	1115-1124	(Calvo-Calle et al., 2007)

Tabelle 2.5: Peptide aus viralen Antigenen, die als T-Zell-Epitope beschrieben wurden und als Negativkontrollen dienten.

SEQUENZ	Quelle	Allel	Position	Referenz
YVDRFYKTLRAEQASQEV	HIV GAG	HLA-DR	164-181	(Geels et al., 2006)
ILKEPVHGV	HIV-1 RT	HLA-A*0201	476-484	(Walker et al., 1989)

2.2 Methoden

2.2.1 Werkzeuge zur Arbeit mit antigenspezifischen Zellen

2.2.1.1 Proteinexpression in *E. coli* und Aufreinigung

Verwendete Materialien:

Bakterien:

- BL21 pLysS *E. coli*, transformiert mit Expressionsvektor pET-3d für eine modifizierte Form der HLA- schweren Kette (ohne Transmembrandomäne, mit Biotinylierungssignal am Carboxyterminus) für die HLA-Allele A*0201, B*0702 und B*2705
- BL21 *E. coli*, transformiert mit Expressionsvektor pET-3a für humanes β_2 -Mikroglobulin.

Ampicillin 100 mg/ml (Roth) in H₂O

Chloramphenicol 34 mg/ml (Sigma) in Ethanol p.a.

Niedrigsalz LB-Medium: 10 g/l Trypton Pepton (Difco), 5 g/l Bacto Yeast Extract (Difco), 5 g/l NaCl (Merck)

Hochsalz LB-Medium: 10 g/l Trypton Pepton (Difco), 5 g/l Bacto Yeast Extract (Difco), 10 g/l NaCl (Merck)

LB-Amp Platten (Hochsalz LB mit 100 μ g/ml Ampicillin, 1,5 % Agar (Difco))

LB-Amp-Camp Platten (wie LB-Amp mit zusätzlich 12,5 μ g/ml Chloramphenicol)

1 M IPTG (Peqlab) in H₂O

Glashomogenisator 60 ml mit Kolben "S" 10-30 μ m (Merck)

Plastikmakroküvetten (Brand)

Quarzmikroküvette (Hellma)

Triton-Waschpuffer: 50 mM Tris pH 8 (Sigma), 100 mM NaCl (Merck), 0,5 % Triton-X-100 (Sigma), 1 mM DTT (Sigma), 1 mM EDTA (Roth), 0,1 % Natriumazid (Merck)

Resuspensionspuffer: 50 mM Tris pH 8 (Sigma), 100 mM NaCl (Merck), 1 mM DTT (Sigma), 1 mM EDTA (Roth), 0,1 % Natriumazid (Merck)

Harnstoffpuffer: 8 M Harnstoff (UCB), 10 mM Tris pH 8 (Sigma), 100 mM NaH₂PO₄ (Merck), 0,1 mM EDTA (Roth), 0,1 mM DTT. Harnstoff als 10 M Stammlösung mit "Duolite" Indikatorbeads (Merck) gelagert und vor Gebrauch filtriert

Hydroxyapatit (DNA Grade Bio-Gel HTP, BioRad)

Sonifier 250 (Branson Ultrasonics)

Vortexer (MS 1 IKA-Works, Inc.)

DNAse I grade II (Böhringer)

1 M MgCl₂ (Merck) in H₂O

Durchführung:

Transformierte Bakterien, die bei -80 °C in Glycerin gelagert worden waren wurden aufgetaut, und in einem Verdünnungsausstrich auf geeignete sterile Agarplatten BL21pLysS → LB-Amp-Camp Platte und BL21 → LB-Amp Platte übertragen (LB-Amp Platte: 100 µg/ml Ampicillin - LB-Amp-Camp Platte: 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol). Daraufhin wurden die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert und am Morgen bis zum Animpfen der Vorkultur bei 4 °C zwischengelagert.

Für diese Vorkultur wurden zweimal 250 ml steriles Niedrigsalz LB-Medium in einer 500 ml- Schüttelflasche mit Schikane zuerst autoklaviert und dann auf 37 °C vorgewärmt und mit Antibiotika versetzt (Konzentrationen wie in Agarplatten). Mit einer Pipettenspitze wurde eine Kolonie von den Verdünnungsausstrichen gepickt und eine der Flaschen damit inokuliert. Die andere Flasche diente als Sterilkontrolle. Beide Flaschen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Um sicher zu gehen, dass die Bakterien im Medium gut anwachsen, ist es möglich vor Inokulierung der Vorkultur, dies in einem 50 ml Röhrchen mit 25 ml LB-Medium zu prüfen und daraufhin erst die Vorkultur mit 1 ml davon zu inokulieren.

Für die Hauptkultur wurden 20 x 1 l Niedrigsalz LB-Medium in 2 l-Flaschen, soweit möglich mit Schikane, autoklaviert, auf 37 °C vorgewärmt und wie die Vorkulturen mit Antibiotika versetzt. Dann wurde jede Flasche mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C/180 rpm inkubiert. Dabei wurden aus einer markierten Flasche regelmäßig Proben entnommen und deren OD₆₀₀ in Einmal-Plastikküvetten (1000 µl) gegen steriles Niedrigsalz LB-Medium gemessen.

Wurde eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 erreicht, wurde jede Flasche mit 0,5 ml IPTG 1 M versetzt und noch einmal 4 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach diesen 4 h wurden die Bakterien bei 4 °C/4200xg für 20' abzentrifugiert (Rotor SLA 3000, 5000 rpm). Die Bakterienpellets mussten nun im Kühlraum in einem möglichst kleinen Volumen an eiskaltem PBS aufgenommen und vereinigt werden. Dies ließ sich aber viel schneller mit Resuspendieren unter Zugabe von Glasperlen bewerkstelligen. Dieses Gemisch wurde daraufhin gevortext. Die Glasperlen konnten mit einem Sieb wieder entfernt werden. Nun war es möglich die Suspension für einige Tage bei -80 °C zu lagern.

Nachdem die Bakterien wieder aufgetaut waren, wurde diesen MgCl₂ (10 mM) und DNAse I (10 µg/ml) beigegeben und auf Eis durch Ultraschall (4 Runden mit den Einstellungen Output 5, Cycle 50 %, 2') lysiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation des gewonnenen Lysats bei 4 °C/27000xg für 20' (Rotor SS34, 15000 rpm). Nach der Zentrifugation war ein mehrschichtiges Pellet sichtbar: Eine feste weißliche untere Schicht (Einschlusskörper) wurde von einer lockeren dunklen oberen

Schicht (Rest der zerstörten Bakterien) bedeckt. Falls diese Schichtung nicht zu erkennen war, musste wieder DNase zugegeben werden und die Ultraschallbehandlung wiederholt werden. Dann wurde zuerst der Überstand abgeschüttet, bevor die obere Schicht durch Abkratzen mit dem Spatel entfernt wurde. Die Einschlusskörper wurden in ca. 30 ml eiskaltem Triton-Waschpuffer im Glashomogenisator auf Eis resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Nach circa vier Wiederholungen dieser Aufreinigung sollte das Pellet der Einschlusskörper sehr hell und der Überstand klar aussehen.

Nun galt es das Detergenz Triton zu entfernen, was durch Waschen der Pellets mit 30 ml eiskaltem Resuspensionspuffer erreicht wurde. Davor wurden das Zentrifugenröhrchen und der Glashomogenisator mit Resuspensionspuffer gespült. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen, die Einschlusskörper mit einem Spatel zerkleinert, circa 25 ml Harnstoffpuffer zugegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator gedreht. Am nächsten Tag wurde die Harnstofflösung 20' bei 27000xg/4 °C zentrifugiert, bei Auftreten eines Pellets aus nicht gelösten Einschlusskörpern wurde der Überstand abgenommen und aufbewahrt und durch erneute Zugabe von Harnstoffpuffer der Lösevorgang fortgesetzt. Wiederum wurde die Suspension mehrere Stunden geschüttelt und die Überstände nach erneuter Zentrifugation vereinigt.

Das erhaltene Harnstoffextrakt wurde spektrometrisch auf DNS-Kontaminationen getestet (Spektrum im Bereich von 240-320 nm). Für die Aufnahme des UV-Spektrums wurde eine Quarzküvette (100 µl) verwendet, die vorher gründlich mit der zu messenden Referenz- oder Probenlösung gespült wurde. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte bei Einschlusskörpern 0,58 betragen. Ein größerer Wert deutet auf eine DNS-Kontamination hin. Diese Kontamination könnte durch Zugabe von 10 % Hydroxyapatit zum Harnstoffextrakt, 5' Inkubation bei RT und Zentrifugation bei 4 °C/27000xg für 20' weitgehend entfernt werden.

Die Reinheit des erhaltenen Harnstoffextrakts könnte außerdem auf einem 12 % SDS Polyacrylamidgel mit anderen HLA-Molekülen als Standard überprüft werden. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test wurde der Harnstoffextrakt aliquotiert (8 mg für HLA schwere Kette, 7 mg für β_2 -Mikroglobulin) und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.2 Rückfaltung von MHC-I-Molekülen

Verwendete Materialien:

Amicon 400 ml Rührzelle (Millipore) mit N₂-Druckgasflasche und Magnetrührer

Biomax 30 PBTK Membran, 76 mm Durchmesser, NMWL 30,000 (Millipore)

Amicon Ultra – 15 Ultrafiltrationseinheit, NMWL 10,000 (Millipore)

Membranpumpe (KNF Neuberger)

L-Arginin freie Base (Sigma)

HEPES (Roth)

EDTA 0,5 M, pH 8 (Roth)

Reduziertes Glutathion (Sigma)

Oxidiertes Glutathion (Sigma)

1000 x PMSF (Sigma): 200 mM in Methanol (Merck), 250 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert

1000 x Leupeptin (Roche): 1 mg/ml in ddH₂O, 250 µl-Aliquots bei -20 °C gelagert

1000 x Pepstatin (Roche): 0,7 mg/ml in Methanol (Merck), 250 µl-Aliquots bei -80 °C

TBS: 20 mM Tris (Sigma), 150 mM NaCl (Merck), pH 8,0 (eingestellt mit HCl 37 % p.a. (Merck) bei 10 °C). Nach Sterilfiltration (Millipore) und Autoklavierung wird dem TBS 0,02 % NaAzid (Merck) zugegeben und das TBSA bei 4 °C gelagert

Faltungspuffer 17,42 g L-Arginin (freie Base), 5,95 g HEPES wurden in 1 ml EDTA 0,5 M pH 8 und 211 ml ddH₂O auf einem Magnetrührer aufgelöst. Bei 10 °C wurde mit konzentrierter HCl (5-10 ml) ein pH-Wert von 7,76 eingestellt, anschließend mit H₂O auf 250 ml aufgefüllt, sterilfiltriert und bei 120 °C für 20' autoklaviert. Lagerung bei 4 °C

Injektionspuffer: 3 M Guanidin-HCl (Fluka), 10 mM Natriumacetat (Sigma), 10 mM EDTA (Roth), mit HCl auf pH 4,2 eingestellt und aliquotiert bei -80 °C gelagert

S75 FPLC-Säule (Pharmacia): HiLoad 26/60 Superdex 75 Prep Grade

Schwere Kette (8 mg) und β₂-Mikroglobulin (7 mg) in Harnstoffpuffer gelöst

Synthetisches Peptid (ca. 5-7 mg) 10 mg/ml in DMSO (Merck) gelöst

Alle Peptide wurden nach Standard-Fmoc-Chemie hergestellt und durch HPLC- und MS-Analyse auf Identität und Reinheit überprüft. Die für die Rückfaltungen verwendeten Peptide sind in den Tabellen 2.1-2.4. zusammengestellt.

Durchführung:

Der Faltungspuffer wurde im Inkubator für Schüttelkulturen (Infors Multitron) bei 10 °C und 100 rpm vortemperiert. Anschließend wurden unter Rühren 385 mg reduziertes Glutathion, 77,5 mg oxidiertes Glutathion und 250 µl PMSF 1000 x zugegeben. Dann folgte die tropfenweise Zugabe der Peptidlösung zum Faltungspuffer. 8 mg α-Kette, die bei Raumtemperatur aufgetaut worden ist, wurde mit Harnstoffpuffer auf eine Konzentration von 20 mg/ml eingestellt, bevor 700 µl

Injektionspuffer zugegeben wurden und die Lösung in einer 1 ml-Spritze mit 26 G Kanüle aufgezogen wurde. Auch 7 mg β_2 -Mikroglobulin in Harnstoffpuffer wurden mit 780 μ l Injektionspuffer versetzt und in einer Spritze aufgezogen. Nun wurde bei maximaler Rührgeschwindigkeit zuerst die schwere Kette und dann die leichte Kette so rasch und nahe wie möglich am Rührer in den Faltungspuffer injiziert.

Nach 12 stündiger Inkubation über Nacht im Inkubator bei 10 °C und 100 rpm wurden am nächsten Morgen erneut 8 mg schwere Kette wie oben beschrieben zugegeben. Nach weiteren 12 h Inkubation erfolgte unter gleichen Bedingungen die nächste Zugabe von 8 mg schwerer Kette, der folgte wiederum eine 12 stündige Inkubation bei 10 °C im Schüttler.

Die während dieser ersten Rückfaltungsphase entstandenen HLA-Aggregate wurden durch Vakuumfiltration (0,22 μ m-Vakuumfilter) an einer Membranpumpe entfernt. Im Anschluss wurde das Filtrat in einer Amicon-Rührzelle mit Biomax 30 Membran, welche zuvor mit 250 ml filtriertem ddH₂O gespült wurde, von 250 ml auf circa 25 ml unter leichtem Rühren und ca. 50 psi Überdruck eingengt. Das Retentat wurde dann aus der Rührzelle pipettiert und die Membran mit 5 ml Permeat gespült und die Spüllösung mit dem Retentat vereinigt, welches nun bis auf weiteres bei 4 °C gelagert wurde. Zur Ressourcenschonung wurde auf die Membran 200 ml Membran-Waschlösung in die Rührzelle gegeben und für 30' bei Raumtemperatur langsam gerührt. Dies regenerierte die Membran und sie konnte ein weiteres Mal benutzt werden. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran der Rührzelle entnommen und in TBSA bei Raumtemperatur gelagert.

Das Permeat wurde für eine zweite Rückfaltung verwendet, da es noch überschüssiges Peptid sowie reduziertes und oxidiertes Glutathion enthält. Bis auf die Zugabe von reduziertem und oxidiertem Glutathion sowie Peptid wiederholte sich die oben beschriebene Prozedur der ersten Rückfaltungsphase. Schließlich wurde beim Einengen der Lösung während der zweiten Rückfaltungsphase in der Amicon-Rührzelle das Retentat der ersten Rückfaltungsphase zugegeben. Hierbei wurde die regenerierte Membran wieder verwendet.

Dieses Retentat wurde nun durch Zentrifugation bei 3200xg/4 °C für 5' (Megafuge 4000 rpm) von erneut ausgefallenen Aggregaten gereinigt und in einer Amicon Ultra – 15 Ultrafiltrationseinheit auf ca. 5 ml in einer Zentrifuge eingengt (3200xg/4 °C in einer Megafuge bei 4000 rpm). Danach wurde die Membran mit 1 ml Permeat gespült und die Spüllösung mit dem Retentat vereinigt.

Um die möglicherweise neu entstandenen Aggregate nochmals zu entfernen wurde wiederum bei 3200xg/4 °C für 5' zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine S75 FPLC-Säule (Pharmacia) aufgetragen. Die Auftrennung fand bei einer Flussrate von 3 ml/min statt, während 5 ml-Fraktionen unter spektroskopischer Kontrolle (280 nm) gesammelt wurden. Die Fraktionen (circa 25 -30 ml Gesamtvolumen), welche das

Monomer enthielten, wurden vereinigt und die Proteaseinhibitoren PMSF, Pepstatin und Leupeptin unmittelbar danach zugegeben.

2.2.1.3 Biotinylierung der Monomere durch BirA

Verwendete Materialien:

10 % Natriumazid (Merck)

BirA-Ligase

D-Biotin (Sigma) 100 mM in 200 mM TrisBase (Sigma); 250 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert

ATP (Sigma) 100 mM in H₂O (eingestellt auf pH 7,0); 300 µl Aliquots bei -80 °C gelagert

Tris (Sigma) 1 M pH 8.0 (bei 25 °C eingestellt)

MgCl₂ (Merck) 1 M

Durchführung:

Das in den Fraktionen in Lösung enthaltene rückgefaltete Monomer wurde in einer, zuvor mit TBS äquilibrierten, Amicon Ultra – 15-Ultrafiltrationseinheit auf ein für die Biotinylierungsreaktion benötigtes Reaktionsvolumen von 5 ml eingeengt. Die eingeengte Lösung wurde durch Zentrifugation bei 3200xg/4 °C für 5' erneut von Niederschlägen befreit und dann wurde der Lösung 400 µl Tris, 25 µl MgCl₂ und 250 µl ATP zugegeben. Nachdem die Lösung invertiert wurde, erfolgte der Start der Biotinylierungsreaktion durch die weitere Zugabe von 20 µg BirA Enzym und 28,5 µl Biotin. Diese Lösung wurde für 12-16 h bei 27 °C im Wasserbad über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die entstandenen Aggregate bei 3200xg/4 °C für 5' (Megafuge 4000 rpm) entfernt. Darauf trennte eine erneute Gelfiltration, wie unter 2.2.1.3 beschrieben, die biotinylierten Monomere von freiem Biotin. Die Monomer-Fraktionen wurden vereinigt, mit PMSF, Leupeptin und Pepstatin sowie 2 mM EDTA und 0,1 % Natriumazid versetzt und in einem frischen Amicon Ultra – 15-Ultrafiltrationseinheit maximal aufkonzentriert (Restvolumen circa 200 µl). Nach dem Nachspülen der Membran sollten nicht mehr als 300 µl Volumen übrig bleiben, das dann für 5' bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert wurde. Bei einer angenommenen Dichte von 1 g/ml wurde das genaue Volumen durch Wiegen bestimmt. Mit dieser Information und dem Bradford-Test war man in der Lage die Proteinkonzentration zu ermitteln. Die Konzentration der Monomerlösung wurde auf 2 mg/ml eingestellt und in Aliquots von je 50 µg in lichtundurchlässigen Cryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

2.2.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test

Verwendete Materialien:

96napf Flachbodenplatte (Greiner Cellstar)

Roti-Nanoquant Proteinassay 5x (Roth), als Arbeitslösung frisch 1:5 in H₂O verdünnt

BSA (Sigma): 0-100 µg/ml im Lösungsmittel der Probenlösung aliquotiert und bei -20 °C gelagert

ELISA-Reader Spectramax 340 mit Software Softmax Pro 2.1 (Molecular Devices)

Durchführung:

Durch eine Abschätzung der Proteinkonzentration mit Hilfe der weniger empfindlichen Messung bei 280 nm konnte die Probenlösung entsprechend verdünnt werden, so dass die Konzentration im Bereich der Standardkurve lag. Um sicher zu gehen sollten zwei Verdünnungen mit unterschiedlichen Konzentrationen pipettiert werden. Der Bradford-Test wurde in 96napf-Platten durchgeführt. Pro Probe wurde eine Zeile der Platte verwendet und die ersten sechs Näpfe mit je 50 µl Standardlösungen von 0, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml befüllt. Die weiteren Näpfe der Platte nahmen Dreifachansätze mit je 50 µl der zwei entsprechenden Verdünnungen auf. Bei der Zugabe von 200 µl Nanoquant Arbeitslösung pro Napf wurde beachtet, dass sowohl Standard- als auch Testlösungen die gleiche Temperatur hatten. Dies wurde durch kurze Äquilibrierung erreicht und dadurch, dass die Nanoquant Arbeitslösung in alle Näpfe gleichzeitig pipettiert wurde (12-Kanalpipette), anschließend wurde mit der Pipette kurz gemischt. Eventuell entstandene Luftblasen konnten mit Hilfe einer Injektionsnadel entfernt werden. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurde dann der Quotient OD₅₉₀/OD₄₅₀ im ELISA-Reader gemessen. Anhand der aus den Standardlösungen erhaltenen Regressionsgeraden wurde darauf die Konzentration der Proben berechnet.

2.2.1.5 Multimerisierung der Monomere mittels Streptavidin

Verwendete Materialien:

Streptavidin-PE 1 mg/ml (Molecular Probes)

Streptavidin-APC 1 mg/ml (Molecular Probes)

Monomer

Durchführung:

Um Tetramere zu erhalten wurde die gewünschte Menge an Peptid-MHC-Monomer aufgetaut und bei 4 °C mit Streptavidin-Konjugat im Verhältnis

Monomer : Streptavidin = 4 : 1 versetzt. Aufgrund der Molekulargewichte von 45 kDa für das Monomer, von 60 kDa für Streptavidin, von 240 kDa für Phycoerythrin und von 104 kDa für Allophycocyanin müssen folgende Mengen für die Multimerisierung von einem Aliquot von 50 µg Monomer zugegeben werden: 78,5 µg Streptavidin-PE bzw. 43,5 µg Streptavidin-APC. Die Zugabe von Streptavidin erfolgte in 10 Schritten – bei jedem Schritt wurden 10 % der Streptavidin-Gesamtmenge zugegeben, gefolgt von 30' auf dem Rotator im Dunkeln bei 4 °C. Am Ende wurde das Röhrchen kurz zentrifugiert und im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Die Haltbarkeit der Tetramere liegt zwischen vier bis sechs Wochen.

2.2.1.6 Synthese von aAPCs

Verwendete Materialien:

96napf-Platte (Corning 3799)

Flaschschüttler (IKA-Vibrax-VXR)

Streptavidin coated 5,47 µm polystyrene microspheres, "Beads" (Bangs Laboratories)

Biotinylierte MHC-I-Monomere.

Biotinylierter Mouse anti-human CD28-Antikörper 9.3 (IgG2a)

Biotinylierter IgG1 Maus-anti-human 4-1BB (Garni-Wagner et al., 1996)

PBS

PBE-Puffer: PBS, 0,5 % BSA (Sigma), 2 mM EDTA, sterilfiltriert

Durchführung:

Sterile Bedingungen!

Die Beads, die es mit MHC-Monomeren und kostimulatorischen Molekülen zu beschichten galt wurden in 96napf-Platten in genau der gleichen Anordnung synthetisiert wie die T-Zellen, die mit ihnen stimuliert werden sollten. Pro Napf wurden immer 1×10^6 MHC-beschichtete Beads hergestellt, dies war für 4 Stimulationen mit je 2×10^5 Beads ausreichend. Mit eingerechnet war dabei ein etwaiger Verlust während der Synthese.

Es wurden immer Beads mit zwei unterschiedlichen MHC-Monomer-Dichten auf deren Oberfläche hergestellt:

- Für *high density* Beads wurde 20 nM MHC-Monomer verwendet.
- Für *low density* Beads wurde 200 pM MHC-Monomer verwendet.

Die kostimulierenden Antikörper anti-CD28 und anti-4-1BB wurden im Verhältnis 1:3 und in einer Gesamtkonzentration von 20 nM eingesetzt.

Dazu wurden zuerst die entsprechenden MHC-Monomere in PBE auf eine Konzentration von 5 µg/ml (Stimulation mit hoher MHC-Dichte) oder auf

0,05 µg/ml (Stimulation mit geringer MHC-Dichte) verdünnt und 50 µl dieser Verdünnungen pro Napf pipettiert.

Auch die kostimulatorischen Antikörper wurden in PBE so eingestellt, dass nach Zugabe von 50 µl dieses Antikörpermixes pro Napf eine Gesamtkonzentration von 20 nM bezogen auf das Gesamtvolumen von 250 µl des Beladungsansatzes vorlag.

Darauf wurde die errechnete Menge der mit Streptavidin beschichteten Beads entnommen und zweimal in 10 ml PBE gewaschen (Zentrifugation der Beads bei 4 °C für 10' bei 1280xg bzw. 2500 rpm in Megafuge). Nach diesen Waschsritten wurden die Beads in PBE auf eine Konzentration von $6,6 \times 10^6$ Beads/ml eingestellt und schließlich wurden in jedes Napf 1×10^6 Beads pipettiert.

Nach einer Inkubation von 30' bei RT und 1000 rpm auf einem Flachsüttler wurde die Platte viermal mit 200 µl PBE pro Napf gewaschen (Zentrifugation für 2' bei 4 °C und 1280xg bzw. 2500 rpm in Megafuge). Danach wurden die MHC-beschichteten Beads in 200 µl PBE resuspendiert. Die Platte wurde in Aluminium-Folie eingewickelt und bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Einfrieren von PBMCs

Verwendete Materialien:

Einfrierbox (Nalgene Cryo Freezing Container) mit Isopropanol (Merck)

Einfriermedium: Hitzeinaktiviertes FCS mit 10 % DMSO (Merck), steril.

Durchführung:

Sterile Bedingungen!

Die PBMCs wurden gewaschen, gezählt und zentrifugiert (10' bei 460xg/RT, 1500 rpm in Megafuge). Das Zellpellet wurde möglichst schnell in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert, um eine Zellkonzentration von 2×10^7 Zellen/ml einzustellen. Daraufhin wurden in Aliquots zu je 1 ml der Zellsuspension pro Cryoröhrchen pipettiert und die Röhrchen sofort in der Einfrierbox bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.2.2 Auftauen von PBMCs

Verwendete Materialien:

T-Zellmedium

Auftaumedium: PBS+2 % hitzeinaktiviertes Humanserum+DNase 3µg/ml (Sigma)

Durchführung:

Sterile Bedingungen!

Alle Zentrifugationsschritte für 10' bei 460xg/RT, 1500 rpm in Megafuge!

Die Cryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37 °C gehalten, bis die darin enthaltene Zellsuspension fast aufgetaut war. Die Zellen wurden schnell in ein Röhrchen mit 10 ml Auftaumedium, welches auf RT vortemperiert war aufgenommen und für 10' bei 460xg (1500 rpm in Megafuge) und RT zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit T-Zellmedium wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen an Medium aufgenommen und für die weitere Verarbeitung gezählt.

2.2.2.3 Bestimmung der Lebendzelldichte

Verwendete Materialien:

Trypanblaulösung: 0,05 % Trypanblau (Merck) und 0,02 % Natriumazid (Merck) in H₂O

Zählkammer (Neubauer)

Lichtmikroskop (Leica DMIL)

Durchführung:

Das Deckglas wurde auf die zuvor gereinigte, angefeuchtete Zählkammer gepresst bis Newtonsche Ringe sichtbar wurden und zum Trocknen beiseite gelegt. Um lebende Zellen von toten Zellen unterscheiden zu können wurden, je nach zu erwartender Zellzahl, 10 µl Zellsuspension in passender Verdünnung mit Trypanblaulösung (Blaufärbung der toten Zellen, da nur diese Trypanblau aufnehmen können) versetzt. Daraufhin wurden ca. 15 µl der blauen Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Die Lebendzelldichte wird folgendermaßen berechnet: Zelldichte in der Zellsuspension [Zellen/ml] = Zellzahl in einem Großquadrat (1 mm²) x (Verdünnungsfaktor) x 10⁴.

2.2.2.4 Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut

Verwendete Materialien:

Lymphozytenseparationsmedium (PAA Laboratories)

PBS

T-Zellmedium

Einfriermedium

Durchführung:

Sterile Bedingungen!

Die zu isolierenden Blutprodukte konnten aus drei Quellen stammen:

- Frisch von einem Spender entnommenes peripheres heparinisieretes Blut.
- Erythrozytenabgereichertes, peripheres heparinisieretes Blut („*Buffy Coat*“) von der Blutbank.
- Durch Leukapherese leukozytenangereichertes Blutprodukt, ebenfalls von der Blutbank.

Diese Blutprodukte wurden mit PBS verdünnt, so dass eine gerade Zahl von 50 ml-Röhrchen mit 30 ml verdünnten Blutprodukt beladen werden konnte. Es wurden in 50 ml-Röhrchen jeweils 15 ml Lymphozytenseparationsmedium mit 30 ml verdünntem Vollblut oder Blutprodukt vorsichtig überschichtet. Eine Zentrifugation bei ausgeschalteter Bremsfunktion für 20' bei 820xg (2000 rpm in Megafuge) folgte. Die weiße zwischen Lymphozytenseparationslösung und Serum (Interphase) gebildete PBMC-Schicht jedes Röhrchens wurde mit der Pipette abgenommen und in je 30 ml PBS transferiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (10' bei 660xg, 1800 rpm in Megafuge) wurde der Überstand verworfen, die Zellen vereinigt und nochmals mit 40 ml PBS gewaschen, gezählt und zentrifugiert (10' bei 460xg, 1500 rpm in Megafuge). Das PBMC Pellet wurde entweder direkt weiterverarbeitet (MACS-Separation!), in T-Zellmedium aufgenommen und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (Adhärenzschritt zur Gewinnung von Monozyten oder für die Weiterverarbeitung zu einem späteren Zeitpunkt), oder in Einfriermedium aufgenommen und eingefroren.

2.2.2.5 MACS Methode

Verwendete Materialien:

T-Zellmedium

PBE-Puffer

MACS-Säulen: LS – max. 2×10^9 Zellen, max. 10^8 markierte Zellen (Miltenyi Biotec)

MACS-Magnet (Miltenyi Biotec)

Streptavidin-Beads (Miltenyi Biotec): 10 $\mu\text{l}/2 \times 10^7$ Zellen verwenden.

Biotinylierter OKT-8 (α -CD8) Antikörper 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Durchführung:

Sterile Bedingungen!

Im Verlauf dieses Protokolls wurden die Zellen immer für 10' bei 460xg und 4 °C (Megafuge: 1500 rpm) zentrifugiert.

Das Inkubationsvolumen für die folgenden Schritte betrug immer 100 μl Volumen/ 2×10^7 Zellen.

Bei den LS-MACS-Säulen wurde jedes Mal gewartet, bis sie leer gelaufen waren, bevor neue Lösung aufgetragen wurde.

Die aus den verschiedenen Blutprodukten gewonnenen PBMCs wurden gezählt und zentrifugiert. Nachdem die Zellen pelletiert worden waren, wurden sie in einer Lösung des biotinylierten OKT-8 Antikörpers resuspendiert (der Antikörper wurde mit kaltem PBE auf 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt; das Volumen entsprach dem Inkubationsvolumen) und für 15' bei 4 °C inkubiert. Danach wurden sie zweimal mit 10 ml kaltem PBE gewaschen, es galt darauf zu achten, dass der Überstand möglichst vollständig abgesaugt wurde. Darauf wurde die benötigte Menge (10 $\mu\text{l}/2 \times 10^7$ Zellen) an Streptavidin-Beads in kaltem PBE auf das Inkubationsvolumen verdünnt und die Zellen damit resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 15' bei 4 °C. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zweimal mit kaltem 10 ml PBE gewaschen.

Während dieses Zentrifugationsschrittes wurde die LS-MACS-Säule mit 3 ml PBE äquilibriert. Anschließend wurden die Zellen in 500 μl PBE resuspendiert, auf die Säule gegeben und dreimal mit 3 ml PBE gewaschen. Der Durchlauf (CD8^- T-Zellen) wurde gesammelt und 1×10^7 CD8^- T-Zellen wurden später in einem Aliquot für eine eventuelle FACS-Analyse der Trenneffizienz eingefroren.

Die Säule wurde nun vorsichtig aus dem Magnet entnommen, in ein 15 ml-Röhrchen gestellt und die CD8^+ Zellen mit 4 ml PBE herausgespült. Dazu wurden die Zellen nach Zugabe von PBE schnell mit dem sterilen Stempel aus der Säule herausgedrückt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in vorgewärmtem T-Zellmedium aufgenommen und gezählt. Ein Aliquot mit 1×10^6 CD8^+ T-Zellen wurde für die FACS-Analyse der Trenneffizienz verwendet und mit den CD8^- T-Zellaliquot eingefroren. Die übrigen CD8^- T-Zellen wurden anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt, oder verworfen. Die CD8^+ T-Zellen wurden in T-Zellmedium aufgenommen und bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

2.2.2.6 Amplifikation von *Aspergillus fumigatus* spezifischen CD4⁺ T-Zellen

Da die Frequenzen von virus-, pilz- oder tumorspezifischen T-Zellen *ex vivo* häufig unter der Nachweisgrenze des IFN γ -ELISpot oder der Intrazellulärfärbung liegen, ist meist eine *in vitro* Amplifikation von den spezifischen T-Zellen vonnöten.

Verwendete Materialien:

96napf-Platten (Corning 3799)

T-Zellmedium

Interleukin 2 (in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, R&D Systems)

Interleukin 4 (in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, R&D Systems)

Interleukin 7 (in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, R&D Systems)

Synthetische Peptide 1 mg/ml in DMSO und ddH₂O (Merck) gelöst

Durchführung:

Sterile Bedingungen!

Im Verlauf dieses Protokolls wurden die Zellen immer für 10' bei 460xg und 4 °C (Megafuge: 1500 rpm) zentrifugiert.

Die zu untersuchenden PBMCs oder T-Zellen wurden aufgetaut, siehe 2.2.2.2. Die Amplifizierung von spezifischen Zellen wurde in 96napf-Platten durchgeführt. Es wurden je 0,5-1x10⁶ Zellen pro Napf einer 96er-Platte in 100 μ l T-Zellmedium mit IL-4 (5ng/ml) und IL-7 (5ng/ml) kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch die zu testenden Peptide, die in 50 μ l T-Zellmedium zugegeben wurden, stimuliert. Die finale Konzentration pro Peptid in einem Napf sollte bei Klasse II restringierten tumor-assoziierten Peptiden 10 μ g/ml, bei viralen Peptiden 1-5 μ g/ml betragen. Am dritten Tag wurde IL-2 gelöst in 50 μ l pro Napf zugegeben, Finalkonzentration pro Napf 2 ng/ml. Das Endvolumen liegt nun bei 200 μ l pro Napf liegen. Alle zwei Tage wurde darauf 100 μ l/Napf mit einer Multikanalpipette vorsichtig entfernt und durch 100 μ l frisches T-Zellmedium mit IL-2 ersetzt, mit 2ng/ml finaler IL-2 Konzentration (Tag 5, Tag 7, Tag 9). Um den Zytokinhintergrund in den nachfolgenden Analysen zu minimieren wurde am Tag 11 der Medienwechsel ohne IL-2 Gabe durchgeführt. Ab Tag 13 konnte die Analyse entweder durch IFN γ -ELISpot (2.2.3.6) oder intrazellulären Zytokinfärbung (2.2.3.4) erfolgen.

2.2.2.7 Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen mittels Peptid-beladener DCs

2.2.2.7.1 Präparation humaner Dendritischer Zellen aus PBMCs

Verwendete Materialien:

T-Zellmedium

PBS (BioWHITTAKER)

Interleukin 2 (in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, R&D Systems)

Interleukin 4 (in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, R&D Systems)

Interleukin 7 (in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, R&D Systems)

GM-CSF (in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, Novartis)

LPS (in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, Sigma)

Prostaglandin E (in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, Sigma)

X-Vivo 20, serumfreies Medium (Cambrex)

Durchführung:

Sterile Bedingungen!

Im Verlauf dieses Protokolls wurden die Zellen immer für 10' bei 460xg und 4 °C (Megafuge: 1500 rpm) zentrifugiert.

PBMCs wurden aufgetaut, siehe 2.2.2.2, danach 100×10^6 bis 120×10^6 Zellen in 15 ml X-Vivo 20 aufgenommen und in eine Gewebekulturflasche überführt. Nach 75-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde das Medium abgenommen, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und 3x mit je 10 ml X-Vivo-Medium nachgespült. Die so erhaltenen PBLs wurden abzentrifugiert, gezählt und eingefroren, siehe 2.2.2.1, oder in 15 ml T-Zellmedium aufgenommen, welches mit IL-2 (2ng/ml) und IL-7 (5ng/ml) versetzt war. Danach wurde die Zellsuspension in eine Gewebekulturflasche überführt und im Inkubator bei 37 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Auf die adhärenierten Monozyten in der Ausgangskulturflasche wurden 15 ml T-Zellmedium (versetzt mit 100 ng/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4) gegeben. Nach dreitägiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden 7,5 ml des Mediums abgenommen und bei 460g (1500 rpm in Megafuge 2.0) für 8'/20 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 7,5 ml frischen T-Zellmedium aufgenommen, welches mit 200 ng/ml GM-CSF und 40 ng/ml

IL-4 versetzt war. Diese Zellsuspension wurde in die Ausgangskulturflasche zurückgegeben diese darauf im Inkubator bei 37 °C für weitere drei Tage inkubiert. Zu den nun unreifen Dendritischen Zellen wurden LPS (100 ng/ml) und Prostaglandin E (1 µg/ ml) zugegeben, der Erfolg der Reifung konnte ein Tag später per FACS-Analyse überprüft werden.

2.2.2.7.2 T-Zell-Induktion mit Peptid-beladenen reifen DCs

Verwendete Materialien:

24napf-Platte (Greiner bio-one)

T-Zellmedium

PBS+E: PBS mit 2 mM EDTA (Roth)

Synthetische Peptide 1 mg/ml in DMSO (Merck) und ddH₂O gelöst

Reife DCs

Durchführung:

Sterile Bedingungen!

Im Verlauf dieses Protokolls wurden die Zellen immer für 10' bei 460xg und 4 °C (Megafuge: 1500 rpm) zentrifugiert.

Die reifen DCs wurden zuerst geerntet, dafür wurde der Überstand aus der Zellkulturflasche abgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt. Dann wurden 10 ml PBS+E zu den Zellkulturflaschen gegeben und diese für 5 min im Brutschrank eingestellt, danach wurden durch „klopfen“ die restlichen Zellen abgelöst. (Sichtkontrolle mit Mikroskop!) Diese Zellen wurden ebenfalls in das 50 ml Falcon überführt und abzentrifugiert. Ein Waschschrift mit T-Zellmedium und Zellzahlbestimmung, siehe 2.2.2.3, folgte. Die T-Zellinduktion wurde in 24napf-Platten durchgeführt. Pro Napf wurden 5×10^5 DCs eingesetzt, wenn möglich, sollten mindestens 3 Nöpfe/Peptid angesetzt werden. Für die Beladung der DCs mit Peptiden wurden die DCs in 1 ml T-Zellmedium aufgenommen und auf 15-ml-Falcons verteilt, pro Peptidansatz wurden 5-10 µl Peptidstocklösung pipettiert, es sollte immer eine finale Endkonzentration von 5-10 µl/ml Peptid eingestellt sein. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 2 Stunden im Brutschrank. Währenddessen wurden die autologen PBMC/PBLs aufgetaut. Es wurden pro Napf mindestens 3×10^6 PBMC/PBLs eingesetzt. Die frisch aufgetauten PBMCs, oder die kultivierten PBLs wurden mindestens zweimal mit T-Zellmedium gewaschen und anschließend die Zellzahl bestimmt. Die PBMC/PBLs konnten bereits in eine 24napf-Platte vorgelegt werden (pro Napf je 1 ml). Nach der zweistündigen Inkubation mit den Peptiden wurden die DCs zu den vorgelegten PBMCs/PBLs zugegeben. (Mit dem Überstand und den darin enthaltenen Peptiden!). Das Endvolumen pro Napf in einer 24napf-Platte wurde immer auf 2 ml

eingestellt. Es folgten sieben Tage Ruhe für die Zellen im Brutschrank und danach die Restimulation mit Peptid-beladenen autologen PBMCs

2.2.2.7.3 Restimulation der spezifischen T-Zellen

Verwendete Materialien:

T-Zellmedium

PBS (Gibco)

Interleukin 2 (in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, R&D Systems)

Synthetische Peptide 1 mg/ml in DMSO (Merck) und ddH₂O gelöst

Eingefrorene autologe PBMCs

Gammazelle (Caesiumquelle, Gammacell 1000 Elite Nordion International Inc)

Durchführung:

Sterile Bedingungen!

Im Verlauf dieses Protokolls wurden die Zellen immer für 10' bei 460xg und 4 °C (Megafuge: 1500 rpm) zentrifugiert.

Die eine Woche zuvor mit DCs stimulierten PBMCs/PBLs (Effektorzellen) wurden aus jedem Napf der 24er Platte entnommen und in ein Falcon überführt. Anschließend wurden diese Zellen abzentrifugiert, einmal mit PBS und dann mit T-Zellmedium gewaschen und dann die Zellzahl bestimmt, siehe 2.2.2.3. Pro Napf einer 24napf-Platte wurden 5×10^5 Effektorzellen in 1 ml T-Zellmedium ausplattiert. Anhand der ermittelten Zahl von Effektorzellen, wurden nun passend autologe PBMCs (Zielzellen) aufgetaut, siehe 2.2.2.2. Pro 5×10^5 Effektorzellen und somit Napf wurden $2,5 \times 10^6$ PBMCs benötigt. Um diese Zielzellen mit Peptid zu beladen wurde die entsprechende Menge an Zellen in einem 15 ml Falcon in 1 ml T-Zellmedium aufgenommen und das Peptid zugegeben. Die Finalkonzentration an Peptid betrug 5-10 µl/ml. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 2 Stunden im Brutschrank, anschließend wurden die Peptid-beladenen Zielzellen bei 30Gy, das bedeutet für 4'21'' in der Gammazelle bestrahlt. Danach wurden die bestrahlten Zielzellen auf die bereits vorgelegten Effektorzellen gegeben. Vorher wurde aber noch die entsprechende Menge T-Zellmedium pro 15-ml-Falcon zugeben, so dass das Endvolumen pro Napf 2 ml betrug. Ab dem nächsten Tag und ab dann in einem Rhythmus von 2 Tagen wurde ein Mediumwechsel mit IL-2 Gabe (2 ng/ml) durchgeführt. Nach einem oder mehreren Restimulationszyklen konnte die Analyse der Effektorzellen entweder durch IFN γ -ELISpot (2.2.3.6), intrazellulärer Zytokinfärbung (2.2.3.4), Tetramerfärbung oder Zytotoxizitätsnachweis (2.2.3.7) erfolgen.

