

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele



**T-Zell-Immunität gegen die tumorassoziierten Antigene HER2/neu, MUC1,
PRAME und WT1 bei gesunden Blutspendern und Schwangeren als ein
immuntherapeutisches Modell für die allogene
Blutstammzelltransplantation**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Mathias Lutz
aus Edenbergen

Würzburg, November 2016

Referent: Prof. Dr. med. Stephan Mielke
Korreferent: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2017
Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hämatopoetische Stammzelltransplantation	1
1.2	Graft-versus-Host-Erkrankung	4
1.2.1	Akute Graft-versus-Host-Erkrankung.....	5
1.2.2	Chronische Graft-versus-Host-Erkrankung.....	9
1.3	Graft-versus-Leukämie-Effekt	12
1.4	Tumorantigene	14
1.4.1	Mutationsantigene	16
1.4.2	Keimbahnantigene.....	16
1.4.3	Differenzierungsantigene.....	17
1.4.4	Überexprimierte Antigene	17
1.4.5	Onkovirale Antigene	18
1.5	Tumorantigene in der Schwangerschaft.....	19
1.6	Zielsetzung.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.1.2	Zelllinien	23
2.1.3	Antikörper	23
2.1.4	Peptide und Dextramere.....	24
2.1.5	Medien, Puffer und Stocklösungen	25
2.1.6	Computerprogramme und Datenbanken	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Arbeitshypothese.....	27
2.2.2	Studienplanung.....	27
2.2.3	Probandenrekrutierung und -befragung.....	30
2.2.4	HLA-Typisierung.....	31
2.2.5	Probengewinnung.....	32
2.2.6	Blutbildbestimmung	33
2.2.7	Dichtegradientenzentrifugation	33

2.2.8	Bestimmung der Zellzahl	35
2.2.9	Zellkultivierung.....	36
2.2.10	Kryokonservierung von Zellen	36
2.2.11	Bestrahlung von Zellen	37
2.2.12	Quantitative Messung von Hormonspiegeln	37
2.2.13	Isolation von CD8 ⁺ T-Lymphozyten	38
2.2.14	Restimulation antigenspezifischer T-Lymphozyten.....	39
2.2.15	Ribonukleinsäure-Isolation	39
2.2.16	Quantitative Reverse Transkriptase-PCR.....	40
2.2.17	Durchflusszytometrie	42
2.2.18	Interferon- γ -ELISPOT	46
2.2.19	Statistische Auswertung	48
3	Ergebnisse	50
3.1	Querschnittsanalyse bei gesunden Blutspendern (Hauptgruppe 1)	50
3.1.1	Probensammlung.....	50
3.1.2	CD8-positive Gedächtnisimmunantworten gegen die untersuchten tumorassoziierten Antigene.....	52
3.1.3	TAA-spezifische Gedächtnisimmunantworten im Vergleich zwischen Frauen und Männern.....	71
3.2	Longitudinalanalyse bei erstschwangeren Frauen (Hauptgruppe 2) ...	73
3.2.1	Probensammlung.....	73
3.2.2	Evaluation der Schwangerschaft	75
3.2.3	CD8-positive Gedächtnisimmunantworten gegen die untersuchten tumorassoziierten Antigene.....	78
4	Diskussion.....	85
4.1	Immunantworten gegen tumorassoziierte Antigene bei gesunden Blutspendern	86
4.2	Geschlechterspezifischer Unterschied der Immunantworten gegen tumorassoziierte Antigene.....	89
4.3	Immunantworten gegen tumorassoziierte Antigene im Verlauf von Schwangerschaft und Stillzeit	91
4.4	Implikationen der Resultate für die Immuntherapie	93

4.5	Limitationen der Studie und Methodenkritik	96
5	Zusammenfassung.....	98
6	Anhang.....	100
6.1	Literaturverzeichnis	100
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	118
6.3	Tabellenverzeichnis.....	119
6.4	Abkürzungsverzeichnis	120
6.4.1	Abkürzungen.....	120
6.4.2	Einheiten.....	124
	Danksagung	125
	Lebenslauf.....	128

Hinweis:

In dieser Arbeit werden der Lesbarkeit und Übersichtlichkeit halber nur die maskulinen Formen von geschlechtsspezifischen Begriffen verwendet. Dabei sind aber – sofern nicht anders angegeben – stets beide Geschlechter gemeint.

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) stellt heutzutage ein international etabliertes Standardtherapieverfahren für Patienten mit malignen hämatologischen Neoplasien wie Leukämien, Lymphomen oder Myelomen, aber auch mit aplastischen Anämien, verschiedenen Immundefekten oder sogar soliden Tumoren dar (APPELBAUM, 2007; COPELAN, 2006). Prinzipiell kann die HSZT sowohl autolog innerhalb eines Individuums als auch allogene zwischen genetisch verschiedenen Individuen erfolgen. Eine Sonderform stellt die syngene Transplantation bei monozygoten Zwillingen dar, die aus genetischer Sicht im Wesentlichen einer autologen Transplantation entsprechen dürfte. Als Quelle für die Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen kommen peripheres Blut, Knochenmark oder Nabelschnurblut in Frage (HASPEL und MILLER, 2008).

Ziel der HSZT war ursprünglich ausschließlich der Ersatz des beim Patienten maligne entarteten beziehungsweise fehlerhaft angelegten blutbildenden Systems durch die transplantierten pluripotenten Blutstammzellen, die sich nach einer myeloablativen Chemo- und/oder Radiotherapie im Knochenmark des Empfängers ansiedeln und den Aufbau eines gesunden Blut- und Immunsystems gewährleisten sollten (THOMAS *et al.*, 1975). Im Laufe der Zeit offenbarte sich allerdings eine zusätzliche Komponente sowohl der allogenen als auch – in geringerem Ausmaß – der autologen HSZT: Bei der Transplantation ebenfalls übertragene Immunzellen können sich im Körper des Patienten gegen maligne Zellen richten und dadurch den so genannten Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (engl. *graft-versus-leukemia effect* = GvL-Effekt) vermitteln (BARRETT, 2008; PORRATA, 2016; SUZUKI *et al.*, 2013).

Dadurch handelt es sich bei der allogenen wie auch autologen HSZT um eine Tumormimmuntherapie, bei der das jeweilige Immunsystem in optimaler Weise zur Bekämpfung einer malignen Erkrankung rekrutiert wird. Auch wenn sich in diesem Bereich derzeit durch die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze wie Immuncheckpoint-Inhibitoren, bispezifischen Antikörpern oder chimären

Antigenrezeptoren (CAR) ein Umbruch anzubahnen scheint, kann die HSZT nach wie vor als erfolgreichste jemals etablierte zelluläre Tumormimmuntherapie angesehen werden (ANSELL, 2015; COOK *et al.*, 2016; NAGORSEN *et al.*, 2009).

Den Ursprung der Forschungen zur HSZT bildete die Entdeckung der myelotoxischen Wirkung von ionisierender Strahlung in der Mitte des 20. Jahrhunderts. Zu dieser Zeit konnte gezeigt werden, dass sich Versuchstiere von den Wirkungen einer myeloablativen Radiatio erholten, wenn ihre hämatopoetischen Gewebe durch einen Bleischutz abgeschirmt waren (JACOBSON *et al.*, 1950). Wenig später wurde eine derartige Erholung auch durch die intravenöse Transfusion von Knochenmark- oder Milzzellen syngener Tiere erreicht (LORENZ *et al.*, 1951).

Die ersten Versuche zur Übertragung von Blutstammzellen beim Menschen wurden Ende der 1950er-Jahre allogenen durchgeführt, die Gewinnung der Stammzellen erfolgte dabei durch eine Entnahme von Knochenmark (MATHÉ *et al.*, 1959; THOMAS *et al.*, 1957). Sämtliche Transplantationen dieser Zeit waren nur zwischen monozygoten Zwillingen erfolgreich (THOMAS *et al.*, 1959). In allen anderen Konstellationen zwischen Spender und Empfänger kam es dagegen zu Komplikationen, die auf einer zunächst unklaren Histoinkompatibilität beruhten und als Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. *graft-versus-host disease* = GvHD) bezeichnet wurden (THOMAS und FERREBEE, 1962).

Erst die Entdeckung des humanen Leukozytenantigensystems (HLA) etwa zur selben Zeit lieferte eine Begründung für die Ursache der GvHD und markierte damit den Durchbruch für die weitere Entwicklung der HSZT, da sich zeigte, dass eine allogene HSZT nur bei möglichst großer Übereinstimmung der HLA-Strukturen von Spender und Empfänger gelingen kann (DAUSSET und BRECQ, 1957; VAN ROOD *et al.*, 1958).

Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurden 1968 die ersten beiden erfolgreichen allogenen Knochenmarktransplantationen durchgeführt (LEVEY *et al.*, 1971). Etwa zehn Jahre später folgten die ersten autologen Transplantationen von kryokonserviertem Knochenmark (APPELBAUM *et al.*, 1978).

In den folgenden Jahrzehnten wurde die HSZT um die Gewinnung von Stammzellen aus peripherem Blut (GOLDMAN *et al.*, 1978) und aus Nabelschnurblut (GLUCKMAN *et al.*, 1989) erweitert und stetig auf neue Indikationen ausgedehnt, so dass inzwischen jährlich weltweit etwa 70.000 Transplantationen (jeweils zu etwa 50 % allogene und autologe HSZT) durchgeführt werden (NIEDERWIESER *et al.*, 2016).

Prognosen gehen davon aus, dass die Bedeutung der HSZT insbesondere auch durch die weitere Nutzbarmachung des GvL-Effektes in der näheren Zukunft weiter zunehmen wird (GRATWOHL *et al.*, 2015; YOSHIMI *et al.*, 2010). Gleichzeitig stellt bei der allogenen HSZT die bereits erwähnte GvHD trotz deutlicher Fortschritte in der Prophylaxe und Therapie nach wie vor ein entscheidendes Problemfeld dar (FERRARA *et al.*, 2009; GARNETT *et al.*, 2013).

1.2 Graft-versus-Host-Erkrankung

Bei der GvHD richten sich immunkompetente T-Lymphozyten des Spenders, die im Rahmen der allogenen HSZT ebenfalls übertragen werden, gegen als „fremd“ erkannte Antigenstrukturen des immunkompromittierten Empfängers (BILLINGHAM, 1966). Die GvHD gilt nach dem Rezidiv der Grunderkrankung als eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität nach einer allogenen HSZT (FERRARA *et al.*, 2009; GARNETT *et al.*, 2013).

Der Verlauf einer GvHD wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und reicht von relativ milden bis zu potenziell lebensbedrohlichen Formen. Klassischerweise wurde dabei zwischen einer akuten GvHD (aGvHD), deren Symptomatik innerhalb der ersten einhundert Tage nach einer allogenen HSZT auftritt, und einer sich später manifestierenden chronischen GvHD (cGvHD) unterschieden (GLUCKSBERG *et al.*, 1974).

Da sich diese Einteilung allerdings ausschließlich am Zeitpunkt der Manifestation der GvHD orientierte und dabei klinische Aspekte vernachlässigte, wurde sie inzwischen verlassen und die Trennung zwischen akuter und chronischer Form anhand klinisch-pathologischer Merkmale eingeführt (FILIPOVICH *et al.*, 2005). Dadurch kam es auch zur Definition von Übergangsformen aus aGvHD und cGvHD (**Tab. 1**).