2.2.2.8 Antigen-spezifische Stimulation der zytotoxischen T-Zellen mittels artifizieller MHC-I beschichteter Beads

Verwendete Materialien:

T-Zellmedium

Interleukin 2 (10^6 U/ml in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, Chiron)

Interleukin 12 (1 $\mu\text{g/ml}$ in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, Promo Cell)

aAPCs, siehe 2.2.1.6.

Durchführung:

Sterile Bedingungen!

Im Verlauf dieses Protokolls wurden die Zellen immer für 10' bei 460xg und $4\text{ }^\circ\text{C}$ (Megafuge: 1500 rpm) zentrifugiert.

Für die Stimulation wurden die MACS-aufgereinigten CD8^+ T-Zellen verwendet, siehe 2.2.2.5. Die Zellen wurden gezählt, zentrifugiert und in T-Zellmedium auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

Die äußeren Nöpfe einer 96napf-Platte wurden mit 250 μl PBS gefüllt, um die Verdunstung in den inneren Nöpfen zu minimieren. Dann wurden 100 μl Zellsuspension pro Napf pipettiert, dies entspricht 1×10^6 Zellen/Napf. Bis zur Zugabe der aAPC wurde die Platte bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Von den wie unter 2.2.1.6 beschrieben mit MHC beladenen Beads wurden aus jedem Napf 50 μl , dies entspricht den für eine Stimulation notwendigen 2×10^5 Beads, entnommen und in eine neue 96napf-Platte übertragen. Jeder Napf wurde 2x mit 200 μl T-Zellmedium gewaschen (Zentrifugation für 2' bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 1280xg bzw. 2500 rpm in Megafuge). Schließlich wurde mit 100 μl vorgewärmtem T-Zellmedium, das 10 ng/ml IL-12 enthielt, resuspendiert und die Beads zu den vorher ausplattierten Zellen zugegeben. Dadurch ergab sich eine finale IL-12-Konzentration von 5 ng/ml. Die Zellen wurden bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert und wurden somit zum ersten Mal mit dem spezifischen Stimulus unseres Interesses konfrontiert.

Nach drei Tagen (Tag 4) wurden aus jedem Napf 100 μl Medium vorsichtig abgesaugt, so dass die am Boden sedimentierten T-Zellen nicht entfernt wurden. 100 μl vorgewärmtes T-Zellmedium mit 80 U/ml IL-2 wurden zugegeben, um eine IL-2 Endkonzentration von 40 U/ml zu erreichen. Die Zellen wurden weiter bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert.

Nach weiteren vier Tagen (Tag 8) wurden wiederum 100 μl Medium abgesaugt und neue aAPCs in T-Zellmedium und IL-12 zugegeben, wie unter Tag 1 beschrieben. Dieser Wechsel aus Restimulation mit aAPCs + IL-12 beziehungsweise Mediumwechsel und IL-2 Gabe wurde über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen fortgesetzt:

Tag 11: siehe Tag 4.

Tag 15: siehe Tag 8.

Tag 18: siehe Tag 4.

Am 21. Tag wurde die Hälfte der Zellen jeder Stimulation abgenommen und für eine spätere FACS-Analyse mit dem spezifischen Tetramer und Oberflächenantikörper (CD3, CD4, CD8) gefärbt wie unter 2.2.3.2 beschrieben. Die verbleibenden Zellen wurden entweder bei positiver FACS-Analyse mit Hilfe des FACS Aria sortiert oder wie am Tag 8 restimuliert und zu einem späteren Zeitpunkt weiterverarbeitet bzw. nochmals analysiert.

2.2.2.9 Kultur verschiedener Zelllinien

Die für diese Arbeit in Kultur gehaltenen Zelllinien sind in folgender Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.6: Verwendete Zelllinien. Dargestellt sind die diversen Zellkulturen ihre Kulturbedingungen und ihre spezifischen Eigenschaften.

Zelllinie	Medium	Kultur	Merkmale
LG2-EBV	T-Zellmedium	Alle 3 Tage 1:2 splitten	EBV-transformierte B-lymphoblastoide Zelllinie; HLA-B*4403
JY	D-MEM	Alle 3 Tage 1:4 splitten	EBV-transformierte humane lymphoblastoide Zelllinie; HLA-A*0201, -B*0702
RCC5	RPMI+10 %HS	Alle 2 Tage 1:4 splitten	Nierenzellkarzinomzelllinie; exprimiert SPAG4; HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-B*07
RCC24	RPMI+10 %HS	Alle 2 Tage 1:2 splitten	Nierenzellkarzinomzelllinie; exprimiert SPAG4; HLA-A*02, HLA-A*68, HLA-B*15,
RCC68	RPMI+10 %HS	Alle 3 Tage 1:2 splitten	Nierenzellkarzinomzelllinie; exprimiert SPAG4; HLA-A*02, HLA-A*29, HLA-B*1501, HLA-B*4501
MZ1257	RPMI+10 %HS	Alle 3 Tage 1:2 splitten	Nierenzellkarzinomzelllinie; exprimiert SPAG4; HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-B*07, HLA-B*44,
X63*2705+VEGF UTR165	RPMI+10 %HS	Alle 4 Tage 1:2 splitten	Murine Myelomzelllinie transfiziert mit VEGF UTR165, enthält die „untranslatierte“ Region (UTR) von VEGF und so auch das SRFGGAVVR-Peptid.
X63*2705+VEGF 165	RPMI+10 %HS	Alle 4 Tage 1:2 splitten	Murine Myelomzelllinie transfiziert mit VEGF 165, enthält nicht die „untranslatierte“ Region (UTR) von VEGF und so fehlt auch das SRFGGAVVR-Peptid.
RCC110	RPMI+10 %HS	Alle 3 Tage 1:2 splitten	Nierenzellkarzinomzelllinie; exprimiert VEGF; HLA-B*2705

2.2.2.10 Mycoplasmenbehandlung

Materialien

Myco-1 (A5222, AppliChem, Darmstadt): basiert auf dem antibiotisch wirksamen Tiamutin des Pilzes *Pleurotus mutilis*

Myco-2 (A5233, AppliChem, Darmstadt): basiert auf einem Tetracyclinderivat

Myco-3 (A5240, AppliChem, Darmstadt): basiert auf dem Antibiotikum Ciprofloxacin

Durchführung

Während der ersten Zeit ihrer Kultivierung mussten manche der Zelllinien wegen Kontaminationen mit Mycoplasmen mit Antibiotika behandelt werden. Dazu wurden die Zellen zunächst für 4 Tage in Medium mit 1 % Myco-1 Reagenz kultiviert, danach für 3 Tage in Medium mit 1 % Myco-2 Reagenz. Diese Abfolge an Antibiotika wurde für zwei weitere Wochen fortgesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 14 Tage in Medium kultiviert, das 1 % Myco-3 Reagenz enthielt. Nach zwei weiteren Wochen der Kultivierung in normalem Medium ohne Antibiotika wurden 1 ml-Aliquots des Mediums abgenommen und zum Mycoplasmentest abgegeben (freundlicherweise durchgeführt von Claudia Falkenburger).

2.2.3 Analyse antigenspezifischer T-Zellen

2.2.3.1 Durchflusszytometrie

Verwendete Materialien:

FACS-Clean, FACS-Rinse, FACS-Flow (Becton Dickinson)

FACS-Puffer PFEA: PBS mit 2 % hitzeinaktiviertem (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth), 0,01 % Natriumazid (Merck)

Steriler Standard-FACS-Puffer sPFE: PBS mit 2 % hitzeinaktiviertem (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth)

FACS-Fix: FACS-Puffer PFEA mit 1 % Formaldehyd (Fluka)

Gefärbte Zellen in FACS-Fix oder FACS-Puffer

Durchflusszytometer:

- FACS-Calibur mit Software Cell Quest oder Cell Quest Pro (Becton Dickinson)
- FACS-Canto II mit Software FACSDiva (Becton Dickinson)

- FACS Aria Cell-Sorting System mit Software FACSDiva (Becton Dickinson)
- FACS LSR II mit Software FACSDiva (Becton Dickinson)

Durchführung:

Ungefärbte und einfach gefärbte Zellen für jedes verwendete Fluorochrom wurden als Kontrollen benötigt, um die Geräteparameter zellspezifisch einstellen zu können und die verschiedenen Fluoreszenzkanäle gegeneinander zu kompensieren. Diese Zellen wurden genauso behandelt wie bei der Tetramerfärbung beschrieben, mit dem Unterschied, dass kein Tetramer zugegeben wurde, sondern nur Tetramer-Färbepuffer und zusätzlich bei den ungefärbten Zellen kein Antikörper.

Die gefärbten Zellen wurden am FACS-Calibur analysiert und mit der Software Cell Quest Pro ausgewertet. Nach jeder Probe wurde kurz mit FACS-Flow gespült, um Kreuzkontaminationen zwischen aufeinander folgenden Proben auszuschließen.

2.2.3.2 Tetramerfärbung

Verwendete Materialien:

96napf-Rundbodenplatte (Corning Incorporated)

500 µl-Röhrchen (Greiner)

5 ml-FACS-Röhrchen, steril (Becton Dickinson)

Analytische Tetramerfärbung:

- Tetramer-Färbepuffer TSB: 50 % PBS, 50 % hitzeinaktiviertes (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth), 0,01 % Natriumazid (Merck)
- Standard-FACS-Puffer PFEA: PBS mit 2 % hitzeinaktiviertem (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth), 0,01 % Natriumazid (Merck)
- BSA-FACS-Puffer PBEA (enthält kein freies Biotin): PBS mit 0,5 % BSA (Sigma A-3059), 2 mM EDTA (Roth), 0,01 % Natriumazid (Merck)
- FACS-Fix: FACS-Puffer PFEA mit 1 % Formaldehyd (Fluka)

Präparative Tetramerfärbung:

Die verwendeten Puffer wurden mit einem 0,22 µm Sterilfilter (Corning) sterilfiltriert,

- Steriler Tetramer-Färbepuffer sTSB: 50 % PBS, 50 % hitzeinaktiviertes (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth)
- Steriler Standard-FACS-Puffer sPFE: PBS mit 2 % hitzeinaktiviertem (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth)
- Steriler BSA-FACS-Puffer sPBE (enthält kein freies Biotin): PBS mit 0,5 % BSA (Sigma A-3059), 2 mM EDTA (Roth)

Tetramer, PE- bzw. APC-gekoppelt

Unkonjugiertes Streptavidin (Sigma) 1mg/ml in PBS, 0,01 Natriumazid

Fluorochrom konjugierte Antikörper: Die verwendeten monoklonalen Antikörper, und die Verdünnung, in der diese eingesetzt werden, können der Tabelle 2.7 entnommen werden.

Tabelle 2.7: Eingesetzte monoklonale Antikörper in der Tetramerfärbung.

Monoklonaler Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Maus α -human CD8 PE	Immunotools	1:200
Maus α -human CD8 PerCP	BD	1:20
Maus α -human CD8 APC	BD	1:50
Maus α -human CD4 FITC	BD	1:20
Maus α -human CD19 FITC	BD	1:100
Maus α -human CD19 APC	BD	1:100

Je nachdem, ob die in dieser Arbeit zu untersuchende T-Zellen nur auf erfolgreiche Stimulation hin getestet werden sollten (Analyse), oder die T-Zellen für eine Tetramer-positive Sortierung (Präparation) gefärbt werden sollten, wurden unterschiedliche Protokolle angewandt.

2.2.3.2.1 Analytische Tetramerfärbung

Durchführung:

Alle Schritte wurden auf Eis und unter Vermeidung von Licht durchgeführt.

Für eine analytische Tetramerfärbung wurde die Färbung unsteril in 96napf-Platten durchgeführt; Zentrifugationen fanden für 2' bei 660xg und 4 °C statt (Megafuge: 1800 rpm).

Die Antikörper wurden in PBEA verdünnt. Außerdem wurde der Lösung 10 μ g/ml freies Streptavidin zugesetzt, um an den Zellen gebundenes Biotin (durch die Zellkultur) zu blockieren. Ohne Zugabe von Streptavidin würde freies Streptavidin-PE oder -APC bei der Tetramerfärbung an die Zellen binden und den Hintergrund erhöhen.

APC-Tetramere wurden in Tetramer-Färbepuffer auf 2 μ g/ml, PE-Tetramere auf 5 μ g/ml verdünnt und Präzipitate 5' bei 13000 rpm (Biofuge)/4 °C abzentrifugiert. Pro Färbung wurden 200 μ l Tetramerlösung verwendet.

Einzelfärbungen: CD8 gekoppelt an jeden verwendeten Farbstoff (FITC, PE, PerCP, APC).

Die T-Zellen wurden immer mit PE-Tetrameren und mit APC-Tetrameren angefärbt. Es wurden PE-Tetramere mit dem zu testenden Peptid-MHC-Monomer und APC-Tetramere mit einem irrelevanten Peptid-MHC-Monomer verwendet, oder nach einer Stimulation mit Beads, die mit zwei zu testenden Peptid-MHC-Monomeren beladen waren; das eine Monomer PE- und das andere Monomer APC-konjugiert verwendet. Es kam immer ein anti-CD8-PerCP-Antikörper zum Einsatz.

Die T-Zellen wurden in die 96napf-Platte aliquotiert und zweimal mit 200 µl PBEA gewaschen. Danach wurden Zellpellets in 50 µl Antikörperlösung resuspendiert und für 20' bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Es folgten 2 Waschschrte mit 200 µl PFEA. Dann wurden die pelletierten Zellen in 50 µl Tetramerlösung resuspendiert und für 30' bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, bevor sie dreimal mit 200 µl PFEA gewaschen wurden und darauf in 100 - 200 µl FACS-Fix resuspendiert wurden. Bis zur Messung wurde die 96napf-Platte in Alufolie eingewickelt im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.3.2.2 Präparative Tetramerfärbung:

Durchführung:

Alle Schritte wurden auf Eis und unter Vermeidung von Licht durchgeführt.

Für eine präparative Tetramerfärbung (mit anschließender Sortierung der Tetramer⁺ Zellen) wurde steril in 5 ml FACS-Röhrchen gefärbt. Zentrifugationen fanden für 5' bei 460xg und 4 °C statt (Megafuge: 1500 rpm). Statt PBEA und PFEA wurde sPBE und sPFE verwendet; außerdem wurde Tetramer-Färbepuffer ohne Azid verwendet.

Die Antikörper wurden in sPBE verdünnt. Auch in diesem Protokoll wurde der Lösung 10 µg/ml freies Streptavidin zugesetzt, um an den Zellen gebundenes Biotin zu blockieren.

APC-Tetramere wurden in Tetramer-Färbepuffer auf 2 µg/ml, PE-Tetramere auf 5 µg/ml verdünnt und Präzipitate 5' bei 13000 rpm (Biofuge)/4 °C abzentrifugiert. Pro Färbung wurden 200 µl Tetramerlösung verwendet.

Einzelfärbungen: CD8 gekoppelt an jeden verwendeten Farbstoff (FITC, PE, PerCP, APC).

Wurden die Zellen mit PE-Tetrameren angefärbt, wurde ein anti-CD8-APC-Antikörper verwendet, bei APC-Tetrameren kam ein anti-CD8-PE-Antikörper zum Einsatz.

Die T-Zellen, die später sortiert werden sollten, wurden auf eine Konzentration von höchstens 2×10^6 pro Färbung eingestellt, für die Einzelfärbungen wurden 1×10^6 T-Zellen verwendet. Die in FACS-Röhrchen

aliquotierten T-Zellen wurden zweimal mit 2 ml sPBE gewaschen, die Zellpellets in 150 μ l Antikörperlösung resuspendiert und für 20' bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Zwei Waschschriffe mit 2 ml sPFE folgten im Anschluss. Darauf wurden die pelletierten Zellen mit 150 μ l Tetramerlösung resuspendiert und für 30' bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, bevor sie dreimal mit 2 ml sPFE gewaschen wurden. Nun wurden die Zellpellets in 1 ml sPFE resuspendiert und bis zur Sortierung auf Eis gelagert.

2.2.3.3 Sortierung der Tetramer⁺ und CD8⁺ Zellen

Verwendete Materialien:

BD FACSAriaTM cell sorter (Becton Dickinson)

5 ml FACS-Röhrchen mit Deckel (Becton Dickinson)

24napf-Platte (Greiner bio-one)

T-Zellmedium

Interleukin 2 (10⁶ U/ml in PBS mit 0,1 % HSA, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, Chiron)

PHA-L (Sigma)

Lymphozytenseparationsmedium (PAA Laboratories)

50-60 ml heparinisieretes Blut

EBV transformierte B-Zellen der Linie LG2-EBV

Durchführung:

Soweit möglich sterile Bedingungen!

Für die Sortierung wurden pro Färbung zwei weitere FACS-Röhrchen mit jeweils 2 ml T-Zellmedium vorbereitet. Kurz vor dem Auffangen der Zellen in dem FACS-Zell-Sorter sollten diese Röhrchen geschwenkt werden, so dass die Zellen, die am Rand hängen bleiben, nicht sofort austrocknen. In das jeweils erste der vorbereiteten FACS-Röhrchen wurden die CD8⁺ Tetramer⁺ Zellen der entsprechenden Färbung sortiert, in das zweite die CD8⁺ Tetramer⁻ Zellen. Danach wurden für die polyklonale Expansion folgende Zellen, die als Feederzellen dienen, aufgereinigt und/oder bestrahlt:

1. PBMCs, aus 50 ml heparinisieretem Blut gewonnen, wurden in T-Zellmedium aufgenommen und für 3'41'' (9 Gy/min) in der Gammazelle bestrahlt. Anschließend wurden die T-Zellen gezählt und jeweils 1x10⁶ gelöst in T-Zellmedium den sortierten Zellen zugegeben.
2. Zellen der Zelllinie LG2-EBV wurden für 21'41'' (9 Gy/min) in der Gammazelle bestrahlt, dann gezählt und jeweils 1x10⁵ Zellen zu den sortierten Zellen zugegeben.

Alle Zellen wurden darauf für 5' bei 460xg und 4 °C (Megafuge: 1500 rpm) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet der jeweiligen Färbung wurde in 2 ml T-Zellmedium mit 300 U/ml IL-2 und 1 µg/ml PHA-L resuspendiert und in einen Napf einer 24napf-Platte überführt. In die äußeren Näpfe der Platte wurden 2 ml PBS als Verdunstungsschutz pipettiert. Die Platte wurde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach vier bis sieben Tagen wurde 1 ml Medium abgesaugt und 1 ml T-Zellmedium mit 600 U/ml IL-2 und 1 µg/ml PHA-L zugegeben. Dann wurde alle zwei bis drei Tage in der gleichen Weise das Medium gewechselt, bis zwei Wochen nach der Sortierung wieder mit PHA, IL-2 und Feederzellen restimuliert wurde. Ziel war es eine möglichst hohe Anzahl von CD8⁺ Tetramer⁺ Zellen für weitere funktionelle Analysen zu züchten.

2.2.3.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Verwendete Materialien:

96napf-Rundbodenplatte (Corning Incorporated)

5 ml FACS-Röhrchen (Becton Dickinson)

0,5 ml FACS-Röhrchen (Greiner)

Synthetische Peptide (laborintern hergestellt nach Standard-Fmoc-Chemie) gelöst in ddH₂O mit 10 % DMSO (Merck), 1 mg/ml; Lagerung bei -80 °C

PMA (Sigma): 10 µg/ml

Ionomycin (Sigma): 1 mM

SEB (Sigma): 10 µg/ml

Fluorochrom konjugierte Antikörper: Die extrazellulär und die intrazellulär verwendeten monoklonale Antikörper können der Tabelle 2.6 entnommen werden.

Golgi-Stop (Becton Dickinson): ethanolische Lösung von Monensin

Brefeldin A (Becton Dickinson)

Zytofix/Zytoperm (Becton Dickinson)

T-Zellmedium

Perm/Wasch-Lösung: PBS, 0,1 % Saponin (Sigma), 0,5 % BSA (Sigma A-3059), 0,02 % Natriumazid (Merck)

Standard-FACS-Puffer PFEA: PBS mit 2 % hitzeinaktiviertem (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth), 0,01 % Natriumazid (Merck)

BSA-FACS-Puffer PBEA: PBS mit 0,5 % BSA (Sigma A-3059), 2 mM EDTA (Roth),
0,01 % Natriumazid (Merck)

FACS-Fix: FACS-Puffer PFEA mit 1 % Formaldehyd (Fluka)

Tabelle 2.8: Extrazelluläre und intrazelluläre eingesetzte monoklonale Antikörper.

Monoklonaler Antikörper	Hersteller/ Klon und Charge	Verdünnung
Ratte α -human CD3 ECD	Beckman Coulter/ Ao7748; Lot. 19	1:50
Maus α -human CD4 FITC	Becton Dickinson/ SK3 clone; Lot. 57081A	1:50
Maus α -human CD8 PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson/ SK1 clone; Lot. 85331	1:50
Maus α -human CD3 Qdot655	Invitrogen/ Klon S4.1	1:120
Maus α -human CD4 Qdot605	Invitrogen/ Klon S3.5	1:120
Maus α -human CD4 Qdot705	Invitrogen/ Klon 3B5	1:120
Maus α -human IL-5 APC	Becton Dickinson/ CatNo.554396; Lot. 84548	1:100
Maus α -human IFN γ PE-Cy7	Becton Dickinson/ CatNo.557844; Lot. 82082	1:600
Maus α -human TNF α ALEXAFluor 700	Becton Dickinson/ CatNo.557996; Lot. 85026	1:120
Maus α -human IL-2 PE	Becton Dickinson/ CatNo.340448; Lot. 89296	1:50
Maus α -human IL-2 FITC	Becton Dickinson/ CatNo 340448	1:50
Maus α -human CD154 PE	Becton Dickinson/ CatNo 555700	1:20
Maus α -human IL-10 PacificBlue	Ebioscience 57-7108-73	1:200
Maus α -human IL-17 APC	R&D Systems IC3171A	1:50
LIVE/DEADaqua	Invitrogen/ L34957; Lot. 32088W	1:400

Durchführung:

Die zu testenden zuvor in 24napf-Platten amplifizierte PBMCs oder T-Zelllinien, siehe 2.2.2.6, wurden einmal mit T-Zellmedium gewaschen, gezählt und 0,5 bis 1×10^6 Zellen, in einem Volumen von 100 μ l T-Zellmedium pro Napf einer 96napf-Platte ausplattiert. Diesen Effektorzellen wurde das Peptid direkt in 100 μ l T-Zellmedium pro Napf, versetzt mit Brefeldin A (Verdünnung: 1:1500) und Monensin (Verdünnung: 1:3000), in einer Endkonzentration von 1 bis 10 μ g/ml zugegeben. Als Positivkontrollen dienten Pools mit viralen Peptiden (CMV/EBV) in der gleichen Konzentration und PMA (Endkonzentration 50

ng/ml)/Ionomycin (Endkonzentration 1 μ M) oder SEB (Endkonzentration 10 μ g/ml); Negativkontrollen bildete ein HIV-Peptid und eine Mediumkontrolle ohne Peptid. Nun folgte eine Inkubation von 5,5 h bis 8 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Anschließend wurden alle Schritte auf Eis und unter Vermeidung von direktem Licht durchgeführt. Die 96napf-Platten wurden immer für 2' bei 660xg und 4 °C (1800 rpm, Megafuge) zentrifugiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und zweimal mit 200 μ l/Napf PBS gewaschen, im Anschluss wurden sie in 100 μ l LIVE/DEADaqua, verdünnt 1:400 in PBS zugegeben. Eine Inkubation von 20' bei 4 °C im Dunkeln folgte. Darauf wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und zweimal mit 200 μ l/Napf PBS gewaschen, im Anschluss wurden die Zellen in 100 μ l einer Lösung mit PBEA, in der die Oberflächenantikörper entsprechend ihren optimalen Verdünnungen vorlagen, für 20' bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 200 μ l/Napf PFEA gewaschen, bevor sie in 100 μ l pro Napf Zytotfix/Zytoperm-Lösung resuspendiert und nochmals für 20' bei 4 °C im Dunkeln inkubiert wurden. Nun wurde zweimal mit 200 μ l/Napf Perm/Wasch-Lösung gewaschen, in 100 μ l Perm/Wasch-Lösung, in denen die gewünschten intrazellulär eingesetzten Antikörper gelöst waren, resuspendiert und 30' bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde zweimal mit 200 μ l/Napf Perm/Wasch-Lösung und einmal mit 200 μ l/Napf PFEA gewaschen. Schlussendlich wurden die Zellen in 100 μ l/Napf FACS-Fix resuspendiert und in Alufolie eingepackt bis zur Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.3.5 Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre Zytokinfärbung

Verwendete Materialien:

96napf-Rundbodenplatte (Corning Incorporated)

5 ml FACS-Röhrchen (Becton Dickinson)

0,5 ml FACS-Röhrchen (Greiner)

Synthetische Peptide (laborintern hergestellt nach Standard-Fmoc-Chemie) gelöst in ddH₂O mit 10 % DMSO (Merck), 1 mg/ml; Lagerung bei -80 °C

PMA (Sigma): 10 μ g/ml

Ionomycin (Sigma): 1 mM

Fluorochrom konjugierte Antikörper: Die extrazellulär und die intrazellulär verwendeten monoklonale Antikörper können der Tabelle 2.9 entnommen werden.

Tetramere, PE-konjugiert

Unkonjugiertes Streptavidin (Sigma) 1mg/ml in PBS, 0,01 Natriumazid

Golgi-Stop (Becton Dickinson): ethanolische Lösung von Monensin

Zytofix/Zytoperm (Becton Dickinson)

T-Zellmedium

X-Vivo 15, serumfreies Medium (Cambrex)

Perm/Wasch-Lösung: PBS, 0,1 % Saponin (Sigma), 0,5 % BSA (Sigma A-3059), 0,02 % Natriumazid (Merck)

Standard-FACS-Puffer PFEA: PBS mit 2 % hitzeinaktiviertem (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth), 0,01 % Natriumazid (Merck)

BSA-FACS-Puffer PBEA: PBS mit 0,5 % BSA (Sigma A-3059), 2 mM EDTA (Roth), 0,01 % Natriumazid (Merck)

FACS-Fix: FACS-Puffer PFEA mit 1 % Formaldehyd (Fluka)

Tetramer-Färbepuffer TSB: 50 % PBS, 50 % hitzeinaktiviertes (30' bei 56 °C) FCS, 2 mM EDTA (Roth), 0,01 % Natriumazid (Merck)

Tabelle 2.9: Eingesetzte monoklonale Antikörper neben der Tetramerfärbung

Monoklonaler Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Maus α -human CD8 PerCP	BD	1:20
Maus α -human IFN γ PE	BD	1:200

Durchführung:

Im Verlauf dieses Protokolls wurden die Zellen immer für 10' bei 460xg und 4 °C (Megafuge: 1500 rpm) zentrifugiert.

Die zu testenden, zuvor in 96napf-Platten stimulierten, PBMCs oder T-Zelllinien, siehe 2.2.2.6, wurden einmal mit T-Zellmedium gewaschen, gezählt und 0,5 bis 1×10^6 Zellen, in einem Volumen von 100 μ l T-Zellmedium pro Napf einer 96napf-Platte eingestellt. Diesen auch Effektorzellen genannten Zellen wurde das Peptid entweder direkt in 100 μ l/Napf in einer Endkonzentration von 1 bis 10 μ g/ml zugegeben, oder auf so genannte Zielzellen, die dann zuvor mit Peptid-beladen wurden. Dazu wurden autologe PBMCs (die nach der Isolierung der PBMCs eingefroren worden waren), Zellen der Zelllinien JY (EBV- transformierte humane lymphoblastoide Zelllinie) und verschiedene Nierenzellkarzinom-Zelllinien (exprimieren SPAG4), siehe 2.2.2.9, verwendet. Als Negativkontrollen wurden Zielzellen verwendet, die mit zuvor HIV-Peptiden oder gar nicht beladen waren. Als Positivkontrollen diente eine Mischung aus PMA und Ionomycin. Die autologen PBMCs wurden am Tag zuvor aufgetaut in T-Zellmedium resuspendiert und in einem Napf einer 6napf-Platte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C gelagert, weil beim Auftauen die Zellen

unspezifisch IFN γ ausschütten. Am nächsten Morgen wurden die PBMCs gut resuspendiert und einmal mit T-Zellmedium gewaschen. Die anderen Zelllinien waren in Kultur und konnten ohne spezielle Vorbehandlung geerntet werden. Nach dem Ernten/Auftauen der Zielzellen wurden diese zweimal mit je 5 ml bei Raumtemperatur temperiertem serumfreiem Medium, in dieser Arbeit X-Vivo 15, gewaschen. Danach wurden sie in 1 ml X-Vivo 15 resuspendiert, bevor das entsprechende Peptid in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben wurde. Die Peptidbeladung erfolgte nun während einer 1,5-stündigen Inkubation bei 37 °C. Danach wurden die beladenen Zellen zweimal mit je 5 ml X-Vivo 15 und einmal mit 5 ml T-Zellmedium gewaschen, gezählt und in 100 μl T-Zellmedium zu den T-Zellen, die ebenfalls in 100 μl T-Zellmedium vorlagen, gegeben. Das Verhältnis Zielzellen: Effektorzellen betrug dabei immer 1:1. Für die Positivkontrollen wurden den Effektorzellen PMA mit einer Endkonzentration von 50 ng/ml und Ionomycin mit einer Endkonzentration von 1 μM in 200 μl T-Zellmedium zugegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde das Golgi-Stop in einer 1:1500-Verdünnung zu allen Zellen gegeben. Nun folgte eine Inkubationszeit von 6 h bei 37 °C und 5 % CO $_2$. Anschließend wurden alle Schritte auf Eis und unter Vermeidung von direktem Licht durchgeführt. Die 96napf-Platten wurden immer für 2' bei 660xg und 4 °C (1800 rpm, Megafuge) zentrifugiert. Die Tetramere wurden in TSB auf eine Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt. Durch Zentrifugation für 5'/13000 rpm bei 4 °C (Biofuge fresco) wurde die Lösung von Präzipitat befreit. Die T-Zellen wurden zweimal mit 200 μl PBEA gewaschen. Danach wurden Zellpellets in 50 μl Antikörperlösung (CD8-PerCP und unkonjugiertes Streptavidin) resuspendiert und für 20' bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Es folgten 2 Waschschrte mit 200 μl PFEA. Dann wurden die pelletierten Zellen in 50 μl Tetramerlösung resuspendiert und für 30' bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, bevor sie zweimal mit 200 μl PFEA gewaschen wurden und in 100 μl /Napf Zytofix/Zytoperm nochmals 20' bei 4 °C im Dunkeln inkubiert wurden. Danach wurde zweimal mit 200 μl pro Napf mit Perm/Wasch-Lösung gewaschen, in 100 μl Perm/Wasch-Lösung, in denen der α -IFN γ -Antikörper gelöst war, resuspendiert und 30' bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde zweimal mit 200 μl pro Napf mit Perm/Wasch-Lösung und einmal mit 200 μl pro Napf mit PFEA gewaschen. Dann wurden die Zellen in 100 μl pro Napf in FACS-Fix resuspendiert und in Alufolie eingepackt bis zur Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.3.6 IFN γ -ELISpot

Verwendete Materialien:

ELISpot Human IFN γ ELISpot Set (Becton Dickinson) oder

ELISpot-Platte: 96napf-Platte MAHABN4510 (Millipore)

Erstantikörper: Monoklonaler Antikörper Anti-human IFN γ Capture 1mg/ml (MabTech, Klon 1D1k)

Zweitantikörper: Monoklonaler Antikörper Biotin Maus Anti-human IFN γ 1 mg/ml (MabTech, Klon 7-B6-1)

Streptavidin – Alkalische Phosphatase E2636 (Sigma)

BCIP/NBT B5655 (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate/Nitro-Blau-Tetrazolium, Sigma)

Waschpuffer: PBS/Tween (Merck) 0,1 %

Inkubationspuffer: PBS+BSA 0.5 % (BSA A4628, Sigma)

X-Vivo 15 oder X-Vivo 20, serumfreies Medium (Cambrex)

ddH₂O

Synthetische Peptide (laborintern hergestellt nach Standard-Fmoc-Chemie) gelöst in ddH₂O mit 10 % DMSO (Merck), 1 mg/ml; Lagerung bei -80 °C

PHA-L (Sigma)

SEB (Sigma): 10 μ g/ml

ELISpot-Reader Immunospot S4 mit ImmunoSpot Academic Analysesoftware und ImmunoCapture Bildaufnahmesoftware (Cellular Technologies LTD)

Durchführung:

Bevor die IFN γ -Sekretion von T-Zellen nach Antigenkontakt durch IFN γ -ELISpot nachgewiesen werden konnte, war es notwendig 24 h zuvor die ELISpot-Platten steril mit dem Erstantikörper zu beladen. Eingesetzt wurde 5 μ g/ml 1-D1K Antikörper in PBS zu je 100 μ l/Napf, dies entsprach einer 1:200 Verdünnung. Idealerweise inkubierten die Platten über Nacht bei 4 °C im Dunkeln. Der Ansatz wurde möglichst blasen freigehalten, eventuell auftretende Blasen wurden mit einer Injektionsnadel zum platzen gebracht.

Am nächsten Tag wurden die über Nacht mit dem Erstantikörper beladenen Platten ausgeklopft und zweimal mit PBS gewaschen (200 μ l/Napf) und danach mit 100 μ l T-Zellmedium pro Napf für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert (Blockierungsschritt!). Nachdem die blockierte Platte ausgeklopft war, wurden 1×10^5 - 1×10^6 der amplifizierten T-Zellen, siehe 2.2.2.6, pro Napf in einem Volumen von 100 μ l T-Zellmedium pipettiert.

Anschließend wurden die zu testenden Peptide in einer Endkonzentration von 5-10 µg/ml zupipettiert. Als Positivkontrollen dienten Pools mit viralen Peptiden (CMV/EBV) in der gleichen Konzentration und PHA-L (Endkonzentration 10 µg/ml) oder SEB (Endkonzentration 10 µg/ml); Negativkontrollen bildeten HIV-Peptide oder Selbstpeptide. Das Endvolumen in einem Napf der ELISpot-Platten lag bei 200 µl. Nun folgte eine möglichst erschütterungsfreie Inkubation bei 37 °C für mindestens 20 bis 26 Stunden. Die Platten wurden dafür in Alufolie eingewickelt. Jedes Peptid wurde mindestens in Duplikaten oder in Triplikaten getestet.

Am nächsten Tag (Tag 3 des kompletten Versuchsansatzes) wurden die Platten zweimal mit 200 µl/Napf ddH₂O gewaschen und daraufhin für 5´ bei Raumtemperatur inkubiert und noch dreimal mit 200 µl/Napf Waschpuffer gewaschen. Der Zweitantikörper wurde auf 1 µg/ml in Inkubationspuffer verdünnt und pro Napf wurden 50 µl dieser Lösung zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C bei RT wurde die Platte fünfmal mit 200 µl/Napf Waschpuffer gespült, bevor 100 µl/Napf einer 1:1000-Verdünnung in Inkubationspuffer der Streptavidin-gekoppelten alkalischen Phosphatase zugegeben wurden. Eine einstündige Inkubation bei RT folgte. Das Substrat wurde, wenn nötig, mit einem 0,2 µm-Filter filtriert, um bereits ausgefallenes Präzipitat nicht in den Versuch einzubringen. Schließlich wurden 100 µl/Napf an Substrat zupipettiert und die Platte bei RT unter ständiger Kontrolle inkubiert, bis eine deutliche Farbreaktion zu beobachten war (2´ bis 10´). Zum Stoppen der Farbreaktion wurde die Platte ausgeklopft und mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gründlich ausgespült. Im Dunkeln wurde die Platte an der Luft getrocknet. Die Auswertung wurde gemäß der Bedienungsanleitung des ELISpot-Readers und der installierten Software vorgenommen.

2.2.3.7 Zytotoxizitätsmessung

Verwendete Materialien:

Szintillationszähler (Wallac, 1450 Microbeta Plus, Liquid Scintillation Counter)

X-Vivo 15 oder X-Vivo 20, serumfreies Medium (Cambrex)

T-Zellmedium

PBS

Zielzellen (siehe 2.2.2.9)

Effektorzellen: peptidspezifische T-Zellen aus diversen Stimulationen

⁵¹Cr (Na₂⁵¹CrO₄), (c = 5 µCi/µl), (NEN Amersham Bioscience)

Synthetische Peptide (laborintern hergestellt nach Standard-Fmoc-Chemie) gelöst in ddH₂O mit 10 % DMSO (Merck), 1 mg/ml; Lagerung bei -80 °C

Durchführung:

Im Verlauf dieses Protokolls wurden die Zellen immer für 10' bei 460xg und 4 °C (Megafuge: 1500 rpm) zentrifugiert.

Am Vortag wurden die Zielzellen mit frischem T-Zellmedium versorgt. Am nächsten Tag wurden die Zielzellen gezählt und die gewünschte Zellmenge in 15 ml-Röhrchen aliquotiert. Von den Zielzellen, deren Lyse durch Effektorzellen induziert werden sollte, wurden 10.000 Zellen pro Napf benötigt. Diese Zielzellen wurden darauf zweimal mit 5 ml X-Vivo-Medium gewaschen und in einem Endvolumen von ca. 200 µl X-Vivo-Medium resuspendiert. Das Peptid wurde zupipettiert, so dass die Finalkonzentration 5-10 µg/ml betrug. Zusätzlich wurde diesen 200 µl Zielzellsuspensionen jeweils 10 µl ⁵¹Cr (100 µCi) zupipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C im Inkubator wurden die Zellen zweimal mit 5 ml X-Vivo-Medium gewaschen, in 5 ml X-Vivo-Medium aufgenommen und für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen wieder abzentrifugiert, mit 5 ml T-Zellmedium gewaschen, in der entsprechenden Menge (100 µl/Napf) T-Zellmedium aufgenommen und ausplattiert. Bei der Mengenermittlung der Zielzellen wurden die zusätzlich benötigten Zellen für maximaler Freisetzung und spontaner Freisetzung miteinberechnet. Die Ermittlung von maximaler Lyse der Zielzellen und der spontanen Lyse der Zielzellen erfolgte mindestens in einem 3fachen Ansatz.

Während der einstündigen Inkubation der Zielzellen wurden die Effektorzellen gezählt, die gewünschte Menge für eine Verdünnungsreihe und somit pro Test entnommen ($1,35 \times 10^6$ Zellen/ml), zweimal mit 5 ml T-Zellmedium gewaschen und in 450 µl T-Zellmedium (150 µl/Napf) aufgenommen und in die drei Näpfe des ersten Triplikates der Verdünnungsreihe pipettiert. Es wurden immer sechs Verdünnungsstufen: 30:1 / 10:1 / 3:1 / 1:1 / 0,3:1 / 0,1:1 angesetzt, das heißt, die Effektorzellen wurden von Triplikat zu Triplikat immer 1:3 verdünnt. Dafür wurden in eine 96napf-Rundbodenplatte 100 µl T-Zellmedium vorgelegt. 150 µl der Effektorzellen wurden in die 1. Reihe der Platte pipettiert, aus dieser Reihe wurden wiederum 50 µl in die darunterliegende Reihe überführt, resuspendiert, erneut 50 µl in die darunterliegende Reihe gegeben usw.

Nach Ablauf der Inkubation der Zielzellen wurden diese zu den Effektorzellen pipettiert. Für die Messung der Maximalfreisetzung wurden zu den Zielzellen 100 µl Triton-X gegeben, für die Bestimmung der spontanen Freisetzung der Zielzellen wurden nur 100 µl T-Zellmedium zu den Zielzellen gegeben.

Die Platte wurde dann bei 37 °C für 4 h oder 20 h inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubation wurden 50 µl/Napf oberflächlich abgenommen, auf eine LUMA-Platte übertragen und über Nacht getrocknet. Am nächsten

Tag wurde die Platte im Szintillations-Zähler gemessen, wobei nach den Bedienungsanleitungen des Gerätes und der Software verfahren wurde.

Der Prozentsatz der spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse} = \frac{(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) \times 100}{(\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})}$$

Der Prozentsatz an spontaner Freisetzung war bei den getesteten Zielzellen immer unter 10 %.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 SPAG4

Das *Human Sperm Associated Antigen* (SPAG4) wird in diversen Tumoren im Vergleich zu dem korrespondierenden gesunden Gewebe überexprimiert (Kennedy et al., 2004a). Diese Erkenntnis macht das Protein zu einem attraktiven Kandidaten für eine peptidgestützte Anti-Tumortherapie. Es sind für SPAG4 noch keine Tumorepitope beschrieben worden, gegen die spezifische T-Zellen erzeugt werden konnten.

3.1.1 SPAG4-Epitopvorhersage

Es wurden schon während meiner Diplomarbeit mit Hilfe der Proteinsequenz des SPAG4-Proteins mögliche Epitope (HLA-Liganden) vorhergesagt, die die Anforderungen dieser HLA-Moleküle bezüglich Ankeraminosäuren und weiteren Kriterien am besten erfüllen. Dazu wurde die Epitopvorhersage mit Hilfe der SYFPEITHI-Datenbank durchgeführt (Rammensee et al., 1999). Der der Epitopvorhersage zugrunde liegende Algorithmus generiert aus einer eingegebenen Proteinsequenz alle möglichen Peptide der gewünschten Länge, in diesem Falle also 9 – 11 Aminosäuren lange Peptide. Allen Aminosäuren im Peptid wird aufgrund der Vorlieben der HLA-Moleküle ein Zahlenwert zugeordnet, der maximal +15 für die optimale Aminosäure an der Ankerposition beträgt. Hilfsankeraminosäuren oder solche, die in natürlichen Liganden an einer bestimmten Position bevorzugt sind, erhalten geringere positive Werte. Aminosäuren, die an der betreffenden Position einen negativen Effekt auf die Bindung an das HLA-Molekül haben, wird ein negativer Wert zugeordnet. Am Ende werden die Werte für alle Aminosäuren des Peptides addiert und eine Rangliste aller Peptide erstellt. Ein natürlich präsentiertes Peptid sollte unter den besten 2 % aller Peptide zu finden sein (die Wahrscheinlichkeit dafür beträgt 80 %).

Tabelle 3.1: Exemplarisch das Motiv, das der Epitopvorhersage für HLA-A*0201 zugrunde liegt.

Das Peptidmotiv für HLA-A*0201								
Position								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker- oder Hilfsankeraminosäuren								
	L			V				V
	M							L
Bevorzugte Aminosäuren								
				E			K	
				K				

Die Epitopvorhersage wurde für HLA-A*0201-, HLA-B*0702- und HLA-B*4402-restringierte Peptide angewandt. Die besten für die genannten HLA-Moleküle vorhergesagten Peptide wurden ausgewählt und synthetisiert sowie mit Hilfe von HPLC und Massenspektrometrie auf Identität und Reinheit überprüft. Von den 15 synthetisierten Peptiden wurden im Rahmen der Diplomarbeit drei Peptide als T-Zell-Epitope verifiziert. Diese sind unter 2.1.4 zusammengestellt. Eine funktionale Charakterisierung und der Nachweis von lytischen Eigenschaften der spezifischen T-Zellen galt es noch zu erbringen. Für dieses Projekt mussten für diese SPAG4-Peptide spezifische zytotoxische T-Zellen generiert werden. Dazu wurden CD8⁺ T-Zellen aus PBMCs von gesunden Spendern mit aAPCs stimuliert. Dafür wurden Peptid/MHC-Komplexe benötigt.

3.1.2 Herstellung von Peptid/MHC-Komplexen

In der folgenden Tabelle 3.2 sind die durchgeführten Rückfaltungen mit den SPAG4-Peptiden aufgelistet.

Tabelle 3.2: Hergestellte Monomere. Eine Rückfaltung war erfolgreich, wenn mindestens 500 mg Monomer hergestellt werden konnte.

SEQUENZ	Molmasse	Position	SYFP-Score	Allel	Rückfaltung
LLFQGLSVL	988,6	138-146	29	HLA-A*0201	+
GLLYLV SPL	973,6	184-192	27	HLA-A*0201	+
GPSCGEPAL	829,4	54-62	24	HLA-B*0702	+

3.1.3 Die CD8⁺ T-Zell-Gewinnung

Die Quelle für die PBMCs, aus denen im weiteren Verlauf CD8⁺ T-Zellen angereichert werden sollten, waren entweder *Buffy Coats* (peripheres, erythrozytenabgereichertes Blut) von gesunden Spendern oder Leukaphereseprodukte (peripheres, leukozytenangereichertes Blut) von gesunden Spendern. Die diversen Blutprodukte wurden von der Transfusionsmedizin in Tübingen bezogen - an dieser Stelle vielen Dank an Frau Prof. D. Wernet. Die PBMCs wurden aus diesen Blutprodukten durch Dichtezentrifugation mit Lymphozytenseparationslösung isoliert. Die Ausbeute und die HLA-Typisierung der gewonnenen PBMCs aus den jeweiligen Blutprodukten ist der Tabelle 3.3 zu entnehmen.

CD8⁺ T-Zellen wurden aus den PBMCs durch positive Selektion via MACS-Aufreinigung gewonnen. Durch diese MACS-Aufreinigung konnten die CD8⁺ T-Zellen mit 90-99 % Reinheit gewonnen werden und unerwünschte Zellpopulationen wie zum Beispiel CD4⁺ T-Zellen beseitigt werden.

Tabelle 3.3: Zusammenstellung der verwendeten Blutprodukte

Blutspender	Blutprodukt	Ausbeute der PBMCs	CMV	HLA			
				A2	A3	B7	B50
1	Buffy Coat	5,7x10 ⁸	CP	A2	A3	B7	B50
2	Leukapherese	9,2x10 ⁸	CP	A2	A24	B7	B55
3	Leukapherese	6,3x10 ⁸	CP	A2	A31	B7	B49
4	Buffy Coat	7,3x10 ⁸	CP	A2	A25	B7	B18
5	Buffy Coat	4,5x10 ⁸	CN	A2		B7	B62
6	Leukapherese	1,6x10 ⁹	CP	A2	A26	B7	B49
7	Leukapherese	1,5x10 ⁹	CP	A2	A3	B7	B44
8	Leukapherese	3,2x10 ⁹	CP	A2		B7	B44
9	Leukapherese	2,0x10 ⁹	CP	A1	A68	B7	B8

3.1.4 *In vitro* Generierung von SPAG4-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Die aus den diversen Blutprodukten gewonnenen CD8⁺ T-Zellen (siehe Tabelle 3.3) wurden mit artifiziellen APCs (siehe 1.8.5.2) stimuliert. Für diese antigenspezifische Stimulationen wurden synthetische Beads verwendet, die jeweils mit einem Monomer von den in Tabelle 3.2 aufgelisteten zu testenden Monomeren und den kostimulatorischen Antikörpern anti-CD28/anti-4-1BBL beladen wurden. Jede Stimulation wurde in einem Napf einer 96napf-Platte angesetzt. Pro Stimulation wurden circa 1x10⁶ CD8⁺ T-Zellen verwendet. Entsprechend der Anzahl CD8⁺ T-Zellen, die von einem Blutprodukt eines Blutspenders aufgereinigt werden konnten, wurde die Anzahl der Stimulationen bestimmt. Die aAPCs wurden in zwei unterschiedlichen Monomerkonzentrationen eingesetzt. Die so genannten *high density* Beads (HD) waren mit 20 nM Monomer, die *low density* Beads (LD) mit 200 pM Monomer beladen. Die Antikörperkonzentration betrug bei beiden Varianten der aAPCs 20 nM.

Die aAPCs mit Monomerbeladung unterschiedlicher Dichte wurden aufgrund folgender Erfahrung hergestellt:

- Die mit *high density* aAPCs stimulierten CD8⁺ T-Zellen zeigen meist ein stärkeres positives Stimulationssignal. Es werden aber auch CD8⁺ T-Zellen mit geringer Avidität stimuliert. Die Anzahl der MHC-Moleküle auf diesen Beads ist ungefähr 100fach höher als auf natürlichen APCs.
- Die mit *low density* aAPCs stimulierten CD8⁺ T-Zellen zeigen meist ein schwächeres positives Stimulationssignal. Es werden aber nur CD8⁺ T-Zellen mit hoher Avidität und somit höherer Funktionalität (Alexander-Miller et al., 1996b) stimuliert. Die Anzahl der MHC-Moleküle auf diesen Beads ist ungefähr gleich wie auf natürlichen APCs.

Aus Tabelle 3.4 ist ersichtlich, wie viele HD-Stimulationen und wie viele LD-Stimulationen pro zu testendem Peptid durchgeführt worden sind. Da die Funktionalität von T-Zellen mit ihrer Avidität zunimmt, wurden hauptsächlich LD-Stimulationen durchgeführt. Dass spezifische CD8⁺ T-Zellen gegen diese Epitope erzeugt werden können, wurde in der Diplomarbeit gezeigt.

Der Prozess der antigenspezifischen Stimulation war zeitintensiv, da die CD8⁺ T-Zellen im Abstand von je einer Woche insgesamt mindestens dreimal mit aAPCs stimuliert wurden. Die Analyse der stimulierten CD8⁺ T-Zellen erfolgte dann sechs Tage nach der letzten Stimulation durch Tetramerfärbung mit dem Durchflusszytometer. In Tabelle 3.4 ist jeweils vermerkt bei welchen Peptid/MHC-Komplexen nach Stimulation Tetramer⁺ Zellen detektiert werden konnten.

Tabelle 3.4: Zusammenstellung der getesteten Peptid/MHC-Komplexe. Dargestellt ist die Anzahl an HD und LD Stimulationen für jedes Peptid und die erfolgreiche *in vitro* Generation von spezifischen T-Zellen.

SPAG4-Peptide		Stimulationen (Napfzahl)			
Allel	SEQUENZ	HD	LD	Blut-Spender	Tetramer ⁺ Zellen
HLA-A*0201	LLFQGLSVL	10	50	1	+
		10	50	2	-
		0	60	3	+
		0	60	4	-
		20	100	6	+
		20	100	7	+
		20	100	8	+
		20	100	9	-
	GLLYLVSPL	10	50	1	+
		10	50	2	-
		0	60	3	-
		0	60	4	-
		20	100	6	+
		20	100	7	+
		20	100	8	+
		20	100	9	-
HLA-B*0702	GPSCGEPAL	10	50	2	-
		0	60	4	+
		0	60	5	+
		20	100	6	-
		20	100	7	+
		20	100	8	+
		20	100	9	-

Als Positiv-Kontrollen wurden parallel zu den zu testenden Peptid/MHC-Komplexen bei jedem Stimulationsansatz, je nach HLA-Typisierung des Blutspenders, zwei HLA-A*0201-restringierte Peptide aus CMV (NLVPMVATV) oder Melan-A (ELAGIGILTV) und ein HLA-B*0702-restringiertes Peptid aus CMV (TPRVTGGGAM) verwendet. Eine Auflistung der Peptide, die als Kontrollen dienten, ist in Tabelle 2.4 zu sehen. Von diesen Epitopen ist bekannt, dass durch Stimulation spezifische Zellen generiert (ELAGIGILTV) oder expandiert (NLVPMVATV und TPRVTGGGAM) werden können.

Um eine unspezifische Bindung jedes Tetramers ausschließen zu können, wurde immer mit einem Tetramercocktail gefärbt, der das Tetramer des zu überprüfenden Peptid/MHC-Komplexes als PE-Konjugat und ein Tetramer eines irrelevanten Peptid/MHC-Komplexes als APC-Konjugat enthielt. Jede Zelle wurde demnach mit einem spezifischen und einem unspezifischen Tetramer gefärbt, so dass falsch positive Ergebnisse anhand der, in diesem Fall ebenfalls positiven, unspezifischen Färbung als solche erkannt werden konnten, Protokoll der Tetramerfärbung siehe 2.2.3.2.1.

Die übrigen der auf diese Weise als spezifisch für LLFQGLSVL, GLLYLVSPL und GPSCGEPAL identifizierten T-Zellen wurden aufgereinigt. Dafür wurden diese Zellen präparativ mit Tetramer angefärbt, siehe 2.2.3.2.2 und anschließend durch das FACS Aria Cell-Sorting System aufgereinigt, siehe 2.2.3.3. Vielen Dank an dieser Stelle an Frau Grimmel, Hautklinik Tübingen. Die sortierten Zellen wurden mit bestrahlten PBMCs und LG2-EBV-Zellen als Feederzellen sowie PHA und IL-2 in Kultur genommen. Es konnten auf diese Art mehrere LLFQGLSVL, GLLYLVSPL und GPSCGEPAL - spezifische T-Zelllinien etabliert werden. Die expandierten zytotoxischen T-Zellen wurden auf ihre funktionalen und lytischen Eigenschaften getestet. Dafür wurden folgende Zielzellen benötigt: 1. autologe PBMCs, und 2. SPAG4 exprimierende Nierenkarzinomzelllinien, siehe Abbildung 3.1. Die verwendeten Zelllinien und die Kulturbedingungen sind unter 2.2.2.9 aufgelistet. Als Zielzellen wurden die Zellen der kultivierten

Zelllinien RCC5, RCC68 und MZ1257 eingesetzt. Diese Zielzellen wurden mit Peptid-beladen und unbeladen eingesetzt.

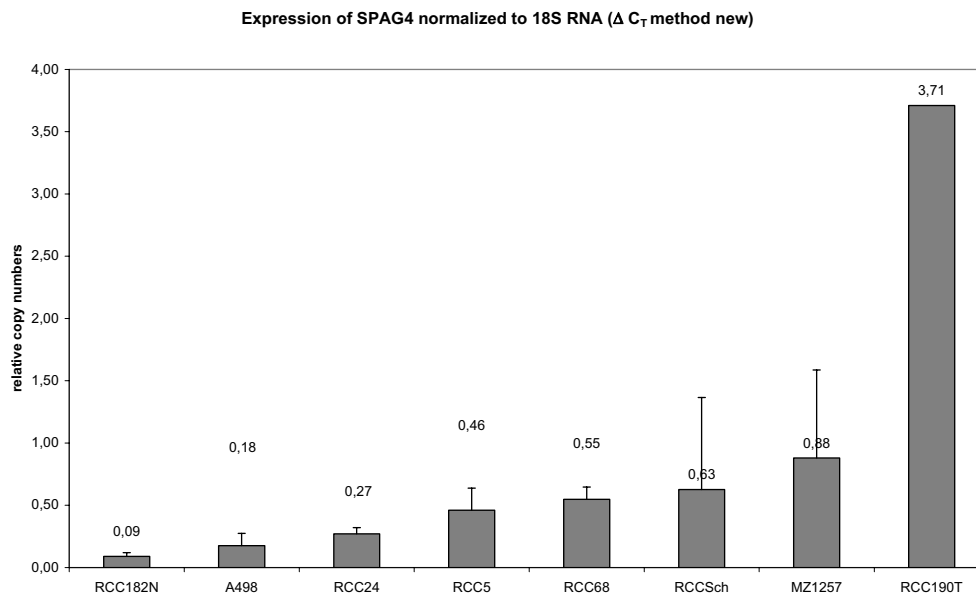


Abbildung 3.1: Genexpressionsanalyse verschiedener Nierenzellkarzinomzelllinien. RCC190T, cDNS gewonnen aus Tumorgewebe dient als Positiv-Referenz. Diplomarbeit. 2005.

3.1.5 Funktionale Analysen der SPAG4-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

3.1.5.1 Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre IFN γ -Färbung

Mit der kombinierten Tetramer- und intrazellulären IFN γ -Färbung sollte nachgewiesen werden, dass die nach Antigenkontakt IFN γ -produzierenden Zellen auch tatsächlich für dieses Antigen spezifisch sind. Die kombinierte Tetramer- und intrazelluläre Zytokinfärbung, siehe 2.2.3.5, detektiert durch den IFN γ -Nachweis in einzelnen Zellen und durch die spezifische Bindung einzelner Zellen an Peptid/MHC-Tetramere die Spezifität und Aktivierung der Zellen. Bei der kombinierten Tetramer- und intrazellulären Zytokinfärbung ist zu beachten, dass der T-Zellrezeptor nach Antigenkontakt herunterreguliert wird.

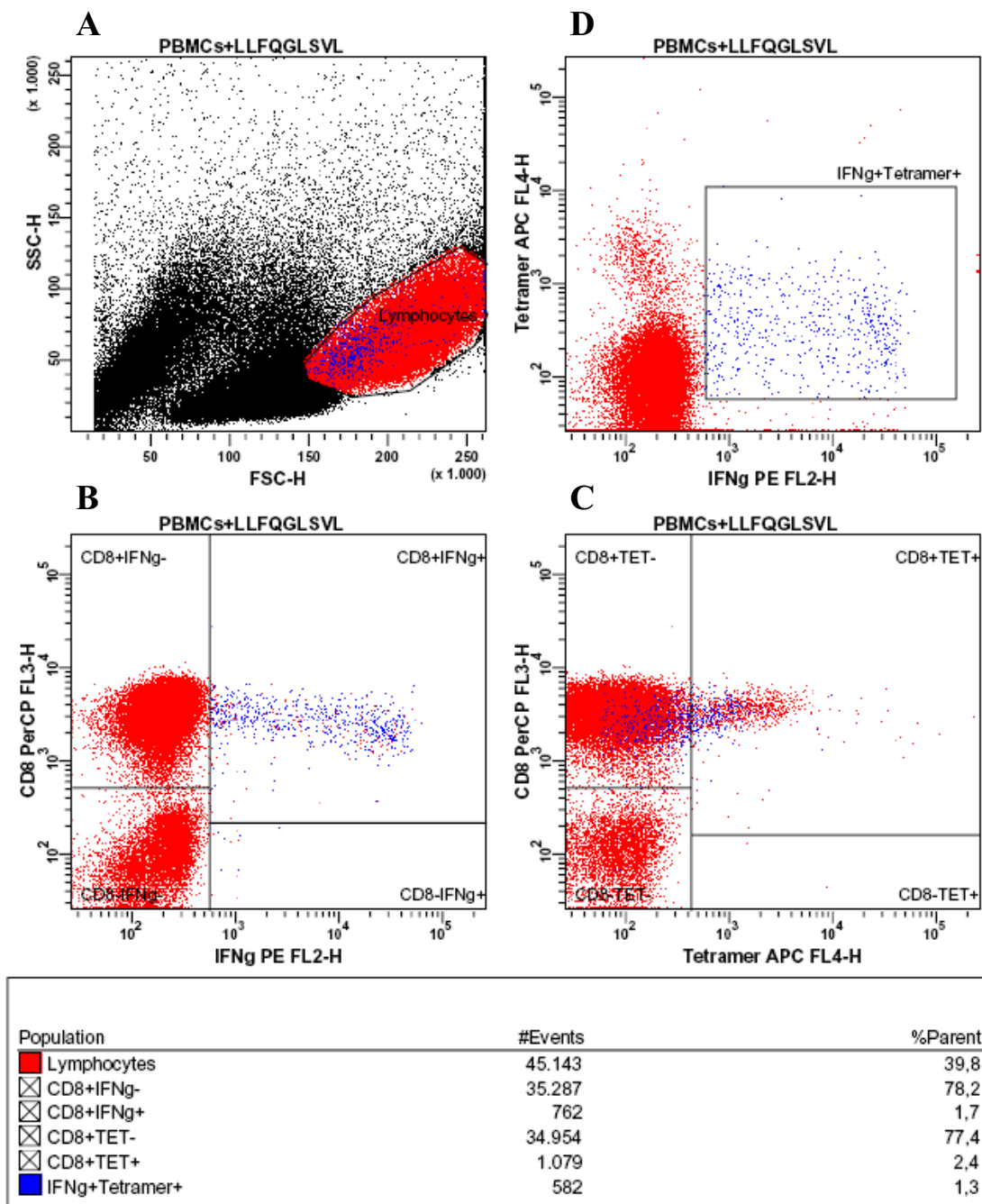


Abbildung 3.2: Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre IFN γ -Färbung der HLA-A*0201-restringierten LLFQGLSVL-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen nach Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: mit LLFQGLSVL beladene autologe PBMCs **A** In diesem SSC-H versus FSC-H Dot Plot wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität abgegrenzt und ausgewählt. In den folgenden Plots sind nur noch die Zellen dieser ausgewählten Zellpopulation dargestellt. **B** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (1,7 % der Lymphozyten/ 2,1 % der CD8⁺). **C** In diesem Dot Plot sind die LLFQGLSVL-Tetramer⁺ und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (2,4 % der Lymphozyten/ 3,0 % der CD8⁺). **D** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden gegen die Tetramer⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen aufgetragen. Die ausgewählten IFN γ ⁺ und Tetramer⁺ T-Zellen (1,3 % der Lymphozyten/ 1,6 % der CD8⁺) sind in den übrigen Dot Plots blau dargestellt.

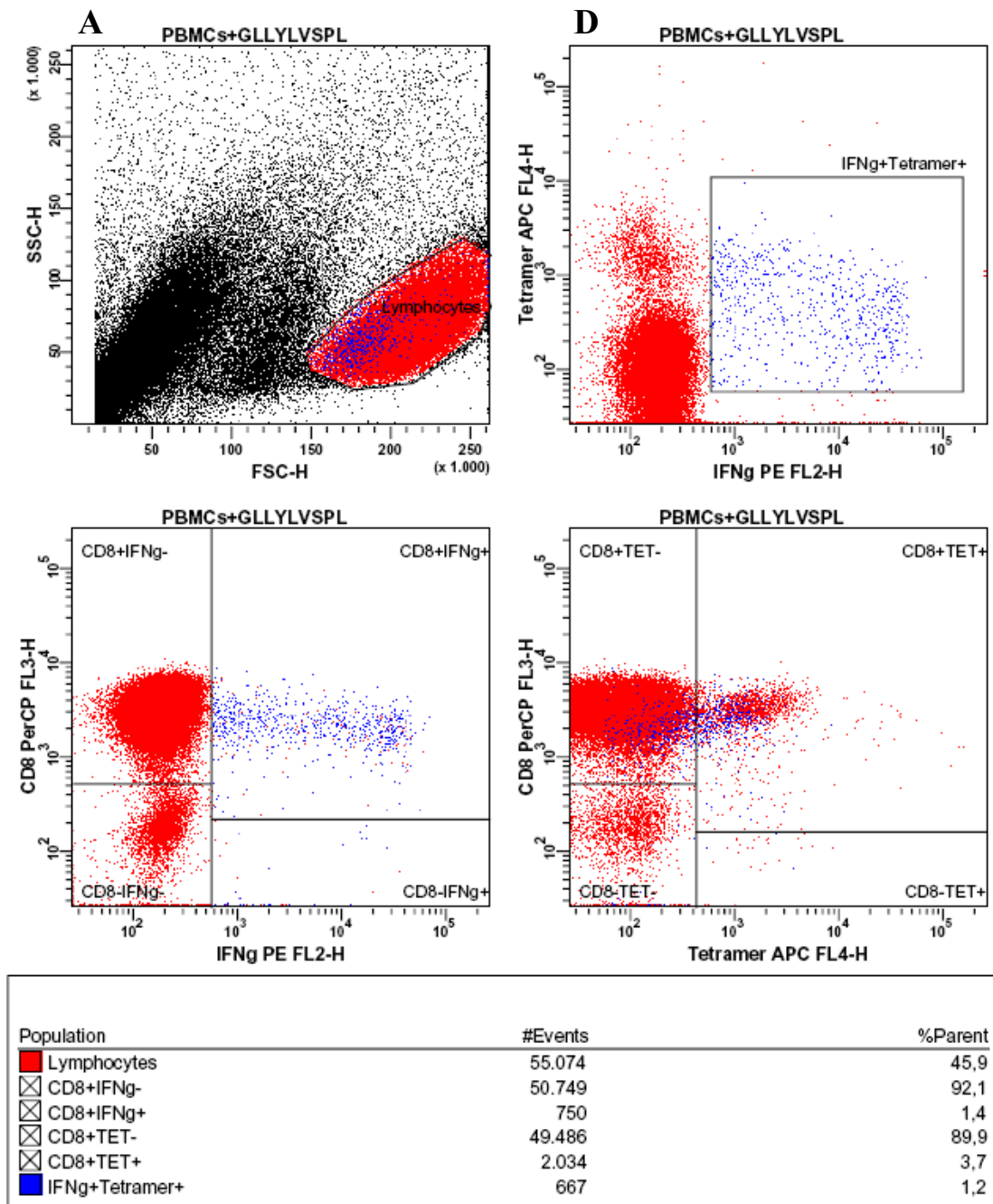


Abbildung 3.3: Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre IFN γ -Färbung der HLA-A*0201-restringierten GLLYLVSPL-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen nach Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: mit GLLYLVSPL beladene autologe PBMCs **A** In diesem SSC-H versus FSC-H Dot Plot wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität abgegrenzt und ausgewählt. In den folgenden Plots sind nur noch die Zellen dieser ausgewählten Zellpopulation dargestellt. **B** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (1,4 % der Lymphozyten/ 1,5 % der CD8⁺). **C** In diesem Dot Plot sind die GLLYLVSPL-Tetramer⁺ und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (3,7 % der Lymphozyten/ 4,0 % der CD8⁺). **D** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden gegen die Tetramer⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen aufgetragen. Die ausgewählten IFN γ ⁺ und Tetramer⁺ T-Zellen (1,2 % der Lymphozyten/ 1,3 % der CD8⁺) sind in den übrigen Dot Plots blau dargestellt.

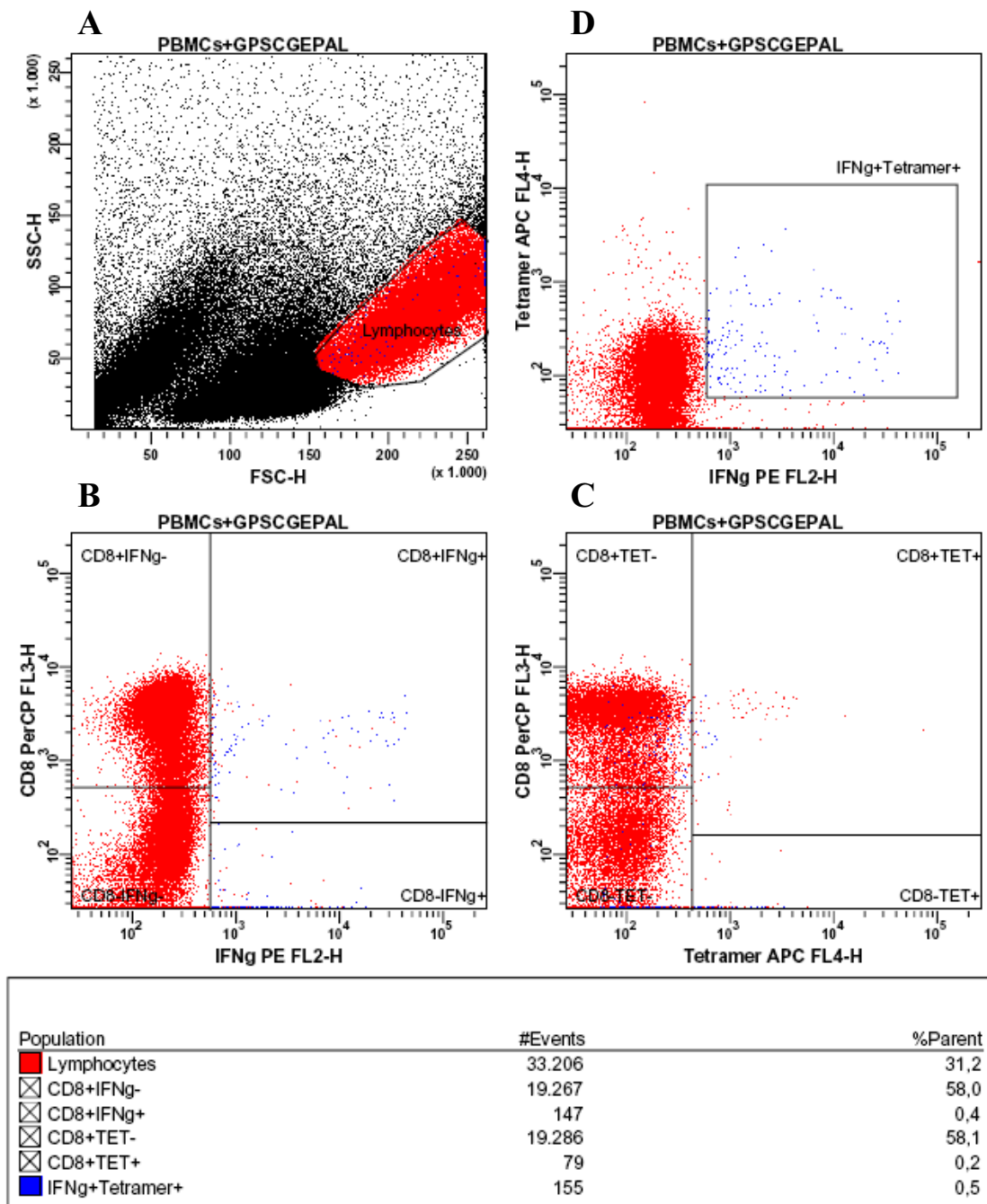


Abbildung 3.4: Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre IFN γ -Färbung der HLA-B*0702-restringierten GPSCGEPAL-Tetramer $^+$ zytotoxischen T-Zellen nach Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: mit GPSCGEPAL beladene autologe PBMCs **A** In diesem SSC-H versus FSC-H Dot Plot wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität abgegrenzt und ausgewählt. In den folgenden Plots sind die Zellen dieser ausgewählten Zellpopulation dargestellt. **B** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden CD8 $^+$ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (0,4 % der Lymphozyten/ 0,8 % der CD8 $^+$). **C** In diesem Dot Plot sind die GPSCGEPAL-Tetramer $^+$ und CD8 $^+$ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (0,2 % der Lymphozyten/ 0,4 % der CD8 $^+$). **D** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden gegen die Tetramer $^+$ CD8 $^+$ zytotoxischen T-Zellen aufgetragen. Die ausgewählten IFN γ^+ und Tetramer $^+$ T-Zellen (0,5 % der Lymphozyten/ 0,8 % der CD8 $^+$) sind in den übrigen Dot Plots blau dargestellt.

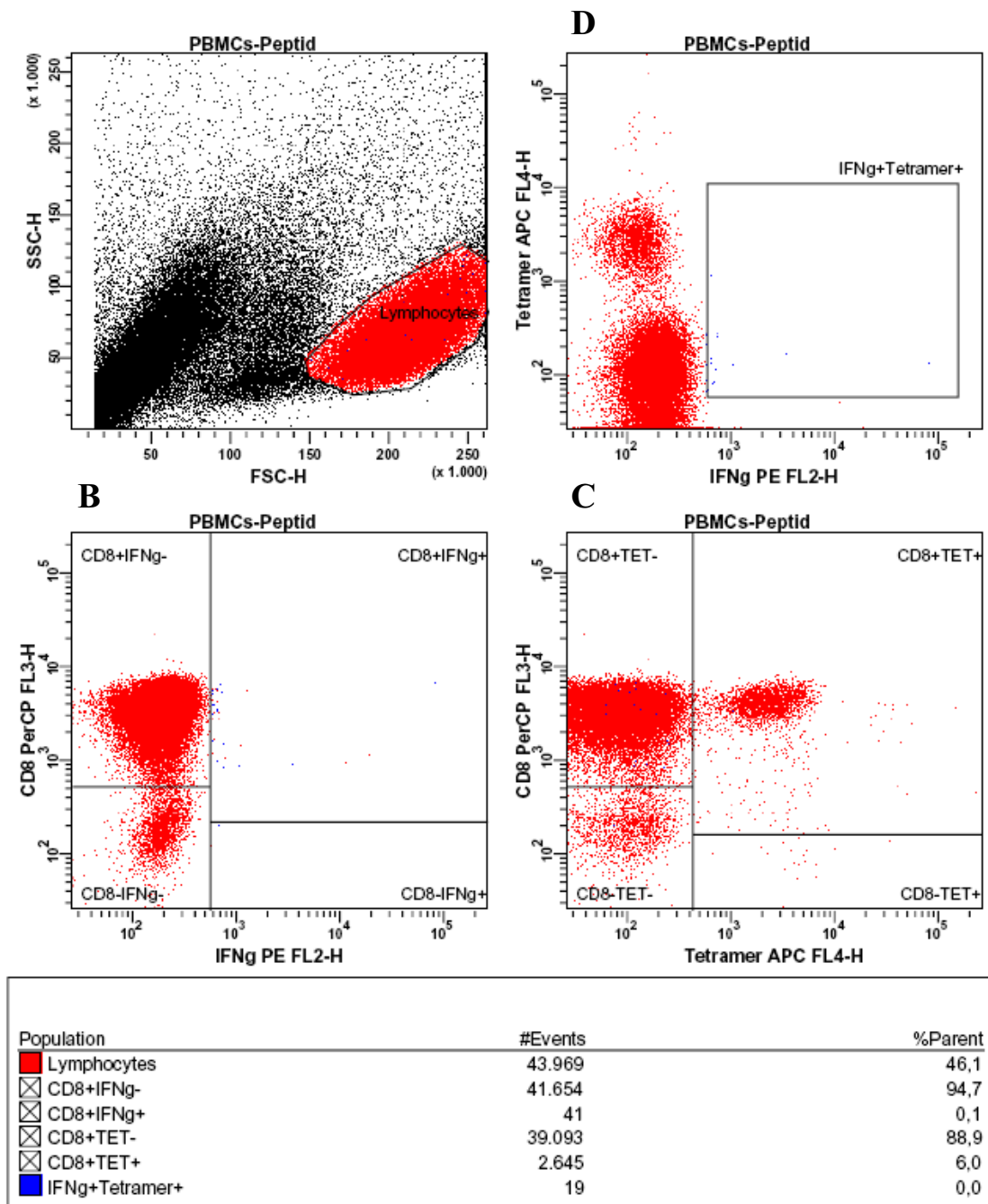


Abbildung 3.5: Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre IFN γ -Färbung der HLA-A*0201-restringierten GLLYLV SPL-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen nach Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: unbeladene autologe PBMCs (negativ Kontrolle) **A** In diesem SSC-H versus FSC-H Dot Plot wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität abgegrenzt und ausgewählt. In den folgenden Plots sind nur noch die Zellen dieser ausgewählten Zellpopulation dargestellt. **B** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (0,1 % der Lymphozyten/ 0,1 % der CD8⁺). **C** In diesem Dot Plot sind die GLLYLV SPL-Tetramer⁺ und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (6,0 % der Lymphozyten/ 6,3 % der CD8⁺). **D** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden gegen die Tetramer⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen aufgetragen. Die ausgewählten IFN γ ⁺ und Tetramer⁺ T-Zellen (0,0 % der Lymphozyten/ 0,0 % der CD8⁺) sind in den übrigen Dot Plots blau dargestellt.

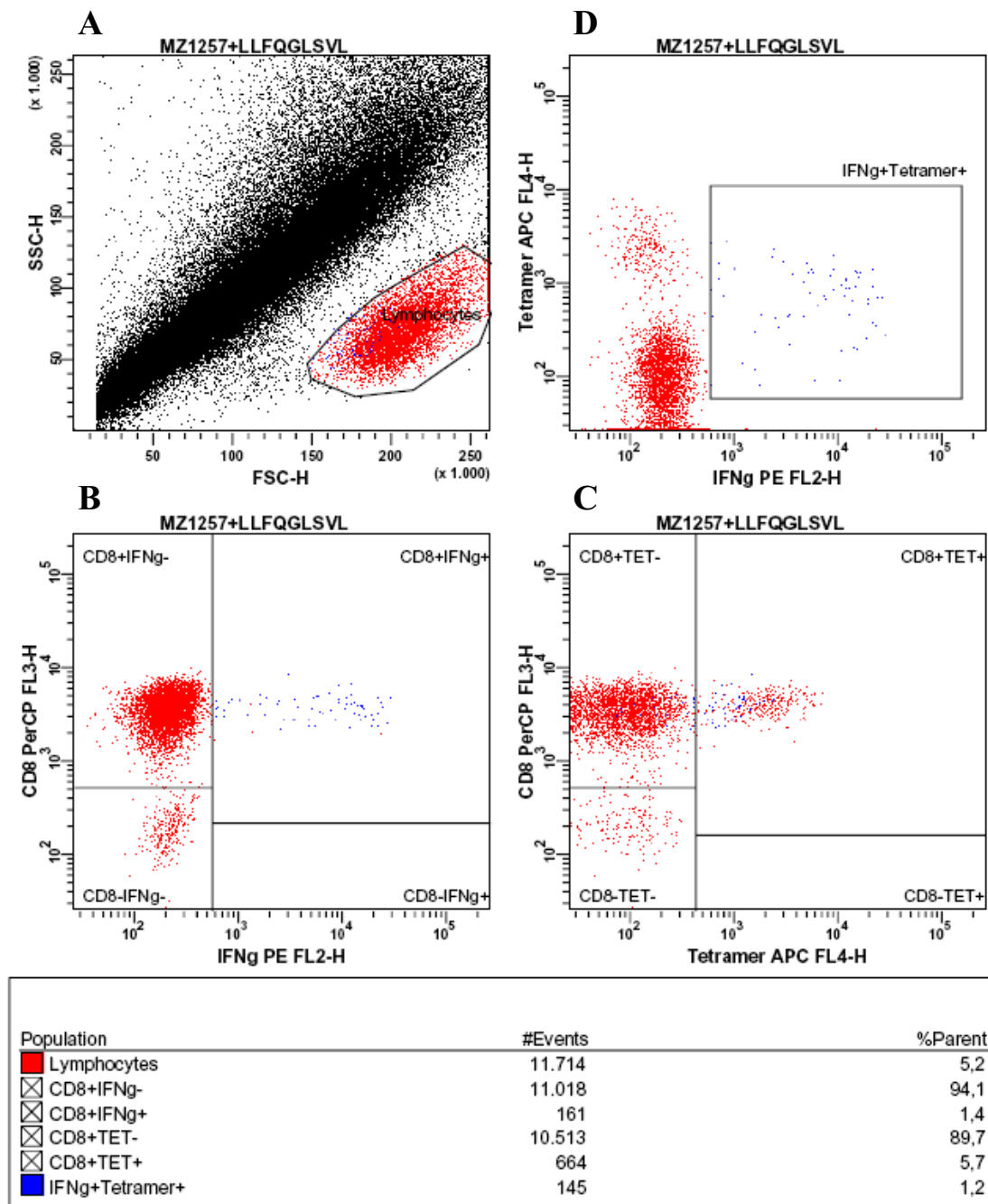


Abbildung 3.6: Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre IFN γ -Färbung der HLA-A*0201-restringierten LLFQGLSVL-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen nach Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: mit LLFQGLSVL beladene SPAG4-exprimierende Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257. **A** In diesem SSC-H versus FSC-H Dot Plot wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität abgegrenzt und ausgewählt. In den folgenden Plots sind nur noch die Zellen dieser ausgewählten Zellpopulation dargestellt. **B** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (1,4 % der Lymphozyten/ 1,4 % der CD8⁺). **C** In diesem Dot Plot sind die LLFQGLSVL-Tetramer⁺ und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (5,7 % der Lymphozyten/ 5,9 % der CD8⁺). **D** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden gegen die Tetramer⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen aufgetragen. Die ausgewählten IFN γ ⁺ und Tetramer⁺ T-Zellen (1,2 % der Lymphozyten/ 1,3 % der CD8⁺) sind in den übrigen Dot Plots blau dargestellt.

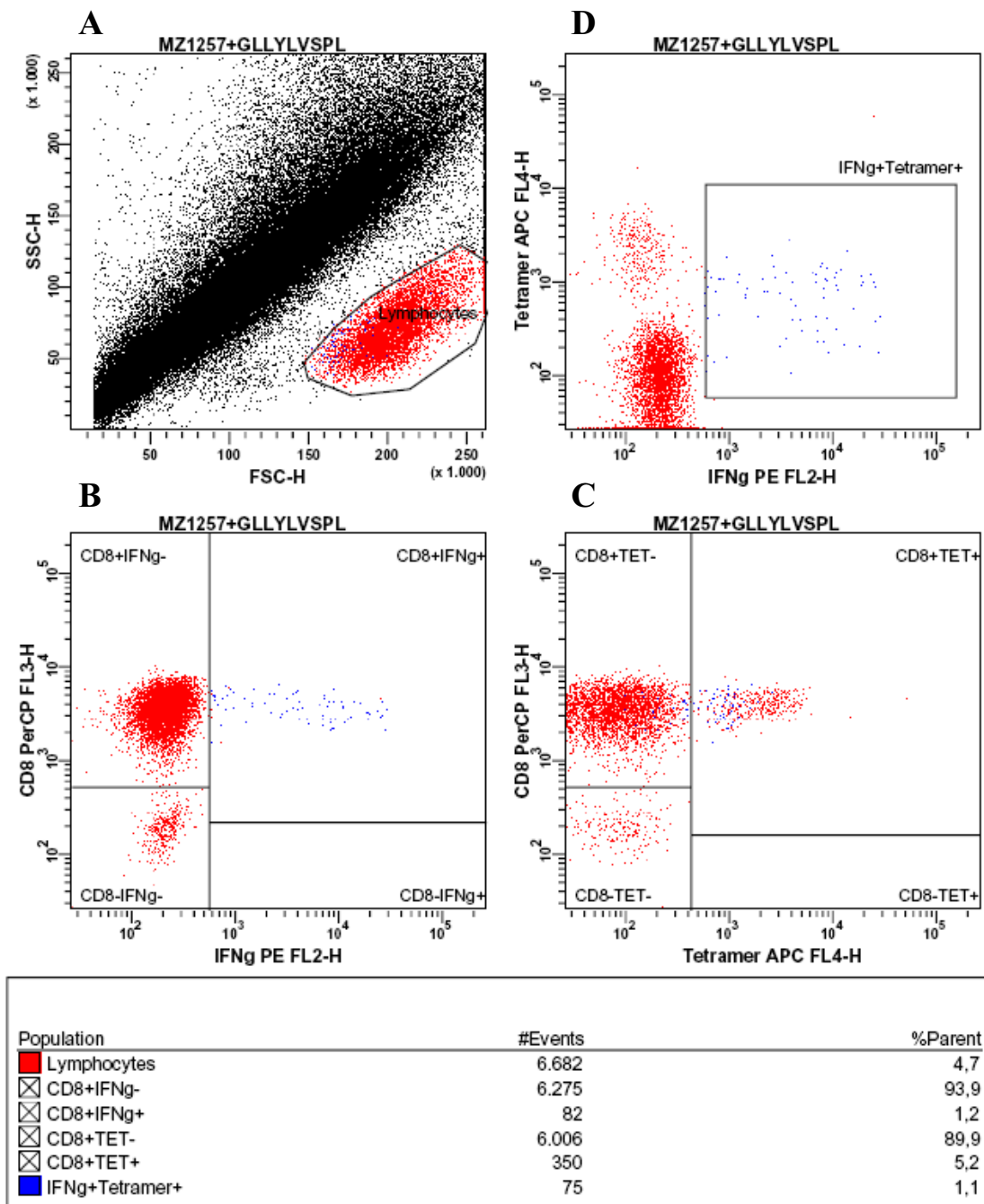


Abbildung 3.7: Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre IFN γ -Färbung der HLA-A*0201-restringierten GLLYLVSPL-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen nach Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: mit GLLYLVSPL beladene SPAG4-exprimierende Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257. **A** In diesem SSC-H versus FSC-H Dot Plot wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität abgegrenzt und ausgewählt. In den folgenden Plots sind nur noch die Zellen dieser ausgewählten Zellpopulation dargestellt. **B** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (1,2 % der Lymphozyten/ 1,3 % der CD8⁺). **C** In diesem Dot Plot sind die GLLYLVSPL-Tetramer⁺ und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (5,2 % der Lymphozyten/ 5,5 % der CD8⁺). **D** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden gegen die Tetramer⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen aufgetragen. Die ausgewählten IFN γ ⁺ und Tetramer⁺ T-Zellen (1,1 % der Lymphozyten/ 1,2 % der CD8⁺) sind in den übrigen Dot Plots blau dargestellt.