Tab. 1: Kategorien der akuten und chronischen GvHD

Kategorie	Manifestation nach einer allogenen HSZT oder DLI	Symptome der aGvHD	Symptome der cGvHD
Akute GvHD			
Klassische akute GvHD	≤ 100 Tage	Ja	Nein
Persistierende, rezidivierende oder späte akute GvHD	> 100 Tage	Ja	Nein
Chronische GvHD			
Klassische chronische GvHD	keine zeitliche Begrenzung	Nein	Ja
Überlappungssyndrom (engl. <i>overlap syndrome</i>)	keine zeitliche Begrenzung	Ja	Ja

1.2.1 Akute Graft-versus-Host-Erkrankung

Die akute GvHD manifestiert sich meist innerhalb der ersten ein bis drei Wochen nach einer allogenen HSZT und tritt mit einer in Abhängigkeit von verschiedenen Variablen schwankenden Inzidenz von 10 % bis 80 % auf (GARNETT *et al.*, 2013). Als wichtigste Risikofaktoren für die Entwicklung einer aGvHD wurden das Ausmaß der HLA-Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger, die Nichtverwandtschaft zwischen Spender und Empfänger und die Art der GvHD-Prophylaxe identifiziert (FLOWERS *et al.*, 2011). Die aGvHD betrifft vor allem die Haut, den Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) und die Leber (MAGENAU *et al.*, 2016; MARTIN *et al.*, 1990).

1.2.1.1 Pathophysiologie

Die Pathogenese der aGvHD läuft in mehreren Stufen ab: Zunächst führt die Gewebeschädigung durch das Konditionierungsregime vor der HSZT zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-12 (IL-12) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α). Diese Mediatoren erhöhen die Permeabilität vor allem des gastrointestinalen Epithels, wodurch es zur Diffusion von bakteriellen Lipopolysacchariden in die Blutzirkulation und dadurch zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems kommt (VOGELSANG *et al.*, 2003; ZEISER *et al.*, 2011). Mit der Infusion des Stammzelltransplantates werden auch potenziell alloreaktive T-Lymphozyten des Spenders durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert, was zu deren signifikanter Expansion führt (MATTE *et al.*, 2004). Diese T-Lymphozyten migrieren im Körper des Empfängers nun vor allem in die Kompartimente, die ihre Zielantigene vorrangig exprimieren – dabei handelt es sich mit der Haut, dem GI-Trakt und der Leber vordergründig um „äußere“ beziehungsweise „innere“ Körperoberflächen. Dort führen die T-Lymphozyten sowohl direkt durch zytotoxische Mechanismen als auch indirekt durch die Rekrutierung zum Beispiel von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und mononukleären Makrophagen zur Gewebeschädigung (MAGENAU *et al.*, 2016; VOGELSANG *et al.*, 2003).

1.2.1.2 Klinisches Bild

Typischerweise manifestiert sich die aGvHD zunächst an der Haut, wo es zu einem makulopapulösen Exanthem vor allem im Schulter- und Nackenbereich, an den Handflächen, Fußsohlen und Ohren kommt. Während milde Formen sich dabei auf ein diskretes Erythem beschränken können, führen Extremfälle bis zur Blasenbildung und generalisierten epidermalen Nekrolyse (VOGELSANG *et al.*, 2003). Die gastrointestinale aGvHD manifestiert sich vor allem durch eine sekretorische Diarrhö. Daneben zählen zum Beispiel Übelkeit und Erbrechen, Anorexie und abdominelle Schmerzen zur Symptomatik (SUNG und CHAO, 2013). Die aGvHD der Leber präsentiert sich als Cholestase mit Hyperbilirubinämie und entsteht durch die lymphozytäre Invasion der kleinen Gallengänge (SNOVER *et al.*, 1985). Neben den drei typischerweise betroffenen Organsystemen kann sich die aGvHD allerdings prinzipiell auch an jedem anderen Organ manifestieren (SUNG und CHAO, 2013).

Der Schweregrad einer aGvHD wird in zwei Stufen erfasst (GLUCKSBERG *et al.*, 1974): Zunächst erfolgt ein Staging der drei Organsysteme Haut, GI-Trakt und Leber mit jeweils vier Stufen. Anschließend erfolgt in Zusammenschau dieser Stufen das Grading mit vier Schweregraden (**Tab. 2**).

Tab. 2: Staging und Grading der akuten GvHD

	Haut	GI-Trakt	Leber
Staging			
1	Exanthem < 25 %	Diarrhö > 500 ml/d	Bilirubin 2–3 mg/dl
2	Exanthem 25–50 %	Diarrhö > 1000 ml/d	Bilirubin 3–6 mg/dl
3	Generalisierte Erythrodermie	Diarrhö > 1500 ml/d	Bilirubin 6–15 mg/dl
4	Schuppung, Blasenbildung	Diarrhö > 2000 ml/d oder Ileus oder Blutungen	Bilirubin > 15 mg/dl
Grading			
I	1–2	0	0
II	1–3	1 und/oder	1
III	2–3	2–3 und/oder	2–3
IV	2–4	2–4 und/oder	2–4

1.2.1.3 Prophylaxe

Da die Entwicklung einer aGvHD mit einer ungünstigen Prognose einhergeht, liegt ein klinischer Schwerpunkt schon in der Prävention der aGvHD. Dabei wird grundsätzlich zwischen zwei Ansätzen unterschieden: Einerseits kann die Funktion von in hoher Zahl vorhandenen T-Lymphozyten des Spenders durch immunmodulatorische Pharmaka eingeschränkt werden (engl. *T-cell repletion*), andererseits können die T-Lymphozyten vor oder nach der Infusion des Stammzelltransplantates depletiert werden (engl. *T-cell depletion*; WAGNER *et al.*, 2005).

Der klassische Ansatz zur immunmodulatorischen Prävention einer aGvHD besteht in der Gabe einer Kombination aus dem Antimetaboliten Methotrexat (MTX) und einem Calcineurininhibitor (CNI) wie Ciclosporin oder Tacrolimus. Als Alternativen haben sich auch Mycophenolat-Mofetil (MMF), ein Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, und Sirolimus, ein Inhibitor der mTOR-Signalkaskade (engl. *mechanistic target of rapamycin*), bewährt (LUTZ und MIELKE, 2016; SUNG und CHAO, 2013). Während neuere Ansätze über die Blockade von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF- α eher unbefriedigende Ergebnisse erbrachten, zeigte der Einsatz des CCR5-Inhibitors (CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5) Maraviroc, der die Chemotaxis von T-Lymphozyten blockiert, vielversprechende Resultate (RESHEF *et al.*, 2012).

Zur Depletion von T-Lymphozyten im Stammzelltransplantat kommen neben der antikörpervermittelten magnetischen Positivselektion hämatopoetischer Stammzellen vor allem das polyklonale Antithymozytenglobulin (ATG) oder monoklonale Antikörper zum Beispiel gegen CD52 zum Einsatz (QIAN *et al.*, 2013). Einen weiteren Ansatz bildet die Photodepletion von T-Lymphozyten (MIELKE *et al.*, 2011). Während durch diese Maßnahmen das Risiko der Entwicklung einer aGvHD erniedrigt wird, steigt zugleich die Rate an Transplantatabstoßungen, Infektionen und Rezidiven der Grunderkrankung. Einige dieser Probleme konnten zum Beispiel durch ein erhöhtes Quantum an transfundierten CD34-positiven Zellen oder eine entsprechende antibiotische Prophylaxe eingedämmt werden (SUNG und CHAO, 2013).

1.2.1.4 Therapie

Eine per definitionem auf die Haut beschränkte aGvHD vom Gesamtgrad I wird in aller Regel – wenn überhaupt – ausschließlich topisch mit Steroiden oder Tacrolimus behandelt. Eine aGvHD ab dem Gesamtgrad II wird initial mit systemischen Steroiden therapiert, worauf etwa die Hälfte der Patienten anspricht (GARNETT *et al.*, 2013).

Spricht die aGvHD etwa eine Woche nach Initiation der Therapie nicht an oder kommt es innerhalb der ersten drei Tage gar zu einer Verschlechterung der Symptomatik, gilt die aGvHD als steroidrefraktär (DEEG, 2007).

Da für die Zweitlinientherapie bisher keine Leitlinien existieren, kommt eine breite Palette von Therapieansätzen zur Anwendung. So können das polyklonale ATG oder monoklonale Antikörper zum Beispiel gegen CD3, CD52, IL-1 und TNF- α ebenso eingesetzt werden wie MMF, Tacrolimus, die mTOR-Inhibitoren Everolimus und Sirolimus oder die extrakorporale Photopherese (QIAN *et al.*, 2013). Die intravenöse Gabe von polyvalenten Immunglobulinen zeigte zwar ein effektives Ansprechen, war aber vor allem durch infektiöse Komplikationen limitiert (SULLIVAN *et al.*, 1990). Neuere Ansätze stützen sich auf den Einsatz immunmodulatorischer mesenchymaler Stammzellen (LE BLANC *et al.*, 2008) oder die Infusion von regulatorischen T-Lymphozyten (ZOU *et al.*, 2016).

1.2.2 Chronische Graft-versus-Host-Erkrankung

Die chronische GvHD manifestiert sich im Vergleich zur akuten GvHD prolongiert nach einem Intervall von typischerweise einhundert Tagen nach einer allogenen HSZT und darüber hinaus und präsentiert sich mit einem eigenen klinischen Muster. Ein Jahr nach der allogenen HSZT sind etwa 50 % der Patienten betroffen (LEE *et al.*, 2003). Während eine vorhergehende aGvHD einen bedeutenden Risikofaktor darstellt, wurden unter anderem mit dem Alter des Patienten und der Transplantation von einem weiblichen Spender in einen männlichen Empfänger Risikofaktoren identifiziert, die unabhängig von einer aGvHD zu sehen sind und verdeutlichen, dass die cGvHD als eigene Krankheitsentität und nicht nur als chronifizierte Form einer aGvHD zu interpretieren ist (FLOWERS *et al.*, 2011). Obwohl die cGvHD mit einer reduzierten Zahl an Rezidiven der malignen Grunderkrankung assoziiert zu sein scheint, stellt sie bei Patienten ab zwei Jahren nach einer allogenen HSZT eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität sowie vor allem auch für eine reduzierte Lebensqualität dar (SOCIE *et al.*, 1999; WOOD *et al.*, 2013).

1.2.2.1 Pathophysiologie

Die genaue Pathophysiologie der cGvHD ist trotz jahrzehntelanger wissenschaftlicher Bemühungen nach wie vor nur zum Teil verstanden. Eine zentrale Rolle in der Entstehung der cGvHD spielt der Verlust der körpereigenen Immuntoleranz, der einerseits durch eine fehlerhafte Funktion von regulatorischen T-Lymphozyten bedingt ist (KORETH *et al.*, 2011). Andererseits kommt es durch die Schädigung des Thymus im Rahmen des Konditionierungsregimes und der aGvHD zu einer fehlenden Negativselektion von autoreaktiven T-Lymphozyten vor allem aus der T-Helfer-Population und zu einer konsekutiven Dysregulation im Zytokinhaushalt (LINHARES *et al.*, 2013). Daneben scheinen in der Pathogenese der cGvHD auch B-Lymphozyten eine bedeutende Rolle zu spielen: So konnten bei Patienten mit einer cGvHD verschiedene autoreaktive Antikörper sowie ein erhöhter Plasmaspiegel des B-Zell-aktivierenden Faktors (BAFF) nachgewiesen werden (PATRIARCA *et al.*, 2006; SARANTOPOULOS *et al.*, 2007).