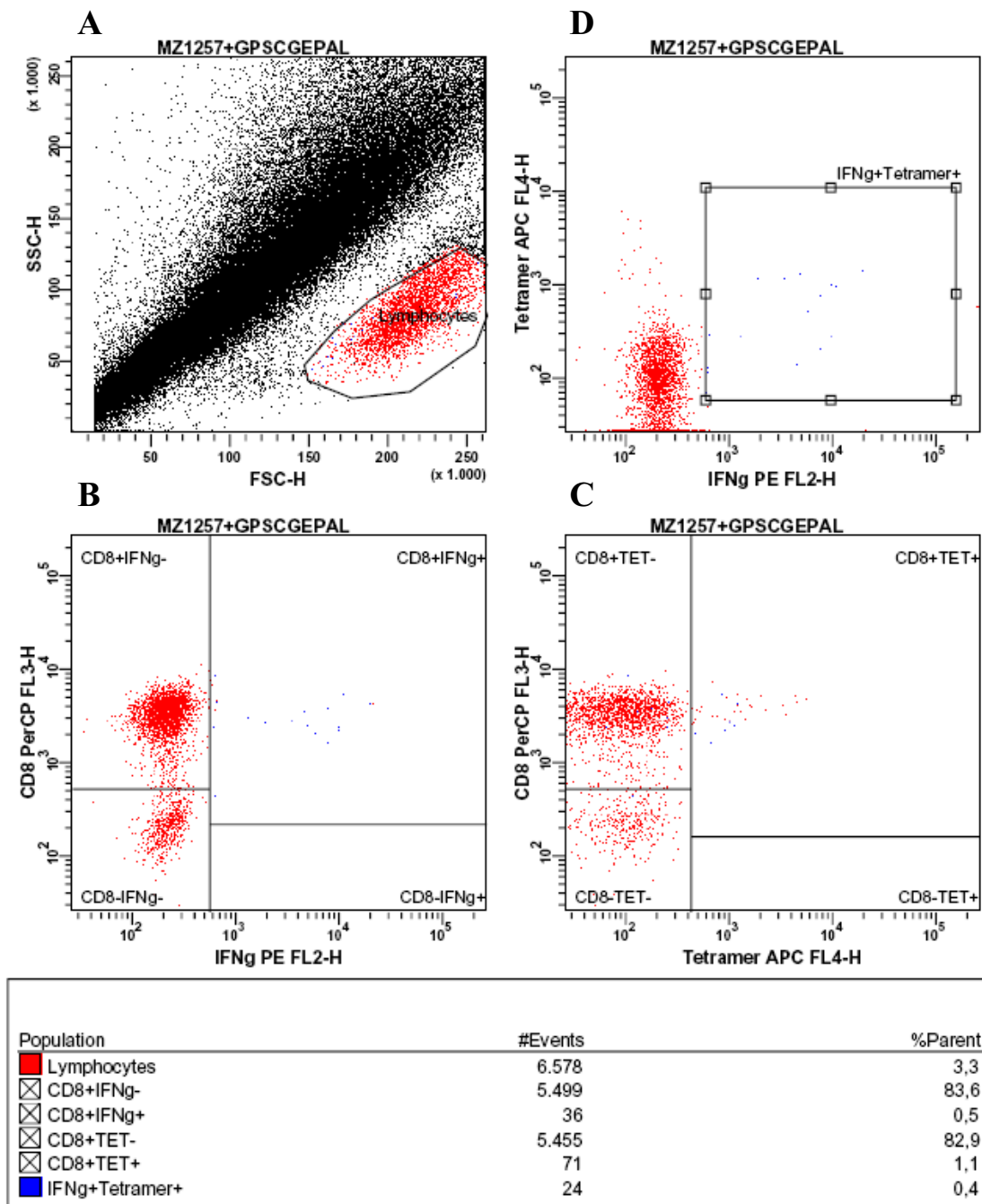


Abbildung 3.8: Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre IFN γ -Färbung der HLA-B*0702-restringierten GPSCGEPAL-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen nach Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: mit GPSCGEPAL beladene SPAG4-exprimierende Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257. **A** In diesem SSC-H versus FSC-H Dot Plot wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität abgegrenzt und ausgewählt. In den folgenden Plots sind nur noch die Zellen dieser ausgewählten Zellpopulation dargestellt. **B** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (0,5 % der Lymphozyten/ 0,7 % der CD8⁺). **C** In diesem Dot Plot sind die GPSCGEPAL-Tetramer⁺ und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (1,1 % der Lymphozyten/ 1,3 % der CD8⁺). **D** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden gegen die Tetramer⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen aufgetragen. Die ausgewählten IFN γ ⁺ und Tetramer⁺ T-Zellen (0,4 % der Lymphozyten/ 0,4 % der CD8⁺) sind in den übrigen Dot Plots blau dargestellt.

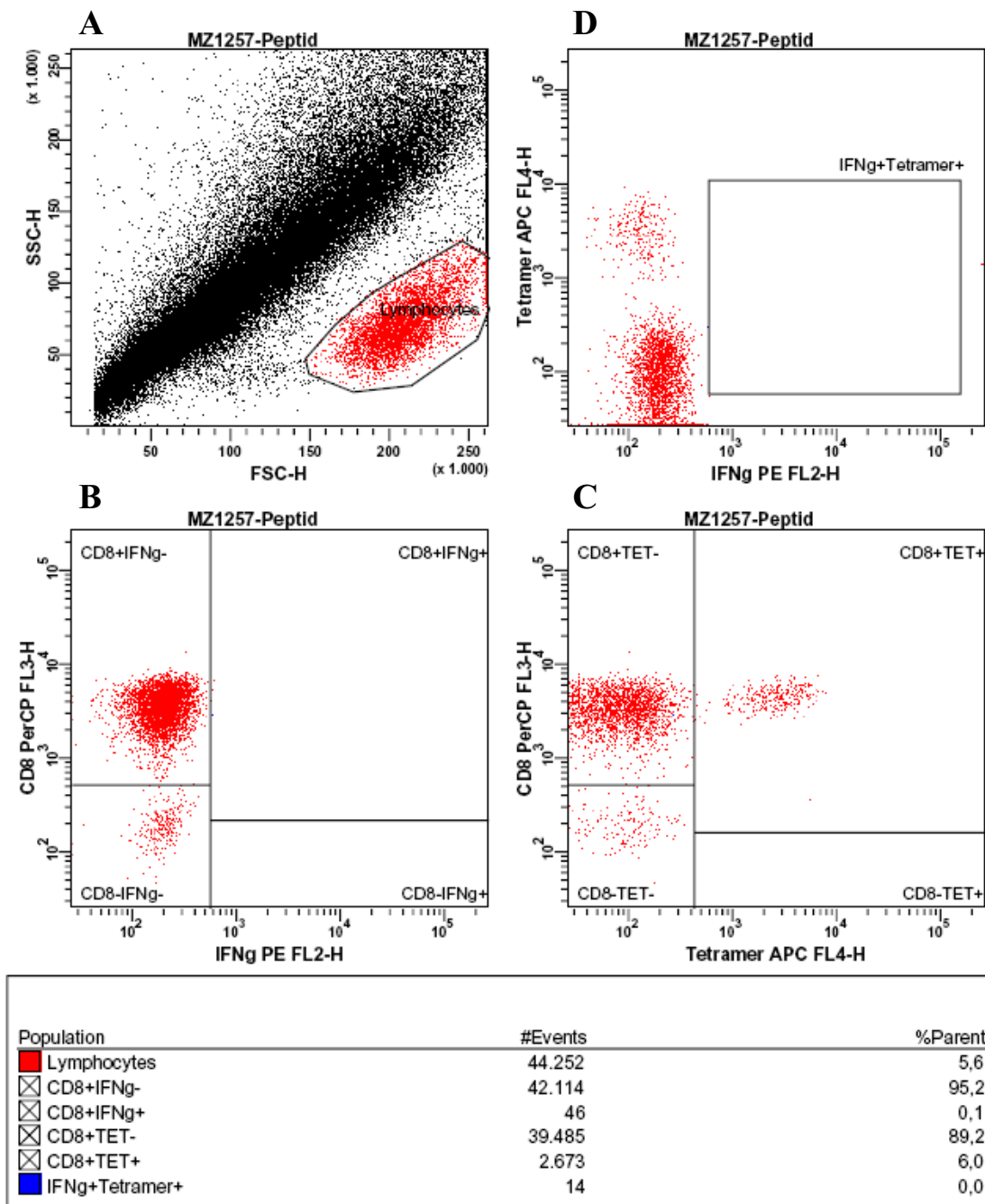


Abbildung 3.9: Kombinierte Tetramer- und intrazelluläre IFN γ -Färbung der HLA-A*0201-restringierten GLLYLVSP-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen nach Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: unbeladene SPAG4-exprimierende Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257. **A** In diesem SSC-H versus FSC-H Dot Plot wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität abgegrenzt und ausgewählt. In den folgenden Plots sind nur noch die Zellen dieser ausgewählten Zellpopulation dargestellt. **B** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (0,1 % der Lymphozyten/ 0,1 % der CD8⁺). **C** In diesem Dot Plot sind die GLLYLVSP-Tetramer⁺ und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen dargestellt (6,0 % der Lymphozyten/ 6,3 % der CD8⁺). **D** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden gegen die Tetramer⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen aufgetragen. Die ausgewählten IFN γ ⁺ und Tetramer⁺ T-Zellen (0,0 % der Lymphozyten/ 0,0 % der CD8⁺) sind in den übrigen Dot Plots blau dargestellt.

Die als spezifisch für LLFQGLSVL oder GLLYLV SPL oder GPSCGEPAL identifizierten T-Zellen waren in der Lage, Peptid-beladene Zielzellen zu erkennen und IFN γ zu produzieren, siehe Abbildung 3.2 bis 3.4 (als Zielzellen fungierten jeweils mit dem spezifischen Peptid-beladene autologe PBMCs) und 3.6 bis 3.8 (als Zielzellen fungierten jeweils mit dem spezifischen Peptid-beladene Zellen, der Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257). Die in der Negativkontrolle eingesetzten unbeladenen autologen PBMCs aktivierten die Tetramer⁺ T-Zellen nicht, so dass in diesem Ansatz keine IFN γ produzierenden Zellen detektiert werden konnten. In Abbildung 3.5 ist dies exemplarisch für die GLLYLV SPL-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen gezeigt. Keine der generierten LLFQGLSVL oder GLLYLV SPL oder GPSCGEPAL spezifischen T-Zellen produzierten nach Inkubation mit unbeladenen autologen PBMCs IFN γ . Ebenfalls keine der als spezifisch für LLFQGLSVL oder GLLYLV SPL oder GPSCGEPAL identifizierten T-Zelllinien war in der Lage, unbeladene Zielzellen der Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257 zu erkennen und IFN γ zu produzieren, siehe exemplarische Abbildung 3.9. In dem Versuchsansatz mit den unbeladenen Zellen der Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257, die SPAG4 exprimieren, wurden zwar Tetramer⁺ T-Zellen detektiert, aber diese produzierten kein IFN γ . Die Herunterregulation des T-Zellrezeptors aufgrund der T-Zellaktivierung ist deutlich, aber beeinträchtigt die Analyse nur unwesentlich. Die blau markierten Zellen - Zellen die aktiviert wurden und Tetramer-spezifisch sind - weisen im Vergleich zu den Zellen, die nicht aktiviert und Tetramer⁺ sind, eine geringere Affinität gegenüber dem spezifischen Tetramer auf. Eine mögliche Ursache dafür, dass die generierten spezifischen T-Zelllinien die Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257, die auf natürlichem Weg SPAG4 exprimiert, nicht erkennen und lysieren können, könnte eine zu geringe SPAG4-Expression der verwendeten Nierenzellkarzinomzelllinie MZ1257 sein. Oder die SPAG4-Expression könnte sich im Verlauf der Kultivierung der Nierenzellkarzinomzelllinien verringert haben. Aber möglicherweise ist die kombinierte Tetramer- und intrazelluläre IFN γ -Färbung nicht sensitiv genug.

Als Goldstandard des Zytotoxizitätsnachweises gilt schon lange der ^{51}Cr -Freisetzungstest. In dem ^{51}Cr -Freisetzungstest werden die zytotoxischen T-Zellen auf ihre Fähigkeit hin Antigen zu erkennen und eine Zielzellyse zu vollführen getestet. Es wurden in diesem Test weitere Nierenzellkarzinomzelllinien, die SPAG4 exprimieren verwendet.

3.1.5.2 Zytotoxizitätsnachweis

Für den ^{51}Cr -Freisetzungstest werden Zielzellen mit Peptiden beladen oder unbeladen verwendet. Diese Zielzellen nehmen während der Inkubation radioaktive ^{51}Cr -Chromationen auf. Werden diese Zielzellen bei anschließender Kokultur durch T-Zelllinien lysiert, kann die Radioaktivität im Überstand der Zellkultur nachgewiesen werden, Protokoll ^{51}Cr -Freisetzungstest siehe 2.2.3.7.

Die generierten LLFQGLSVL oder GLLYLVSP oder GPSCGEPAL spezifischen T-Zelllinien wurden auf verschiedene Peptid-beladene und unbeladene Zielzellen, siehe 2.2.2.9, getestet.

Um die Zytotoxizität der HLA-A*0201-restringierten LLFQGLSVL-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen der HLA-A*0201-restringierten Nierenzellkarzinomzelllinien MZ1257 und RCC68 als Zielzellen verwendet, siehe Abbildung 3.10.

⁵¹Cr-Freisetzungstest mit LLFQGLSVL spezifischer Zelllinie

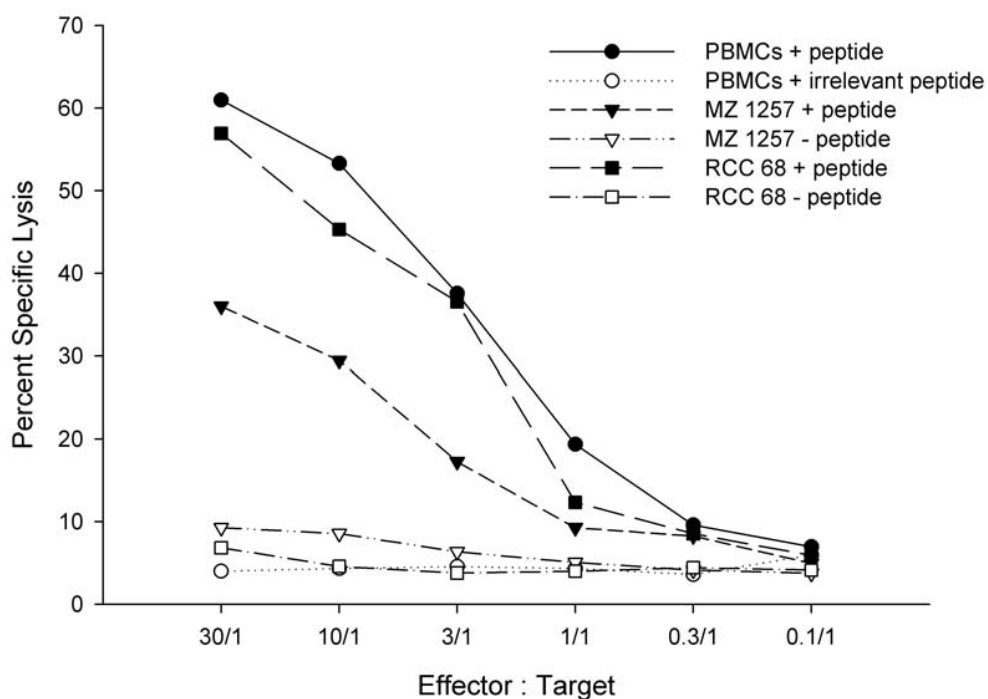


Abbildung 3.10: ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit HLA-A*0201-restringierten LLFQGLSVL-spezifischen zytotoxischen T-Zellen nach 5 h Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: sowohl Peptid-beladene und unbeladene SPAG4-exprimierende Nierenzellkarzinomzelllinien MZ1257 und RCC68 als auch Peptid-beladene und unbeladene autologe PBMCs. Dargestellt ist der Prozentsatz der spezifischen Lyse bei unterschiedlichen Verhältnissen von Effektorzellen zu Zielzellen. Die LLFQGLSVL-spezifischen T-Zellen lysieren Peptid-beladene Zielzellen effektiv, aber nicht unbeladene Zielzellen der Nierenzellkarzinomzelllinien MZ1257 und RCC68.

Um die Zytotoxizität der HLA-A*0201-restringierten GLLYLVSPL-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen der HLA-A*0201-restringierten Nierenzellkarzinomzelllinien MZ1257 und RCC68 als Zielzellen verwendet, siehe Abbildung 3.11.

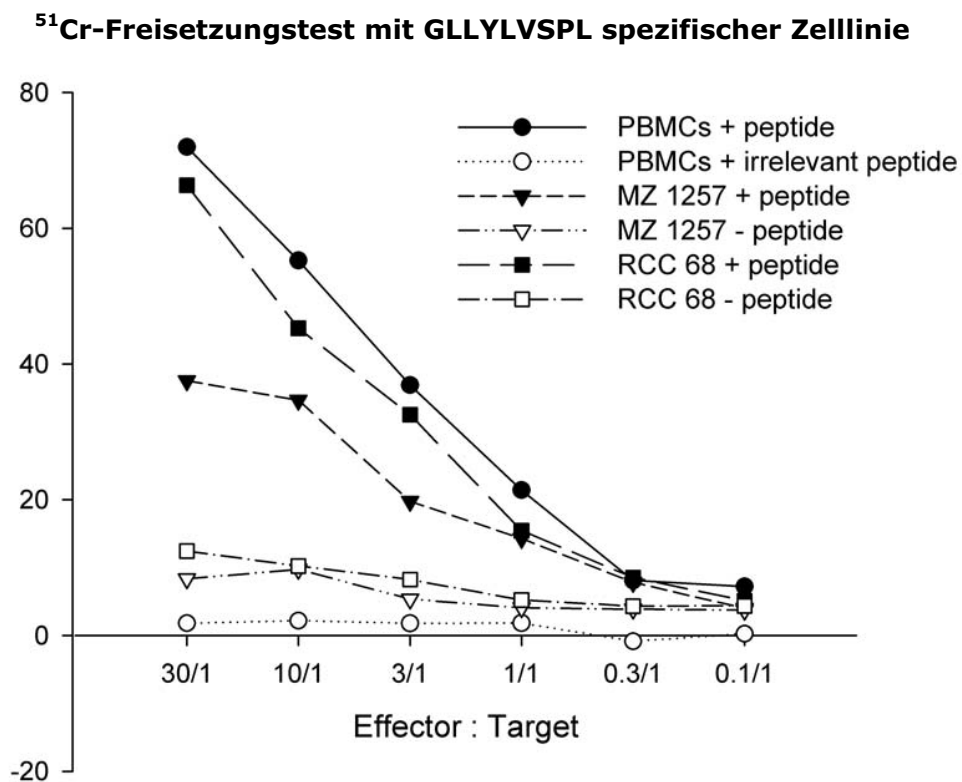


Abbildung 3.11: ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit HLA-A*0201-restringierten GLLYLVSPL-spezifischen zytotoxischen T-Zellen nach 5 h Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: sowohl Peptid-beladene und unbeladene SPAG4-exprimierende Nierenzellkarzinomzelllinien MZ1257 und RCC68 als auch Peptid-beladene und unbeladene autologe PBMCs. Dargestellt ist der Prozentsatz der spezifischen Lyse bei unterschiedlichen Verhältnissen von Effektorzellen zu Zielzellen. Die LLFQGLSVL-spezifischen T-Zellen lysieren Peptid-beladene Zielzellen effektiv, aber nicht unbeladene Zielzellen der Nierenzellkarzinomzelllinien MZ1257 und RCC68.

Um die Zytotoxizität der HLA-A*0702-restringierten GPSCGEPAL-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen der HLA-A*0702-restringierten Nierenzellkarzinomzelllinien MZ1257 und RCC5 als Zielzellen verwendet, siehe Abbildung 3.12.

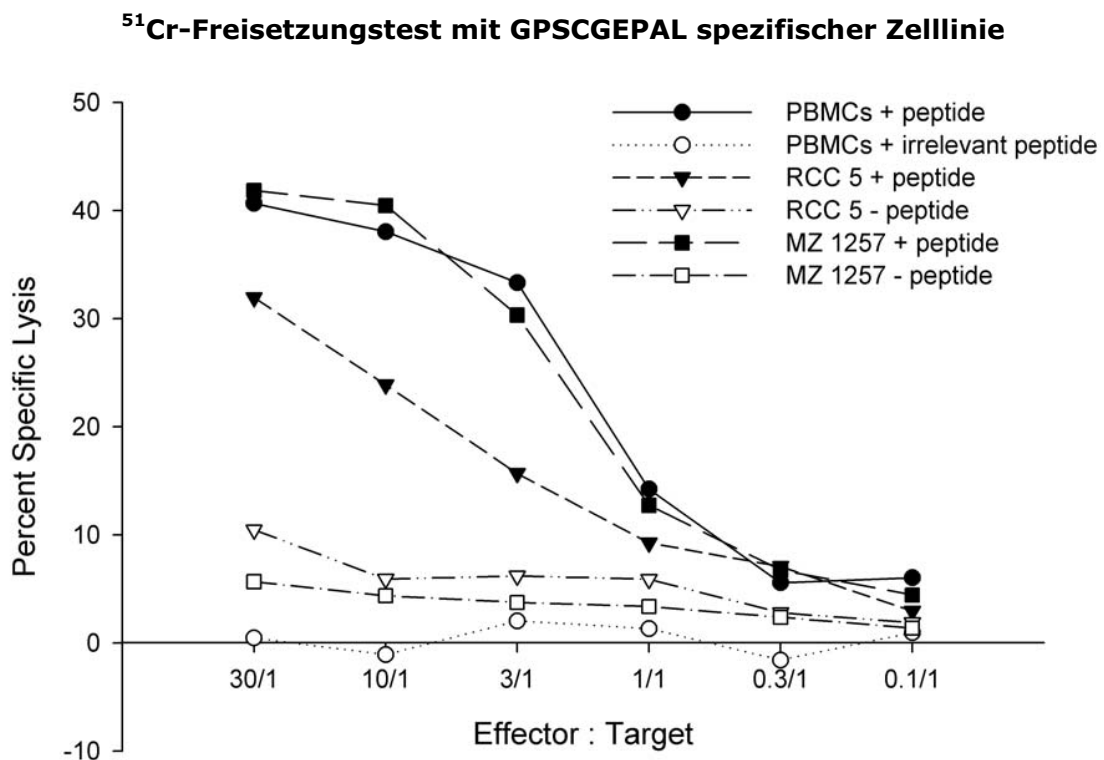


Abbildung 3.12: ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit HLA-A*0702-restringierten GPSCGEPAL-spezifischen zytotoxischen T-Zellen nach 5 h Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: sowohl Peptid-beladene und unbeladene SPAG4-exprimierende Nierenzellkarzinomzelllinien MZ1257 und RCC5 als auch Peptid-beladene und unbeladene autologe PBMCs. Dargestellt ist der Prozentsatz der spezifischen Lyse bei unterschiedlichen Verhältnissen von Effektorzellen zu Zielzellen. Die LLFQGLSVL-spezifischen T-Zellen lysieren Peptid-beladene Zielzellen effektiv, aber nicht unbeladene Zielzellen der Nierenzellkarzinomzelllinien MZ1257 und RCC5.

Die als spezifisch für LLFQGLSVL oder GLLYLVSPL oder GPSCGEPAL identifizierte T-Zelllinien waren in der Lage, Peptid-beladene Zielzellen effektiv zu lysieren, siehe Abbildung 3.10 bis 3.12. Aber sie waren nicht in der Lage, die unbeladenen Nierenzellkarzinomzelllinien zu lysieren. So konnte auch durch den ^{51}Cr -Freisetzungstest keine spezifisch gerichtete Funktionalität der generierten T-Zelllinien gegen auf natürlicher Weise SPAG4-exprimierende Nierenzellkarzinomzelllinien detektiert werden. Es besteht aber auch neben den Möglichkeiten der zu geringen SPAG4-Expression der verwendeten Nierenzellkarzinomzelllinie oder der zu schwachen Sensitivität der verwendeten Nachweismethoden auch die Möglichkeit, dass mit den vorhergesagten Peptiden LLFQGLSVL, GLLYLVSPL und GPSCGEPAL eine T-Zellaktivierung möglich ist, diese Peptide aber nicht von Tumorzellen prozessiert und präsentiert werden. Somit wären diese Peptide keine natürlichen MHC-Liganden. Bisher wurde keines der drei Peptide auf Nierenzellkarzinomen gefunden. Aus diesen Gründen scheiden diese aus dem SPAG4-Protein vorhergesagten Peptide LLFQGLSVL, GLLYLVSPL und GPSCGEPAL, trotz den vielversprechenden Genexpressionsdaten von SPAG4 und dem Umstand spezifische zytotoxische T-Zellen erzeugen zu können, für die Anwendung in einer peptidbasierten Vakzine aus. Die Identifizierung von T-Zell-Epitopen durch Epitopvorhersagen aus Proteinen, die durch Genexpressionsanalysen als tumorassoziierte Antigene charakterisiert wurden, birgt immer die Gefahr, dass diese T-Zell-Epitope keine natürlichen Liganden darstellen. Dieser Nachweis ist jedoch erst sehr spät in dem Identifizierungsprozess durch *in vitro* generierte spezifische T-Zelllinien vermittelte Lyse von Zielzellen, die dieses Protein exprimieren, zu erbringen. Daher ist es ein bedeutender Vorteil, wenn ein Peptid, wie im VEGF-Projekt, zuerst als natürlicher Ligand zum Beispiel durch massenspektrometrische Verfahren identifiziert werden konnte, siehe 3.2.

3.2 VEGF

Das von Andreas Weinzierl auf zwei Nierenzellkarzinomen durch massenspektrometrische Analysen gefundene HLA-B*2705-restringierte SRFGGAVVR, welches in das Leseraster der aktuellen Proteinsequenz von VEGF passt und durch das alternative CUG⁴⁹⁹ Startcodon transkribiert werden kann, siehe Abbildung 1.7, ist ein idealer Kandidat für eine Peptid- oder T-Zellbasierte Immuntherapie. Das Antigen VEGF wird im Tumor auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich zu Normalgewebe überexprimiert. Daher sollte in diesem Projekt dieses neu identifizierte Peptid SRFGGAVVR als T-Zell-Epitop durch T-Zellstimulationen mit aAPCs und anschließenden funktionellen Analysen verifiziert werden.

3.2.1 Herstellung von Peptid/MHC-Komplexen

Die Rückfaltungen mit dem VEGF-Peptid SRFGGAVVR waren erfolgreich, siehe folgende Tabelle 3.5.

Tabelle 3.5: Hergestellte Monomere. Eine Rückfaltung war erfolgreich, wenn mindestens 500 mg Monomer hergestellt werden konnte.

SEQUENZ	Molmasse	Position	SYFP-Score	Allel	Rückfaltung
SRFGGAVVR	947,53	siehe Abb. 1.7	30	B*2705	+

3.2.2 Die CD8⁺ T-Zell-Gewinnung

Die Quelle für die PBMCs, aus denen im weiteren Verlauf CD8⁺ T-Zellen angereichert wurden, waren - analog zu dem SPAG4-Projekt - entweder *Buffy Coats* von gesunden Spendern oder Leukaphereseprodukte (peripheres, leukozytenangereichertes Blut) von gesunden Spendern aus der Transfusionsmedizin in Tübingen. Die PBMCs wurden aus diesen Blutprodukten durch Dichtezentrifugation mit Lymphozytenseparationslösung isoliert. Die Ausbeute und die HLA-

Typisierung der gewonnenen PBMCs aus den jeweiligen Blutprodukten ist der Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Tabelle 3.6: Zusammenstellung der verwendeten Blutprodukte

Blutspender	Blutprodukt	PBMCs	CMV	HLA			
				A2	A11	B7	B27
1	Leukapherese	1,6x10 ⁹	-	A2	A11	B7	B27
2	Buffy Coat	7,0x10 ⁸	-	A2	A31	B27	B61
3	Leukapherese	1,0x10 ⁹	-	A24	A32	B27	B44
4	Buffy Coat	7,0x10 ⁸	+	A2	A24	B7	B27
5	Leukapherese	1,8x10 ⁹	-	A2	-	B18	B27
6	Leukapherese	2,5x10 ⁹	+	A2	A28	B7	B27
7	Leukapherese	1,2x10 ⁹	+	A1	A2	B8	B27
8	Leukapherese	2,1x10 ⁹	-	A3	A28	B18	B27
9	Leukapherese	1,4x10 ⁹	+	A1	A31	B8	B27

CD8⁺ T-Zellen wurden aus den PBMCs durch positive Selektion via MACS-Aufreinigung gewonnen. Durch diese MACS-Aufreinigung konnten die CD8⁺ T-Zellen mit 90-99 % Reinheit gewonnen werden und unerwünschte Zellpopulationen wie zum Beispiel CD4⁺ T-Zellen beseitigt werden.

3.2.3 *In vitro* Generierung von SRFGGAVVR-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Die aus den diversen Blutprodukten gewonnenen CD8⁺ T-Zellen (siehe Tabelle 3.7) wurden mit artifiziellen APCs (siehe 1.8.5.2) stimuliert. Jede Stimulation wurde in einem Napf einer 96napf-Platte mit 1x10⁶ CD8⁺ T-Zellen angesetzt. Entsprechend der Anzahl CD8⁺ T-Zellen, die von einem Blutprodukt eines Blutspenders aufgereinigt werden konnten, wurde die Anzahl der Stimulationen bestimmt. Die aAPCs wurden in zwei unterschiedlichen Monomerkonzentrationen eingesetzt. Die so genannten *high density* Beads (HD) waren mit 20 nM Monomer, die *low density*

Beads (LD) mit 200 pM Monomer beladen. Die Antikörperkonzentration betrug bei beiden Varianten der aAPCs 20 nM.

Aus Tabelle 3.7 ist ersichtlich, wie viele HD-Stimulationen und wie viele LD-Stimulationen durchgeführt worden sind. Da die Funktionalität von T-Zellen mit ihrer Avidität zunimmt, wurden hauptsächlich LD-Stimulationen durchgeführt (Alexander-Miller et al., 1996a; Alexander-Miller, 2005).

Tabelle 3.7: Zusammenstellung der durchgeführten Stimulationen mit aAPCs beladen mit SRFGGAVVR-MHC-Komplexen.

Durchgeführte aAPC-Stimulationen mit SRFGGAVVR-MHC-Komplex				
HD (Napfzahl)	LD (Napfzahl)	Blut-Spender	Tetramer⁺ Zellen	Tetramer⁺ (Napfzahl)
20	100	1	+	8
10	50	2	-	-
20	100	3	+	5
10	50	4	-	-
30	150	5	-	-
20	100	6	+	7
20	100	7	+	4
30	150	8	-	-
10	50	9	+	2

SRFGGAVVR-Tetramer⁺ zytotoxische T-Zellen konnten durch *in vitro* Stimulation mit aAPCs von fünf Blutspendern generiert werden. Insgesamt konnten in 26 Stimulationen (ein Napf = eine Stimulation) von 540 Stimulationen SRFGGAVVR-Tetramer⁺ T-Zelllinien erzeugt werden. In diesen Stimulationen konnten von 0,45 % bis zu 83,41 % SRFGGAVVR-Tetramer⁺ T-Zellen (Prozent der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen) detektiert werden.

Als Positiv-Kontrollen wurden parallel zu den zu testenden Peptid/MHC-Komplexen bei jedem Stimulationsansatz, je nach HLA-Typisierung des Blutspenders, zwei HLA-A*0201-restringierte Peptide aus CMV (NLVPMVATV) oder Melan-A (ELAGIGILTV) und ein HLA-B*0702-restringiertes Peptid aus CMV (TPRVTGGGAM) verwendet. Eine Auflistung der Peptide, die als Kontrollen dienten, ist in Tabelle 2.4 zu sehen. Von diesen Epitopen ist bekannt, dass durch Stimulation spezifische Zellen generiert (im Fall von Melan-A) oder expandiert (im Fall von CMV) werden können.

Um eine unspezifische Bindung jedes Tetramers ausschließen zu können, wurde immer mit einem Tetramercocktail gefärbt, der das Tetramer des zu überprüfenden Peptid/MHC-Komplexes als PE-Konjugat und ein Tetramer des irrelevanten Peptid/MHC-Komplexes als APC-Konjugat enthielt. Jede Zelle wurde demnach mit einem spezifischen und einem unspezifischen Tetramer gefärbt, so dass falsch positive Ergebnisse anhand der, in diesem Fall ebenfalls positiven, unspezifischen Färbung als solche erkannt werden konnten, Protokoll der Tetramertifärbung siehe 2.2.3.2.1. Exemplarisch ist in Abbildung 3.13 eine Tetramertifärbung gezeigt.

Die auf diese Weise ermittelten SRFGGAVVR-Tetramer⁺ T-Zellen wurden aufgereinigt. Dafür wurden diese Zellen präparativ mit Tetramer angefärbt, siehe 2.2.3.2.2, und anschließend durch das FACS Aria Cell-Sorting System aufgereinigt, siehe 2.2.3.3. Die sortierten Zellen wurden mit bestrahlten PBMCs und LG2-EBV-Zellen als Feederzellen sowie PHA und IL-2 in Kultur genommen. Es konnten auf diese Art mehrere SRFGGAVVR-Tetramer⁺ T-Zelllinien etabliert werden.

Dank großer PBMC-Ausbeuten mancher Leukapheresen waren genug Zellen vorhanden, um neben den Stimulationsansätzen mit den aAPCs auch DCs zu gewinnen und Stimulationsansätze mit Peptid-beladenen DCs durchzuführen, siehe Tabelle 3.8. In zwei Ansätzen (Blutspender sieben und acht) konnten SRFGGAVVR-spezifische T-Zellen generiert werden.

Diese wurden via MACS sortiert und ebenfalls für die funktionalen Nachweise, Zytokinsekretion nach Antigenkontakt und spezifische Lyse, verwendet.

Tabelle 3.8: Zusammenstellung der durchgeführten Stimulationen mit SRFGGAVVR-Peptid-beladenen aus Monozyten gereiften DCs.

Durchgeführte DC-Stimulationen mit SRFGGAVVR-Peptid		
Blutspender	Tetramer ⁺ Zellen	Tetramer ⁺ Zellzahlen
5	-	-
7	+	5,2x10 ⁶
8	-	-
9	+	7,0x10 ⁶

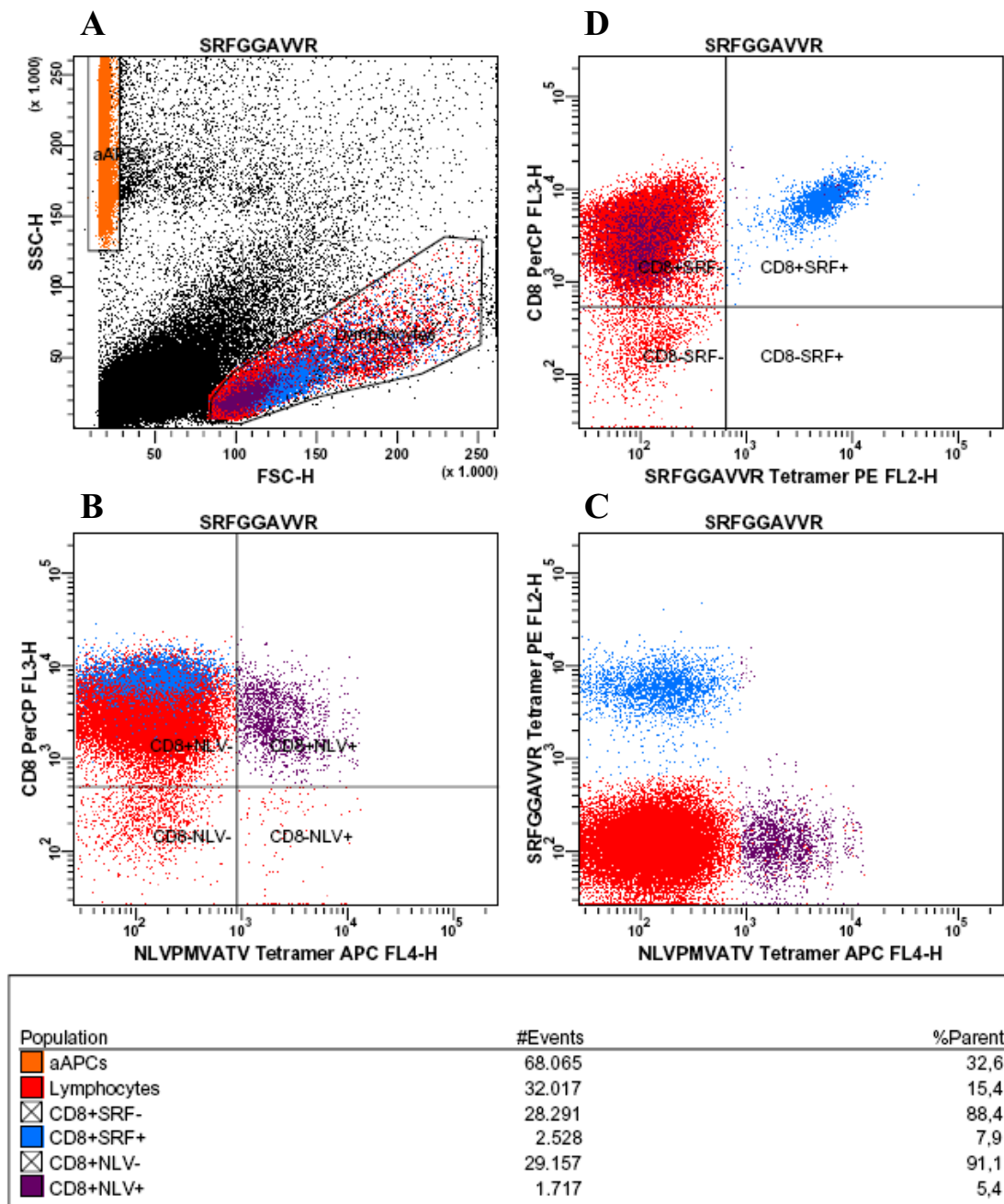


Abbildung 3.13: Tetramerfärbung der HLA-B*2705-restringierten SRFGGAVVR-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen nach *in vitro* Stimulation. **A** In diesem SSC-H versus FSC-H Dot Plot wurden die Lymphozyten und die aAPCs anhand ihrer Größe und Granularität von dem Debris abgegrenzt und ausgewählt. In den folgenden Plots sind nur noch die Zellen der ausgewählten CD8⁺ Zellpopulation dargestellt. **B** Durch diesen Dot Plot können die NLVPMVATV-Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen diskriminiert werden (5,4 % der Lymphozyten/ 5,6 % der CD8⁺). Diese Zellen sind in den übrigen Dot Plots violett dargestellt. **C** In diesem Dot Plot sind die SRFGGAVVR-Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen dargestellt (7,9 % der Lymphozyten/ 8,2 % der CD8⁺). Diese Zellen sind in den übrigen Dot Plots blau dargestellt. **D** In diesem Dot Plot können unspezifische Tetrameraggregate erkannt werden.