1.2.2.2 Klinisches Bild

Das klinische Bild einer cGvHD ist sehr vielgestaltig, da sie nahezu jedes Organ betreffen und ihr Schweregrad von einer diskreten Symptomatik bis zu einem lebensbedrohlichen Organversagen reichen kann. Häufig betroffen sind vor allem die Haut und Schleimhäute, die Augen, der gastrointestinale und der respiratorische Trakt, das muskuloskeletale und das hämatopoetische System (LEE *et al.*, 2003).

Dementsprechend erfolgt die Diagnose einer cGvHD heute anhand klar definierter „Konsenskriterien“, einer umfangreichen Liste von Kriterien für alle potenziell beteiligten Organe, die unter der Federführung des nationalen Gesundheitsinstitutes der USA (engl. *National Institutes of Health* = NIH) entwickelt wurde. Grundsätzlich kann eine cGvHD nur dann diagnostiziert werden, wenn mindestens ein klar definiertes „diagnostisches Kriterium“ vorliegt oder eine charakteristische Manifestation einer cGvHD, die durch einen histologischen, laboratorischen oder radiologischen Befund gesichert wurde. Bezüglich des Schweregrades wird zwischen einer milden, einer moderaten und einer schweren Verlaufsform unterschieden. Die Zuordnung zu einem Schweregrad erfolgt wiederum anhand von klar definierten Kriterien hinsichtlich der Beteiligung einzelner Organe (FILIPOVICH *et al.*, 2005).

1.2.2.3 Therapie

Die Erstlinientherapie der cGvHD besteht in der Gabe von Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren in Kombination mit adjuvanten Therapeutika und intensiven pflegerischen Maßnahmen (LEE *et al.*, 2003). Milde Formen der cGvHD werden dabei gewöhnlich mit topischen Immunsuppressiva behandelt. Bei fehlender Besserung der Symptome oder Organmanifestationen, die einer topischen Therapie nicht zugänglich sind, wird eine systemische Therapie eingeleitet.

Eine initiale systemische Therapie wird dagegen für moderate und schwere Formen der cGvHD erwogen (GARNETT *et al.*, 2013). Die Resultate der derzeitigen Therapiestrategien sind nach wie vor suboptimal, so dass eine Aufnahme der Patienten in klinische Studien empfohlen wird (LINHARES *et al.*,

2013). Das übliche Vorgehen besteht in der Gabe von Prednison in Kombination mit einem CNI (GARNETT *et al.*, 2013). Das Ansprechen auf die Therapie wird gewöhnlich nach ein bis drei Monaten evaluiert. Ungefähr die Hälfte der Patienten hat bis dahin keine Besserung ihrer Symptome erfahren und wird dann einer Zweitlinientherapie zugeführt (LEE *et al.*, 2003).

Für die Therapie der steroidrefraktären cGvHD bestehen keine standardisierten Therapieschemata. Aufgrund der vielfältigen Nebenwirkungen einer längerfristig hochdosierten Steroidtherapie stellt die Reduktion der Steroiddosis ein bedeutendes Ziel dar. Hierbei kommen häufig MMF und MTX zum Einsatz (GARNETT *et al.*, 2013). Zur Zweitlinientherapie der cGvHD vor allem der Haut und Schleimhäute hat sich auch die extrakorporale Photopherese bewährt (FLOWERS *et al.*, 2008). Aufgrund der Annahme, dass B-Lymphozyten in die Pathogenese der cGvHD involviert sind, wurde auch der monoklonale Anti-CD20-Antikörper Rituximab eingesetzt und zeigte vor allem bei Patienten mit muskuloskelettalen oder Hautmanifestationen gute Resultate (KHARFAN-DABAHA *et al.*, 2009). Vielversprechende Ansprechraten der steroidrefraktären cGvHD zeigte auch der Einsatz von mTOR-Inhibitoren. Während Sirolimus vor allem in Kombination mit CNI therapielimitierende Nebenwirkungen aufwies (COURIEL *et al.*, 2005), erbrachte Everolimus bei ähnlich guten Ansprechraten vor allem eine äußerst geringe Rate an Rezidiven der malignen Grunderkrankung, was der antineoplastischen Komponente des Pharmakons zugeschrieben wird (MIELKE *et al.*, 2014).

1.3 Graft-versus-Leukämie-Effekt

Der GvL-Effekt stellt die Grundlage der HSZT als Tumorimmuntherapie dar und kommt dadurch zustande, dass im Rahmen der HSZT neben Stammzellen auch Immunzellen vom Spender auf den Empfänger übertragen werden und sich gegen die Leukämiezellen in dessen Körper richten (BARRETT, 2008; SUZUKI *et al.*, 2013). Da es sich bei diesen malignen Zellen auch um andere Tumorentitäten handeln kann, wird häufig auch allgemeiner vom Transplantat-gegen-Malignom-Effekt gesprochen (BARRETT, 1995).

Erste Berichte über einen GvL-Effekt stammen aus den 1950er-Jahren, als bei bestrahlten Mäusen die Eradikation einer Leukämie durch eine allogene (von einem unterschiedlichen Mausstamm stammende), nicht aber durch eine syngene (vom selben Mausstamm stammende) Transplantation von Knochenmark gelang (BARNES *et al.*, 1956; BARNES und LOUIT, 1957). Zu dieser Zeit wurde die allogene HSZT primär als Rescue-Verfahren nach einer möglichst hochdosierten Chemo- und/oder Strahlentherapie zum Ersatz des zerstörten Knochenmarks durch Spenderknochenmark angesehen (THOMAS *et al.*, 1957). Im Laufe der Zeit zeigte sich aber, dass immunkompetente T-Lymphozyten im Transplantat GvL-Effekte vermitteln können. Dabei wurde eine Assoziation mit dem Auftreten einer GvHD festgestellt, wobei die cGVHD stärkere GvL-Effekte zu vermitteln schien als die aGVHD (WEIDEN *et al.*, 1981; WEIDEN *et al.*, 1979). Weitere Hinweise auf das Vorliegen eines GvL-Effektes ergaben sich aus Beobachtungen an Patienten, die eine allogene HSZT von ihren Zwillingsgeschwistern erhielten und keine GvHD entwickelten, aber höhere Rezidivraten ihrer hämatologischen Erkrankung aufwiesen als Patienten, die eine allogene HSZT von HLA-identischen Geschwistern erhalten hatten (FEFER *et al.*, 1987). Patienten, die ein T-Lymphozyten-depletiertes Transplantat erhielten, wiesen einerseits eine niedrigere GvHD-Inzidenz auf, gleichzeitig aber auch höhere Rezidivraten des hämatologischen Malignoms (GOLDMAN *et al.*, 1988; HOROWITZ *et al.*, 1990).

In der Folge dieser Beobachtungen verschob sich die Bedeutung der allogenen HSZT zunehmend vom supportiven hin zum essenziellen immuntherapeutischen

Bestandteil der Tumorthherapie. Dieses Potenzial wurde für die Einführung der Donorlymphozyteninfusion (DLI) genutzt: Durch die zusätzliche Gabe von Spenderlymphozyten nach der eigentlichen HSZT konnte der GvL-Effekt verstärkt werden (KOLB *et al.*, 1990). Diese Entwicklung ermöglichte die Einführung von non-myeloablativen Konditionierungsschemata und ebnete damit Patienten, die aufgrund ihres Alters oder ihrer Komorbiditäten bisher für eine HSZT nach einer myeloablativen Konditionierung nicht in Frage kamen, den Weg zur HSZT (GIRALT *et al.*, 1997; SLAVIN *et al.*, 1998).

Als Zielstrukturen für die GvL-vermittelnden Immunantworten wurden zunächst Minorhistokompatibilitätsantigene (MiHA) identifiziert: Diese Alloantigene können zwischen Spender und Empfänger einer allogenen HSZT trotz Übereinstimmung in den HLA-Merkmalen eine allogene T-lymphozytäre Immunantwort vermitteln. Dabei handelt es sich um dem Immunsystem des Spenders bisher unbekannte Peptide, die entweder polymorphen Proteinen (zum Beispiel HA-1 oder HA-2) oder potenziell neuen Antigenen (zum Beispiel den für Frauen „unbekannten“ H-Y-Antigenen, die auf dem Y-Chromosom codiert sind) entstammen und von HLA-Molekülen der Klassen I und II auf der Zelloberfläche präsentiert werden (SIMPSON und ROOPENIAN, 1997).

Inzwischen wurde aber gezeigt, dass auch Immunantworten gegen Tumorantigene, also von Tumorzellen exprimierte Antigene, bei der Kontrolle der hämatologischen Neoplasie nach einer allogenen HSZT eine Rolle spielen (MOLLDREM *et al.*, 2000). So konnten zum Beispiel Gedächtnisimmunantworten gegen das Tumorantigen WT1 (Wilms-Tumor-Protein 1) identifiziert werden, die vom Spender auf den Empfänger übertragen wurden und dort zum GvL-Effekt gegen WT1-tragende Leukämiezellen beitragen konnten (REZVANI *et al.*, 2003). Die Wirksamkeit dieser gegen Tumorantigene gerichteten Immunantworten ist vor allem vom Grad der Antigenexpression im Zielgewebe und einem proinflammatorischen Immunmilieu abhängig, die es auch T-Lymphozyten niedriger Avidität ermöglichen die periphere immunologische Toleranz zu überwinden und sich gegen die malignen Zellen zu richten (MOLLDREM *et al.*, 2002; MORRIS *et al.*, 2003).

1.4 Tumorantigene

Als Tumorantigene werden von Tumorzellen exprimierte Proteine bezeichnet, die im betroffenen Organismus eine Immunantwort induzieren können. Klassischerweise werden Tumorantigene in tumorspezifische (TSA) und tumorassoziierte Antigene (TAA) unterteilt. TSA entstehen durch eine Mutation ausschließlich in den Tumorzellen und stellen dadurch für den Organismus ein neues und damit dem Immunsystem unbekanntes Antigen dar. Damit bilden sie theoretisch die ideale Zielstruktur für eine spezifische Tumorimmuntherapie. TAA werden dagegen nicht nur im Tumorgewebe, sondern auch in gesunden Zellen exprimiert, wobei ihr Expressionsmuster in Tumorzellen aber durch verschiedene Mechanismen verändert ist. Die Verwendung von TAA als Zielstrukturen für eine spezifische Tumorimmuntherapie birgt das Risiko von erheblichen Nebenwirkungen durch die Beeinträchtigung von gesundem Gewebe. Die strikte Trennung zwischen TSA und TAA als Unterformen der Tumorantigene wurde zwischenzeitlich verworfen, da einige Vertreter der TSA später auch in gesunden Zellen nachgewiesen werden konnten und damit formal den TAA zuzuordnen waren (BUONAGURO *et al.*, 2011).