3.2.4 Funktionale Analysen der SRFGGAVVR-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

Die expandierten zytotoxischen T-Zellen/Zelllinien wurden auf ihre funktionalen - mittels intrazellulärer Zytokinfärbung - und lytischen - mittels ⁵¹Cr-Freisetzungstest - Eigenschaften getestet. Dafür wurden folgende Zielzellen verwendet: autologe PBMCs, die VEGF exprimierende Nierenkarzinomzelllinie RCC110 und die mit humanem HLA-B*2705 und β_2 -Mikroglobulin transfizierten Maus-Myelomzelllinie X63-B*2705, siehe Abbildung 3.1. Die X63-B*2705 wurden eingesetzt um eine konstitutive endogene VEGF-Expression auszuschließen. Diese Zellen wurden entweder mit VEGF UTR165, welches die „untranslatierte“ Region (UTR) von VEGF enthält und so auch das SRFGGAVVR-Peptid präsentiert, transfiziert oder mit VEGF 165, welches die UTR von VEGF nicht enthält und so auch kein SRFGGAVVR-Peptid präsentiert. Die Kulturbedingungen sind unter 2.2.2.9 aufgelistet. Die für den ⁵¹Cr-Freisetzungstest benötigten Zielzellen wurden von Florian Altenberend transfiziert und bereitgestellt. Die VEGF-Proteinexpression ist der folgenden Abbildung 3.14 zu entnehmen. Die VEGF-Proteinexpression der VEGF165-Zellen war gegenüber den VEGF-UTR165-Zellen 10fach erhöht.

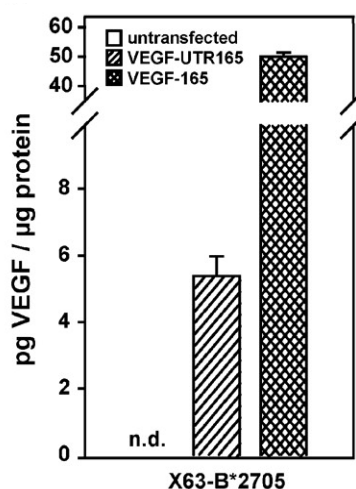


Abbildung 3.14: Die Transfektionseffizienz der verschiedenen VEGF-Konstrukten in X63-B*2705 Zellen wurde durch einen beadbasierten Sandwich-Immunoassay quantifiziert. In untransfizierten X63-B*2705 Zellen war kein VEGF-Protein detektierbar.

Die generierten SRFGGAVVR-Tetramer⁺CD8⁺ T-Zellen produzieren nach 6 h Kokultur mit Peptid-beladenen PBMCs IFN γ , siehe exemplarisch die Abbildung 3.15. Diese zeigt, dass die generierten Zellen sowohl spezifisch als auch funktional sind.

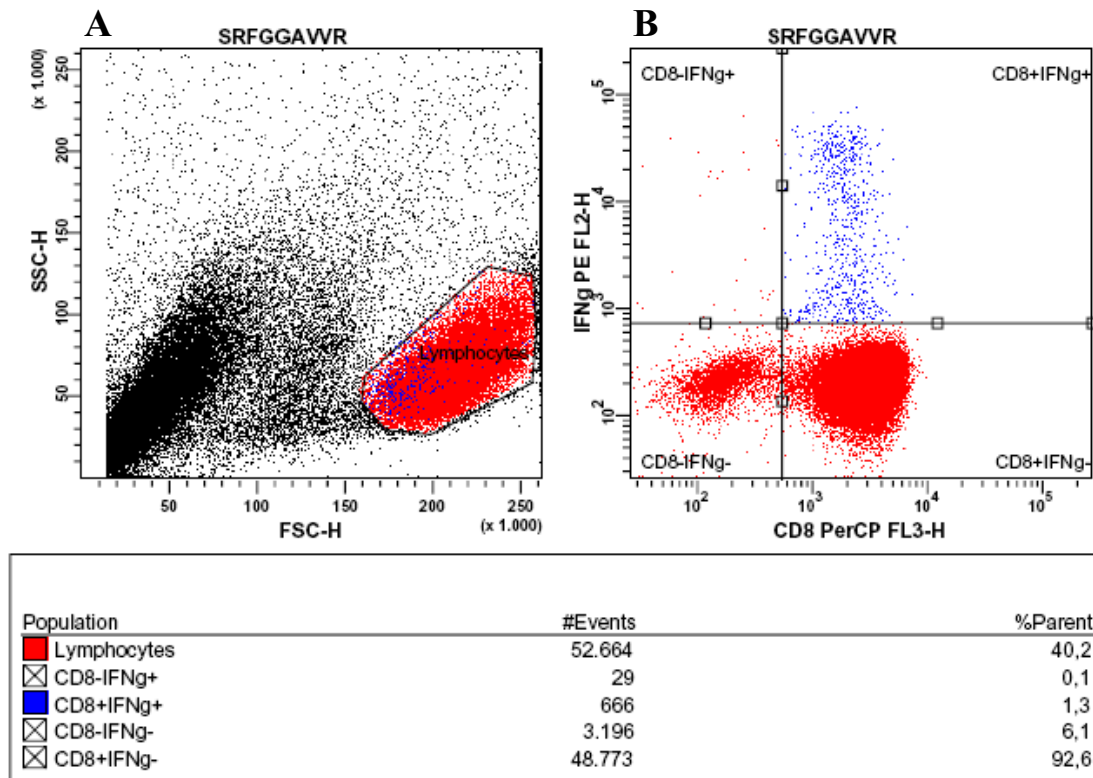


Abbildung 3.15: Intrazelluläre IFN γ -Färbung der HLA-B*2705-restringierten SRFGGAVVR-Tetramer⁺ zytotoxischen T-Zellen nach Zugabe des SRFGGAVVR-Peptids für 6 h. **A** In diesem SSC-H versus FSC-H Dot Plot wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität von dem Debris abgegrenzt und ausgewählt. In den folgenden Plots sind nur noch die Zellen der ausgewählten CD8⁺ Zellpopulation dargestellt. **B** In diesem Dot Plot sind die IFN γ produzierenden CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen blau dargestellt (1,3 % der Lymphozyten/ 1,4 % der CD8⁺).

Darüber hinaus wurde in einem ⁵¹Cr-Freisetzungstest die lytische Fähigkeit von einer SRFGGAVVR spezifischen Zelllinie ermittelt. Dafür wurden HLA-B*2705-restringierte SRFGGAVVR-spezifische zytotoxische T-Zellen für 5 h mit ⁵¹Cr-beladenen Zielzellen kokultiviert. Es wurden folgende Zielzellen eingesetzt: autologe, mit irrelevantem Peptid-beladene, PBMCs, die VEGF exprimierende Nierenkarzinomzelllinie RCC110 und die mit humanem HLA-B*2705 und β 2-Mikroglobulin transfizierte Maus-Myelomzelllinie X63-B*2705. Die X63-B*2705 wurden in zwei Varianten eingesetzt; mit VEGF UTR165 und mit VEGF 165 transfiziert. Die SRFGGAVVR-spezifischen T-

Zellen lysieren die Zellen der Zelllinie RCC110 und X63-B*2705+VEGF UTR165 effektiv, aber nicht die mit irrelevantem Peptid-beladenen autologen PBMCs und die Zellen der Zielzelllinie X63-B*2705+VEGF165, obwohl letztere eine 10fach erhöhte VEGF-Proteinmenge als die VEGF-UTR165 Zellen aufwiesen, siehe Abbildung 3.14.

⁵¹Cr-Freisetzungstest mit SRFGGAVVR spezifischer Zelllinie

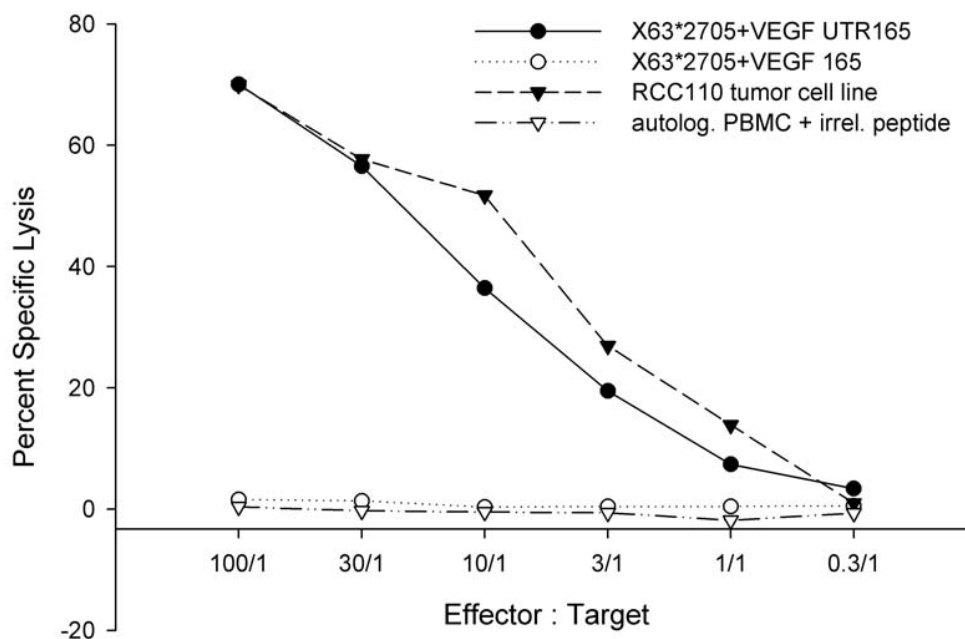


Abbildung 3.16: ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit HLA-B*2705-restringierten SRFGGAVVR-spezifischen zytotoxischen T-Zellen nach 5 h Antigenkontakt. Eingesetzte Zielzellen: autologe, mit irrelevantem Peptid-beladene, PBMCs, die VEGF exprimierende Nierenkarzinomzelllinie RCC110 und die mit humanem HLA-B*2705 und β 2-Mikroglobulin transfizierte Maus-Myelomzelllinie X63-B*2705. Die X63-B*2705 wurden in zwei Varianten eingesetzt. Mit VEGF UTR165 transfiziert, enthält die UTR von VEGF und so auch das SRFGGAVVR-Peptid, und mit VEGF 165 transfiziert, enthält die UTR von VEGF nicht und so auch kein SRFGGAVVR-Peptid. Dargestellt ist der Prozentsatz der spezifischen Lyse bei unterschiedlichen Verhältnissen von Effektorzellen zu Zielzellen. Die SRFGGAVVR-spezifischen T-Zellen lysieren die Zellen der Zelllinie RCC110 und X63-B*2705+VEGF UTR165 effektiv, aber nicht die mit irrelevante Peptid-beladenen autologen PBMCs und die Zellen der Zielzelllinie X63-B*2705+VEGF165.

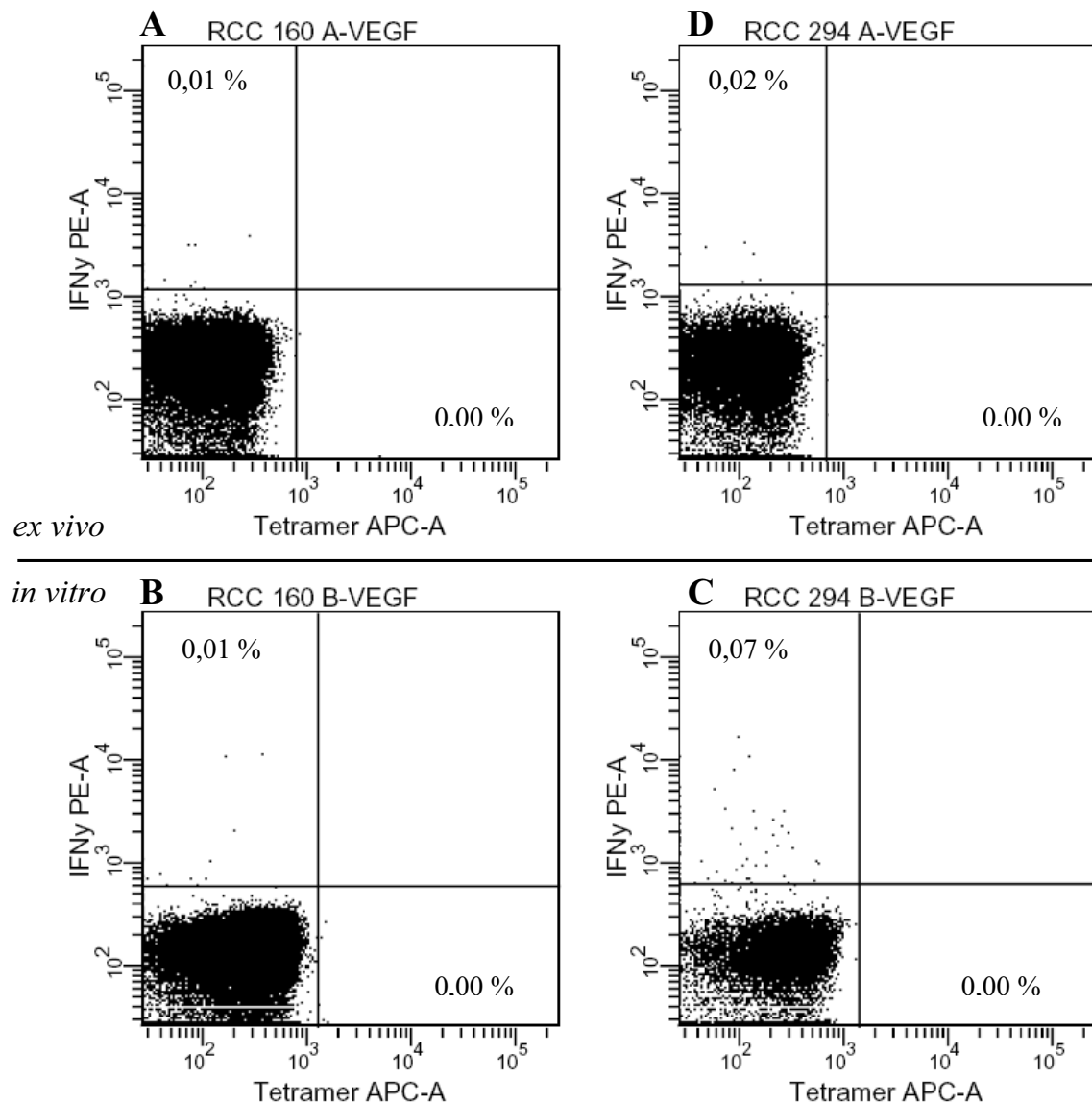


Abbildung 3.17: Kombinierte IFN γ - und Tetramerfärbung von PBMCs zweier RCC-Patienten (RCC160 und RCC294). Die Färbung wurde *ex vivo* (A+D) und nach einwöchiger *in vitro* Stimulation mit SRFGGAVVR-Peptid durchgeführt (B+C). In allen Dot Plots sind nur die CD8⁺ T-Zellen gezeigt. Es konnten keine Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen detektiert werden. In keinem RCC war die Zahl der IFN γ produzierenden Zellen höher als in der Negativkontrolle.

Um zu untersuchen ob das SRFGGAVVR-Peptid in RCC-Patienten *in vivo* spezifische T-Zellen induziert und somit spezifische T-Zellen vorhanden sind, wurden eingefrorene PBMCs von 12 verschiedenen HLA-B*2705⁺ RCC-Patienten analysiert. Exemplarisch sind in der Abbildung 3.17 die Ergebnisse von RCC160 und RCC294 gezeigt. Die untersuchten RCC-Patienten sind der Tabelle 3.9 aufgelistet. Zur Detektion von *in vivo*

SRFGGAVVR-spezifischen T-Zellen in diesen RCC-Patienten wurden deren PBMCs *ex vivo* und nach einwöchiger *in vitro*-Stimulation mit dem SRFGGAVVR-Peptid durch kombinierte IFN γ - und Tetramerfärbung analysiert. In keinen der PBMCs der RCC-Patienten, RCC110 eingeschlossen, konnten Tetramer⁺ oder IFN γ ⁺ Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle detektiert werden. Als Negativkontrolle wurde ein irrelevantes Peptid eingesetzt. Stimulation mit diesem Peptid generierte dieselbe Zahl an IFN γ produzierenden Zellen wie das SRFGGAVVR-Peptid. Als Positivkontrolle diente PMA/Ionomycin. Damit konnten bis zu 80 % IFN γ produzierende T-Zellen (von allen CD8⁺ T-Zellen) generiert werden.

Tabelle 3.9: Suche nach von *in vivo* SRFGGAVVR-spezifischen T-Zellen in diversen RCC Patienten. Die Analyse erfolgte *ex vivo* und nach einwöchiger *in vitro* Stimulation.

Patient	Geschlecht	HLA-Typisierung	<i>ex vivo</i> Analyse	<i>in vitro</i> Analyse
RCC110	w	A*02, B*18, B*27	-	-
RCC112	w	A*01, A*31, B*08, B*27	-	-
RCC116	m	A*01, A*02, B*27, B*37	-	-
RCC160	m	A*01, A*03, B*27, B*35	-	-
RCC184	w	A*01, A*11, B*08, B*27	-	-
RCC199	m	A*02, A*03, B*07, B*27	-	-
RCC206	w	A*11, A*32, B*27, B*44	-	-
RCC255	w	A*02, A*03, B*27, B*40	-	-
RCC284	w	A*01, A*02, B*27, B*35	-	-
RCC294	m	A*02, A*24, B*27, B*40	-	-
RCC339	m	A*25, A*29, B*18, B*27	-	-
RCC385	m	A*01, A*32, B*27, B*58	-	-

Dies weist darauf hin, dass das SRFGGAVVR-Peptid nicht spontan von den T-Zellen der RCC-Patienten erkannt wird. Dies ist zum einen auf die sehr geringen Frequenzen an naiven Vorläuferzellen und auf die nicht existierenden spezifischen Gedächtniszellen zurückzuführen.

Dieser von Andreas Weinzierl durch massenspektrometrische Analysen gefundene MHC-Ligand SRFGGAVVR, welcher aus der „untranslatierten“ Region des VEGF-Proteins stammt, ist in der Lage spezifische und funktionelle zytotoxische T-Zellen aus PBMCs von gesunden Blutspendern mit lytischen Fähigkeiten gegen VEGF-exprimierende Zellen zu erzeugen. Dadurch kann SRFGGAVVR als tumorassoziertes T-Zell-Epitop bezeichnet werden. Die Möglichkeit für eine immuntherapeutische Anwendung des SRFGGAVVR-Peptids im Rahmen einer aktiven Immunisierung ist gegeben. Im Falle von stark immunsupprimierten Patienten ist auch an die Möglichkeit der passiven Immunisierung zu denken. Dabei werden autologe *in vitro* expandierte SRFGGAVVR-spezifische zytotoxische T-Zellen reinfundiert. Dieses Konzept der adoptiven zellulären Immunisierung gegen Tumore oder andere Pathogene wurde zum ersten Mal von Mitchison im Jahr 1970 präsentiert (Mitchison, 1970). Diese peptidbasierenden immuntherapeutischen Ansätze könnten in Kombination mit den bisherigen Tumorthérapien die gegen VEGF agieren eingesetzt werden und deren Wirkung verstärken. Bisherige anti-VEGF Tumorthérapien sind zum Beispiel Kinaseinhibitoren, wie Sunitinib und Sorafenib, die den mitogenen und angiogenen Mediator VEGFR-2 blockieren (Abril et al., 1996a; Nathan et al., 2006a; Schrader et al., 2006b), oder der neu entwickelte monoklonale Antikörper Bevacizumab, welcher verhindert, dass VEGF an seine Rezeptoren binden kann (Presta et al., 1997a).

Die Anwendung des adoptiven T-Zell-Transfers eignet sich auch besonders in durch Krebs und/ oder unspezifische Krebstherapien (Chemotherapie) immunsupprimierte Patienten. Für diese Patienten sind gerade Infektionen

mit Pathogenen, die normalerweise gut durch unser Immunsystem reguliert werden, gefährlich und tödlich. Beispiele sind Infektionen mit Vertretern aus der Familie der Herpesviren oder Infektionen durch humanpathogene Pilze, wie *Aspergillus Fumigatus*. Da die Durchseuchung dieser Pathogene in der Bevölkerung relativ hoch ist und/ oder die Bevölkerung diversen Pathogenen ständig ausgesetzt ist (*Aspergillus Fumigatus*) ist es möglich die von dem zellulären Immunsystem dieser gesunden Individuen erkannten T-Zell-Epitopen für eine passive Immunisierung in Immunsupprimierten zu verwenden. Um diese relevanten T-Zell-Epitope zu identifizieren ist der Ansatz der Reversen Immunologie ideal. Diese Strategie wurde bei dem *Aspergillus Fumigatus*-Projekt angewendet, siehe 3.3.

3.3 *Aspergillus fumigatus*

Für *Aspergillus fumigatus* wurden nach dem Ansatz der Reversen Immunologie aus diversen Antigenen dieses Pilzes Peptide vorhergesagt. Die vorhergesagten Peptide sollten dahingehend getestet werden, ob sie im Verbund mit MHC als T-Zell-Epitope fungieren. Jene als immunogen identifizierten Peptide repräsentieren einen Teil der *in vivo* relevanten T-Zell-Epitope der T-Zellantwort gegen *Aspergillus fumigatus*. Dadurch wäre die Kontrolle des Pilzes in immunsupprimierten Patienten durch eine Immuntherapie mit adoptiv transferierten spezifischen CD4⁺ T-Zellen möglich. Zusätzlich kann die Verteilung dieser neu identifizierten T-Zell-Epitope in der Bevölkerung näherungsweise ermittelt werden. Für möglichst immunogen wirkende Peptide ist die Auswahl der Antigene, aus denen sie vorhergesagt werden, von großer Wichtigkeit.

3.3.1 Auswahl der Antigene

Es sind diverse Antigene von *Aspergillus fumigatus*, die eine Immunantwort induzieren können bekannt. Diese klinisch relevanten Antigene können anhand ihrem Produktionsort oder ihrer Lokalisation, ihrer Struktur und Funktion zu Klassen zusammengefasst werden. Weiter unterscheidet man zwischen Proteinen, Polysacchariden, Glykoproteinen und diversen Enzymen (Kurup and Kumar, 1991).

Für die folgenden vier Antigene von *Aspergillus fumigatus* wurden HLA-DRB1*01-, HLA-DRB1*03-, HLA-DRB1*04-, HLA-DRB1*07-, HLA-DRB1*11 und HLA-DRB1*15-restringierte Liganden vorhergesagt. Dafür wurde die Epitopvorhersage der SYFPEITHI-Datenbank verwendet (Rammensee et al., 1999).

- **Asp f1**, ein Ribotoxin, welches sezerniert wird (Arruda et al., 1990; Kurup et al., 1998). Es wurden aus diesem Antigen 8 HLA-Klasse II restringierte Liganden vorhergesagt.

- **Asp f2**, ein Glykoprotein (Banerjee et al., 1998). Es wurden aus diesem Antigen 12 HLA-Klasse II restringierte Liganden vorhergesagt.
- **Cat B**, ein Antigen, das zu einer Unterklasse der Katalasen gehört, es wird ebenfalls sezerniert (Lopez-Medrano et al., 1995). Es wurden aus diesem Antigen 15 HLA-Klasse II restringierte Liganden vorhergesagt.
- **Chi B**, die Chitinase B, welche sezerniert wird (Siaens et al., 2004; Taib et al., 2005). Es wurden aus diesem Antigen 13 HLA-Klasse II restringierte Liganden vorhergesagt.

Die Liganden mit dem höchsten durch SYFPEITHI ermittelten Bindungswert und die Promiskuitivsten für die genannten HLA-Moleküle wurden ausgewählt und synthetisiert sowie mit Hilfe von HPLC und Massenspektrometrie auf Identität und Reinheit überprüft, siehe 2.1.4. Ob diese MHC Klasse II Liganden von T-Zellen erkannt werden und ob sie demnach als klinisch relevante T-Zell-Epitope eingestuft werden können, wurde durch IFN γ -Nachweis mittels ELISpot analysiert. Um möglichst viele Peptide auf T-Zellen möglichst vieler gesunder Individuen in kurzer Zeit zu testen, wurden Pools von jeweils vier Peptiden eingesetzt. Jedes zu testende Peptid war in zwei unterschiedlichen Pools vorhanden, wodurch meist gewährleistet war, dass eine IFN γ positive Antwort dem richtigen Peptid zugeordnet werden konnte. Ein Beispiel für diese Poolstrategie ist nachfolgender Abbildung 3.18 zu entnehmen.

9	10	11	12	Poolnr.
Peptid 1	Peptid 5	Peptid 9	Peptid 13	13
Peptid 2	Peptid 6	Peptid 10	Peptid 14	14
Peptid 3	Peptid 7	Peptid 11	Peptid 15	15
Peptid 4	Peptid 8	Peptid 12	Peptid 16	16

Abbildung 3.18: Ein Pool bestand aus vier Peptiden. Jedes zu analysierende Peptid war in zwei Pools vorhanden. Im Falle einer T-Zellantwort gegen Pool 9 und Pool 16 -wie in Abbildung 3.19a-c dargestellt - konnte das Peptid 4 als das immunogene Peptid identifiziert werden.

3.3.2 Immunogenitätsanalyse der gepoolten Peptide

Durch die Verwendung von Pools bestehend aus vier Peptiden konnte der Durchsatz von vorhergesagten Peptiden bei deren Immunogenitätsanalyse auf diversen gesunden Spendern deutlich erhöht werden. Die PBMCs für diese Analysen wurden aus gesunden Blutspendern gewonnen, die nicht routinemäßig für Klasse II typisiert werden. Durch die Promiskuität der vorhergesagten MHC Klasse II restringierten Peptide und den hohen Durchsatz an Peptiden und Spendern war eine aufwändige und kostenintensive HLA-Klasse II Typisierung für die Identifizierung von immunogenen Peptiden vorerst nicht notwendig.

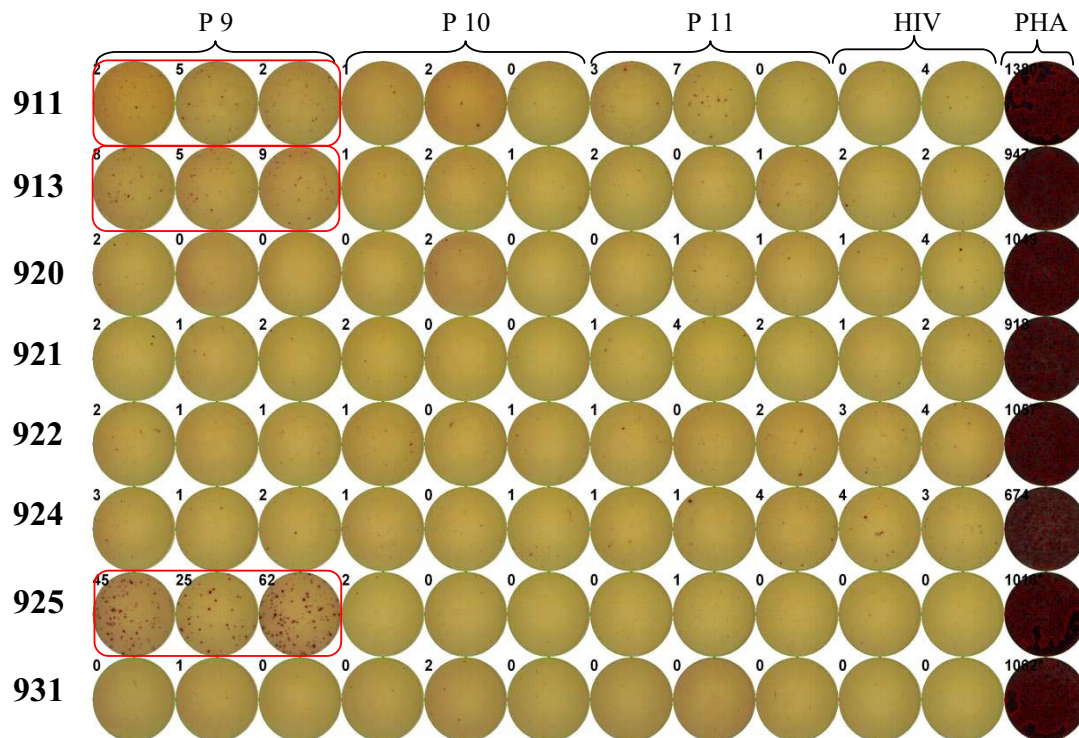


Abbildung 3.19a: Die erste von drei gescannten ELISpot-Platten einer Immunogenitätsanalyse von gepoolten Peptiden mit Angabe der Zahl der detektierten IFN γ -positiven Zellen. Die Poolgröße betrug vier Peptide. In jeder Zeile sind die PBMCs eines gesunden HLA-Klasse II untypisierten Spenders aufgetragen (911-931, laborinterne Nummerierung). Es wurden $0,5 \cdot 10^6$ PBMCs pro Napf eingesetzt. Diese PBMCs wurden mit 3 verschiedenen Peptidpools (Pool 9-11) in Triplikaten stimuliert. Die Peptidkonzentration betrug $10 \mu\text{g/ml}$. Als Negativkontrolle diente ein irrelevantes HIV-Peptid, als Positivkontrolle PHA. Positive Antworten sind durch einen roten Rahmen hervorgehoben.

In Abbildungen 3.19a-3.19c ist exemplarisch eine komplette Auswertung eines Experiments zur Bestimmung der Immunogenität verschiedener vorhergesagter Peptide dargestellt. Diese Immunogenitätsanalysen wurden immer nach demselben Muster, wie in Abbildungen 3.19a-3.19c ersichtlich, durchgeführt. Acht Peptidpools wurden auf acht Spendern mit drei ELISpot-Platten analysiert. Auf jeder Platte liefen als Negativkontrolle ein als immunogen bekanntes virales Klasse II restringiertes HIV-Peptid und als präparative Positivkontrolle der unspezifische Stimulus PHA mit.

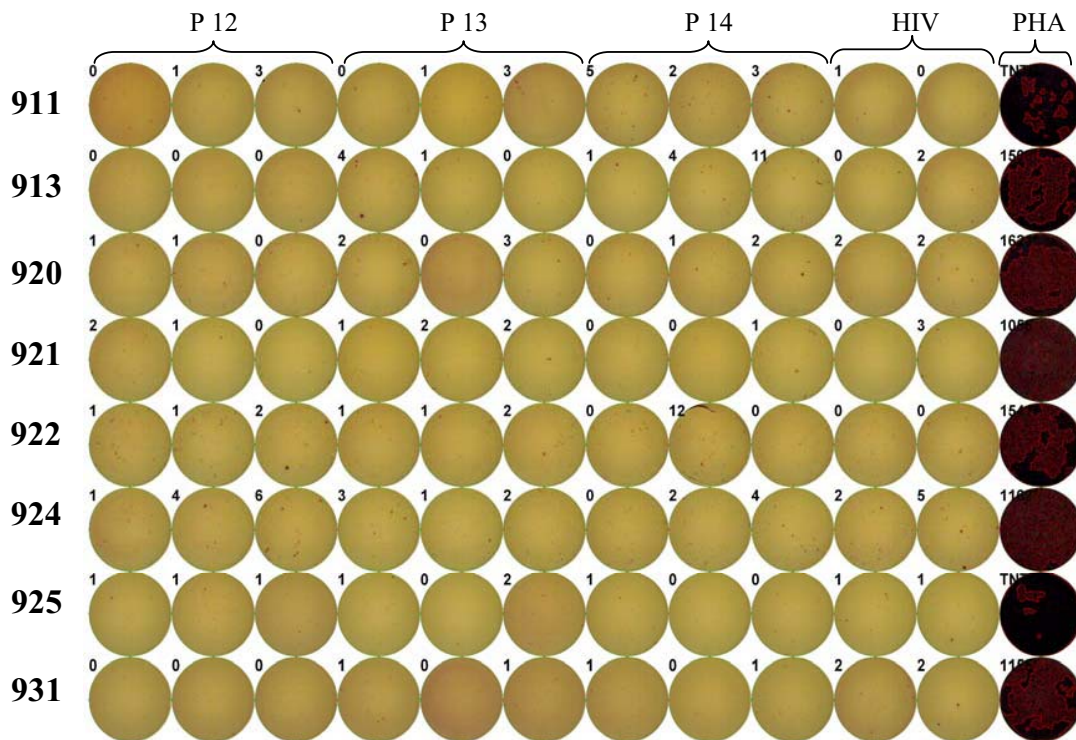


Abbildung 3.19b: Die zweite von drei gescannten ELISpot-Platten einer Immunogenitätsanalyse von gepoolten Peptiden mit Angabe der Zahl der detektierten IFN γ -positiven Zellen. Die Poolgröße betrug vier Peptide. In jeder Zeile sind die PBMCs eines gesunden HLA-Klasse II untypisierten Spenders aufgetragen (911-931, laborinterne Nummerierung). Es wurden $0,5-1 \times 10^6$ PBMCs pro Napf eingesetzt. Diese PBMCs wurden mit 3 verschiedenen Peptidpools (Pool 12-14) in Triplikaten stimuliert. Die Peptidkonzentration betrug $10 \mu\text{g/ml}$. Als Negativkontrolle diente ein irrelevantes HIV-Peptid, als Positivkontrolle PHA. Positive Antworten sind durch einen roten Rahmen hervorgehoben.

Auf der dritten der drei Platten eines Experimentes lieferte der Positiv-Mix, bestehend aus immunogenen EBV und CMV MHC Klasse II Peptiden, eine Aussage über den Amplifikationserfolg. Die verwendeten Peptide sind unter 2.1.4 zusammengestellt. Da die Frequenzen der *Aspergillus fumigatus*-spezifischen T-Zellen *ex vivo* sehr gering waren und dadurch meist unter der Nachweisgrenze des ELISpots lagen, wurden die zu untersuchenden PBMCs der einzelnen Spender erst nach vorherigen Präsensitivierung mit dem Antigen untersucht. Das bedeutet, dass die T-Zellen zuerst durch die Gabe der vorhergesagten Peptide spezifisch amplifiziert wurden, siehe 2.2.2.6.

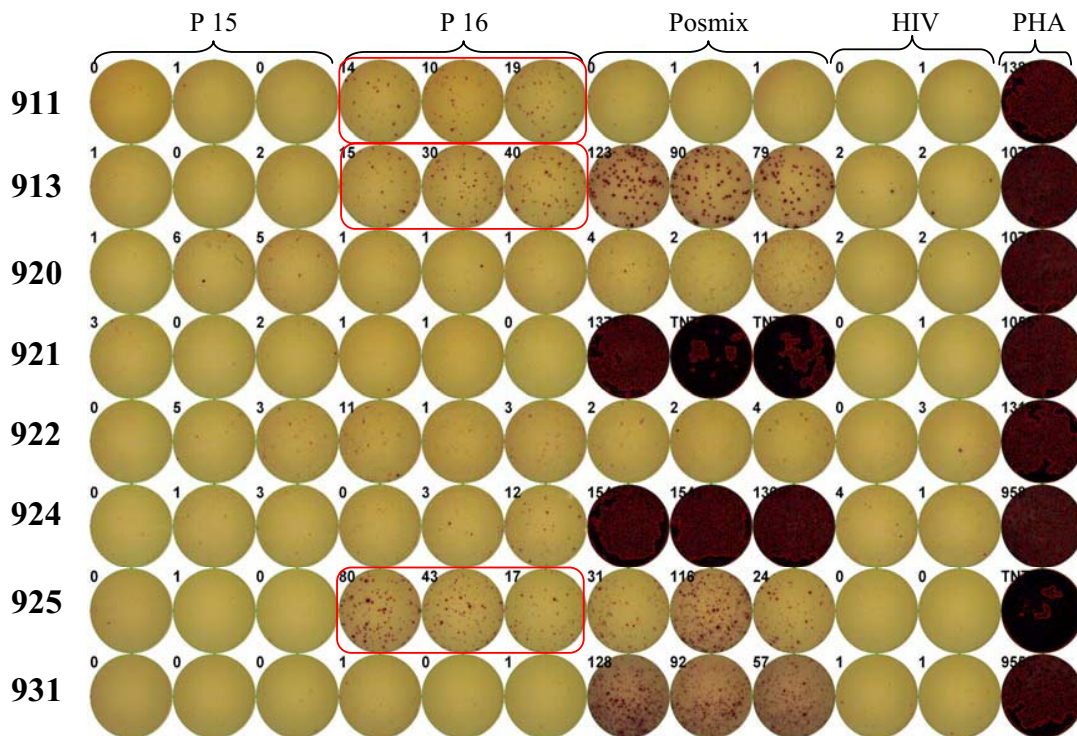


Abbildung 3.19c: Die dritte von drei gescannten ELISpot-Platten einer Immunogenitätsanalyse von gepoolten Peptiden mit Angabe der Zahl der detektierten IFN γ -positiven Zellen. Die Poolgröße betrug vier Peptide. In jeder Zeile sind die PBMCs eines gesunden HLA-Klasse II untypisierten Spenders aufgetragen (911-931, laborinterne Nummerierung). Es wurden $0,5 \cdot 10^6$ PBMCs pro Napf eingesetzt. Diese PBMCs wurden mit 3 verschiedenen Peptidpools (Pool 15-16 und dem viralen positiv Peptidmix) in Triplikaten stimuliert. Die Peptidkonzentration betrug $10 \mu\text{g/ml}$. Als Negativkontrolle diente ein irrelevantes HIV-Peptid, als Positivkontrolle PHA. Positive Antworten sind durch einen roten Rahmen hervorgehoben.

Die spezifische Amplifikation von präexistierenden T-Zell-Antworten wurde durch Zugabe von Peptid ohne kostimulatorische Signale erreicht. Ganz im Gegensatz zu dem Protokoll der *in vitro* Stimulation in dem DCs oder aAPCs das passende MHC-gebundene Peptid und kostimulatorische Signale den T-Zellen präsentieren und so naive T-Zellen primen. Es ist davon auszugehen, dass nach Peptidgabe ohne kostimulatorische Signale nur spezifische präexistierende T-Zellen zur Proliferation angeregt werden und keine naiven T-Zellen ein Priming erfahren. Allerdings ist ein Priming, bei passendem Zytokinmilieu und Reifungsstadium einiger DCs nicht komplett auszuschließen. Diese spezifische Amplifikation erfolgte für jeden einzelnen Napf einer 96napf-Platte separat. So konnten Rückschlüsse auf

die Vorläuferfrequenzen gemacht werden. Nach 13 Tagen Kultur erfolgte die Auswertung im ELISpot, siehe 1.8.3.2. Den Abbildungen 3.19a-3.19c ist zu entnehmen, dass die PBMCs der Spender 911, 913 und 925 auf den Peptidpool 9 und 16 reagieren. Das Peptid 4 ist in diesen beiden Pools vorhanden und so das als immunogen einzustufendes Peptid. Das Peptid 4 hat die Sequenz IPVFFIQDAILFPDL. Auf diese Art und Weise wurden insgesamt 48 vorhergesagte HLA-Klasse II restringierte Peptide aus den vier Antigenen von *Aspergillus fumigatus* auf PBMCs von 88 gesunden Spendern getestet. Es konnten sechs neue bisher unveröffentlichte T-Zell-Epitope identifiziert werden, diese Peptide sind in Tabelle 3.10 aufgelistet. Die Zahl der Spender die auf die jeweiligen T-Zell-Epitope reagierten variierte stark. 12,5 % der getesteten Spender erkannten das Peptid FVRFSTVAGSRGSSD, wobei 87,5 % der Spender das Peptid IPVFFIQDAILFPDL erkannten. IPVFFIQDAILFPDL deklarierten wir daher als immundominant. Die Definition von Immundominanz ist, dass mehr als 50 % der Individuen eine positive Antwort gegen dieses Epitop zeigen. Immundominanz bezeichnet das Phänomen, dass das Immunsystem des Wirts nur auf einige wenige der vielen möglichen Epitope in fremden Proteinen reagiert. Dieses Phänomen kann bei Infektionen mit allerlei Pathogenen beobachtet werden (Deng et al., 1997a; Brehm et al., 2002). Die Ursachen des Phänomens der Immundominanz sind vielfältig und noch nicht komplett erforscht, siehe unter 1.4.4.

Tabelle 3.10: Zusammenfassung der durchgeführten Immunogenitätsanalysen mit gepoolten Peptiden. Von insgesamt 48 vorhergesagten Peptiden, die auf 88 gesunden Spendern getestet wurden, waren sechs immunogen. Das jeweilige Ursprungsantigen für diese Peptide ist aufgelistet. Die Zahl der Spender die auf die jeweiligen T-Zell-Epitope reagierten variierte stark (12,5 % – 87,5 %). In fett gedruckt dargestellt ist das T-Zell-Epitop, welches wir als immundominant deklariert haben. Die Definition von Immundominanz ist in diesem Fall, dass mehr als 50 % der Individuen eine positive Antwort gegen dieses Epitop zeigen.

T-Zell-Epitop		Antigen	Spender mit positiver Antwort (%)
Sequenz	Peptid-ID		
IKNFLLLAATAVSVL	60554	Asp f 1	33,3
NEAVELARHAKAHIL	70014	Asp f 2	37,5
GTKLKKLDGLKVGVL	70051	CATB	20,8
IPVFFIQDAILFPDL	70055	CATB	87,5
AWDFFSQPSTMHTL	70061	CATB	25,0
FVRFSTVAGSRGSSD	70079	CATB	12,5

Mit diesen sechs neu identifizierten T-Zell-Epitopen wurden anschließend Einzeltestungen durchgeführt. Dies bedeutet, dass mit jedem Peptid einzeln die PBMCs/ CD4⁺ T-Zellen stimuliert und dadurch spezifisch amplifiziert wurden. Die Auswertung durch den ELISpot erfolgte danach ebenfalls in Einzeltestungen.

3.3.3 Immunogenitätsanalyse einzelner Peptide.

Für die Einzeltestungen der neu identifizierten T-Zell-Epitope wurden PBMCs von 14 HLA-Klasse II typisierten Blutspendern verwendet, siehe untenstehende Tabelle 3.11.

Tabelle 3.11: Zusammenstellung der verwendeten Blutprodukte

Blutspender	Blutprodukt	HLA			
		DQB1*0202	DQB1*0301	DRB1*0701	DRB1*1301
1	Buffy Coat	DQB1*0202	DQB1*0301	DRB1*0701	DRB1*1301
2	Buffy Coat	DQB1*0402	DQB1*0604	DRB1*0801	DRB1*1302
3	Buffy Coat	DQB1*0603	DQB1*0609	DRB1*1301	DRB1*1302
4	Buffy Coat	DQB1*0503	DQB1*0602	DRB1*1401	DRB1*1501
5	Buffy Coat	DQB1*0302	DQB1*0601	DRB1*0401	DRB1*1502
6	Buffy Coat	DQB1*0202	DQB1*0501	DRB1*0101	DRB1*0701
7	Buffy Coat	DQB1*0202	DQB1*0301	DRB1*0710	DRB1*1201
8	Buffy Coat	DQB1*0301	DQB1*0501	DRB1*0101	DRB1*1303
9	Buffy Coat	DQB1*0602	DQB1*0603	DRB1*1301	DRB1*1501
10	Buffy Coat	DQB1*0301	DQB1*0603	DRB1*1101	DRB1*1301
11	Buffy Coat	DQB1*0501	DQB1*0503	DRB1*0101	DRB1*1401
12	Buffy Coat	DQB1*0302	DQB1*0501	DRB1*0101	DRB1*0402
13	Buffy Coat	DQB1*0603		DRB1*0801	DRB1*1301
14	Buffy Coat	DQB1*0501	DQB1*0602	DRB1*0101	DRB1*1501

Die sechs Peptide wurden zusätzlich zu den zuvor durchgeführten Stimulationen mit gepoolten Peptiden in Einzelstimulationen verifiziert, um Synergieeffekte mehrerer Peptide auszuschließen und eventuelle unklare Ergebnisse bei den Immunogenitätsnachweisen mit den gepoolten Peptiden zu untersuchen. Erst so war eine definitive Aussage über die jeweilige Immunogenität eines Peptids zu ermöglichen.

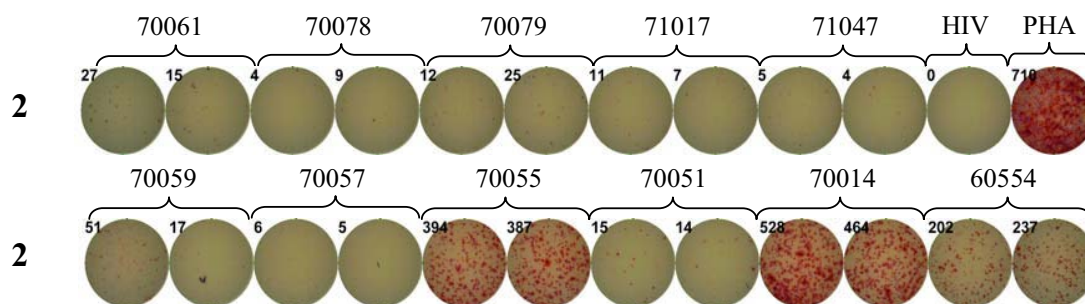


Abbildung 3.20: Ausschnitt einer gescannten ELISpot-Platte einer Immunogenitätsanalyse von einzelnen Peptiden mit Angabe der Zahl der detektierten IFN γ -positiven Zellen. Die PBMCs des gesunden HLA-Klasse II typisierten Spenders Nr. 2 wurden mit 11 vorhergesagten Peptiden (60554-71047, laborinterne Nummerierung) stimuliert. Es wurden $0,5 \cdot 10^6$ PBMCs pro Napf eingesetzt. Die Peptidkonzentration betrug $10 \mu\text{g/ml}$. Als Negativkontrolle diente ein irrelevantes HIV-Peptid, als Positivkontrolle PHA. Der Spender Nr. 2 reagierte stark gegen die Peptide 60554, 70014 und 70055, und schwach gegen 70051, 70079 und 70061.

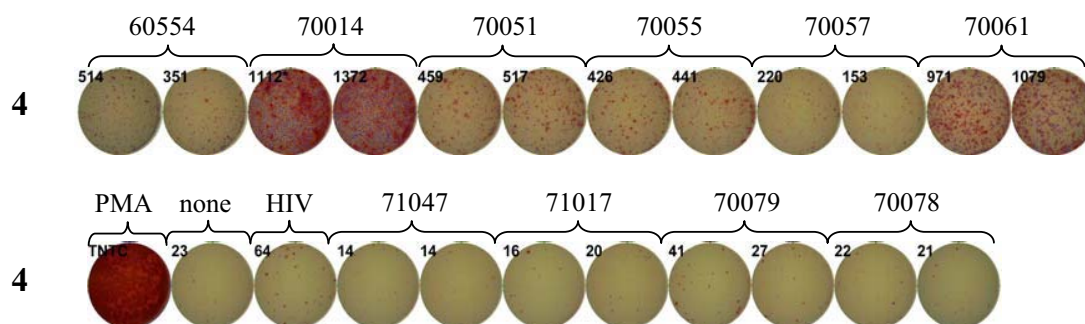


Abbildung 3.21: Ausschnitt einer gescannten ELISpot-Platte einer Immunogenitätsanalyse von einzelnen Peptiden mit Angabe der Zahl der detektierten IFN γ -positiven Zellen. Die PBMCs des gesunden HLA-Klasse II typisierten Spenders Nr. 4 wurden mit 10 vorhergesagten Peptiden (60554-71047, laborinterne Nummerierung) stimuliert. Es wurden $0,5 \cdot 10^6$ PBMCs pro Napf eingesetzt. Die Peptidkonzentration betrug $10 \mu\text{g/ml}$. Als Negativkontrolle diente ein irrelevantes HIV-Peptid, als Positivkontrolle PHA. Der Spender Nr. 4 reagierte stark gegen die Peptide 70014, 70051, 70055 und 70061.

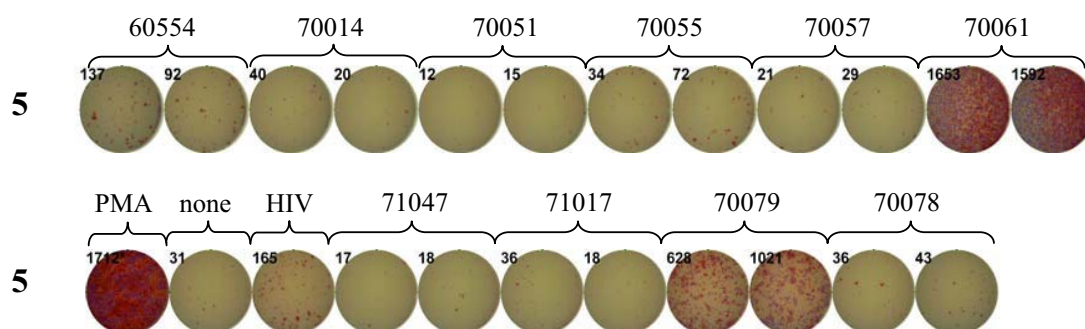


Abbildung 3.22: Ausschnitt einer gescannten ELISpot-Platte einer Immunogenitätsanalyse von einzelnen Peptiden mit Angabe der Zahl der detektierten IFN γ -positiven Zellen. Die PBMCs des gesunden HLA-Klasse II typisierten Spenders Nr. 5 wurden mit 10 vorhergesagten Peptiden (60554-71047, laborinterne Nummerierung) stimuliert. Es wurden $0,5 \cdot 10^6$ PBMCs pro Napf eingesetzt. Die Peptidkonzentration betrug $10 \mu\text{g/ml}$. Als Negativkontrolle diente ein irrelevantes HIV-Peptid, als Positivkontrolle PHA. Der Spender Nr. 5 reagierte stark gegen die Peptide 70061 und 70079.

Die Abbildungen 3.20 bis 3.22 zeigen, dass die durch Stimulationen mit Peptiden im Pool identifizierten Epitope sich auch in Einzelstimulationen als immunogen erweisen. Auch der tatsächlichen HLA-Restriktion dieser Peptide konnte teilweise durch die typisierten Spender nachgegangen werden. Die Promiskuität von MHC Klasse II bindenden Peptiden lässt allerdings keine eindeutige Schlussfolgerung zu. Weitergehende Blockierungsversuche mit anti-HLA-DR-Antikörper wären notwendig. Auch könnten für die verschiedenen HLA homozygote Zielzelllinien im ELISpot verwendet werden und so Rückschlüsse auf die HLA-Restriktion der T-Zell-Epitope gewonnen werden. Die getesteten Peptide wurden mit Hilfe der Datenbank SYFPEITHI für DRB1*01, DRB1*03, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*11 und DRB1*15 vorhergesagt. Aufgrund der Promiskuität ist es allerdings durchaus möglich, dass die identifizierten T-Zell-Epitope an weitere MHC Klasse II-Moleküle binden. Für eine immuntherapeutische Anwendung ist allerdings das Wissen um die HLA-Restriktion nicht zwingend notwendig. Zum einen könnte man mit einem Cocktail bestehend aus den identifizierten hoch promiskuitiven T-Zell-Epitopen einen großen Anteil der Klasse II HLA-Allele der Bevölkerung abdecken und zum anderen könnte man vor der *in vitro* Generation von autologen spezifischen T-Zellen und anschließender passiven Immunisierung die Patienten durch einen Blutprobentest gegen die T-Zell-Epitope testen. So könnte im Voraus in Erfahrung gebracht werden, ob die zeitaufwendige Prozedur der *in vitro* Stimulation für den adoptiven Zelltransfer Sinn ergibt.

3.3.4 Polyfunktionale Charakterisierung der identifizierten T-Zell-Epitope

Es ist nur schlüssig, dass die Qualität einer Vakzin-induzierten CD4⁺ T-Zellzytokinantwort *in vivo* über ihre Effektivität entscheidet (Kannanganat et al., 2007). CD4⁺ T-Zellen mit Multizytokinantworten und somit

multifunktionale CD4⁺ T-Zellen sind *in vivo* viel effektiver als Zellen die nur ein Zytokin sezernieren. (Darrah et al., 2007).

Die T-Zell-Antworten der neu identifizierten *Aspergillus fumigatus*-spezifischen T-Zell-Epitope wurden nach *in vitro* Amplifikation polyfunktional charakterisiert, um ihre Eignung als Immuntherapeutikum zu validieren. Es kommen ausschließlich jene generierten spezifischen T-Zellen in Frage, die in der Lage sind eine effektive Immunantwort auszulösen. Diese polyfunktionale Charakterisierung konnte durch die intrazelluläre Zytokinfärbung ermöglicht werden, siehe 1.8.3.3. Diese ist bei Ermittlung des Immunstatus nach Vakzinierung mittlerweile eine gängige Analysemethode (Casazza et al., 2006; Betts et al., 2006; Chattopadhyay et al., 2006).

Die in dieser Arbeit durchgeführte intrazelluläre Zytokinfärbung wurde an einem FACS LSR II analysiert. Folgende Parameter wurden untersucht. Produktion der Zellen von IFN γ , TNF α , IL-5, IL-17, IL-2 und die Expression von CD154 (CD40 ligand). T_H1 Zellen produzieren hauptsächlich IL-2 und IFN γ , T_H2 Zellen im Gegensatz IL-4 und IL-5. Die T_H17 Zellen geben IL-17 und TNF α ab (Knutson and Disis, 2005b; Romagnani, 2006a). CD154 ist ein Mitglied der TNF-Gen-Familie und wird unter anderem von verschiedenen Zellen, insbesondere von aktivierten spezifischen CD4⁺ T-Zellen exprimiert und ist so ein sehr guter Aktivierungsmarker (Toes et al., 1998). Die in der intrazellulären Zytokinfärbung verwendeten Antikörper sind unter Tabelle 2.8 einzusehen.

3.3.4.1 Gating-Strategie und Boolesche Auswertung

Die Auswertung der mit dem FACS LSR II ermittelten Daten erfolgte mittels der Software FlowJo 8.7.3. Nur diese Software erlaubt die boolesche Auswertung diverser Parameter. Die Auswertung erfolgte nach einer standardisierten Gating-Strategie, siehe Abbildung 3.23. Zuerst wurde ausgeschlossen, dass Zellaggregate, die meist unspezifisch

angefärbt sind, mit ausgewertet werden. Dies wurde durch die Auswahl der Singletten in dem FSC-A versus FSC-H Dot-Plot erreicht. Weiter wurden nur die lebenden Lymphozyten ausgewählt. Dafür wurde der Debris durch einen aminreaktiven Farbstoff angefärbt und kann so von den Zellen mit intakter Zellmembran unterschieden werden. Des Weiteren wurden zuerst die CD3⁺ T-Zellen ausgewählt und dann die CD4⁺ T-Zellen von den CD8⁺ T-Zellen diskriminiert. Die ausgewählten CD4⁺ T-Zellen wurden noch auf IL-10 Produktion hin überprüft. Die CD4⁺ IL-10⁻ T-Zellen wurden ausgewählt und die funktionalen Parameter IL-2, TNF α , IFN γ , IL-5, CD154 untersucht. Jegliche Kombinationen der CD4⁺IL-2⁺, CD4⁺TNF α ⁺, CD4⁺IFN α ⁺, CD4⁺IL-5⁺, CD4⁺CD154⁺ wurden anschließend in einer booleschen Auswertung errechnet. Diese polyfunktionale Analyse der spezifischen CD4⁺ T-Zellen ist für jedes Peptid in den folgenden Abbildungen durch ein Balkendiagramm dargestellt.

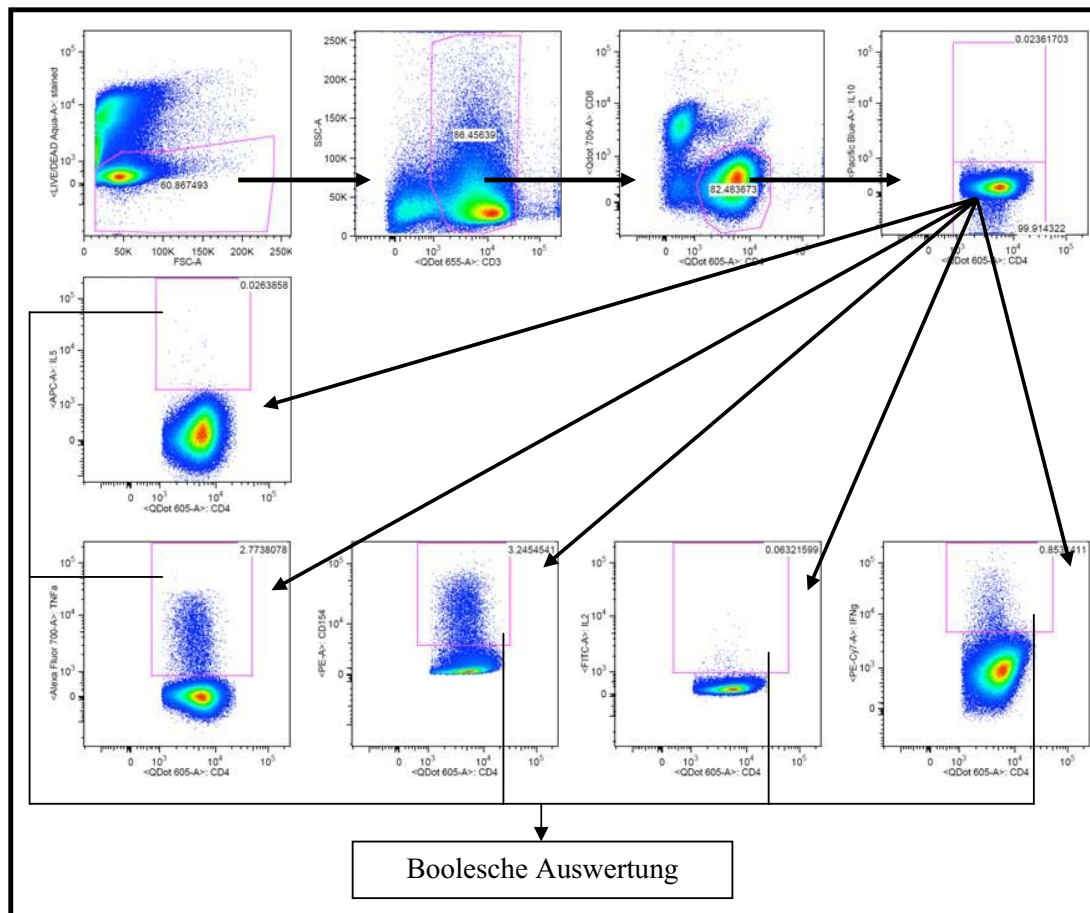


Abbildung 3.23: Gating-Strategie und Boolesche Auswertung der intrazellulär gefärbten spezifischen CD4^+ T-Zellen. Zuerst wurden die einzelnen Zellen im FSC-A versus FSC-H Dot-Plot ausgewählt und somit die zusammenklebenden Zellaggregate entfernt (nicht in der Grafik dargestellt). Diese Singletten wurden dann in dem Plot Live/DEADaqua versus FSC-A dargestellt, um die lebenden Lymphozyten zu diskriminieren. Weiter wurden in den folgenden Plots erst die CD3^+ Zellen ausgewählt, dann die CD4^+ Zellen von den CD8^+ abgrenzt und schließlich die CD4^+ und IL-10^- Zellpopulation ausgewählt. Diese CD4^+ Zellpopulation wurde in weiteren Plots auf spezifische Zytokinsekretion und Expression des Aktivierungsmarkers CD154 überprüft. Daraufhin wurden diese Zellen ausgewählt. Jegliche Kombinationen der $\text{CD4}^+\text{IL-2}^+$, $\text{CD4}^+\text{TNF}\alpha^+$, $\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^+$, $\text{CD4}^+\text{IL-5}^+$, $\text{CD4}^+\text{CD154}^+$ wurden anschließend in einer booleschen Auswertung untersucht.

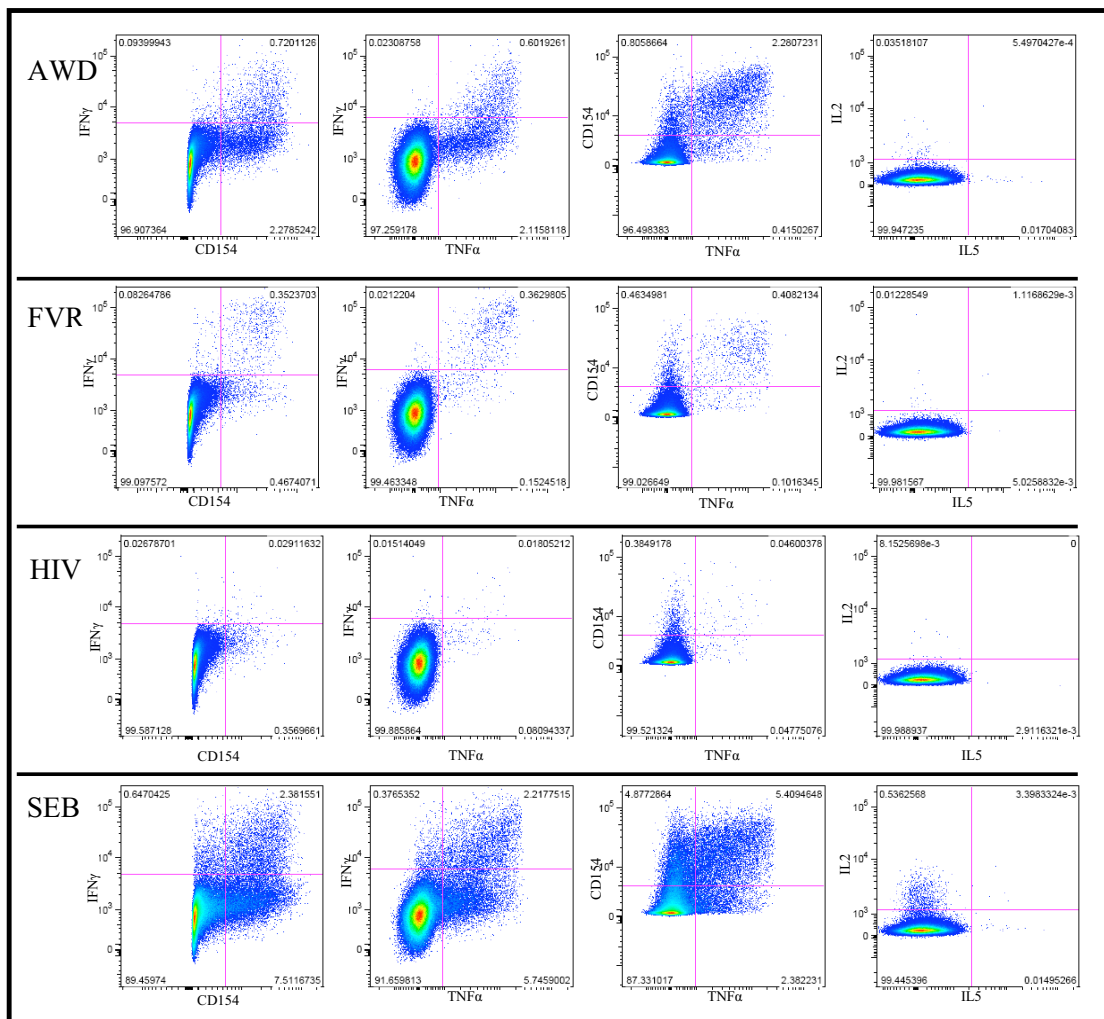


Abbildung 3.24: Exemplarische Darstellung einer polyfunktionalen Zytokinantwort. Diese Zytokinsekretionsmuster der CD4⁺ T-Zellen spezifisch gegen die aus *Aspergillus fumigatus*-Antigen vorhergesagten Peptide AWDFFSQQPSTMHTL und FVRFSTVAGSRGSSD sind dargestellt. Als Negativkontrolle diente das als immunogen bekannte virale Klasse II restringierte HIV-Peptid und als Positivkontrolle das unspezifische Superantigen SEB.

Exemplarisch sind die Rohdaten einer polyfunktionalen Zytokinantwort in Abbildung 3.24. dargestellt. Es sind die Zytokinsekretionsmuster der CD4⁺ T-Zellen, die spezifisch gegen die Peptide AWDFFSQQPSTMHTL und FVRFSTVAGSRGSSD sind, zu sehen. Als Negativkontrolle diente das als immunogen bekannte virale Klasse II restringierte HIV-Peptid und als Positivkontrolle das unspezifische Superantigen SEB.

3.3.4.2 Polyfunktionelle Analysen der spezifischen T-Zellen

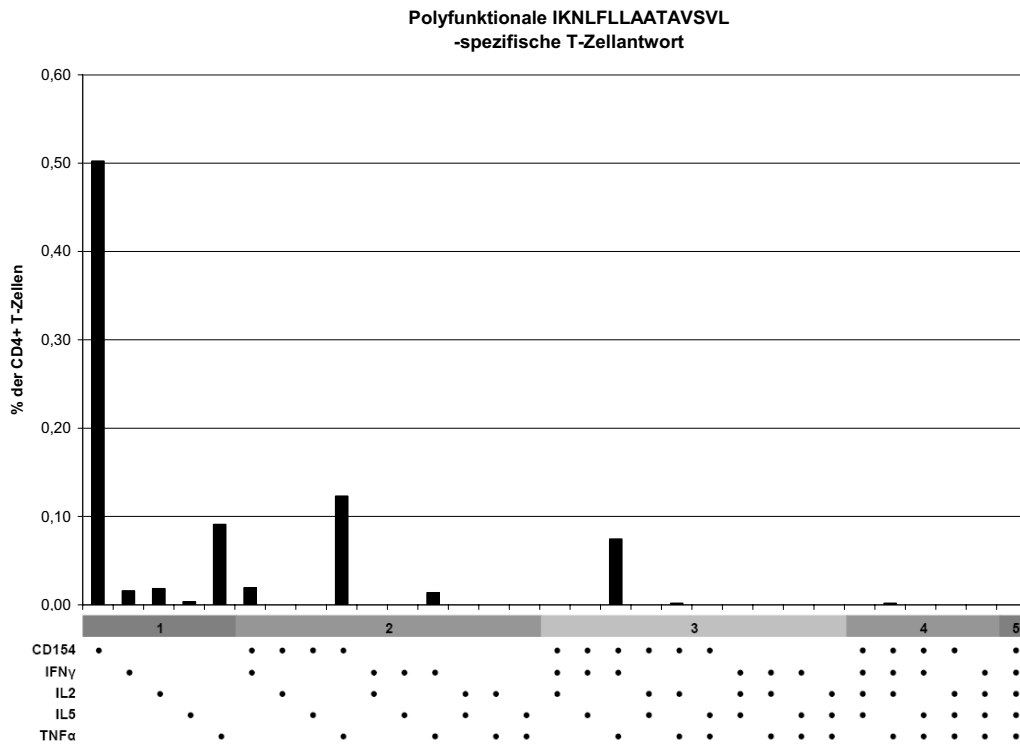


Abbildung 3.25: Die IKNLFLLAATAVSVL-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort in gesunden Spendern ist polyfunktional. Die schwarzen Balken repräsentieren die Frequenz der diversen Kombinationen an funktionalen Antworten einer spezifischen T-Zellantwort gegen IKNLFLLAATAVSVL des repräsentativen Blutspenders Nr. 5. Von den dargestellten Antworten wurde der Hintergrund subtrahiert. Die auf der X-Achse aufgetragenen Punkte zeigen für den jeweiligen Balken die sezernierten Zytokine oder den Aktivierungsmarker einzeln und ihre booleschen Kombinationen an. Die diversen funktionalen Antworten sind in % der gesamten CD4⁺ T-Zellen auf der Y-Achse aufgetragen.

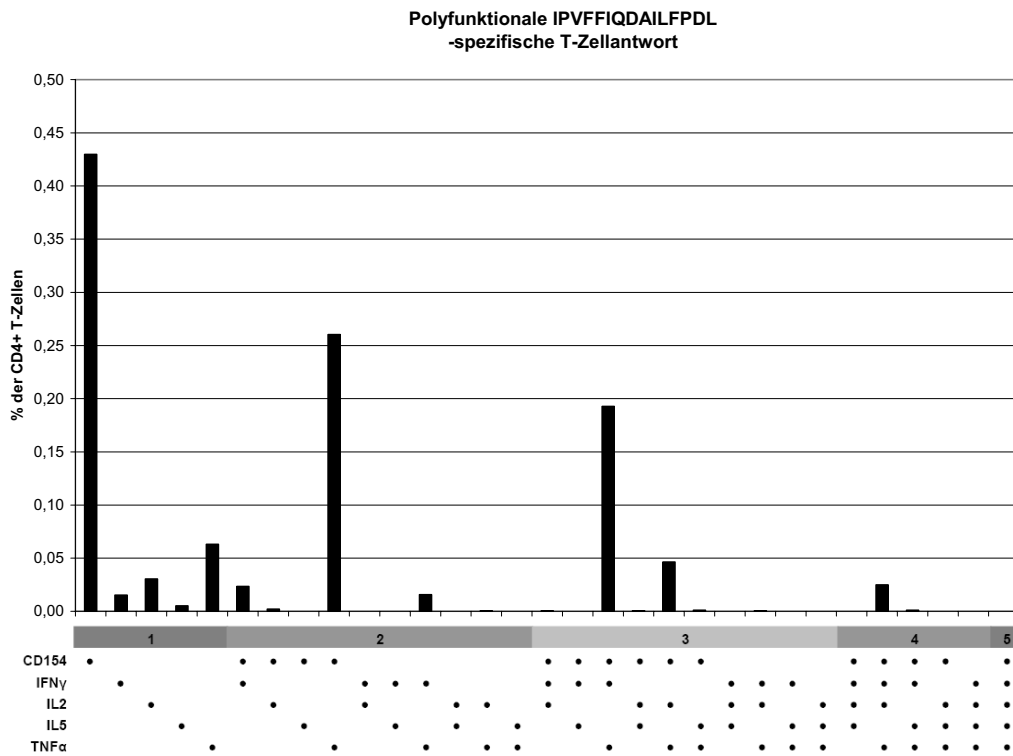


Abbildung 3.26: Die IPVFFIQDAILFPDL-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort in gesunden Spendern ist polyfunktional. Die schwarzen Balken repräsentieren die Frequenz der diversen Kombinationen an funktionalen Antworten einer spezifischen T-Zellantwort gegen IPVFFIQDAILFPDL des repräsentativen Blutspenders Nr. 7. Von den dargestellten Antworten wurde der Hintergrund subtrahiert. Die auf der X-Achse aufgetragenen Punkte zeigen für den jeweiligen Balken die sezernierten Zytokine oder den Aktivierungsmarker einzeln und ihre booleschen Kombinationen an. Die diversen funktionalen Antworten sind in % der gesamten CD4⁺ T-Zellen auf der Y-Achse aufgetragen.

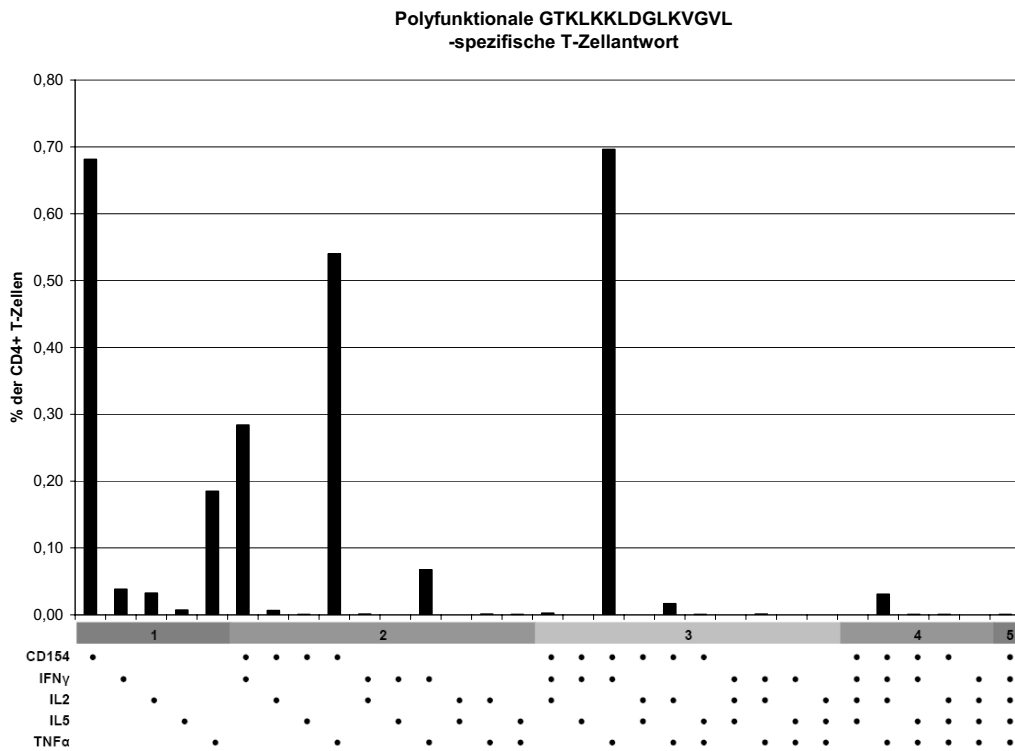


Abbildung 3.27: Die GTKLKKLDGLKVGVL-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort in gesunden Spendern ist polyfunktional. Die schwarzen Balken repräsentieren die Frequenz der diversen Kombinationen an funktionalen Antworten einer spezifischen T-Zellantwort gegen GTKLKKLDGLKVGVL des repräsentativen Blutspenders Nr. 7. Von den dargestellten Antworten wurde der Hintergrund subtrahiert. Die auf der X-Achse aufgetragenen Punkte zeigen für den jeweiligen Balken die sezernierten Zytokine oder den Aktivierungsmarker einzeln und ihre booleschen Kombinationen an. Die diversen funktionalen Antworten sind in % der gesamten CD4⁺ T-Zellen auf der Y-Achse aufgetragen.

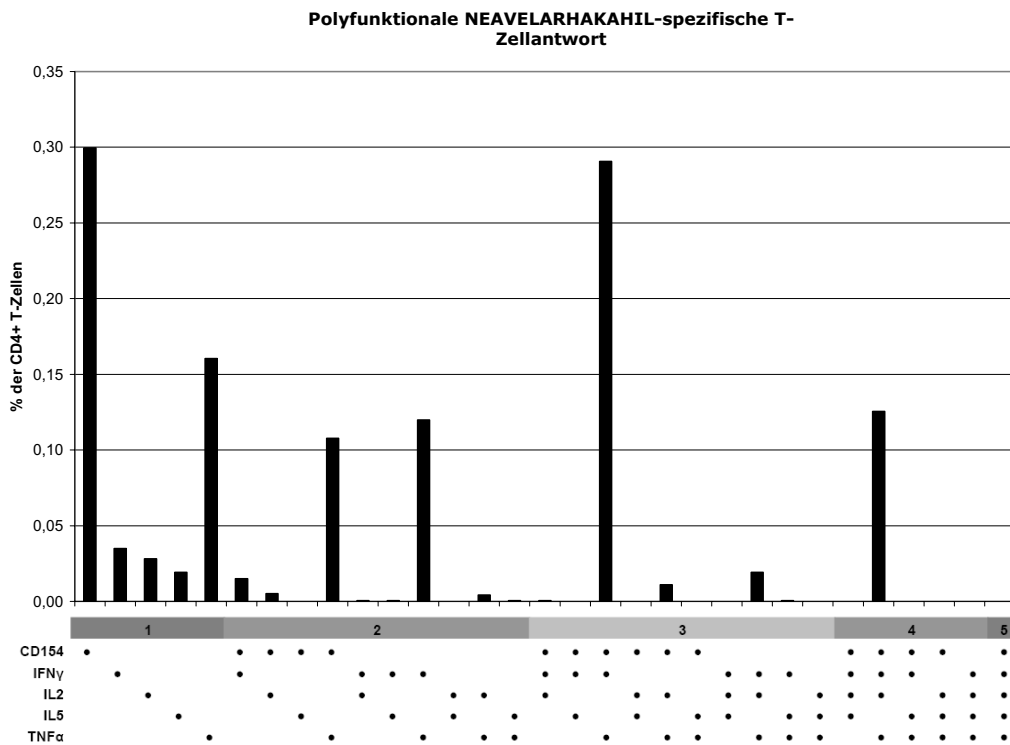


Abbildung 3.28: Die NEAVELARHAKAHIL-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort in gesunden Spendern ist polyfunktional. Die schwarzen Balken repräsentieren die Frequenz der diversen Kombinationen an funktionalen Antworten einer spezifischen T-Zellantwort gegen NEAVELARHAKAHIL des repräsentativen Blutspenders Nr. 4. Von den dargestellten Antworten wurde der Hintergrund subtrahiert. Die auf der X-Achse aufgetragenen Punkte zeigen für den jeweiligen Balken die sezernierten Zytokine oder den Aktivierungsmarker einzeln und ihre booleschen Kombinationen an. Die diversen funktionalen Antworten sind in % der gesamten CD4⁺ T-Zellen auf der Y-Achse aufgetragen.

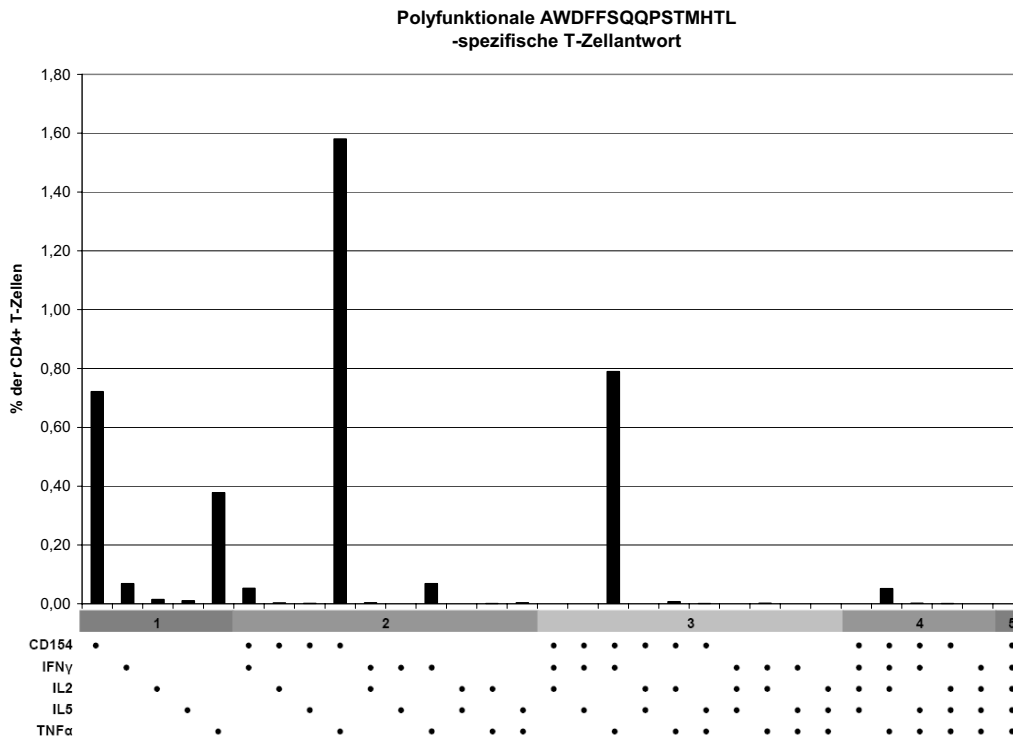


Abbildung 3.29: Die AWDFFSQQPSTMHTL-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort in gesunden Spendern ist polyfunktional. Die schwarzen Balken repräsentieren die Frequenz der diversen Kombinationen an funktionalen Antworten einer spezifischen T-Zellantwort gegen AWDFFSQQPSTMHTL des repräsentativen Blutspenders Nr. 5. Von den dargestellten Antworten wurde der Hintergrund subtrahiert. Die auf der X-Achse aufgetragenen Punkte zeigen für den jeweiligen Balken die sezernierten Zytokine oder den Aktivierungsmarker einzeln und ihre booleschen Kombinationen an. Die diversen funktionalen Antworten sind in % der gesamten CD4⁺ T-Zellen auf der Y-Achse aufgetragen.

Alle sechs immunogenen T-Zell-Epitope generieren *in vitro* spezifische CD4⁺ T-Zellen, die das Zytokinsekretionsmuster von T_H1-Zellen aufweisen. Einige T_H1-Zellen sezernieren IFN γ , TNF α , IL-2 und sind für den Aktivierungsmarker CD154 positiv, daher können diese Zellen als multifunktionale T_H1-Zellen bezeichnet werden.

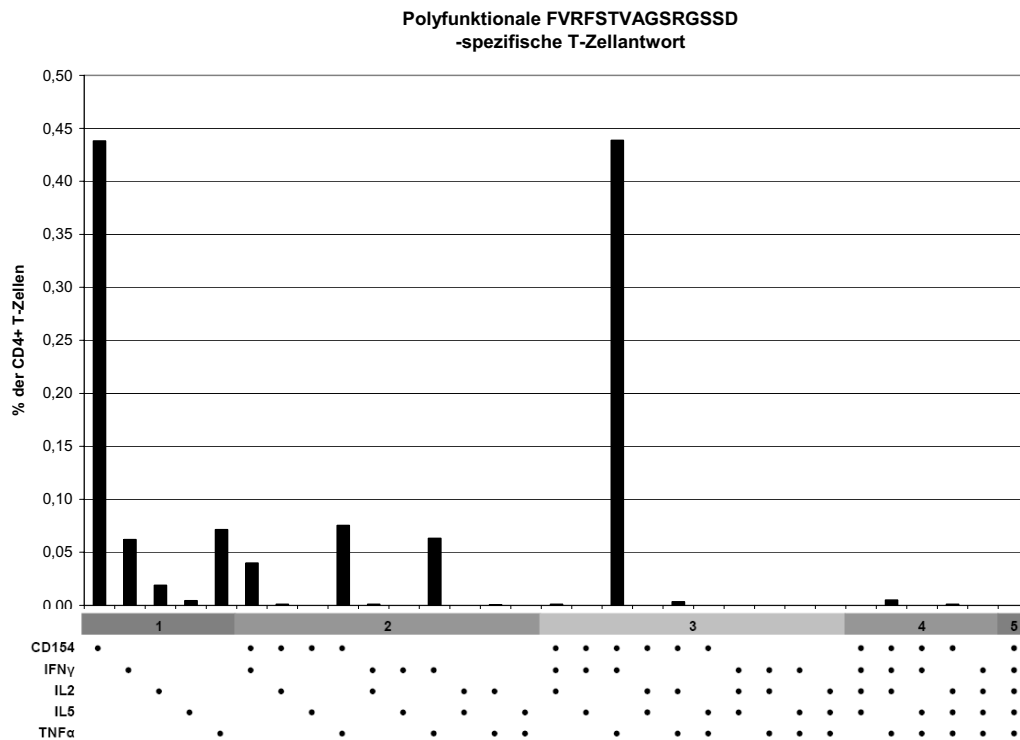


Abbildung 3.30: Die FVRFSTVAGSRGSSD-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort in gesunden Spendern ist polyfunktional. Die schwarzen Balken repräsentieren die Frequenz der diversen Kombinationen an funktionalen Antworten einer spezifischen T-Zellantwort gegen FVRFSTVAGSRGSSD des repräsentativen Blutspenders Nr. 5. Von den dargestellten Antworten wurde der Hintergrund subtrahiert. Die auf der X-Achse aufgetragenen Punkte zeigen für den jeweiligen Balken die sezernierten Zytokine oder den Aktivierungsmarker einzeln und ihre booleschen Kombinationen an. Die diversen funktionalen Antworten sind in % der gesamten CD4⁺ T-Zellen auf der Y-Achse aufgetragen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *in vitro* amplifizierte CD4⁺ T-Zellen, welche für die neu identifizierten *Aspergillus fumigatus*-Epitope spezifisch sind, für einen Adoptiven Transfer in immunsupprimierten Patienten geeignet wären. Eine rezente Fallstudie belegt eindrucksvoll, dass der adoptive Transfer von antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen klinisch relevant ist (Hunder et al., 2008).