Tumorantigene spielen in der klinischen Praxis sowohl diagnostisch als auch therapeutisch zunehmend eine bedeutende Rolle. Als Tumormarker dienen sie der initialen Diagnostik, der Beurteilung des Therapieverlaufes und der Erkennung von Rezidiven nach erfolgreicher Therapie von neoplastischen Erkrankungen. Therapeutisch können Tumorantigene als Zielstrukturen für eine spezifische Tumorimmuntherapie genutzt werden (COULIE *et al.*, 2014).

Entsprechend ihrer Genese und ihrer Expressionsmuster werden unabhängig von der Unterteilung in TSA und TAA verschiedene Kategorien von Tumorantigenen unterschieden. In absteigender Reihenfolge ihrer Spezifität für einen bestimmten Tumor handelt es sich dabei um Mutationsantigene, Keimbahnantigene, Differenzierungsantigene und überexprimierte Antigene (**Abb. 1**). Daneben werden auch einige virale Antigene zu den Tumorantigenen gerechnet (SEREMET *et al.*, 2011).

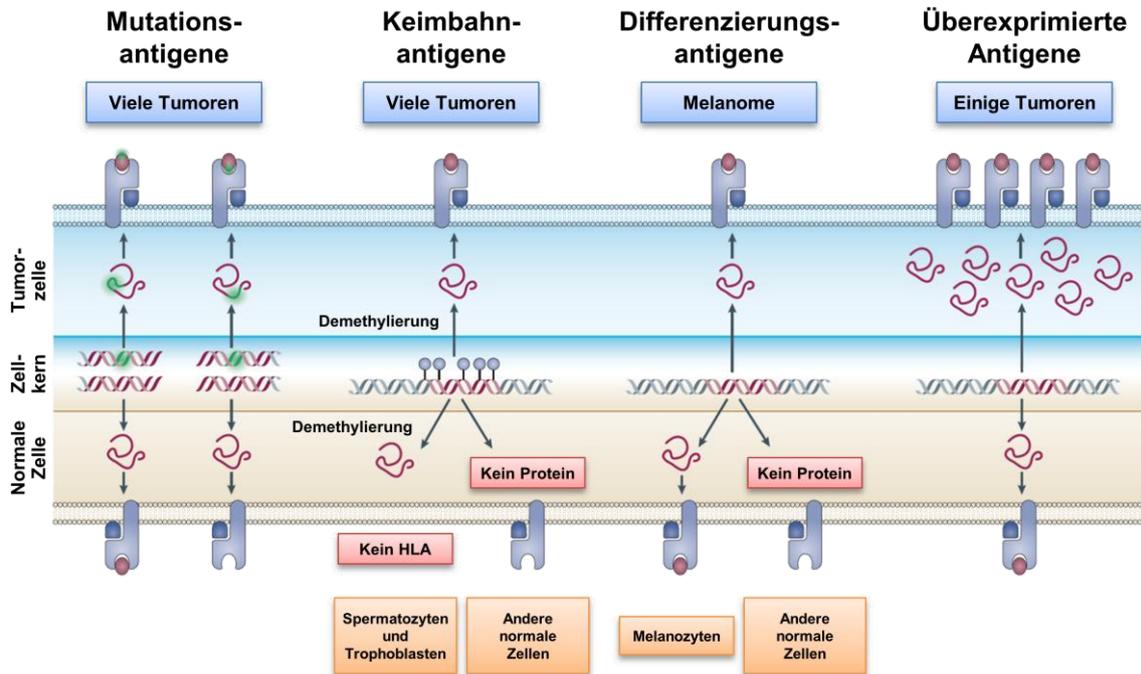


Abb. 1: Übersicht über die verschiedenen Kategorien von Tumorantigenen

Mutationsantigene entstehen durch Punktmutationen oder Translokationen in der Tumorzelle. Keimbahnantigene werden außer in Spermatozyten und Trophoblasten im gesunden Gewebe nicht exprimiert. Differenzierungsantigene werden nur in dem spezifischen Gewebe exprimiert, aus dem der Tumor entsteht. Überexprimierte Antigene werden im Tumorgewebe deutlich stärker exprimiert als im gesunden Gewebe. Virale Antigene sind in dieser Abbildung nicht dargestellt.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach COULIE *et al.*, 2014 (*schriftliche Genehmigung vorliegend*).

1.4.1 Mutationsantigene

Mutationsantigene entstehen in der Regel durch Punktmutationen oder Translokationen in normalen Genen, die ein neues, abnormes Genprodukt bedingen und daher auch als Neoantigene bezeichnet werden. Sie sind oft mit der Tumorgenese oder -progression assoziiert. Häufig handelt es sich dabei um für ein spezifisches Individuum einzigartige Mutationen (DE SMET *et al.*, 1997; LAWRENCE *et al.*, 2013; LOHR *et al.*, 2014).

Mutationsantigene werden in dieser Form nur in den Tumorzellen exprimiert und können daher als TSA bezeichnet werden. Hierunter fällt zum Beispiel das Fusionsprodukt aus BCR (engl. *breakpoint cluster region*) und ABL1 (engl. *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*), das durch eine reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 („Philadelphia-Chromosom“) zustande kommt und vor allem für die Pathogenese der chronischen myeloischen Leukämie (CML) bedeutsam ist (BOSCH *et al.*, 1996).

1.4.2 Keimbahnantigene

Keimbahnantigene werden unter physiologischen Umständen nur in den Spermatozyten des Hodengewebes und in den Trophoblasten der Plazenta exprimiert (JUNGBLUTH *et al.*, 2007). Die HLA-Moleküle der Klasse I dieser Zellen sind durch posttranskriptionale Mechanismen so modifiziert, dass die Zellen von körpereigenen T-Lymphozyten nicht erkannt werden können (GUILLAUX *et al.*, 1996; SMITH und CERUNDOLO, 2001).

In Tumorzellen außerhalb der genannten Gewebe kann es zum Beispiel durch Demethylierung von „stillen Genen“, die normalerweise nicht mehr transkribiert werden, zur Expression von Keimbahnantigenen kommen, die deswegen auch als Tumor-Hoden-Antigene (engl. *cancer/testis antigens* = CTA) bezeichnet werden (DE SMET *et al.*, 1999).

1.4.3 Differenzierungsantigene

Differenzierungsantigene sind spezifisch für ein bestimmtes Gewebe, werden dort aber sowohl von den gesunden Zellen als auch von Tumorzellen, die aus diesem Gewebe entstanden sind, exprimiert. Dementsprechend richten sich für diese Antigene spezifische T-lymphozytäre Immunantworten sowohl gegen Tumor- als auch gegen gesunde Zellen (SEREMET *et al.*, 2011). Zu den Differenzierungsantigenen, die vor allem beim Melanom bekannt sind, gehört unter anderem das Glykoprotein 100 (gp100; BAKKER *et al.*, 1994).

1.4.4 Überexprimierte Antigene

Überexprimierte Antigene sind in verschiedenen gesunden Geweben nachweisbar, daneben aber auch in Tumorzellen. Dort werden sie bedingt durch genetische Mutationen erheblich stärker exprimiert und teilweise auch posttranslational modifiziert, so dass sie den Schwellenbereich für eine Erkennung durch T-Lymphozyten erreichen, die immunologische Toleranz durchbrechen und für eine Immunantwort relevant werden können (BUONAGURO *et al.*, 2011). Hierzu gehören unter anderem HER2/neu (Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2), MUC1 (Mucin 1), PRAME (engl. *preferentially expressed antigen of melanoma*) und WT1.

HER2/neu ist ein Rezeptor für Wachstumsfaktoren, der in geringer Expression auf gesunden Epithelien nachweisbar ist (PRESS *et al.*, 1990), mit einem erhöhten Expressionsmuster dagegen unter anderem bei Mamma- und Ovarialkarzinomen, bei Tumoren des GI-Traktes und der Nieren sowie bei Melanomen (MORGAN *et al.*, 2010; SLAMON *et al.*, 1989).

MUC1 ist ein Transmembranprotein, das in den apikalen Zellen von sekretorischen Epithelien exprimiert wird und für eine Protektion der darunter liegenden Zellschichten sorgt. Eine Expression von MUC1 ist neben dem gastrointestinalen, respiratorischen und reproduktiven Trakt, der weiblichen Brustdrüse und den harnableitenden Wegen auch in hämatopoetischen Zellen nachweisbar (GENDLER, 2001). Die Überexpression eines aberrant glykosylierten MUC1 ist für viele epitheliale Tumoren, aber auch für hämatologische Neoplasien belegt (NATH und MUKHERJEE, 2014).

PRAME supprimiert die antineoplastische Wirkung von Retinsäure auf Zellen durch eine Interaktion mit ihrem Rezeptor (WADELIN *et al.*, 2010). Eine Expression von PRAME ist in diversen Tumorentitäten wie Melanomen, Bronchial- und Nierenzellkarzinomen, aber auch in hämatologischen Neoplasien nachweisbar (KESSLER *et al.*, 2001). Im gesunden Gewebe wird PRAME unter anderem in den Hoden, im Endometrium und in den Ovarien, im Gehirn und in der Haut exprimiert (IKEDA *et al.*, 1997). Da PRAME außerhalb des Hodens allerdings nur sehr gering exprimiert wird, wird es teilweise auch zu den Keimbahnantigenen gerechnet (WADELIN *et al.*, 2010).

WT1 ist ein Transkriptionsfaktor mit Zinkfingermotiven, der in die Regulation von Zellwachstum und -differenzierung involviert ist und beim erwachsenen Menschen unter physiologischen Umständen in den Nieren, der Milz, den Hoden und den Ovarien exprimiert wird (CALL *et al.*, 1990; OHMINAMI *et al.*, 2000). Eine Überexpression von WT1 ist sowohl für hämatologische Neoplasien wie Leukämien und das Multiple Myelom als auch für solide Tumoren nachgewiesen (OKA *et al.*, 2008).

1.4.5 Onkovirale Antigene

Durch onkogene Viren infizierte Zellen exprimieren die auf der viralen Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid* = DNA) kodierte Proteine, die von körpereigenen T-Lymphozyten erkannt werden und damit als Tumorantigene wirken.

Zu dieser Gruppe zählen zum Beispiel die Onkoproteine E6 und E7 des humanen Papillomavirus (HPV) Typ 16, das unter anderem entscheidend mit der Pathogenese von Neoplasien des weiblichen Genitaltrakts assoziiert ist (RESSING *et al.*, 1995), sowie die latenten Membranproteine LMP1 und LMP2 des Epstein-Barr-Virus (EBV), das unter anderem in der Pathogenese von nasopharyngealen Karzinomen eine Rolle spielt (DAWSON *et al.*, 2012).

1.5 Tumorantigene in der Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft unterliegt die Expression von Tumorantigenen besonderen Einflüssen, da zur Abschirmung des semiallogenen Fetus vor einer maternalen Abstoßungsreaktion sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem der Mutter in einem starken Ausmaß moduliert werden (VEENSTRA VAN NIEUWENHOVEN *et al.*, 2003).

So ist für einige Tumorantigene wie das Carcinoembryonale Antigen (CEA) und das α -Fetoprotein (AFP) eine physiologische Expression ausschließlich im fetalen Gewebe belegt, während sie sich im erwachsenen Gewebe nur bei bestimmten Tumoren nachweisen lassen und deswegen auch als onkofetale Antigene bezeichnet werden (XYLINAS *et al.*, 2014).