4 Zusammenfassung

Der Einsatz funktionaler antigenspezifischer T-Zellen für eine Immuntherapie von Krebspatienten oder Infektionen bei immunsupprimierten Patienten erfordert molekular definierte Antigene.

Teil dieser Arbeit war die *in vitro* Generierung und Charakterisierung spezifischer T-Zellen gegen die Nierenzellkarzinom-assoziierten Antigene SPAG4 und VEGF.

Aus dem Protein SPAG4 konnte bislang kein natürlicher MHC-Ligand identifiziert werden, obwohl es in Nierenzellkarzinom überexprimiert wird. Vorhergesagte HLA-Liganden sollten als T-Zell-Epitope verifiziert werden. Die identifizierten Epitope LLFQGLSVL (HLA-A*0201), GLLYLVSPL (HLA-A*0201) und GPSCGEPAL (HLA-B*0702) konnten keine CD8⁺ T-Zellspezifitäten, die in der Lage waren SPAG4-exprimierende Zellen zu lysieren, erzeugen. Dies zeigt, dass diese vorhergesagten T-Zell-Epitope keine natürlichen MHC-Liganden sind. Im Gegensatz dazu wurde das Peptid SRFGGAVVR durch massenspektrometrische Verfahren als natürlicher MHC-Ligand aus dem VEGF-Protein identifiziert. *In vitro* generierte SRFGGAVVR-spezifische CTLs produzierten IFN γ und lysierten effektiv VEGF-exprimierende Zellen. Diese funktionellen und lytischen Analysen bestätigen das VEGF-T-Zell-Epitop als Kandidaten für einen immuntherapeutischen Ansatz.

Nach dem Ansatz der Reversen Immunologie wurden auch MHC-II-Liganden von *Aspergillus fumigatus* vorhergesagt. Sechs Peptide konnten als T-Zell-Epitope verifiziert werden und wurden funktional charakterisiert. Alle sechs immunogenen T-Zell-Epitope generieren *in vitro* spezifische CD4⁺ T-Zellen, die das Zytokinsekretionsmuster von T_H1-Zellen aufweisen. Einige T_H1-Zellen sezernieren IFN γ , TNF α , IL-2 und sind für den Aktivierungsmarker CD154 positiv. Dies macht die identifizierten T-Zell-Epitope für eine Immuntherapie interessant, denn um eine effiziente Immunreaktion *in vivo* nach adoptiven Transfer auszulösen sind multifunktionelle T_H1-Zellen essentiell.

5 Summary

The identification of antigens and the generation of functional antigen specific cells is essential for an immunotherapeutic treatment of cancer patients or infections especially in immunocompromised patients.

The antigens SPAG4 and VEGF are both associated with renal cell carcinoma (RCC). Therefore, one aim of this study was the *in vitro* generation and characterization of SPAG4- and VEGF-specific T cells.

So far, no SPAG4-derived peptides have been identified as natural MHC ligands, although SPAG4 is overexpressed in RCC. Accordingly, predicted HLA ligands should be verified as T cell epitopes. The peptides LLFQGLSVL (HLA-A*0201), GLLYLVSP (HLA-A*0201) and GPSCGEPAL (HLA-B*0702) identified as T cell epitopes could not generate CD8⁺ T cell specificities capable of killing SPAG4-expressing cell lines. This indicates that these predicted T cell epitopes are no natural ligands. Contrary to this, the peptide SRFGGAVVR deriving from the VEGF protein was identified as natural ligand through mass spectrometry. *In vitro* generated SRFGGAVVR-specific T cells produced IFN γ and killed efficiently VEGF-expressing cell lines. These findings confirm SRFGGAVVR as candidate epitope for immunotherapeutic approaches.

According to the reverse immunology approach, MHC class II ligands from *Aspergillus fumigatus* were predicted. Six peptides could be identified as T cell epitopes and were further functionally characterized. Each of these six T cell epitopes generated *in vitro* specific T cells showing the cytokine secretion pattern of T_H1 cells. A couple of these T_H1 cells secreted IFN γ , TNF α , IL-2, were positive for the activation marker CD154 and consequently considered as multicytokine responders. Such multifunctional cells are required for an efficient *in vivo* immune response after adoptive transfer. Thus, the identified T cell epitopes are promising candidates for an immunotherapy approach.

6 Appendix

6.1 Abkürzungen

aAPC	Artificial Antigen-Presenting Cell
Amp	Ampicillin
APC	Antigen-Presenting Cell oder Allophycocyanin
ATP	Adenosine-5'-Triphosphate
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- Phosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
Camp	Chloramphenicol
CD	Cluster of Differentiation
cDNS	Complementary DNS
CDR	Complementary Determining Region
CCA	Colon Carcinoma
CMV	Cytomegalovirus
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
DC	Dendritic Cell
ddH₂O	Double Distilled Water
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA/DNS	Deoxyribonucleic acid
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	Enzyme Classification
ECD	Energy Couple Dye
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISpot	Enzyme Linked ImmunoSPOT Assay
ER	Endoplasmic Reticulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetal calf serum

FITC	Fluorescein Isothiocyanate
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HEPES	2 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid
HEV	High endothelial venules
HLA	Human Leukocyte antigen
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSA	Albumin from Human Serum
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactosid
ISH	<i>in situ</i> Hybridization
IU	International Unit
kDa	Kilodalton
KIRs	Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnet Assisted Cell Sorting
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIIC	MHC Class II Compartment
mRNA	Messenger RNA
MS	Mass Spectrometry
MW	Molecular Weight
OD_x	"Optical Density at x nm" = spezifische Extinktion bei der Wellenlänge x nm
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBL	Peripheral Blood Lymphocyte
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	R-Phycoerythrin
PE-Cy7	Tandem Conjugate: R-Phycoerythrin and cyanine dye
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein

PerCP-Cy5.5	Tandem Conjugate: Peridinin Chlorophyll Protein and cyanine dye
pH	Potentia Hydrogenii
PHA	Phytohemagglutinin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	Phenylmethyl-sulfonylfluoride
PRRs	Pattern Recognition Receptors
psi	Pounds per Square Inch
Qdot	Quantum Dots
rpm	Revolutions per Minute
RT	Room Temperature oder Reverse Transcriptase
SEB	Staphylococcus Aureus Enterotoxin B
TAP	Transporter Associated with Antigen Processing
TBS	Tris Buffered Saline
TCR	T-Cell Receptor
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris[hydroxymethyl]amino-methan
UTR	Untranslated Region
Vol.	Volume

6.2 Referenzen

1. Abril,E., Mendez,R.E., Garcia,A., Serrano,A., Cabrera,T., Garrido,F., and Ruiz-Cabello,F., 1996a. Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue Antigens*, **47**, 391-398.
2. Abril,E., Mendez,R.E., Garcia,A., Serrano,A., Cabrera,T., Garrido,F., and Ruiz-Cabello,F., 1996b. Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue Antigens*, **47**, 391-398.
3. Abril,E., Mendez,R.E., Garcia,A., Serrano,A., Cabrera,T., Garrido,F., and Ruiz-Cabello,F., 1996c. Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue Antigens*, **47**, 391-398.
4. Abril,E., Mendez,R.E., Garcia,A., Serrano,A., Cabrera,T., Garrido,F., and Ruiz-Cabello,F., 1996d. Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue Antigens*, **47**, 391-398.
5. Ahmadzadeh,M., Hussain,S.F., and Farber,D.L., 2001. Heterogeneity of the memory CD4 T cell response: persisting effectors and resting memory T cells. *J.Immunol.*, **166**, 926-935.
6. Alfonso,C. and Karlsson,L., 2000. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.*, **18**, 113-142.
7. Altman,J.D., Moss,P.A., Goulder,P.J., Barouch,D.H., Heyzer-Williams,M.G., Bell,J.I., McMichael,A.J., and Davis,M.M., 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, **274**, 94-96.
8. Amsen,D. and Kruisbeek,A.M., 1996. CD28-B7 interactions function to co-stimulate clonal deletion of double-positive thymocytes. *Int.Immunol.*, **8**, 1927-1936.
9. Anderson,M.S., Venanzi,E.S., Chen,Z., Berzins,S.P., Benoist,C., and Mathis,D., 2005. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity.*, **23**, 227-239.

10. Andreasen,S.O., Christensen,J.E., Marker,O., and Thomsen,A.R., 2000. Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. *J.Immunol.*, **164**, 3689-3697.
11. Andriole,V.T., 1993. Infections with Aspergillus species. *Clin.Infect.Dis.*, **17 Suppl 2**, S481-S486.
12. ANFINSEN,C.B., HABER,E., SELA,M., and WHITE,F.H., Jr., 1961. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **47**, 1309-1314.
13. Appay,V., Nixon,D.F., Donahoe,S.M., Gillespie,G.M., Dong,T., King,A., Ogg,G.S., Spiegel,H.M., Conlon,C., Spina,C.A., Havlir,D.V., Richman,D.D., Waters,A., Easterbrook,P., McMichael,A.J., and Rowland-Jones,S.L., 2000. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J.Exp.Med.*, **192**, 63-75.
14. Arruda,L.K., Platts-Mills,T.A., Fox,J.W., and Chapman,M.D., 1990. Aspergillus fumigatus allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *J.Exp.Med.*, **172**, 1529-1532.
15. Baars,P.A., Sierro,S., Arens,R., Tesselaar,K., Hooibrink,B., Klenerman,P., and van Lier,R.A., 2005. Properties of murine (CD8+). *Eur.J.Immunol.*, **35**, 3131-3141.
16. Bachmann,M.F., Kundig,T.M., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M., 1997. Protection against immunopathological consequences of a viral infection by activated but not resting cytotoxic T cells: T cell memory without "memory T cells"? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 640-645.
17. Banchereau,J. and Steinman,R.M., 1998a. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**, 245-252.
18. Banchereau,J. and Steinman,R.M., 1998b. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**, 245-252.
19. Banerjee,B., Greenberger,P.A., Fink,J.N., and Kurup,V.P., 1998. Immunological characterization of Asp f 2, a major allergen from

- Aspergillus fumigatus* associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Infect.Immun.*, **66**, 5175-5182.
20. Beckett,D., Kovaleva,E., and Schatz,P.J., 1999. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci.*, **8**, 921-929.
 21. Benitez,R., Godelaine,D., Lopez-Nevot,M.A., Brasseur,F., Jimenez,P., Marchand,M., Oliva,M.R., van,B.N., Cabrera,T., Andry,G., Landry,C., Ruiz-Cabello,F., Boon,T., and Garrido,F., 1998. Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens*, **52**, 520-529.
 22. Bennett,S.R., Carbone,F.R., Karamalis,F., Flavell,R.A., Miller,J.F., and Heath,W.R., 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*, **393**, 478-480.
 23. Berg,E.L., Robinson,M.K., Warnock,R.A., and Butcher,E.C., 1991. The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J.Cell Biol.*, **114**, 343-349.
 24. Bettelli,E., Carrier,Y., Gao,W., Korn,T., Strom,T.B., Oukka,M., Weiner,H.L., and Kuchroo,V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, **441**, 235-238.
 25. Betts,M.R., Nason,M.C., West,S.M., De Rosa,S.C., Migueles,S.A., Abraham,J., Lederman,M.M., Benito,J.M., Goepfert,P.A., Connors,M., Roederer,M., and Koup,R.A., 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*, **107**, 4781-4789.
 26. Bevan,M.J., 2006. Cross-priming. *Nat.Immunol.*, **7**, 363-365.
 27. Bjorkman,P.J., Saper,M.A., Samraoui,B., Bennett,W.S., Strominger,J.L., and Wiley,D.C., 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, **329**, 506-512.
 28. Bornes,S., Boulard,M., Hieblot,C., Zanibellato,C., Iacovoni,J.S., Prats,H., and Touriol,C., 2004. Control of the vascular endothelial growth factor internal ribosome entry site (IRES) activity and

- translation initiation by alternatively spliced coding sequences. *J.Biol.Chem.*, **279**, 18717-18726.
29. Borst,J., Sluyser,C., De,V.E., Klein,H., Melief,C.J., and van Lier,R.A., 1989. Alternative molecular form of human T cell-specific antigen CD27 expressed upon T cell activation. *Eur.J.Immunol.*, **19**, 357-364.
 30. Bouvier,M. and Wiley,D.C., 1994. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science*, **265**, 398-402.
 31. Bozza,S., Gaziano,R., Lipford,G.B., Montagnoli,C., Bacci,A., Di,F.P., Kurup,V.P., Wagner,H., and Romani,L., 2002. Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microbes.Infect.*, **4**, 1281-1290.
 32. Brandt,K., Singh,P.B., Bulfone-Paus,S., and Ruckert,R., 2007. Interleukin-21: a new modulator of immunity, infection, and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **18**, 223-232.
 33. Braud,V.M., Allan,D.S., and McMichael,A.J., 1999. Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr.Opin.Immunol.*, **11**, 100-108.
 34. Brehm,M.A., Pinto,A.K., Daniels,K.A., Schneck,J.P., Welsh,R.M., and Selin,L.K., 2002. T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat.Immunol.*, **3**, 627-634.
 35. Brocker,T., 1997. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J.Exp.Med.*, **186**, 1223-1232.
 36. Brossart,P., Heinrich,K.S., Stuhler,G., Behnke,L., Reichardt,V.L., Stevanovic,S., Muhm,A., Rammensee,H.G., Kanz,L., and Brugger,W., 1999. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood*, **93**, 4309-4317.
 37. Brunner,K.T., Mauel,J., Cerottini,J.C., and Chapuis,B., 1968a. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on

- 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, **14**, 181-196.
38. Brunner, K.T., Mauel, J., Cerottini, J.C., and Chapuis, B., 1968b. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, **14**, 181-196.
39. Burrows, S.R., Kienzle, N., Winterhalter, A., Bharadwaj, M., Altman, J.D., and Brooks, A., 2000. Peptide-MHC class I tetrameric complexes display exquisite ligand specificity. *J.Immunol.*, **165**, 6229-6234.
40. Busch, D.H. and Pamer, E.G., 1999. T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *J.Exp.Med.*, **189**, 701-710.
41. Butler, M.O., Lee, J.S., Ansen, S., Neuberg, D., Hodi, F.S., Murray, A.P., Drury, L., Berezovskaya, A., Mulligan, R.C., Nadler, L.M., and Hirano, N., 2007. Long-lived antitumor CD8+ lymphocytes for adoptive therapy generated using an artificial antigen-presenting cell. *Clin.Cancer Res.*, **13**, 1857-1867.
42. Calvo-Calle, J.M., Strug, I., Nastke, M.D., Baker, S.P., and Stern, L.J., 2007. Human CD4+ T cell epitopes from vaccinia virus induced by vaccination or infection. *PLoS.Pathog.*, **3**, 1511-1529.
43. Carmeliet, P., Ng, Y.S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V.V., Stalmans, I., Mattot, V., Perriard, J.C., Dewerchin, M., Flameng, W., Nagy, A., Lupu, F., Moons, L., Collen, D., D'Amore, P.A., and Shima, D.T., 1999. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat.Med.*, **5**, 495-502.
44. Casazza, J.P., Betts, M.R., Price, D.A., Precopio, M.L., Ruff, L.E., Brenchley, J.M., Hill, B.J., Roederer, M., Douek, D.C., and Koup, R.A., 2006. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J.Exp.Med.*, **203**, 2865-2877.
45. Cassileth, P.A., Lynch, E., Hines, J.D., Oken, M.M., Mazza, J.J., Bennett, J.M., McGlave, P.B., Edelstein, M., Harrington, D.P., and O'Connell, M.J., 1992. Varying intensity of postremission therapy in acute myeloid leukemia. *Blood*, **79**, 1924-1930.

46. Celis,E., Fikes,J., Wentworth,P., Sidney,J., Southwood,S., Maewal,A., del Guercio,M.F., Sette,A., and Livingston,B., 1994c. Identification of potential CTL epitopes of tumor-associated antigen MAGE-1 for five common HLA-A alleles. *Mol.Immunol.*, **31**, 1423-1430.
47. Celis,E., Fikes,J., Wentworth,P., Sidney,J., Southwood,S., Maewal,A., del Guercio,M.F., Sette,A., and Livingston,B., 1994b. Identification of potential CTL epitopes of tumor-associated antigen MAGE-1 for five common HLA-A alleles. *Mol.Immunol.*, **31**, 1423-1430.
48. Celis,E., Fikes,J., Wentworth,P., Sidney,J., Southwood,S., Maewal,A., del Guercio,M.F., Sette,A., and Livingston,B., 1994a. Identification of potential CTL epitopes of tumor-associated antigen MAGE-1 for five common HLA-A alleles. *Mol.Immunol.*, **31**, 1423-1430.
49. Cenci,E., Mencacci,A., Del,S.G., Bacci,A., Montagnoli,C., d'Ostiani,C.F., Mosci,P., Bachmann,M., Bistoni,F., Kopf,M., and Romani,L., 1999. Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *J.Infect.Dis.*, **180**, 1957-1968.
50. Cenci,E., Perito,S., Enssle,K.H., Mosci,P., Latge,J.P., Romani,L., and Bistoni,F., 1997. Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect.Immun.*, **65**, 564-570.
51. Chang,J., 2006. Efficient amplification of melanoma-specific CD8+ T cells using artificial antigen presenting complex. *Exp.Mol.Med.*, **38**, 591-598.
52. Chao,C.C., Jensen,R., and Dailey,M.O., 1997. Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells. *J.Immunol.*, **159**, 1686-1694.
53. Chapman,H.A., 2006. Endosomal proteases in antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.*, **18**, 78-84.
54. Chattopadhyay,P.K., Price,D.A., Harper,T.F., Betts,M.R., Yu,J., Gostick,E., Perfetto,S.P., Goepfert,P., Koup,R.A., De Rosa,S.C., Bruchez,M.P., and Roederer,M., 2006. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nat.Med*, **12**, 972-977.

55. Chattopadhyay,P.K., Yu,J., and Roederer,M., 2005. A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles. *Nat.Med*, **11**, 1113-1117.
56. Chazalet,V., Debeaupuis,J.P., Sarfati,J., Lortholary,J., Ribaud,P., Shah,P., Cornet,M., Vu,T.H., Gluckman,E., Brucker,G., and Latge,J.P., 1998. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J.Clin.Microbiol.*, **36**, 1494-1500.
57. Chen,W., Anton,L.C., Bennink,J.R., and Yewdell,J.W., 2000. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity.*, **12**, 83-93.
58. Chen,Y., Kuchroo,V.K., Inobe,J., Hafler,D.A., and Weiner,H.L., 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, **265**, 1237-1240.
59. Chicz,R.M., Urban,R.G., Gorga,J.C., Vignali,D.A., Lane,W.S., and Strominger,J.L., 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J.Exp.Med.*, **178**, 27-47.
60. Cho,B.K., Wang,C., Sugawa,S., Eisen,H.N., and Chen,J., 1999. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 2976-2981.
61. Chouaib,S., Sselin-Paturel,C., Mami-Chouaib,F., Caignard,A., and Blay,J.Y., 1997. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol.Today*, **18**, 493-497.
62. Clark,E.D., 2001. Protein refolding for industrial processes. *Curr.Opin.Biotechnol.*, **12**, 202-207.
63. Clark,E.D.B., 1998a. Refolding of recombinant proteins. *Curr.Opin.Biotechnol.*, **9**, 157-163.
64. Clark,E.D.B., 1998b. Refolding of recombinant proteins. *Curr.Opin.Biotechnol.*, **9**, 157-163.
65. Cooper,D., Bansal-Pakala,P., and Croft,M., 2002. 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8 T cells in vivo but

- does not contribute to the development of cytotoxicity. *Eur.J.Immunol.*, **32**, 521-529.
66. Corr,M., Slanetz,A.E., Boyd,L.F., Jelonek,M.T., Khilko,S., Al-Ramadi,B.K., Kim,Y.S., Maher,S.E., Bothwell,A.L., and Margulies,D.H., 1994. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science*, **265**, 946-949.
 67. Coulie,P.G., Brichard,V., Van,P.A., Wolfel,T., Schneider,J., Traversari,C., Mattei,S., De,P.E., Lurquin,C., Szikora,J.P., Renauld,J.C., and Boon,T., 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J.Exp.Med.*, **180**, 35-42.
 68. Cox,A.L., Skipper,J., Chen,Y., Henderson,R.A., Darrow,T.L., Shabanowitz,J., Engelhard,V.H., Hunt,D.F., and Slingluff,C.L., Jr., 1994. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science*, **264**, 716-719.
 69. Croft,M., 2003b. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat.Rev.Immunol.*, **3**, 609-620.
 70. Croft,M., 2003a. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat.Rev.Immunol.*, **3**, 609-620.
 71. Croft,M. and Swain,S.L., 1991. B cell response to T helper cell subsets. II. Both the stage of T cell differentiation and the cytokines secreted determine the extent and nature of helper activity. *J.Immunol.*, **147**, 3679-3689.
 72. Czerkinsky,C.C., Nilsson,L.A., Nygren,H., Ouchterlony,O., and Tarkowski,A., 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J.Immunol.Methods*, **65**, 109-121.
 73. Daniels,M.A. and Jameson,S.C., 2000. Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers. *J.Exp.Med.*, **191**, 335-346.
 74. Darrah,P.A., Patel,D.T., De Luca,P.M., Lindsay,R.W., Davey,D.F., Flynn,B.J., Hoff,S.T., Andersen,P., Reed,S.G., Morris,S.L., Roederer,M., and Seder,R.A., 2007. Multifunctional TH1 cells define

- a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat.Med*, **13**, 843-850.
75. Davis,I.D., Skak,K., Smyth,M.J., Kristjansen,P.E., Miller,D.M., and Sivakumar,P.V., 2007. Interleukin-21 signaling: functions in cancer and autoimmunity. *Clin.Cancer Res.*, **13**, 6926-6932.
76. Davis,M.M. and Bjorkman,P.J., 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, **334**, 395-402.
77. de Bree,G.J., van Leeuwen,E.M., Out,T.A., Jansen,H.M., Jonkers,R.E., and van Lier,R.A., 2005. Selective accumulation of differentiated CD8+ T cells specific for respiratory viruses in the human lung. *J.Exp.Med.*, **202**, 1433-1442.
78. De Rosa,S.C., Lu,F.X., Yu,J., Perfetto,S.P., Falloon,J., Moser,S., Evans,T.G., Koup,R., Miller,C.J., and Roederer,M., 2004. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. *J Immunol.*, **173**, 5372-5380.
79. de,J.R., Loenen,W.A., Brouwer,M., van,E.L., de Vries,E.F., Borst,J., and van Lier,R.A., 1991. Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors. *J.Immunol.*, **146**, 2488-2494.
80. De,P.E., Lurquin,C., Van,P.A., Mariame,B., Szikora,J.P., Wolfel,T., Sibille,C., Chomez,P., and Boon,T., 1988. Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **85**, 2274-2278.
81. Del,P.G., De,C.M., D'Elis,M.M., Daniel,K.C., Almerigogna,F., Alderson,M., Smith,C.A., Thomas,E., and Romagnani,S., 1995. CD30-mediated signaling promotes the development of human T helper type 2-like T cells. *J.Exp.Med.*, **182**, 1655-1661.
82. Deng,Y., Yewdell,J.W., Eisenlohr,L.C., and Bennink,J.R., 1997b. 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.*, **158**, 1507-1515.
83. Deng,Y., Yewdell,J.W., Eisenlohr,L.C., and Bennink,J.R., 1997a. 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.*, **158**, 1507-1515.
84. Dengjel,J., Schoor,O., Fischer,R., Reich,M., Kraus,M., Muller,M., Kreymborg,K., Altenberend,F., Brandenburg,J., Kalbacher,H., Brock,R., Driessen,C., Rammensee,H.G., and Stevanovic,S., 2005. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **102**, 7922-7927.
 85. Denkberg,G., Cohen,C.J., and Reiter,Y., 2001. Critical role for CD8 in binding of MHC tetramers to TCR: CD8 antibodies block specific binding of human tumor-specific MHC-peptide tetramers to TCR. *J.Immunol.*, **167**, 270-276.
 86. Denning,D.W., 1996. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin.Infect.Dis.*, **23**, 608-615.
 87. Derbinski,J., Gabler,J., Brors,B., Tierling,S., Jonnakuty,S., Hergenahn,M., Peltonen,L., Walter,J., and Kyewski,B., 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J.Exp.Med.*, **202**, 33-45.
 88. Diamond,R.D., Huber,E., and Haudenschild,C.C., 1983. Mechanisms of destruction of *Aspergillus fumigatus* hyphae mediated by human monocytes. *J.Infect.Dis.*, **147**, 474-483.
 89. Ding,Y.H., Smith,K.J., Garboczi,D.N., Utz,U., Biddison,W.E., and Wiley,D.C., 1998. Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity.*, **8**, 403-411.
 90. Dovhey,S.E., Ghosh,N.S., and Wright,K.L., 2000. Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res.*, **60**, 5789-5796.
 91. Dudley,M.E., Wunderlich,J.R., Yang,J.C., Hwu,P., Schwartzenuber,D.J., Topalian,S.L., Sherry,R.M., Marincola,F.M., Leitman,S.F., Seipp,C.A., Rogers-Freezer,L., Morton,K.E., Nahvi,A., Mavroukakis,S.A., White,D.E., and Rosenberg,S.A., 2002. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J.Immunother.*, **25**, 243-251.

92. Ehrlich,R. and Lemonnier,F.A., 2000. HFE--a novel nonclassical class I molecule that is involved in iron metabolism. *Immunity.*, **13**, 585-588.
93. Eisenlohr,L.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R., 1992. Flanking sequences influence the presentation of an endogenously synthesized peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J.Exp.Med.*, **175**, 481-487.
94. Ellis,T.M., Simms,P.E., Slivnick,D.J., Jack,H.M., and Fisher,R.I., 1993. CD30 is a signal-transducing molecule that defines a subset of human activated CD45RO+ T cells. *J.Immunol.*, **151**, 2380-2389.
95. Alexander-Miller,M.A., 2005. High-avidity CD8+ T cells: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunol.Res.*, **31**, 13-24.
96. Alexander-Miller,M.A., Leggatt,G.R., and Berzofsky,J.A., 1996b. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **93**, 4102-4107.
97. Alexander-Miller,M.A., Leggatt,G.R., and Berzofsky,J.A., 1996a. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **93**, 4102-4107.
98. Falk,K., Rotzschke,O., Stevanovic,S., Jung,G., and Rammensee,H.G., 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, **351**, 290-296.
99. Falk,K., Rotzschke,O., Stevanovic,S., Jung,G., and Rammensee,H.G., 2006. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. 1991. *J.Immunol.*, **177**, 2741-2747.
100. Faria,A.M. and Weiner,H.L., 2005. Oral tolerance. *Immunol.Rev.*, **206**, 232-259.
101. Faroudi,M., Utzny,C., Salio,M., Cerundolo,V., Guiraud,M., Muller,S., and Valitutti,S., 2003. Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic

- T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **100**, 14145-14150.
102. Ferrara,N., Gerber,H.P., and LeCouter,J., 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med.*, **9**, 669-676.
 103. Ferrara,N., Houck,K.A., Jakeman,L.B., Winer,J., and Leung,D.W., 1991. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J.Cell Biochem.*, **47**, 211-218.
 104. Ferrara,N. and Davis-Smyth,T., 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr.Rev.*, **18**, 4-25.
 105. Fisk,B., Blevins,T.L., Wharton,J.T., and Ioannides,C.G., 1995. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp.Med*, **181**, 2109-2117.
 106. Folkman,J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N.Engl.J.Med.*, **285**, 1182-1186.
 107. Fontenot,J.D. and Rudensky,A.Y., 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat.Immunol.*, **6**, 331-337.
 108. Frensch,M., Arbach,O., Kirchhoff,D., Moewes,B., Worm,M., Rothe,M., Scheffold,A., and Thiel,A., 2005. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat.Med.*, **11**, 1118-1124.
 109. Futagawa,T., Akiba,H., Kodama,T., Takeda,K., Hosoda,Y., Yagita,H., and Okumura,K., 2002. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int.Immunol.*, **14**, 275-286.
 110. Galkina,E., Tanousis,K., Preece,G., Tolaini,M., Kioussis,D., Florey,O., Haskard,D.O., Tedder,T.F., and Ager,A., 2003. L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes. *J.Exp.Med.*, **198**, 1323-1335.
 111. Gao,G.F., Tormo,J., Gerth,U.C., Wyer,J.R., McMichael,A.J., Stuart,D.I., Bell,J.I., Jones,E.Y., and Jakobsen,B.K., 1997. Crystal

- structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature*, **387**, 630-634.
112. Garboczi,D.N., Ghosh,P., Utz,U., Fan,Q.R., Biddison,W.E., and Wiley,D.C., 1996a. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*, **384**, 134-141.
 113. Garboczi,D.N., Ghosh,P., Utz,U., Fan,Q.R., Biddison,W.E., and Wiley,D.C., 1996b. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*, **384**, 134-141.
 114. Garboczi,D.N., Hung,D.T., and Wiley,D.C., 1992. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **89**, 3429-3433.
 115. Garcia,K.C., Degano,M., Pease,L.R., Huang,M., Peterson,P.A., Teyton,L., and Wilson,I.A., 1998. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science*, **279**, 1166-1172.
 116. Garlanda,C., Hirsch,E., Bozza,S., Salustri,A., De,A.M., Nota,R., Maccagno,A., Riva,F., Bottazzi,B., Peri,G., Doni,A., Vago,L., Botto,M., De,S.R., Carminati,P., Siracusa,G., Altruda,F., Vecchi,A., Romani,L., and Mantovani,A., 2002. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*, **420**, 182-186.
 117. Garni-Wagner,B.A., Lee,Z.H., Kim,Y.J., Wilde,C., Kang,C.Y., and Kwon,B.S., 1996. 4-1BB is expressed on CD45RAhiROhi transitional T cell in humans. *Cell Immunol.*, **169**, 91-98.
 118. Garrido,F., Cabrera,T., Concha,A., Glew,S., Ruiz-Cabello,F., and Stern,P.L., 1993. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol.Today*, **14**, 491-499.
 119. Ge,Q., Rao,V.P., Cho,B.K., Eisen,H.N., and Chen,J., 2001. Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/ MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 1728-1733.

120. Geels,M.J., Jansen,C.A., Baan,E., De,C., I, van Schijndel,G.J., Schuitemaker,H., Goudsmit,J., Pollakis,G., Miedema,F., Paxton,W.A., and van,B.D., 2006. CTL escape and increased viremia irrespective of HIV-specific CD4+ T-helper responses in two HIV-infected individuals. *Virology*, **345**, 209-219.
121. Geginat,J., Lanzavecchia,A., and Sallusto,F., 2003. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, **101**, 4260-4266.
122. Gerber,H.P., Dixit,V., and Ferrara,N., 1998. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.*, **273**, 13313-13316.
123. Gershon,R.K. and Kondo,K., 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology*, **21**, 903-914.
124. Gilfillan,M.C., Noel,P.J., Podack,E.R., Reiner,S.L., and Thompson,C.B., 1998. Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J.Immunol.*, **160**, 2180-2187.
125. Gottschalk,S., Heslop,H.E., and Rooney,C.M., 2005. Adoptive immunotherapy for EBV-associated malignancies. *Leuk.Lymphoma*, **46**, 1-10.
126. Grakoui,A., Bromley,S.K., Sumen,C., Davis,M.M., Shaw,A.S., Allen,P.M., and Dustin,M.L., 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, **285**, 221-227.
127. Gravestien,L.A., Blom,B., Nolten,L.A., De,V.E., van der Bruggen ,H.G., Ossendorp,F., Borst,J., and Loenen,W.A., 1993. Cloning and expression of murine CD27: comparison with 4-1BB, another lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family. *Eur.J.Immunol.*, **23**, 943-950.
128. Graziutti,M.L., Rex,J.H., Cowart,R.E., Anaissie,E.J., Ford,A., and Savary,C.A., 1997. *Aspergillus fumigatus* conidia induce a Th1-type cytokine response. *J.Infect.Dis.*, **176**, 1579-1583.

129. Groothuis,T.A. and Neefjes,J., 2005. The many roads to cross-presentation. *J Exp.Med*, **202**, 1313-1318.
130. Gross,S. and Walden,P., 2008. Immunosuppressive mechanisms in human tumors: why we still cannot cure cancer. *Immunol.Lett.*, **116**, 7-14.
131. Grufman,P., Sandberg,J.K., Wolpert,E.Z., and Karre,K., 1999a. Immunization with dendritic cells breaks immunodominance in CTL responses against minor histocompatibility and synthetic peptide antigens. *J.Leukoc.Biol.*, **66**, 268-271.
132. Grufman,P., Wolpert,E.Z., Sandberg,J.K., and Karre,K., 1999b. T cell competition for the antigen-presenting cell as a model for immunodominance in the cytotoxic T lymphocyte response against minor histocompatibility antigens. *Eur.J.Immunol.*, **29**, 2197-2204.
133. Guelly,C., Kupcu,Z., Zalusky,D., Karner,M., Zehetner,M., and Schweighoffer,T., 2002. Activation requirements of circulating antigen-specific human CD8(+) memory T cells probed with insect cell-based artificial antigen-presenting cells. *Eur.J.Immunol.*, **32**, 182-192.
134. Guerder,S., Meyerhoff,J., and Flavell,R., 1994. The role of the T cell costimulator B7-1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen. *Immunity.*, **1**, 155-166.
135. Gunn,M.D., Tangemann,K., Tam,C., Cyster,J.G., Rosen,S.D., and Williams,L.T., 1998. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **95**, 258-263.
136. Hahne,M., Rimoldi,D., Schroter,M., Romero,P., Schreier,M., French,L.E., Schneider,P., Bornand,T., Fontana,A., Lienard,D., Cerottini,J., and Tschopp,J., 1996. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, **274**, 1363-1366.
137. Harris,N.L. and Ronchese,F., 1999. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol.Cell Biol.*, **77**, 304-311.

138. Hayday,A.C., Roberts,S., and Ramsburg,E., 2000. gammadelta cells and the regulation of mucosal immune responses. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, **162**, S161-S163.
139. He,X.S., Rehermann,B., Lopez-Labrador,F.X., Boisvert,J., Cheung,R., Mumm,J., Wedemeyer,H., Berenguer,M., Wright,T.L., Davis,M.M., and Greenberg,H.B., 1999a. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 5692-5697.
140. He,X.S., Rehermann,B., Lopez-Labrador,F.X., Boisvert,J., Cheung,R., Mumm,J., Wedemeyer,H., Berenguer,M., Wright,T.L., Davis,M.M., and Greenberg,H.B., 1999b. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 5692-5697.
141. Heath,W.R. and Carbone,F.R., 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu.Rev.Immunol.*, **19**, 47-64.
142. Hendriks,J., Gravestein,L.A., Tesselaar,K., van Lier,R.A., Schumacher,T.N., and Borst,J., 2000. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat.Immunol.*, **1**, 433-440.
143. Henkart,P.A., 1994. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity.*, **1**, 343-346.
144. Hermans,I.F., Silk,J.D., Yang,J., Palmowski,M.J., Gileadi,U., McCarthy,C., Salio,M., Ronchese,F., and Cerundolo,V., 2004. The VITAL assay: a versatile fluorometric technique for assessing CTL- and NKT-mediated cytotoxicity against multiple targets in vitro and in vivo. *J.Immunol.Methods*, **285**, 25-40.
145. Hintzen,R.Q., Lens,S.M., Lammers,K., Kuiper,H., Beckmann,M.P., and van Lier,R.A., 1995. Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation. *J.Immunol.*, **154**, 2612-2623.
146. Hori,S., Nomura,T., and Sakaguchi,S., 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, **299**, 1057-1061.

147. Houck,K.A., Leung,D.W., Rowland,A.M., Winer,J., and Ferrara,N., 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J.Biol.Chem.*, **267**, 26031-26037.
148. Hughes,E.A., Hammond,C., and Cresswell,P., 1997. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 1896-1901.
149. Hunder,N.N., Wallen,H., Cao,J., Hendricks,D.W., Reilly,J.Z., Rodmyre,R., Jungbluth,A., Gnjjatic,S., Thompson,J.A., and Yee,C., 2008. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N.Engl.J Med*, **358**, 2698-2703.
150. Ibrahim-Granet,O., Philippe,B., Boleti,H., Boisvieux-Ulrich,E., Grenet,D., Stern,M., and Latge,J.P., 2003. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect.Immun.*, **71**, 891-903.
151. Irvine,D.J., Purbhoo,M.A., Krogsaaard,M., and Davis,M.M., 2002. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature*, **419**, 845-849.
152. Itoh,M., Takahashi,T., Sakaguchi,N., Kuniyasu,Y., Shimizu,J., Otsuka,F., and Sakaguchi,S., 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J.Immunol.*, **162**, 5317-5326.
153. Jacobsen,J., Grankvist,K., Rasmuson,T., Bergh,A., Landberg,G., and Ljungberg,B., 2004. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU.Int.*, **93**, 297-302.
154. Jäger,E., Ringhoffer,M., Altmannsberger,M., Arand,M., Karbach,J., Jager,D., Oesch,F., and Knuth,A., 1997. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int.J.Cancer*, **71**, 142-147.
155. Janeway,C.A., Jr., 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu.Rev.Immunol.*, **10**, 645-674.

156. Jang,M.H., Sougawa,N., Tanaka,T., Hirata,T., Hiroi,T., Tohya,K., Guo,Z., Umemoto,E., Ebisuno,Y., Yang,B.G., Seoh,J.Y., Lipp,M., Kiyono,H., and Miyasaka,M., 2006. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J.Immunol.*, **176**, 803-810.
157. Jensen,P.E., 1999. Mechanisms of antigen presentation. *Clin.Chem.Lab Med.*, **37**, 179-186.
158. Kaech,S.M. and Ahmed,R., 2001. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat.Immunol.*, **2**, 415-422.
159. Kannanganat,S., Ibegbu,C., Chennareddi,L., Robinson,H.L., and Amara,R.R., 2007. Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *J Virol.*, **81**, 8468-8476.
160. Kedl,R.M., Rees,W.A., Hildeman,D.A., Schaefer,B., Mitchell,T., Kappler,J., and Marrack,P., 2000. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J.Exp.Med.*, **192**, 1105-1113.
161. Kedl,R.M., Schaefer,B.C., Kappler,J.W., and Marrack,P., 2002. T cells down-modulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo. *Nat.Immunol.*, **3**, 27-32.
162. Kedzierska,K., La Gruta,N.L., Davenport,M.P., Turner,S.J., and Doherty,P.C., 2005. Contribution of T cell receptor affinity to overall avidity for virus-specific CD8+ T cell responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **102**, 11432-11437.
163. Kennedy,C., Sebire,K., de Kretser,D.M., and O'Bryan,M.K., 2004a. Human sperm associated antigen 4 (SPAG4) is a potential cancer marker. *Cell Tissue Res.*, **315**, 279-283.
164. Kennedy,C., Sebire,K., de Kretser,D.M., and O'Bryan,M.K., 2004b. Human sperm associated antigen 4 (SPAG4) is a potential cancer marker. *Cell Tissue Res.*, **315**, 279-283.
165. Kennedy,C., Sebire,K., de Kretser,D.M., and O'Bryan,M.K., 2004c. Human sperm associated antigen 4 (SPAG4) is a potential cancer marker. *Cell Tissue Res.*, **315**, 279-283.

166. Kersh, E.N., Shaw, A.S., and Allen, P.M., 1998. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science*, **281**, 572-575.
167. Keyt, B.A., Berleau, L.T., Nguyen, H.V., Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R., and Ferrara, N., 1996. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem.*, **271**, 7788-7795.
168. Khanna, R., Burrows, S.R., Steigerwald-Mullen, P.M., Thomson, S.A., Kurilla, M.G., and Moss, D.J., 1995. Isolation of cytotoxic T lymphocytes from healthy seropositive individuals specific for peptide epitopes from Epstein-Barr virus nuclear antigen 1: implications for viral persistence and tumor surveillance. *Virology*, **214**, 633-637.
169. Kirberg, J., Berns, A., and von, B.H., 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J. Exp. Med.*, **186**, 1269-1275.
170. Klausner, R.D., Donaldson, J.G., and Lippincott-Schwartz, J., 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.*, **116**, 1071-1080.
171. Kloetzel, P.M., 2004. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. Biophys. Acta*, **1695**, 225-233.
172. Knutson, K.L. and Disis, M.L., 2005b. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, **54**, 721-728.
173. Knutson, K.L. and Disis, M.L., 2005a. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, **54**, 721-728.
174. Koppelman, S.J., Lakemond, C.M., Vlooswijk, R., and Hefle, S.L., 2004. Detection of soy proteins in processed foods: literature overview and new experimental work. *J. AOAC Int.*, **87**, 1398-1407.
175. Krummel, M.F. and Davis, M.M., 2002. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr. Opin. Immunol.*, **14**, 66-74.