Bei anderen Tumorantigenen ist dagegen eine Expression in der Plazenta nachweisbar. Aus der Gruppe der überexprimierten Tumorantigene zählen dazu unter anderem HER2/neu (MÜHLHAUSER *et al.*, 1993), MUC1 (JESCHKE *et al.*, 2002), PRAME (IKEDA *et al.*, 1997) und WT1 (FEINGOLD *et al.*, 1998), die im Rahmen der Schwangerschaft teilweise zusätzliche Funktionen übernehmen. So sorgt zum Beispiel MUC1 für die Herabregulierung von dezidualen NK-Zellen und unterstützt damit die Toleranz des semiallogenen Fetus durch das maternale Immunsystem mit der Folge einer geringeren Wachstumsinhibition des Trophoblasten. Im Laufe der erfolgreichen Implantation nimmt die Expression von MUC1 ab, weil dann eine genauere Regulation der Trophoblasteninvasion notwendig wird (LASKARIN *et al.*, 2010; REDZOVIC *et al.*, 2013).

Während der Geburt kann es zum Übertritt dieser TAA von der Plazenta in den maternalen Kreislauf und damit zur Generierung von entsprechenden Immunantworten gegen die TAA durch die Mutter kommen (MEDEN *et al.*, 1997).

1.6 Zielsetzung

Der GvL-Effekt stellt die Grundlage für das kurative Potenzial der allogenen HSZT als Tumorimmuntherapie dar und kommt vor allem durch vom Spender übertragene T-Lymphozyten zustande, die sich gegen die malignen Zellen im Körper des Empfängers richten. Während dabei die Bedeutung von Minorhistokompatibilitätsantigenen – also für das Immunsystem des Spenders unbekannt Antigenen – als Zielstrukturen dieser Immunantworten schon seit einiger Zeit bekannt ist, wurden inzwischen auch Tumorantigene als spezifische Auslöser des GvL-Effektes identifiziert. Immunantworten gegen diese auch unter physiologischen Bedingungen exprimierten Antigene werden bei gesunden Menschen durch Mechanismen der peripheren Toleranz reprimiert. Im Rahmen einer allogenen HSZT können aber durch das veränderte Immunmilieu inklusive einer Lymphodepletion die für diese Immunantworten verantwortlichen T-Lymphozyten expandieren und einen gegen die malignen Zellen gerichteten GvL-Effekt induzieren. Dabei ist bisher unklar, wodurch diese Immunantworten gegen Tumorantigene bei gesunden Menschen, die potenziell als Stammzellspender fungieren können, hervorgerufen werden.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, einerseits die bis dato unbekannt Frequenz von Gedächtnisimmunantworten gegen transplantationsrelevante Tumorantigene bei gesunden Probanden zu bestimmen. Andererseits soll die im Rahmen einer physiologischen Schwangerschaft stattfindende Überexpression von plazentaren Tumorantigenen als Ursprung von Autoimmunprozessen gegen Tumorantigene aufgezeigt werden. Hierfür wurden mit HER2/neu, MUC1, PRAME und WT1 vier Tumorantigene ausgewählt, die einerseits eine klinische Bedeutung im Rahmen der Tumorimmuntherapie besitzen und für die andererseits eine plazentare Expression belegt ist.

Die in dieser Arbeit erlangten Kenntnisse sollen zur Optimierung der Suche nach einem geeigneten Stammzellspender und damit auch der HSZT als Tumorimmuntherapie beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Aqua ad iniectabilia „Ampuwa“-Spüllösung	Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Deutschland)
Brefeldin A Reinheit ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat Reinheit ≥ 99 %	Calbiochem, Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
CD8-positives Zellisolationskit „Dynabeads“ und „DETACHaBEAD“	Invitrogen Dynal AS (Oslo, Norwegen)
Chloroform Reinheit ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator-Desinfektionslösung „Incuwater-Clean“	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Desoxyribonuklease I 203,7 U/μl	Invitrogen by Life Technologies Ltd. (Paisley, Großbritannien)
Dimethylsulfoxid Reinheit ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)
Ethanol Reinheit ≥ 99,5 %	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
FACS-Desinfektionslösung „FACS Clean“	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
FACS-Lyselösung „FACS Lysing Solution 10X“	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
FACS-Permeabilisierungslösung „FACS Permeabilizing Solution 2“	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
FACS-Reinigungslösung „FACS Rinse“	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
FACS-Trägerflüssigkeit „FACS Flow“	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Fetales bovines Serum hitzeinaktiviert	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)

GTC-Phenol „TRIzol Reagent“	Invitrogen by Life Technologies Ltd. (Paisley, Großbritannien)
Humanes AB-Serum „Human Serum, Off the Clot, AB“	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Ionomycin Calciumsalz, Reinheit ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)
Lymphozytenseparationsmedium „LSM 1077“	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Lysepuffer „BioWhittaker ACK Lysing Buffer“	Lonza Inc. (Walkersville, Maryland, USA)
Monensin „BD GolgiStop“ 3mM	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid Reinheit ≥ 98 %	Calbiochem, Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Nukleasefreies Wasser Reinheit 100 %	Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)
Paraformaldehyd Reinheit 95 %	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat Reinheit ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)
2-Propanol Reinheit $\geq 99,5$ %	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
RNA-Pufferlösung „RNA Storage Solution“	Ambion by Life Technologies Ltd. (Paisley, Großbritannien)
Staphylokokken-Enterotoxin B von <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)
Trypanblau „Trypan Blue Stain (0.4 %)“	Gibco by Life Technologies Ltd. (Paisley, Großbritannien)
„Vi-CELL“ Reagenzpack Trypanblau, Puffer- und Reinigungslösung	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Wasserbadschutz „AKASOLV Aqua Care“	Akadia-Chemie (Mannheim, Deutschland)

2.1.2 Zelllinien

Die in dieser Arbeit eingesetzten T2-Zellen sind defizient für den Antigenpeptid-Transporter (engl. *transporter associated with antigen processing* = TAP) und präsentieren dementsprechend auf ihren HLA-Molekülen der Klasse I keine zelleigenen Peptide. Stattdessen können die HLA-Moleküle *in vitro* mit externen Peptiden beladen werden (LUFT *et al.*, 2001).

T2-Zellen (CRL-1992)

B- und T-Zell-Hybrid (SALTER *et al.*, 1985)

American Type Culture Collection

(Manassas, Virginia, USA)

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden von *BD Biosciences* (San José, Kalifornien, USA) bezogen.

Spezifität	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Produktnummer
Anti-CD3	SK7	Maus IgG ₁ , κ	APC/FITC	BD-345767/3
Anti-CD4	SK3	Maus IgG ₁ , κ	PE	BD-345769
Anti-CD8	SK1	Maus IgG ₁ , κ	PerCP	BD-345774
Anti-CD107a	H4A3	Maus IgG ₁ , κ	FITC	BD-555800
Anti-CD107b	H4B4	Maus IgG ₁ , κ	FITC	BD-560946
Anti-IFN-γ	25723.11	Maus IgG _{2b} , κ	APC	BD-341117

2.1.3.2 Antikörper für den IFN-γ-ELISPOT

Die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper für den IFN-γ-ELISPOT wurden von *Mabtech AB* (Nacka Strand, Schweden) bezogen.

Spezifität	Klon	Isotyp	Funktion	Produktnummer
Anti-IFN-γ	1-D1K	Maus IgG ₁	Erstantikörper	3420-3-1000
Anti-IFN-γ	7-B6-1-Biotin	Maus IgG ₁	Zweitantikörper	3420-6-1000

2.1.4 Peptide und Dextramere

2.1.4.1 Peptide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Peptide wurden von *Bio-Synthesis Inc.* (Lewisville, Texas, USA) synthetisiert. Die Reinheit aller Peptide betrug nach Herstellerangaben > 95 %.

Antigen	HLA-Allel	Peptidsequenz	Position	Referenz
CMV-pp65	A*02:01	NLVPMVATV	495–503	WILLS <i>et al.</i> , 1996
gp100	A*02:01	IMDQVPFSV	209–217	PASS <i>et al.</i> , 1998
HER2/neu	A*02:01	KIFGSLAFL	369–377	FISK <i>et al.</i> , 1995
MUC-1	A*02:01	STAPPVHNV	950–958	BROSSART <i>et al.</i> , 1999
PRAME	A*02:01	ALYVDSLFFL	300–309	KESSLER <i>et al.</i> , 2001
WT1	A*02:01	RMFPNAPYL	126–134	OKA <i>et al.</i> , 2000

2.1.4.2 Dextramere

Die in dieser Arbeit eingesetzten Dextramere wurden von *Immudex* (Kopenhagen, Dänemark) bezogen.

Antigen	HLA-Allel	Peptidsequenz	Fluorochrom	Produktnummer
CMV-pp65	A*02:01	NLVPMVATV	APC	WB2132-APC
HER2/neu	A*02:01	KIFGSLAFL	APC	WB2735-APC
MUC-1	A*02:01	STAPPVHNV	APC	WB3427-APC
Negativkontrolle	A*02:01	–	APC	WB2666-APC
PRAME	A*02:01	ALYVDSLFFL	APC	WB3428-APC
WT1	A*02:01	RMFPNAPYL	APC	WB2177-APC

2.1.5 Medien, Puffer und Stocklösungen

BFA-Stocklösung	5 µg/µl BFA in Ethanol (100 %)
DNase I-Stocklösung	10 U/µl DNase I in PBS
„Dynabeads-Puffer 1“	PBS (ohne Calcium und Magnesium) 0,1 % BSA (0,5 g in 500 ml PBS) 2 mM EDTA (290 g in 500 ml PBS) pH 7,4
„Dynabeads-Puffer 2“	FBS (1 %) RPMI 1640 (99 %)
Einfriermedium	FBS (40 %) RPMI 1640 (60 %)
ELISPOT-Reaktionslösung	11 ml Tris pH 9,5 200 µl BCIP 100 µl NBT
HABS-Medium	Humanes AB-Serum (10 %) RPMI 1640 (90 %)
Ionomycin-Stocklösung	0,5 mg/ml Ionomycin in DMSO
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	„Dulbecco's PBS“ ohne Calcium und Magnesium (<i>Gibco by Life Technologies Ltd., Paisley, Großbritannien</i>)
PMA-Stocklösung	0,1 mg/ml PMA in DMSO
RPMI 1640	„RPMI Medium 1640 + GlutaMAX-I“ (<i>Gibco by Life Technologies Ltd., Paisley, Großbritannien</i>)
Zellkulturmedium	FBS (10 %) RPMI 1640 (90 %)

2.1.6 Computerprogramme und Datenbanken

2.1.6.1 Computerprogramme

CellQuest Pro 4.0.2	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
CFX Manager 1.6	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
CorelDraw Graphics Suite X5	Corel Corporation (Ottawa, Ontario, Kanada)
EndNote X6	Thomson Reuters Corporation (New York City, New York, USA)
FlowJo 7.6.1	Tree Star Inc. (Ashland, Oregon, USA)
ImmunoSpot Academic 4.0.16	Cellular Technology Ltd. (Shaker Heights, Ohio, USA)
IS-H*med für SAP ECC 6.0	Siemens AG, Healthcare Sector (Erlangen, Deutschland)
Office 2013	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
Prism 5.04	GraphPad Software Inc. (San Diego, Kalifornien, USA)
Vi-CELL XR-Software 2.03	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
WinTransmed	Elter Computertechnik (Würzburg, Deutschland)

2.1.6.2 Datenbanken

GeneCards	Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel) http://www.genecards.org/
PubMed	National Library of Medicine (Bethesda, Maryland, USA) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Tumor T Cell Antigen Database	Dana-Faber Cancer Institute (Boston, Massachusetts, USA) http://cvc.dfci.harvard.edu/tadb/

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeitshypothese

Die Arbeitshypothese der dieser Dissertation zugrunde liegenden Studie lautete: *„Bei Frauen kommt es im Rahmen der Schwangerschaft zu einer Immunisierung gegen tumorassoziierte Antigene, wie sie beispielsweise von der fetoplazentaren Einheit exprimiert werden. Bei einer Persistenz dieser Immunität auch über die Schwangerschaft hinaus sollten Frauen nach einer stattgehabten Schwangerschaft häufiger nachweisbare Immunantworten gegen diese tumorassoziierten Antigene zeigen als Männer oder als Frauen, die noch nie schwanger waren.“*

2.2.2 Studienplanung

Die dieser Dissertation zugrunde liegende Studie wurde von Herrn PROF. DR. MED. STEPHAN MIELKE (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Würzburg) und Herrn PROF. DR. RER. NAT. CHRISTOPH OTTO (Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Würzburg) geplant.

Als Projekt „D-150“ mit dem Titel „Expression von Tumorantigenen während der Schwangerschaft als Auslöser zellulärer Autoimmunantworten und Grundlage von Graft-versus-Leukämie-Effekten in der allogenen Stammzelltransplantation“ wurde die Studie vom Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 1. Juli 2010 bis zum 30. Juni 2013 gefördert.

2.2.2.1 Biometrisches Studiendesign

Das biometrische Studiendesign basierte auf Berechnungen von Herrn DR. RER. NAT. UWE MÄDER (Tumorregister Mainfranken der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg).

Als Berechnungsgrundlage wurde dabei die Frequenz der gegen das tumorassoziierte Antigen WT1 (Wilms-Tumor-Protein 1) gerichteten Immunantworten verwendet. Für das Kollektiv aller gesunden Probanden wurde hierbei der Literatur folgend von einer Frequenz von 20 % ($f = 0,2$)

ausgegangen (REZVANI *et al.*, 2003). In Anbetracht der der Annahme, dass diese Frequenz von abgelaufenen Schwangerschaften und Geburten beeinflusst werden könnte, wurde für Männer und für Frauen mit negativer Schwangerschaftsanamnese eine halb so große Frequenz ($f_1 = 0,1$), für Frauen mit einer positiven Geburtenanamnese dagegen eine doppelt so hohe Frequenz postuliert ($f_2 = 0,4$).

Die Studie wurde mit zwei zu untersuchenden Hauptgruppen geplant:

Die Hauptgruppe 1 sollte im Querschnitt analysiert werden und aus gesunden Blutspendern bestehen, die in drei gleich große Subgruppen zu unterteilen waren: In eine Subgruppe von Männern, in eine Subgruppe von Frauen mit einer negativen Schwangerschaftsanamnese und in eine Subgruppe von Frauen mit einer positiven Geburtenanamnese. Bei Anwendung eines zweiseitigen Chi-Quadrat-Testes nach PEARSON mit einer Power von 80 % ($\beta = 0,2$) und einem Signifikanzniveau von 95 % ($\alpha = 0,05$) ergab sich für diese drei geplanten Subgruppen eine Fallzahl von jeweils mindestens 38 Probanden, um zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede in den Immunantworten gegen die tumorassoziierten Antigene darstellen zu können.

Die Hauptgruppe 2 sollte aus erstmalig schwangeren Frauen bestehen, die im Verlauf ihrer Schwangerschaft longitudinal untersucht werden sollten. Zur Planung der Gruppengröße kam ein auf denselben Parametern wie bei der Hauptgruppe 1 basierender gepaarter Chi-Quadrat-Test nach McNEMAR zum Einsatz. Hierbei ergab sich ebenfalls eine Gruppengröße von mindestens 38 Probanden, um die Konversion der zu untersuchenden Immunantworten im Verlauf der Schwangerschaft und nach der Geburt signifikant darstellen zu können (**Abb. 2**).

Da alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide HLA-A*02:01-restringiert sind, musste dieses HLA-Merkmal bei allen für die Studie zu rekrutierenden Probanden vorliegen (siehe **2.2.4**).

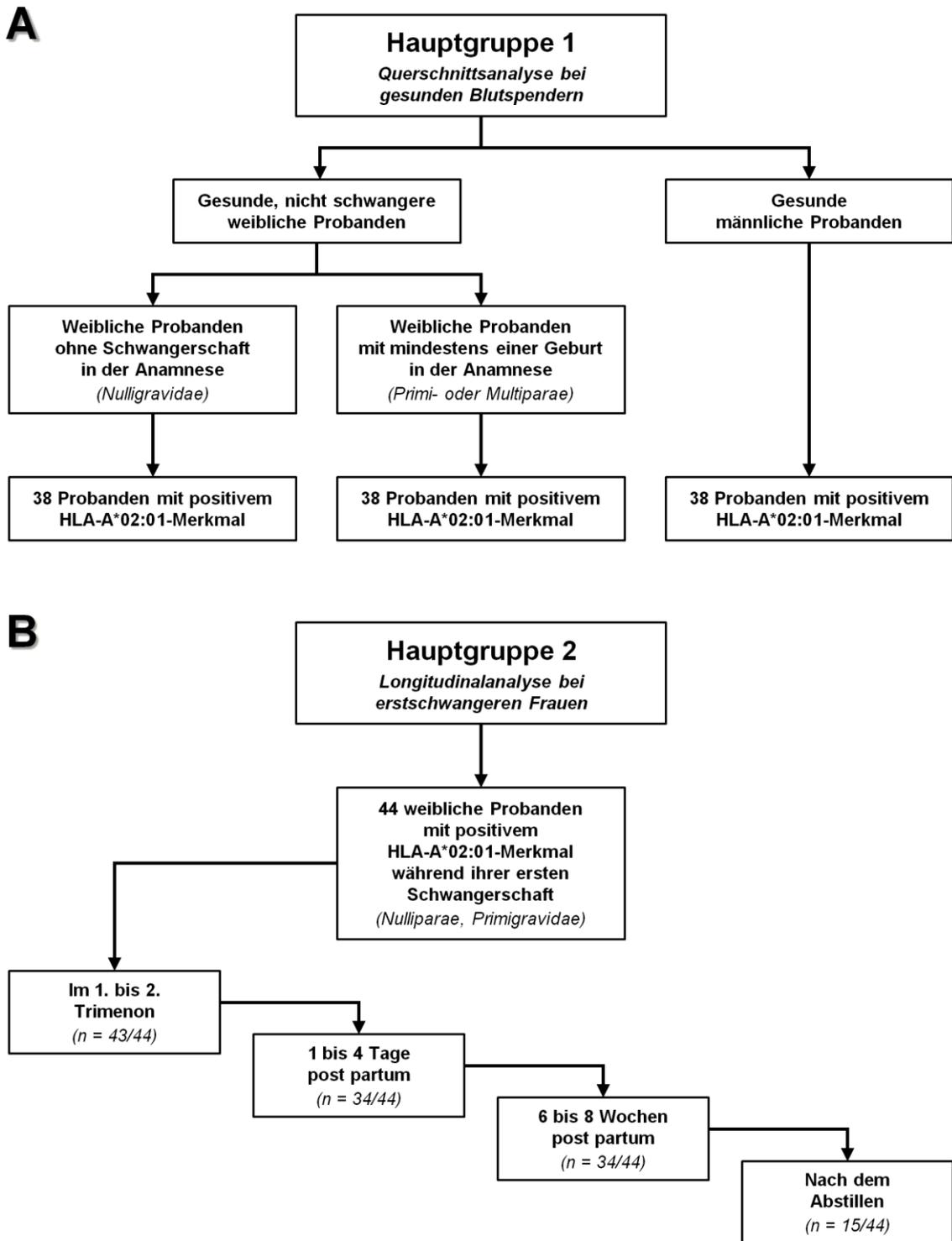


Abb. 2: Übersicht über die Studiengruppen

Die Hauptgruppe 1 (A) bestand entsprechend dem biometrischen Studiendesign aus drei Subgruppen (Frauen mit negativer Schwangerschaftsanamnese, Frauen mit positiver Geburtenanamnese und Männer) mit jeweils 38 Probanden.

Die Hauptgruppe 2 (B) umfasste insgesamt 44 weibliche Probanden, die im Longitudinalverlauf während ihrer ersten Schwangerschaft untersucht wurden.

2.2.2.2 Ethikvotum

Die initiale Begutachtung der geplanten Studie durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg erfolgte in der Sitzung vom 15. Juni 2009. Hierbei ergaben sich keine ethischen oder rechtlichen Bedenken gegen die Durchführung der Studie (Aktenzeichen 115/09). Im Verlauf der Studie wurden fünf Amendments eingereicht, die jeweils von der Ethikkommission begutachtet wurden und gegen die keine ethischen oder rechtlichen Bedenken bestanden.

2.2.3 Probandenrekrutierung und -befragung

Die Rekrutierung der Probanden für die Hauptgruppe 1 erfolgte größtenteils unter den freiwilligen Thrombozytenspendern des Institutes für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg. Daneben wurden einige Probanden anderweitig rekrutiert. Die potenziellen Studienteilnehmer wurden mit dem von der Ethikkommission genehmigten Aufklärungsbogen über die Studie aufgeklärt.

Die Rekrutierung der schwangeren Probanden der Hauptgruppe 2 erfolgte in mehreren gynäkologischen Praxen im Großraum Würzburg sowie in der Ambulanz der Frauenklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg. Die potenziellen Studienteilnehmer wurden mit dem von der Ethikkommission genehmigten Aufklärungsbogen über die Studie aufgeklärt.

Nach der Aufnahme in die Studie wurde allen Probanden beim ersten Spendetermin ein Fragebogen vorgelegt, in dem sie nach Vorerkrankungen, Medikamenten und im Falle der weiblichen Subgruppen nach oraler Kontrazeption, nach bisherigen Schwangerschaften und nach einem möglichen postmenopausalen Zustand befragt wurden. Der postmenopausale Zustand wurde dabei als letzte menstruale Blutung mindestens zwölf Monate vor der Aufnahme in die Studie definiert.

Der serologische CMV-Status der Probanden aus der Hauptgruppe 1 wurde aus der Datenbank des Institutes für Virologie und Immunbiologie des Universitätsklinikums Würzburg als Rohwert des Enzygnost-ELISA (*Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland*) übernommen.

2.2.4 HLA-Typisierung

Da alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide HLA-A*02:01-restringiert sind, wurde vor der Aufnahme der Probanden in die Studie im Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg eine HLA-Typisierung im A-Locus mittels Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction* = PCR) durchgeführt. Hierbei wird zwischen einer niedrigauflösenden Typisierung nur auf die Allelgruppen der einzelnen HLA-Antigene (zum Beispiel HLA-A*02) und einer hochauflösenden Typisierung auch auf die Einzelallele (zum Beispiel HLA-A*02:01) unterschieden.