176. Kuhober,A., Pudollek,H.P., Reifenberg,K., Chisari,F.V., Schlicht,H.J., Reimann,J., and Schirmbeck,R., 1996a. DNA immunization induces antibody and cytotoxic T cell responses to hepatitis B core antigen in H-2b mice. *J.Immunol.*, **156**, 3687-3695.
177. Kuhober,A., Pudollek,H.P., Reifenberg,K., Chisari,F.V., Schlicht,H.J., Reimann,J., and Schirmbeck,R., 1996b. DNA immunization induces antibody and cytotoxic T cell responses to hepatitis B core antigen in H-2b mice. *J.Immunol.*, **156**, 3687-3695.
178. Kundig,T.M., Bachmann,M.F., Oehen,S., Hoffmann,U.W., Simard,J.J., Kalberer,C.P., Pircher,H., Ohashi,P.S., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M., 1996. On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **93**, 9716-9723.
179. Kurup,V.P., Banerjee,B., Murali,P.S., Greenberger,P.A., Krishnan,M., Hari,V., and Fink,J.N., 1998. Immunodominant peptide epitopes of allergen, Asp f 1 from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Peptides*, **19**, 1469-1477.
180. Kurup,V.P. and Kumar,A., 1991. Immunodiagnosis of aspergillosis. *Clin.Microbiol.Rev.*, **4**, 439-456.
181. La Gruta,N.L., Kedzierska,K., Pang,K., Webby,R., Davenport,M., Chen,W., Turner,S.J., and Doherty,P.C., 2006. A virus-specific CD8+ T cell immunodominance hierarchy determined by antigen dose and precursor frequencies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **103**, 994-999.
182. Labrecque,N., Whitfield,L.S., Obst,R., Waltzinger,C., Benoist,C., and Mathis,D., 2001. How much TCR does a T cell need? *Immunity*, **15**, 71-82.
183. Lang,F. and Bodinier,M., 2001. MHC-peptide multimers: tools of choice for detecting and sorting antigen-specific T-cells. *Transfusion*, **41**, 687-690.
184. Latge,J.P., 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin.Microbiol.Rev.*, **12**, 310-350.
185. Latge,J.P., 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.*, **9**, 382-389.

186. Latouche, J.B. and Sadelain, M., 2000a. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 405-409.
187. Latouche, J.B. and Sadelain, M., 2000b. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 405-409.
188. Le, B.A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F., 2003. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.*, **4**, 1009-1015.
189. Lee, H.W., Park, S.J., Choi, B.K., Kim, H.H., Nam, K.O., and Kwon, B.S., 2002a. 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J. Immunol.*, **169**, 4882-4888.
190. Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M., and Shaw, A.S., 2002b. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science*, **295**, 1539-1542.
191. Lee, K.H., Wang, E., Nielsen, M.B., Wunderlich, J., Migueles, S., Connors, M., Steinberg, S.M., Rosenberg, S.A., and Marincola, F.M., 1999. Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression. *J. Immunol.*, **163**, 6292-6300.
192. Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A., 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.*, **14**, 233-258.
193. Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N., 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, **246**, 1306-1309.
194. Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D.L., and Vignali, D.A., 2000. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity*, **13**, 665-675.
195. Loffler, B.M. and Kunze, H., 1989. Refinement of the Coomassie brilliant blue G assay for quantitative protein determination. *Anal. Biochem.*, **177**, 100-102.

196. Lopez-Medrano,R., Ovejero,M.C., Calera,J.A., Puente,P., and Leal,F., 1995. *Aspergillus fumigatus* antigens. *Microbiology*, **141 (Pt 10)**, 2699-2704.
197. Lyons,A.B., 1999. Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol.Cell Biol.*, **77**, 509-515.
198. MacDonald,H.R., Radtke,F., and Wilson,A., 2001. T cell fate specification and alphabeta/gammadelta lineage commitment. *Curr.Opin.Immunol.*, **13**, 219-224.
199. Madden,D.R., Garboczi,D.N., and Wiley,D.C., 1993. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell*, **75**, 693-708.
200. Maenaka,K. and Jones,E.Y., 1999. MHC superfamily structure and the immune system. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, **9**, 745-753.
201. Mahnke,Y.D. and Roederer,M., 2007. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin.Lab Med.*, **27**, 469-85, v.
202. Marin,R., Ruiz-Cabello,F., Pedrinaci,S., Mendez,R., Jimenez,P., Geraghty,D.E., and Garrido,F., 2003. Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics*, **54**, 767-775.
203. Masopust,D., Vezys,V., Marzo,A.L., and Lefrancois,L., 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*, **291**, 2413-2417.
204. Matsui,K., Boniface,J.J., Steffner,P., Reay,P.A., and Davis,M.M., 1994. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 12862-12866.
205. Matsumoto,T. and Mugishima,H., 2006. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J.Atheroscler.Thromb.*, **13**, 130-135.
206. McHugh,R.S., Whitters,M.J., Piccirillo,C.A., Young,D.A., Shevach,E.M., Collins,M., and Byrne,M.C., 2002. CD4(+)/CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a

- functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.*, **16**, 311-323.
207. Melief,C.J., 1989. Dendritic cells as specialized antigen-presenting cells. *Res.Immunol.*, **140**, 902-906.
208. Mempel,T.R., Henrickson,S.E., and Von Andrian,U.H., 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, **427**, 154-159.
209. Michael,A. and Pandha,H.S., 2003. Renal-cell carcinoma: tumour markers, T-cell epitopes, and potential for new therapies. *Lancet Oncol.*, **4**, 215-223.
210. Mitchison,N.A., 1970. Immunologic approach to cancer. *Transplant.Proc*, **2**, 92-103.
211. Mohamedali,K.A., Poblenz,A.T., Sikes,C.R., Navone,N.M., Thorpe,P.E., Darnay,B.G., and Rosenblum,M.G., 2006. Inhibition of prostate tumor growth and bone remodeling by the vascular targeting agent VEGF121/rGel. *Cancer Res.*, **66**, 10919-10928.
212. Monks,C.R., Freiberg,B.A., Kupfer,H., Sciaky,N., and Kupfer,A., 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, **395**, 82-86.
213. Moretta,A., Bottino,C., Vitale,M., Pende,D., Biassoni,R., Mingari,M.C., and Moretta,L., 1996. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu.Rev.Immunol.*, **14**, 619-648.
214. Moron,G., Dadaglio,G., and Leclerc,C., 2004. New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol.*, **25**, 92-97.
215. Moser,B. and Brandes,M., 2006. Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC. *Trends Immunol.*, **27**, 112-118.
216. Mosmann,T.R. and Coffman,R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.*, **7**, 145-173.

-
217. Munoz-Fernandez,M.A., Pimentel-Muinos,F.X., Gonzalez,A., Gambon,F., varez-Vallina,L., and Fresno,M., 1992. Differential effect of tumour necrosis factor on human thymocyte subpopulations. *Immunology*, **76**, 439-445.
218. Murali-Krishna,K., Altman,J.D., Suresh,M., Sourdive,D.J., Zajac,A.J., Miller,J.D., Slansky,J., and Ahmed,R., 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity.*, **8**, 177-187.
219. Nakamura,K., Taguchi,E., Miura,T., Yamamoto,A., Takahashi,K., Bichat,F., Guilbaud,N., Hasegawa,K., Kubo,K., Fujiwara,Y., Suzuki,R., Kubo,K., Shibuya,M., and Isae,T., 2006. KRN951, a highly potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, has antitumor activities and affects functional vascular properties. *Cancer Res.*, **66**, 9134-9142.
220. Nakamura,T., Lee,R.K., Nam,S.Y., Al-Ramadi,B.K., Koni,P.A., Bottomly,K., Podack,E.R., and Flavell,R.A., 1997. Reciprocal regulation of CD30 expression on CD4+ T cells by IL-4 and IFN-gamma. *J.Immunol.*, **158**, 2090-2098.
221. Nastke,M.D., Herrgen,L., Walter,S., Wernet,D., Rammensee,H.G., and Stevanovic,S., 2005. Major contribution of codominant CD8 and CD4 T cell epitopes to the human cytomegalovirus-specific T cell repertoire. *Cell Mol.Life Sci.*, **62**, 77-86.
222. Nathan,P., Chao,D., Brock,C., Savage,P., Harries,M., Gore,M., and Eisen,T., 2006a. The place of VEGF inhibition in the current management of renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer*, **94**, 1217-1220.
223. Nathan,P., Chao,D., Brock,C., Savage,P., Harries,M., Gore,M., and Eisen,T., 2006b. The place of VEGF inhibition in the current management of renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer*, **94**, 1217-1220.
224. Neefjes,J.J., Momburg,F., and Hammerling,G.J., 1993. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*, **261**, 769-771.
225. Nestic,D. and Vukmanovic,S., 1998. MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8+ thymic emigrants. *J.Immunol.*, **160**, 3705-3712.

-
226. Nicol,D., Hii,S.I., Walsh,M., Teh,B., Thompson,L., Kennett,C., and Gotley,D., 1997. Vascular endothelial growth factor expression is increased in renal cell carcinoma. *J.Urol.*, **157**, 1482-1486.
227. Nielsen,M.B., Monsurro,V., Migueles,S.A., Wang,E., Perez-Diez,A., Lee,K.H., Kammula,U., Rosenberg,S.A., and Marincola,F.M., 2000. Status of activation of circulating vaccine-elicited CD8+ T cells. *J.Immunol.*, **165**, 2287-2296.
228. Nishimura,H., Yajima,T., Muta,H., Podack,E.R., Tani,K., and Yoshikai,Y., 2005. A novel role of CD30/CD30 ligand signaling in the generation of long-lived memory CD8+ T cells. *J.Immunol.*, **175**, 4627-4634.
229. Novellino,L., Castelli,C., and Parmiani,G., 2005. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol.Immunother.*, **54**, 187-207.
230. Nussbaum,A.K., Kuttler,C., Hadelers,K.P., Rammensee,H.G., and Schild,H., 2001. PProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics*, **53**, 87-94.
231. O'Garra,A. and Arai,N., 2000. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.*, **10**, 542-550.
232. Ochsenbein,A.F., Pinschewer,D.D., Odermatt,B., Carroll,M.C., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M., 1999. Protective T cell-independent antiviral antibody responses are dependent on complement. *J.Exp.Med.*, **190**, 1165-1174.
233. Ortman,B., Copeman,J., Lehner,P.J., Sadasivan,B., Herberg,J.A., Grandea,A.G., Riddell,S.R., Tampe,R., Spies,T., Trowsdale,J., and Cresswell,P., 1997. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science*, **277**, 1306-1309.
234. Owyang,A.M., Zaph,C., Wilson,E.H., Guild,K.J., McClanahan,T., Miller,H.R., Cua,D.J., Goldschmidt,M., Hunter,C.A., Kastelein,R.A., and Artis,D., 2006. Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J.Exp.Med.*, **203**, 843-849.

-
235. Paludan,C., Bickham,K., Nikiforow,S., Tsang,M.L., Goodman,K., Hanekom,W.A., Fonteneau,J.F., Stevanovic,S., and Munz,C., 2002. Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J.Immunol.*, **169**, 1593-1603.
236. Pamer,E. and Cresswell,P., 1998. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu.Rev.Immunol.*, **16**, 323-358.
237. Pantel,K., Schlimok,G., Angstwurm,M., Passlick,B., Izbicki,J.R., Johnson,J.P., and Riethmuller,G., 1995. Early metastasis of human solid tumours: expression of cell adhesion molecules. *Ciba Found.Symp.*, **189**, 157-170.
238. Parker,D.C., 1993. The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin.Immunol.*, **5**, 413-420.
239. Parker,K.C., Bednarek,M.A., and Coligan,J.E., 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol.*, **152**, 163-175.
240. Perfetto,S.P., Chattopadhyay,P.K., and Roederer,M., 2004. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat.Rev.Immunol.*, **4**, 648-655.
241. Peters,B., Bulik,S., Tampe,R., Van Endert,P.M., and Holzhutter,H.G., 2003. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J.Immunol.*, **171**, 1741-1749.
242. Picker,L.J., 1994. Control of lymphocyte homing. *Curr.Opin.Immunol.*, **6**, 394-406.
243. Pieters,J., 1997. MHC class II compartments: specialized organelles of the endocytic pathway in antigen presenting cells. *Biol.Chem.*, **378**, 751-758.
244. Plouet,J., Schilling,J., and Gospodarowicz,D., 1989. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.*, **8**, 3801-3806.
245. Podack,E.R., Strbo,N., Sotosec,V., and Muta,H., 2002. CD30-governor of memory T cells? *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **975**, 101-113.

-
246. Pollok, K.E., Kim, S.H., and Kwon, B.S., 1995. Regulation of 4-1BB expression by cell-cell interactions and the cytokines, interleukin-2 and interleukin-4. *Eur.J.Immunol.*, **25**, 488-494.
247. Polverino, A., Coxon, A., Starnes, C., Diaz, Z., DeMelfi, T., Wang, L., Bready, J., Estrada, J., Cattley, R., Kaufman, S., Chen, D., Gan, Y., Kumar, G., Meyer, J., Neervannan, S., Alva, G., Talvenheimo, J., Montestruque, S., Tasker, A., Patel, V., Radinsky, R., and Kendall, R., 2006. AMG 706, an oral, multikinase inhibitor that selectively targets vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and kit receptors, potently inhibits angiogenesis and induces regression in tumor xenografts. *Cancer Res.*, **66**, 8715-8721.
248. Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M., and Ferrara, N., 1997b. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.*, **57**, 4593-4599.
249. Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M., and Ferrara, N., 1997a. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.*, **57**, 4593-4599.
250. Probst, H.C., Tschannen, K., Gallimore, A., Martinic, M., Basler, M., Dumrese, T., Jones, E., and van den Broek, M.F., 2003. Immunodominance of an antiviral cytotoxic T cell response is shaped by the kinetics of viral protein expression. *J.Immunol.*, **171**, 5415-5422.
251. Rammensee, H.G., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A., and Stevanovic, S., 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, **50**, 213-219.
252. Rammensee, H.G., Falk, K., and Rotzschke, O., 1993. MHC molecules as peptide receptors. *Curr.Opin.Immunol.*, **5**, 35-44.
253. Randolph, G.J., Angeli, V., and Swartz, M.A., 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat.Rev.Immunol.*, **5**, 617-628.
254. Rees, W., Bender, J., Teague, T.K., Kedl, R.M., Crawford, F., Marrack, P., and Kappler, J., 1999. An inverse relationship between T

- cell receptor affinity and antigen dose during CD4(+) T cell responses in vivo and in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 9781-9786.
255. Reinhardt,R.L., Khoruts,A., Merica,R., Zell,T., and Jenkins,M.K., 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*, **410**, 101-105.
256. Renkvist,N., Castelli,C., Robbins,P.F., and Parmiani,G., 2001. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol.Immunother.*, **50**, 3-15.
257. Rensing,M.E., Sette,A., Brandt,R.M., Ruppert,J., Wentworth,P.A., Hartman,M., Oseroff,C., Grey,H.M., Melief,C.J., and Kast,W.M., 1995. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J.Immunol.*, **154**, 5934-5943.
258. Ridge,J.P., Di,R.F., and Matzinger,P., 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*, **393**, 474-478.
259. Robbins,P.F., El-Gamil,M., Li,Y.F., Kawakami,Y., Loftus,D., Appella,E., and Rosenberg,S.A., 1996. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J.Exp.Med.*, **183**, 1185-1192.
260. Roederer,M., 2001. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*, **45**, 194-205.
261. Rogers,P.R., Dubey,C., and Swain,S.L., 2000. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J.Immunol.*, **164**, 2338-2346.
262. Romagnani,S., 2006a. Regulation of the T cell response. *Clin.Exp.Allergy*, **36**, 1357-1366.
263. Romagnani,S., 2006b. Regulation of the T cell response. *Clin.Exp.Allergy*, **36**, 1357-1366.

-
264. Romani,L., 1997. The T cell response against fungal infections. *Curr.Opin.Immunol.*, **9**, 484-490.
265. Rooke,R., Waltzinger,C., Benoist,C., and Mathis,D., 1997. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity.*, **7**, 123-134.
266. Rosa,P., Mantovani,S., Rosboch,R., and Huttner,W.B., 1992. Monensin and brefeldin A differentially affect the phosphorylation and sulfation of secretory proteins. *J.Biol.Chem.*, **267**, 12227-12232.
267. Rosenberg,S.A., 1999. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity.*, **10**, 281-287.
268. Rowen,L., Koop,B.F., and Hood,L., 1996. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science*, **272**, 1755-1762.
269. Rudolf,D., Silberzahn,T., Walter,S., Maurer,D., Engelhard,J., Wernet,D., Buhring,H.J., Jung,G., Kwon,B.S., Rammensee,H.G., and Stevanovic,S., 2008b. Potent costimulation of human CD8 T cells by anti-4-1BB and anti-CD28 on synthetic artificial antigen presenting cells. *Cancer Immunol.Immunother.*, **57**, 175-183.
270. Rudolf,D., Silberzahn,T., Walter,S., Maurer,D., Engelhard,J., Wernet,D., Buhring,H.J., Jung,G., Kwon,B.S., Rammensee,H.G., and Stevanovic,S., 2008a. Potent costimulation of human CD8 T cells by anti-4-1BB and anti-CD28 on synthetic artificial antigen presenting cells. *Cancer Immunol.Immunother.*, **57**, 175-183.
271. Ruhrberg,C., Gerhardt,H., Golding,M., Watson,R., Ioannidou,S., Fujisawa,H., Betsholtz,C., and Shima,D.T., 2002. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.*, **16**, 2684-2698.
272. Russell,J.H. and Ley,T.J., 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu.Rev.Immunol.*, **20**, 323-370.
273. Sachdeva,N. and Asthana,D., 2007. Cytokine quantitation: technologies and applications. *Front Biosci.*, **12**, 4682-4695.

-
274. Safdar,A., 2007. Antifungal immunity and adjuvant cytokine immune enhancement in cancer patients with invasive fungal infections. *Clin.Microbiol.Infect.*, **13**, 1-4.
275. Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M., and Toda,M., 1995a. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.*, **155**, 1151-1164.
276. Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M., and Toda,M., 1995b. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.*, **155**, 1151-1164.
277. Sallusto,F., Lenig,D., Forster,R., Lipp,M., and Lanzavecchia,A., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, **401**, 708-712.
278. Saper,M.A., Bjorkman,P.J., and Wiley,D.C., 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 A resolution. *J.Mol.Biol.*, **219**, 277-319.
279. Savage,P., Gao,L., Vento,K., Cowburn,P., Man,S., Steven,N., Ogg,G., McMichael,A., Epenetos,A., Goulmy,E., and Stauss,H.J., 2004. Use of B cell-bound HLA-A2 class I monomers to generate high-avidity, allo-restricted CTLs against the leukemia-associated protein Wilms tumor antigen. *Blood*, **103**, 4613-4615.
280. Savage,P.A., Boniface,J.J., and Davis,M.M., 1999. A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response. *Immunity.*, **10**, 485-492.
281. Scanlan,M.J., Gure,A.O., Jungbluth,A.A., Old,L.J., and Chen,Y.T., 2002. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol.Rev.*, **188**, 22-32.
282. Scanlan,M.J., Simpson,A.J., and Old,L.J., 2004. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.*, **4**, 1.

283. Schatz,P.J., 1993. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N.Y.)*, **11**, 1138-1143.
284. Scheibenbogen,C., Romero,P., Rivoltini,L., Herr,W., Schmittel,A., Cerottini,J.C., Woelfel,T., Eggermont,A.M., and Keilholz,U., 2000b. 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*, **244**, 81-89.
285. Scheibenbogen,C., Romero,P., Rivoltini,L., Herr,W., Schmittel,A., Cerottini,J.C., Woelfel,T., Eggermont,A.M., and Keilholz,U., 2000a. 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*, **244**, 81-89.
286. Schluns,K.S., Kieper,W.C., Jameson,S.C., and Lefrancois,L., 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat.Immunol.*, **1**, 426-432.
287. Schoenberger,S.P., Toes,R.E., van,d., V, Offringa,R., and Melief,C.J., 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, **393**, 480-483.
288. Schrader,A.J., Varga,Z., Pfoertner,S., Goelden,U., Buer,J., and Hofmann,R., 2006b. Treatment targeted at vascular endothelial growth factor: a promising approach to managing metastatic kidney cancer. *BJU.Int.*, **97**, 461-465.
289. Schrader,A.J., Varga,Z., Pfoertner,S., Goelden,U., Buer,J., and Hofmann,R., 2006a. Treatment targeted at vascular endothelial growth factor: a promising approach to managing metastatic kidney cancer. *BJU.Int.*, **97**, 461-465.
290. Schroder,M. and Bowie,A.G., 2005. TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends Immunol.*, **26**, 462-468.
291. Schubert,U., Anton,L.C., Gibbs,J., Norbury,C.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R., 2000a. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, **404**, 770-774.

292. Schubert,U., Ott,D.E., Chertova,E.N., Welker,R., Tessmer,U., Princiotta,M.F., Bennink,J.R., Krausslich,H.G., and Yewdell,J.W., 2000b. Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 13057-13062.
293. Schulz,O., Diebold,S.S., Chen,M., Naslund,T.I., Nolte,M.A., Alexopoulou,L., Azuma,Y.T., Flavell,R.A., Liljestrom,P., and Reis e Sousa, 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*, **433**, 887-892.
294. Seddon,B. and Mason,D., 2000. The third function of the thymus. *Immunol.Today*, **21**, 95-99.
295. Sedgwick,J.D. and Holt,P.G., 1983. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J.Immunol.Methods*, **57**, 301-309.
296. Seliger,B., Maeurer,M.J., and Ferrone,S., 2000. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol.Today*, **21**, 455-464.
297. Senger,D.R., Galli,S.J., Dvorak,A.M., Perruzzi,C.A., Harvey,V.S., and Dvorak,H.F., 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, **219**, 983-985.
298. Serrano,A., Brady,C.S., Jimenez,P., Duggan-Keen,M.F., Mendez,R., Stern,P., Garrido,F., and Ruiz-Cabello,F., 2000. A mutation determining the loss of HLA-A2 antigen expression in a cervical carcinoma reveals novel splicing of human MHC class I classical transcripts in both tumoral and normal cells. *Immunogenetics*, **51**, 1047-1052.
299. Sette,A., Vitiello,A., Reheman,B., Fowler,P., Nayersina,R., Kast,W.M., Melief,C.J., Oseroff,C., Yuan,L., Ruppert,J., and ., 1994. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol.*, **153**, 5586-5592.
300. Shanebeck,K.D., Maliszewski,C.R., Kennedy,M.K., Picha,K.S., Smith,C.A., Goodwin,R.G., and Grabstein,K.H., 1995. Regulation of murine B cell growth and differentiation by CD30 ligand. *Eur.J.Immunol.*, **25**, 2147-2153.

-
301. Shao,X., Tarnasky,H.A., Lee,J.P., Oko,R., and van der Hoorn,F.A., 1999. Spag4, a novel sperm protein, binds outer dense-fiber protein Odf1 and localizes to microtubules of manchette and axoneme. *Dev.Biol.*, **211**, 109-123.
 302. Shevach,E.M., 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat.Rev.Immunol.*, **2**, 389-400.
 303. Shevach,E.M., 2006. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity.*, **25**, 195-201.
 304. Shinkai,Y., Rathbun,G., Lam,K.P., Oltz,E.M., Stewart,V., Mendelsohn,M., Charron,J., Datta,M., Young,F., Stall,A.M., and ., 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, **68**, 855-867.
 305. Shortman,K., Egerton,M., Spangrude,G.J., and Scollay,R., 1990. The generation and fate of thymocytes. *Semin.Immunol.*, **2**, 3-12.
 306. Shortman,K. and Wu,L., 1996. Early T lymphocyte progenitors. *Annu.Rev.Immunol.*, **14**, 29-47.
 307. Siaens,R., Eijsink,V.G., Dierckx,R., and Slegers,G., 2004. (123)I-Labeled chitinase as specific radioligand for in vivo detection of fungal infections in mice. *J.Nucl.Med.*, **45**, 1209-1216.
 308. Singh-Jasuja,H., Emmerich,N.P., and Rammensee,H.G., 2004. The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol.Immunother.*, **53**, 187-195.
 309. Smalley,D.M. and Ley,K., 2005. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J.Cell Mol.Med.*, **9**, 255-266.
 310. Solache,A., Morgan,C.L., Dodi,A.I., Morte,C., Scott,I., Baboonian,C., Zal,B., Goldman,J., Grundy,J.E., and Madrigal,J.A., 1999. Identification of three HLA-A*0201-restricted cytotoxic T cell epitopes in the cytomegalovirus protein pp65 that are conserved between eight strains of the virus. *J.Immunol.*, **163**, 5512-5518.
 311. Sprent,J., 1973. Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties. *Cell Immunol.*, **7**, 10-39.

-
312. Stalmans,I., Ng,Y.S., Rohan,R., Fruttiger,M., Bouche,A., Yuce,A., Fujisawa,H., Hermans,B., Shani,M., Jansen,S., Hicklin,D., Anderson,D.J., Gardiner,T., Hammes,H.P., Moons,L., Dewerchin,M., Collen,D., Carmeliet,P., and D'Amore,P.A., 2002. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J.Clin.Invest*, **109**, 327-336.
313. Starr,T.K., Daniels,M.A., Lucido,M.M., Jameson,S.C., and Hogquist,K.A., 2003a. Thymocyte sensitivity and supramolecular activation cluster formation are developmentally regulated: a partial role for sialylation. *J.Immunol.*, **171**, 4512-4520.
314. Starr,T.K., Jameson,S.C., and Hogquist,K.A., 2003b. Positive and negative selection of T cells. *Annu.Rev.Immunol.*, **21**, 139-176.
315. Stein,I., Itin,A., Einat,P., Skaliter,R., Grossman,Z., and Keshet,E., 1998. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol.Cell Biol.*, **18**, 3112-3119.
316. Steinman,R.M., Lustig,D.S., and Cohn,Z.A., 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J.Exp.Med.*, **139**, 1431-1445.
317. Stevanovic,S., 2002b. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat.Rev.Cancer*, **2**, 514-520.
318. Stevanovic,S., 2002a. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat.Rev.Cancer*, **2**, 514-520.
319. Stout,R.D. and Bottomly,K., 1989. Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J.Immunol.*, **142**, 760-765.
320. Surh,C.D. and Sprent,J., 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*, **372**, 100-103.
321. Taib,M., Pinney,J.W., Westhead,D.R., McDowall,K.J., and Adams,D.J., 2005. Differential expression and extent of fungal/plant and fungal/bacterial chitinases of *Aspergillus fumigatus*. *Arch.Microbiol.*, **184**, 78-81.

-
322. Tanchot,C., Rosado,M.M., Agenes,F., Freitas,A.A., and Rocha,B., 1997. Lymphocyte homeostasis. *Semin.Immunol.*, **9**, 331-337.
323. Tato,C.M., Laurence,A., and O'Shea,J.J., 2006. Helper T cell differentiation enters a new era: le roi est mort; vive le roi! *J.Exp.Med.*, **203**, 809-812.
324. Tato,C.M. and O'Shea,J.J., 2006. Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature*, **441**, 166-168.
325. Tee,M.K. and Jaffe,R.B., 2001. A precursor form of vascular endothelial growth factor arises by initiation from an upstream in-frame CUG codon. *Biochem.J.*, **359**, 219-226.
326. Tenzer,S., Peters,B., Bulik,S., Schoor,O., Lemmel,C., Schatz,M.M., Kloetzel,P.M., Rammensee,H.G., Schild,H., and Holzhutter,H.G., 2005. Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *Cell Mol.Life Sci.*, **62**, 1025-1037.
327. Thornton,A.D., Ravn,P., Winslet,M., and Chester,K., 2006. Angiogenesis inhibition with bevacizumab and the surgical management of colorectal cancer. *Br.J.Surg.*, **93**, 1456-1463.
328. Tischer,E., Mitchell,R., Hartman,T., Silva,M., Gospodarowicz,D., Fiddes,J.C., and Abraham,J.A., 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J.Biol.Chem.*, **266**, 11947-11954.
329. Toes,R.E., Schoenberger,S.P., van,d., V, Offringa,R., and Melief,C.J., 1998. CD40-CD40Ligand interactions and their role in cytotoxic T lymphocyte priming and anti-tumor immunity. *Semin.Immunol.*, **10**, 443-448.
330. Torres,M.J., Ruiz-Cabello,F., Skoudy,A., Berrozpe,G., Jimenez,P., Serrano,A., Real,F.X., and Garrido,F., 1996. Loss of an HLA haplotype in pancreas cancer tissue and its corresponding tumor derived cell line. *Tissue Antigens*, **47**, 372-381.
331. Tough,D.F. and Sprent,J., 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J.Exp.Med.*, **179**, 1127-1135.

332. Troy,A.E. and Shen,H., 2003. Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition. *J.Immunol.*, **170**, 672-676.
333. Trumfheller,C., Caskey,M., Nchinda,G., Longhi,M.P., Mizenina,O., Huang,Y., Schlesinger,S.J., Colonna,M., and Steinman,R.M., 2008. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **105**, 2574-2579.
334. Ulmer,A.J., Scholz,W., Ernst,M., Brandt,E., and Flad,H.D., 1984. Isolation and subfractionation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation on Percoll. *Immunobiology*, **166**, 238-250.
335. Auphan-Anezin,N. and Schmitt-Verhulst,A.M., 2001. Differential survival of transferred CD8 T cells and host reconstitution depending on TCR avidity for host-expressed alloantigen. *J.Immunol.*, **166**, 7200-7207.
336. Auphan-Anezin,N., Verdeil,G., and Schmitt-Verhulst,A.M., 2003. Distinct thresholds for CD8 T cell activation lead to functional heterogeneity: CD8 T cell priming can occur independently of cell division. *J.Immunol.*, **170**, 2442-2448.
337. Valitutti,S., Dessing,M., Aktories,K., Gallati,H., and Lanzavecchia,A., 1995. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J.Exp.Med.*, **181**, 577-584.
338. Valitutti,S., Muller,S., Dessing,M., and Lanzavecchia,A., 1996. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J.Exp.Med.*, **183**, 1917-1921.
339. Valmori,D., Fonteneau,J.F., Lizana,C.M., Gervois,N., Lienard,D., Rimoldi,D., Jongeneel,V., Jotereau,F., Cerottini,J.C., and Romero,P., 1998. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol*, **160**, 1750-1758.
340. van der Bruggen,B.P., Traversari,C., Chomez,P., Lurquin,C., De,P.E., Van den,E.B., Knuth,A., and Boon,T., 1991. A gene encoding an

- antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, **254**, 1643-1647.
341. van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E., and Schoenberger, S.P., 2001. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat.Immunol.*, **2**, 423-429.
342. Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A., and Rocha, B., 2000. Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat.Immunol.*, **1**, 47-53.
343. Viatte, S., Alves, P.M., and Romero, P., 2006. Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: advantages and hurdles. *Immunol.Cell Biol.*, **84**, 318-330.
344. Viola, A., Contento, R.L., and Molon, B., 2006. T cells and their partners: The chemokine dating agency. *Trends Immunol.*, **27**, 421-427.
345. von, B.H., 1988. The developmental biology of T lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.*, **6**, 309-326.
346. Wald, A., Leisenring, W., van Burik, J.A., and Bowden, R.A., 1997. Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J.Infect.Dis.*, **175**, 1459-1466.
347. Walker, B.D., Flexner, C., Birch-Limberger, K., Fisher, L., Paradis, T.J., Aldovini, A., Young, R., Moss, B., and Schooley, R.T., 1989. Long-term culture and fine specificity of human cytotoxic T-lymphocyte clones reactive with human immunodeficiency virus type 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **86**, 9514-9518.
348. Walter, S., Herrgen, L., Schoor, O., Jung, G., Wernet, D., Buhring, H.J., Rammensee, H.G., and Stevanovic, S., 2003. Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J.Immunol.*, **171**, 4974-4978.
349. Wang, F.Q., So, J., Reierstad, S., and Fishman, D.A., 2006. Vascular endothelial growth factor-regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of matrix metalloproteinases. *Int.J.Cancer*, **118**, 879-888.

350. Wang, J.E., Warris, A., Ellingsen, E.A., Jorgensen, P.F., Flo, T.H., Espevik, T., Solberg, R., Verweij, P.E., and Aasen, A.O., 2001. Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect.Immun.*, **69**, 2402-2406.
351. Weekes, M.P., Wills, M.R., Mynard, K., Carmichael, A.J., and Sissons, J.G., 1999. The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J.Virol.*, **73**, 2099-2108.
352. Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., Schirle, M., Obermayr, F., Walter, S., Schoor, O., Kurek, R., Loeser, W., Bichler, K.H., Wernet, D., Stevanovic, S., and Rammensee, H.G., 2002. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.*, **62**, 5818-5827.
353. Weinzierl, A.O., Maurer, D., Altenberend, F., Schneiderhan-Marra, N., Klingel, K., Schoor, O., Wernet, D., Joos, T., Rammensee, H.G., and Stevanovic, S., 2008. A cryptic vascular endothelial growth factor T-cell epitope: identification and characterization by mass spectrometry and T-cell assays. *Cancer Res.*, **68**, 2447-2454.
354. Wentworth, P.A., Celis, E., Crimi, C., Stitely, S., Hale, L., Tsai, V., Serra, H.M., Del Guercio, M.F., Livingston, B., Alazard, D., and ., 1995. In vitro induction of primary, antigen-specific CTL from human peripheral blood mononuclear cells stimulated with synthetic peptides. *Mol.Immunol.*, **32**, 603-612.
355. Whelan, J.A., Dunbar, P.R., Price, D.A., Purbhoo, M.A., Lechner, F., Ogg, G.S., Griffiths, G., Phillips, R.E., Cerundolo, V., and Sewell, A.K., 1999. Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent. *J.Immunol.*, **163**, 4342-4348.
356. Wiederhold, N.P., Lewis, R.E., and Kontoyiannis, D.P., 2003. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies. *Pharmacotherapy*, **23**, 1592-1610.
357. Willis, R.A., Kappler, J.W., and Marrack, P.C., 2006. CD8 T cell competition for dendritic cells in vivo is an early event in activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **103**, 12063-12068.

358. Wills, M.R., Carmichael, A.J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M.P., Plachter, B., and Sissons, J.G., 1996. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J. Virol.*, **70**, 7569-7579.
359. Winau, F., Weber, S., Sad, S., de, D.J., Hoops, S.L., Breiden, B., Sandhoff, K., Brinkmann, V., Kaufmann, S.H., and Schaible, U.E., 2006. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity.*, **24**, 105-117.
360. Witherden, D., van, O.N., Waltzinger, C., Weiss, A., Benoist, C., and Mathis, D., 2000. Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.*, **191**, 355-364.
361. Wolpert, E.Z., Grufman, P., Sandberg, J.K., Tegnesjo, A., and Karre, K., 1998. Immunodominance in the CTL response against minor histocompatibility antigens: interference between responding T cells, rather than with presentation of epitopes. *J. Immunol.*, **161**, 4499-4505.
362. Xu, Y. and Song, G., 2004. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *J. Biomed. Sci.*, **11**, 426-438.
363. Yewdell, J.W. and Bennink, J.R., 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 51-88.
364. Yewdell, J.W. and Bennink, J.R., 2001. Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr. Opin. Immunol.*, **13**, 13-18.
365. Zamoyska, R., 1998. CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 82-87.
366. Zhou, M., Yang, B., Ma, R., and Wu, C., 2008. Memory Th-17 cells specific for *C. albicans* are persistent in human peripheral blood. *Immunol. Lett.*, **118**, 72-81.
367. Zimmerman, C., Brduscha-Riem, K., Blaser, C., Zinkernagel, R.M., and Pircher, H., 1996. Visualization, characterization, and turnover of

- CD8+ memory T cells in virus-infected hosts. *J.Exp.Med.*, **183**, 1367-1375.
368. Zimmermann,C., Prevost-Blondel,A., Blaser,C., and Pircher,H., 1999. Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences. *Eur.J.Immunol.*, **29**, 284-290.
369. Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C., 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, **248**, 701-702.
370. Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C., 1979. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv.Immunol.*, **27**, 51-177.

Publikationen

1. **Maurer D**, Weinzierl AO, Altenberend F, Schneiderhan-Marra N, Klingel K, Schoor O, Wernet D, Joos T, Rammensee HG, Stevanovic S. 2008. A cryptic vascular endothelial growth factor T-cell epitope: identification and characterization by mass spectrometry and T-cell assays. *Cancer Res* 68:2447-2454.
2. Rudolf D, Silberzahn T, Walter S, **Maurer D**, Engelhard J, Wernet D, Buhning HJ, Jung G, Kwon BS, Rammensee HG, Stevanovic S. 2008. Potent costimulation of human CD8 T cells by anti-4-1BB and anti-CD28 on synthetic artificial antigen presenting cells. *Cancer Immunol Immunother* 57:175-183.
3. Weinzierl AO, Rudolf D, **Maurer D**, Wernet D, Rammensee HG, Stevanovic S and Klingel K. 2008 Identification of HLA-A*01- and HLA-A*02-restricted CD8⁺ T-cell epitopes shared among group B enteroviruses. *Journal of General Virology* 89:2090-2097.
4. Rudolf D, Nastke MD, **Maurer D**, Wernet D, Sinzger C, Rammensee HG, Stevanovic S. Synthetic artificial APCs: Fast and reproducible in vitro priming of HCMV-specific T cells from seronegative donors *submitted Journal of Immunology*
5. **Maurer D**. Identifizierung HLA-A*02-, HLA-B*07- und HLA-B*44 restringierter T-Zell-Epitope aus dem Nierenzellkarzinom-Tumorantigen SPAG4. *Diplomarbeit*. 2005.
6. **Maurer D**, Walter S, Wernet D, Rammensee HG, Stevanovic S. 2008. Generation and characterization of T Cell responses directed to predicted HLA Class II restricted epitopes from *Aspergillus fumigatus*. *Manuscript in preparation*. 2008.

6.3 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, das Interesse an meiner Arbeit und die ständige Bereitschaft für Diskussionen und Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der Arbeitsthemen und die ausgezeichnete Betreuung, wobei er mir viele Freiheiten zur eigenen Gestaltung des Forschungsgebietes ließ.

Dr. Despina Rudolf, ohne deren Hilfe so mancher Tag im Chaos geendet und so die Bearbeitung der Arbeitsthemen wohl viel länger gedauert hätte.

Patricia für die vielen von mir benötigten Peptide und das eine oder andere Wort.

Christina Kyzirakos, die unermüdlich beim Korrekturlesen der Arbeit half und mich mit Fragen löcherte.

Dr. Stefan Löb für seine ständige Diskussionsbereitschaft, wertvolle Ratschläge aus dem Forschungsalltag und den Spaß den wir hatten.

Dr. Andreas Weinzierl für die erfolgreiche Zusammenarbeit und geselligen Stunden.

Dr. Florian Altenberend für die schönen Transfektanden.

Dr. Steffen Walter für die bereitwillige Hilfe bei theoretischen und praktischen Fragen, Versorgungsengpässen von Reagenzien und die Bereitstellung des LSR II.

Lynne Yakes und Gerhard Hörr für ihre Hilfe in organisatorischen Angelegenheiten.

Claudia Falkenburger und Franziska Löwenstein für all die Tätigkeiten zur Aufrechterhaltung des Laborbetriebes.

Andreas, Anneke, Christina, Desi, Felix, Florian, Gabor, Lisa, Marc, Matthias, Oliver, Patricia, Thomas, Stefans und Verena, für einige unvergessliche Momente und den Spaß, den wir zusammen hatten. Es war mir eine Freude mit euch zusammenzuarbeiten.

Allen Elchen für die tolle Atmosphäre und das harmonische Miteinander.

Dorothee und Christian, die besten Geschwister, die man sich wünschen kann.

Meinen Eltern, denen ich so vieles verdanke, die jederzeit für mich da sind und mir in vielen Bereichen als Vorbild dienen.

Meiner Frau Steffi, ohne die nichts so wäre, wie es ist...und die uns unsere phantastische und liebenswürdige Hannah geboren hat. Vielen Dank für alles!

6.4 Lebenslauf

Name: Dominik Maurer
 geboren am: 20. Dezember 1979 in Tübingen
 Familienstand: verheiratet
 Adresse: Gartenstraße 43/1
 72764 Reutlingen

Schulische Laufbahn

1986-1987 Grundschule auf der Wanne, Tübingen
 1987-1988 Grundschule Hügelstraße, Tübingen
 1988-1990 Gottlieb Rühle-Schule, Mössingen
 1990-1994 Quenstedt-Gymnasium, Mössingen
 1994-1999 Evangelisches Firstwald-Gymnasium Mössingen und Erlangen der allgemeinen Hochschulreife.

Studium der Biologie

10/2000-01/2003 **Grundstudium der Biologie** an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
 02/2003-03/2005 **Hauptstudium der Biologie** an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
 Fachrichtungen: Immunologie, medizinische Virologie, Tierphysiologie.
 04/2005-12/2005 **Diplomarbeit**
 Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
 Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie.
 Leitung: Professor Dr. Hans-Georg Rammensee
 Arbeitsgruppe: Professor Dr. Stefan Stevanović
 „Identifizierung HLA-A*02-, HLA-B*07- und HLA-B*44 restringierter T-Zell-Epitope aus dem Nierenzellkarzinom-Tumorantigen SPAG4“
 1/2006 **Diplom in Biologie**

Promotion

01/2006-08/2008

Doktorarbeit

Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung
Immunologie.

Leitung: Professor Dr. Hans-Georg Rammensee

Arbeitsgruppe: Professor Dr. Stefan Stevanović

„Generierung und Charakterisierung von
spezifischen T-Zell-Antworten gegen Pilz- und
Tumorantigene“