Für die Hauptgruppe 1 wurden nur Thrombozytenspender ausgewählt, bei denen zu einem früheren Zeitpunkt eine niedrigauflösende HLA-Typisierung im A-Locus vorgenommen worden war, die das HLA-A*02-Merkmal ergeben hatte. Diesen Probanden wurden im Rahmen eines Spendetermins zusätzlich 2,7 ml Blut in eine mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) antikoagulierte Monovette (*Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland*) entnommen. Daraus erfolgte die hochauflösende HLA-A*02:01-Typisierung.

Den Probanden der Hauptgruppe 2 wurden ebenfalls 2,7 ml Blut in eine EDTA-Monovette entnommen. Diese Probe wurde zunächst niedrigauflösend im A-Locus typisiert. Nur wenn sich hierbei die HLA-A*02-Allelgruppe ergab, wurde hochauflösend auf das HLA-A*02:01-Merkmal typisiert.

HLA-A*02:01-negative Probanden aller Gruppen wurden nicht in die Studie aufgenommen.

2.2.5 Probengewinnung

2.2.5.1 Proben aus Leukozytenreduktionssystem-Kammern

Im Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg kommt für die Thrombozytenspende das Blutkomponenten-Sammelsystem „Trima Accel“ (*Terumo BCT Inc., Colorado, USA*) zum Einsatz, welches das Vollblut in seine Hauptkomponenten auftrennt und Thrombozyten und Plasma in Beuteln sammelt. Die Leukozyten werden mit Hilfe eines Leukozytenreduktionssystems (LRS) herausgefiltert und reichern sich hochkonzentriert in einer LRS-Kammer an. Die restlichen Blutbestandteile werden in den Körper des Spenders zurückgeführt (*BURGSTALER et al., 2004*).

Die meisten Blutproben der Probanden aus der Hauptgruppe 1 wurden aus den LRS-Kammern gewonnen, die nach Abschluss der Thrombozytenspende von den Mitarbeitern des Institutes aus dem Blutkomponenten-Sammelsystem entfernt wurden (*DIETZ et al., 2006*). Die Proben wurden innerhalb weniger Stunden im Labor weiterverarbeitet.

2.2.5.2 Vollblutproben

Die Blutproben der Probanden aus der Hauptgruppe 2 sowie eines Teils der Probanden aus der Hauptgruppe 1 wurden über eine Vollblutentnahme gewonnen. Dabei wurden bei jedem Entnahmeterrin 90 ml Blut über einen venösen Zugang mit einem Butterfly-Blutentnahmesystem („*Safety-Multifly*“, *Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland*) in EDTA-antikoagulierte Monovetten entnommen. Zur quantitativen Messung der Hormonspiegel im Serum der Probanden der Hauptgruppe 2 wurden zusätzlich 7,5 ml Blut in eine Serum-Monovette (*Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland*) entnommen (siehe **2.2.12**). In einzelnen Fällen waren aufgrund der Venenverhältnisse weniger als 90 ml Blut zu akquirieren. Die Proben wurden innerhalb weniger Stunden im Labor weiterverarbeitet.

2.2.6 Blutbildbestimmung

Vor der Verdünnung einer Vollblutprobe für die Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.2.7) wurden 2 ml der Probe in eine EDTA-antikoagulierte Monovette überführt und daraus mit einem Hämatologie-Analysator („KX-21N“, *Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland*) ein Blutbild erstellt.

Dabei saugt das Gerät 50 µl der Blutprobe an, verdünnt diese in einer Pufferlösung und führt gegebenenfalls eine Hämolyse durch. In der Messkammer wird anschließend nach dem Widerstandsmessprinzip (Impedanzprinzip) die Zahl der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten ermittelt. Die Hämoglobin-Konzentration (HGB) wird durch ein zyanidfreies Photometrierfahren bestimmt. Aus diesen gewonnenen Werten berechnet der Analysator insgesamt neunzehn verschiedene Parameter. Nach jedem Messdurchgang spült das Gerät automatisch alle Schläuche und Kammern, um Kontaminationen zu vermeiden.

2.2.7 Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein physikalisches Trennverfahren, bei dem die unterschiedliche Migration von Zellen während der Zentrifugation zur Bildung von Schichten führt, in denen sich die einzelnen Zelltypen entsprechend ihrer Schwebedichte ansammeln. Um nach der Zentrifugation eine Vermischung durch Konvektion zu vermeiden, wird durch ein Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin (Lymphozytenseparationsmedium = LSM) ein Dichtegradient aufgebaut, so dass die höchste Dichte am Boden des Röhrchens liegt und von dort an nach oben immer weiter abnimmt. So kann die gewünschte Zellpopulation entsprechend dieser Auftrennung gezielt entnommen werden (BÖYUM, 1968).

Zur Vorbereitung auf die Dichtegradientenzentrifugation wurden die Vollblutproben im Verhältnis 1:1 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline* = PBS) verdünnt, die Proben aus den LRS-Kammern dagegen mit 50 ml PBS. Danach wurde in 50 ml-Röhrchen (*Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland*) das verdünnte Blut im Verhältnis 2:1 vorsichtig auf das vorgelegte LSM aufgeschichtet und die Röhrchen für 30 min

bei 677 x g (Beschleunigung 9, Bremse 1) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert („Heraeus Multifuge 1S“, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Anschließend wurden die mononukleären Zellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells* = PBMCs) aus der Interphase (**Abb. 3**) abpipettiert und in neue Röhrchen überführt, die mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und dann bei 300 x g für 10 min bei RT (Beschleunigung 9, Bremse 9) zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, die Röhrchen wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 200 x g für 10 min bei RT (Beschleunigung 9, Bremse 9) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, die PBMCs wurden gezählt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

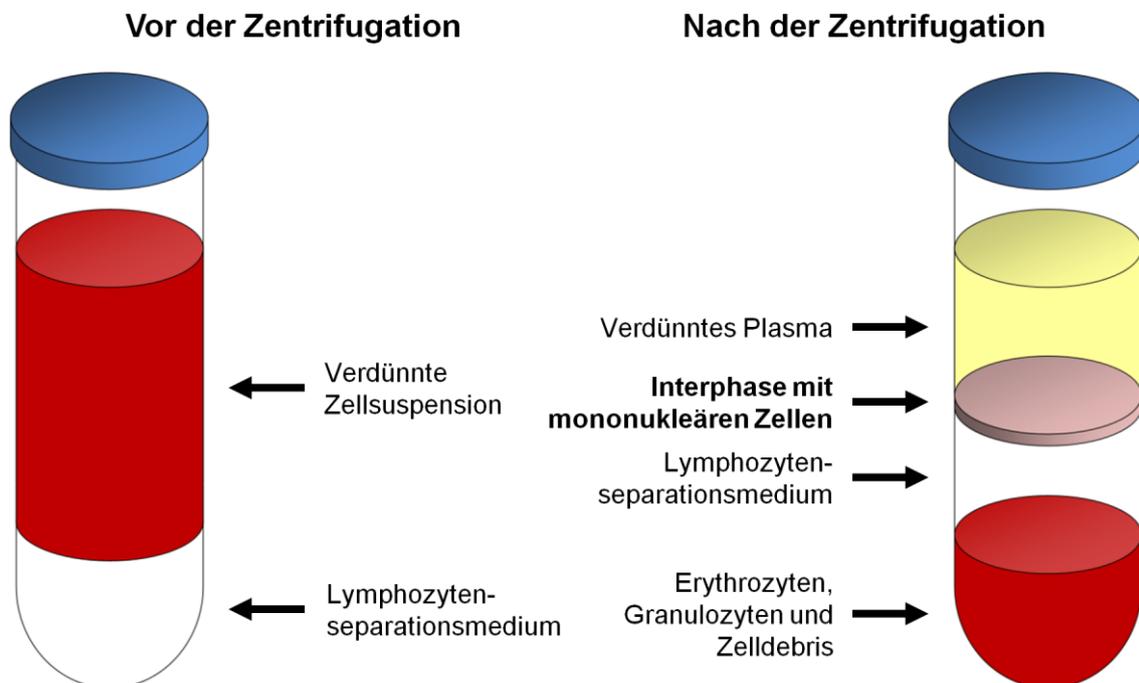


Abb. 3: Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation

Die verdünnte Zellsuspension wird vorsichtig auf das Lymphozytenseparationsmedium aufgeschichtet. Nach der Zentrifugation ergeben sich mehrere Schichten, in denen sich die verschiedenen Zelltypen entsprechend ihrer Schwebedichte angesammelt haben. Die mononukleären Zellen befinden sich in einer dünnen Interphase.

2.2.8 Bestimmung der Zellzahl

2.2.8.1 Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der vitalen Zellzahl mittels der Neubauer-Zählkammer („*Neubauer Improved*“, *HBG Henneberg-Sander GmbH, Gießen-Lützellinden, Deutschland*) wurden die zu zählenden Zellen im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (0,4 %) vermischt, das sich nur in toten Zellen anreichert. Unter dem Lichtmikroskop („*Primo Star*“, *Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland*) wurden nun bei zehnfacher Vergrößerung die ungefärbten Zellen in mindestens zwei der vier Großquadrate der Neubauer-Zählkammer mäanderförmig gezählt. Aus der Summe der erhobenen Zellen wurde in Bezug auf die ausgewerteten Großquadrate der Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension konnte dann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.8.2 „Vi-CELL XR“-Zellanalysator

Das „Vi-CELL XR“ (*Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland*) ist ein vollautomatischer Zellanalysator, der mittels Trypanblaufärbung die Zellzahl und weitere Parameter wie die Zellvitalität in einer Suspension bestimmen kann. Im Gegensatz zur Neubauer-Zählkammer werden dabei unterschiedliche Ergebnisse einer Zellzählung durch verschiedene Benutzer ausgeschlossen (KÖNIG, 2004). Die zu zählenden Zellen wurden in einem „Vi-CELL Sample Vial“ (*Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland*) im Verhältnis 1:50 in „ACK Lysing Buffer“ verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min, in der die Erythrozyten in der Lösung durch den Puffer spezifisch lysiert wurden, wurde das „Vi-CELL Sample Vial“ in den Probearm des „Vi-CELL XR“-Zellanalysators gestellt. Das Gerät wurde über die dazugehörige „Vi-CELL XR-Software 2.03“ gesteuert. Der Zählvorgang erfolgte unter Einstellung des Verdünnungsfaktors 1:50 bei einem zu erfassenden Zelldurchmesser von 5 bis 50 µm.

2.2.9 Zellkultivierung

Die Kultivierung sowohl der Spenderzellen (PBMCs oder CD8⁺ T-Lymphozyten) als auch der für TAP (engl. *transporter associated with antigen processing*) defizienten Zelllinie T2 erfolgte im CO₂-Brutschrank („*INCO 108/246*“, *Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland*) bei einer Temperatur von 37°C, einer CO₂-Sättigung von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %.

2.2.10 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung ermöglicht die langfristige Lagerung von Zellen unter weitgehendem Erhalt der Vitalität. Dabei werden die Zellen unter Einsatz eines Gefrierschutzmittels zunächst in einer speziellen Kryoeinfrierbox, die mit 2-Propanol (Isopropylalkohol = IPA) gefüllt ist, um 1°C pro Stunde bis zu einer Temperatur von -80°C abgekühlt und dann in Flüssigstickstoff überführt, wo sie bei einer Temperatur von etwa -150°C dauerhaft gelagert werden können.

2.2.10.1 Einfrieren von Zellen

Für jedes einzufrierende Kryoröhrchen („*CryoGen*“, *A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland*) wurde eine maximale Zellzahl von 5×10^7 Zellen angestrebt. Diese Zellsuspension wurde in 900 µl Einfriermedium aufgenommen und im Verhältnis 1:1 mit dem Gefrierschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO; 1:4 in Einfriermedium) in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden abschließend kräftig durchmischt und in einer Kryoeinfrierbox („*Mr. Frosty*“, *Nalge Nunc International Co., Rochester, New York, USA*) im Ultratiefkühlschrank („*MDF-U7386S*“, *Sanyo Electric Co. Ltd., Osaka, Japan*) gelagert. Spätestens nach sieben Tagen konnten die Kryoröhrchen dann in den Flüssigstickstofflagertank („*CryoPlus 1*“, *Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA*) überführt werden.

2.2.10.2 Auftauen von Zellen

Für den Auftauvorgang wurden die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstofflagertank entnommen und ohne zeitliche Verzögerung in einem Schwimmständer (*A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland*) in das 37°C-Wasserbad („*WNB 22*“, *Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach,*

Deutschland) gestellt. Nach der vollständigen Ablösung des gefrorenen Zellpellets vom Boden der Kryoröhrchen wurde die darin enthaltene Suspension in ein Röhrchen mit Zellkulturmedium überführt. Um eine Verklumpung der Zellen durch freigewordene DNA zu vermeiden, wurde dem Röhrchen außerdem Desoxyribonuklease I (2 ml DNase-Stocklösung 10 U/µl pro Kryoröhrchen) beigegeben und die Lösung resuspendiert. Nach einer Zentrifugation bei 300 x g für 10 min (Beschleunigung 9, Bremse 9) bei RT wurde der Überstand abgesaugt. Abschließend wurden die Zellen in eine mit Zellkulturmedium vorbereitete Zellkulturflasche („CELLSTAR“, *Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland*) überführt und für mindestens 2 h bei 37°C und 5 % CO₂ im CO₂-Brutschrank inkubiert.

2.2.11 Bestrahlung von Zellen

Zur Hemmung der Zellteilung bei gleichzeitig erhaltener Vitalität wurden die Zellen in einem Röntgenbestrahlungssystem („CP-160“, *Faxitron Bioptics LLC, Tucson, Arizona, USA*) mit einer Energiedosis von 30 Gy bestrahlt, die mit einer Bestrahlungsdauer von 8 min bei einer elektrischen Spannung von 160 kV und einer Stromstärke von 6,3 mA erreicht wurde.

2.2.12 Quantitative Messung von Hormonspiegeln

Zur Bestimmung der schwangerschaftsrelevanten Hormonspiegel im Serum wurden den Probanden der Hauptgruppe 2 bei jedem Entnahmeterrin 7,5 ml Blut aus einer Armvene in eine Serum-Monovette entnommen. Die Monovette wurde für 10 min bei 2500 x g zentrifugiert, anschließend wurde jeweils 1 ml des Überstandes in ein Reaktionsgefäß (*Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland*) überführt. Diese Proben wurden bei -80°C gelagert.

Die quantitative Messung der Hormonspiegel für Estradiol, β-humanes Choriongonadotropin (β-HCG), Prolaktin und Progesteron erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg durch einen immunologischen *in vitro*-Test mit Hilfe des Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA; *Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland*).

2.2.13 Isolation von CD8⁺ T-Lymphozyten

„Dynabeads CD8“ sind 4,5 µm große magnetisierbare Partikel aus Polystyrol, die an einen murinen monoklonalen Anti-CD8-Antikörper gekoppelt sind und dadurch an die Subpopulation der CD8⁺ T-Lymphozyten binden. Diese können dann von einem Magneten angezogen und von den restlichen Zellen getrennt werden (Positivisolierung). Um die so isolierten CD8⁺ T-Lymphozyten wieder von den „Dynabeads CD8“ zu lösen, wird anschließend „DETACHaBEAD CD8“ zugegeben. Dieser polyklonale Antikörper vom Schaf richtet sich gegen den F_{ab}-Teil der „Dynabeads CD8“ und gibt dadurch die isolierten Zellen wieder frei (**Abb. 4**). Mit diesem Verfahren lässt sich eine Reinheit von über 90 % CD8⁺ T-Lymphozyten erreichen (LUNDGREN *et al.*, 2003).

Die Isolation der CD8⁺ T-Lymphozyten aus den PBMCs wurde gemäß den Herstellervorgaben mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Die „Dynabeads CD8“ wurden dreimal mit 1 ml „Dynabeads-Puffer 1“ gewaschen, daneben wurde zur Erhöhung der Zellausbeute der finale Waschschrift zur Lösung der „Dynabeads CD8“ von den CD8⁺ T-Lymphozyten fünfmal mit „Dynabeads-Puffer 2“ wiederholt (LUNDIN *et al.*, 2002).

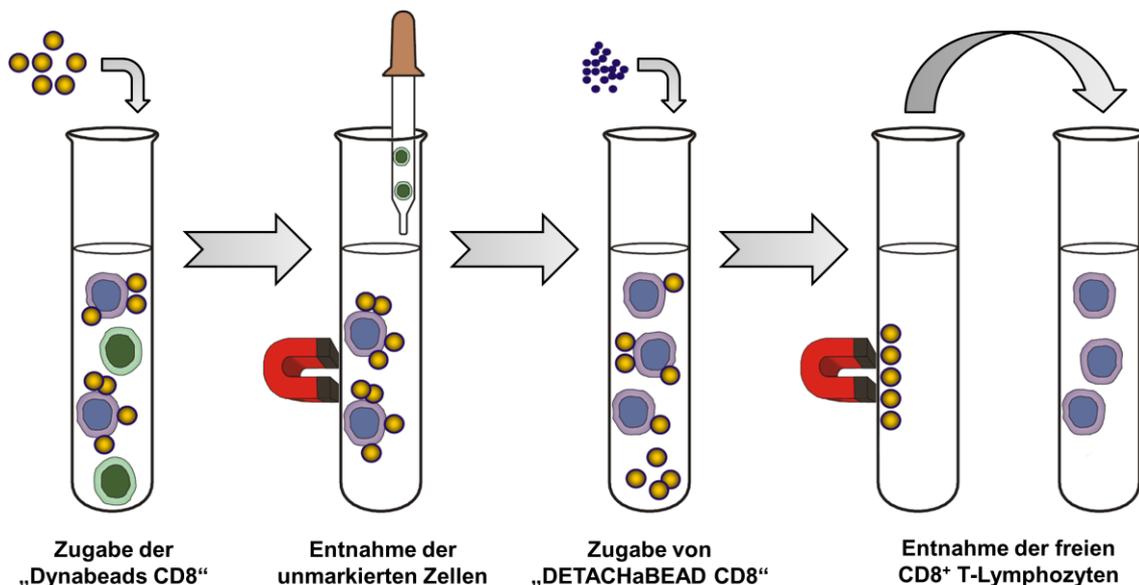


Abb. 4: Schema zum Ablauf der Isolation von CD8⁺ T-Lymphozyten

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach einer Grafik, die freundlicherweise von LIFE TECHNOLOGIES (Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt wurde (*schriftliche Genehmigung vorliegend*).

2.2.14 Restimulation antigenspezifischer T-Lymphozyten

Zur Restimulation antigenspezifischer T-Lymphozyten wurden zunächst jeweils 1×10^6 CD8⁺ T-Lymphozyten in 200 µl HABS-Medium pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte („*Nunclon Surface*“, *Nunc A/S, Roskilde, Dänemark*) überführt. Die Platte wurde anschließend über Nacht bei 37°C im CO₂-Brutschrank (5 % CO₂) inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 1×10^6 T2-Zellen mit 100 µl RPMI in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit jeweils 2 µl der untersuchten Peptide in zwei Konzentrationen (0,1 µmol/l bzw. 10 µmol/l) beladen. Nach einer Inkubation von 2 h im CO₂-Brutschrank (37°C; 5 % CO₂) wurden die beladenen T2-Zellen bestrahlt, bei 500 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und in 500 µl RPMI gewaschen. Die 1×10^6 T2-Zellen wurden dann in 50 µl HABS-Medium zu den 1×10^6 CD8⁺ T-Lymphozyten pro Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte außerdem die Zugabe der Positivkontrolle in eine Vertiefung nur mit CD8⁺ T-Lymphozyten. Hierzu wurden die PMA-Stocklösung im Verhältnis 1:100 und die Ionomycin-Stocklösung im Verhältnis 1:10 in PBS verdünnt und dann 10 µl der PMA- und 8 µl der Ionomycinlösung zu den CD8⁺ T-Lymphozyten gegeben. Nach einer Inkubation im CO₂-Brutschrank (37°C; 5 % CO₂) über 3 h standen die Zellen zur weiteren Verwendung bereit.

2.2.15 Ribonukleinsäure-Isolation

Zur Isolation der zellulären Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid* = RNA) und ihrer Trennung von Ribonukleasen (RNasen) wurde die Einschritt-Methode mit Guanidiniumthiocyanat (GTC), Phenol und Chloroform eingesetzt (CHOMCZYNSKI und SACCHI, 1987).

Für die RNA-Isolation wurden die restimulierten T-Lymphozyten (siehe **2.2.14**) zunächst für 5 min bei 500 x g (Beschleunigung 5, Bremse 5) bei RT in PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend mit 1 ml GTC-Phenol resuspendiert, dann bei 2500 rpm vortexiert („*Mixer Uzusio VTX-3000L*“, *Laboratory & Medical Supplies Co. Ltd., Tokyo, Japan*) und in einen Kühlakkuständer gestellt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden jeweils 200 µl Chloroform hinzupipettiert, die Reaktionsgefäße bei 2500 rpm vortexiert

und wieder im Kühlakkuständer für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 16.060 x g für 15 min bei 4°C. Aus der nun entstandenen Dreischichtung wurde vorsichtig die obere transparente Phase abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl IPA (100 %) überführt. Danach wurden die Reaktionsgefäße mehrmals invertiert und über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Reaktionsgefäße bei 13.684 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und dann zu jeder Probe 1 ml Ethanol (mit 25 % nukleasefreiem Wasser) pipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 5345 x g für 5 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 10 min bei 37°C getrocknet. Abschließend wurden 45 µl RNA-Pufferlösung hinzugegeben und die Reaktionsgefäße für 10 min bei 57°C und 1400 rpm im Thermoblock („*Thermomixer compact*“, *Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*) geschüttelt. Bei direkter Weiterverarbeitung wurden die Reaktionsgefäße dann bei -20°C, andernfalls bei -80°C gelagert.

2.2.16 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR

Die quantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-qPCR) zur Messung der Expression von IFN- γ -mRNA als relatives Maß für die Anzahl der antigenspezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für experimentelle Transplantationsimmunologie am Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt.

Die Integrität der isolierten RNA (siehe **2.2.15**) wurde mit einem automatisierten Elektrophoresesystem („*Experion*“, *Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland*) verifiziert. Die Synthese der cDNA (engl. *complementary DNA*) erfolgte mit 20 µl eines kommerziell erhältlichen Kits („*iScript cDNA synthesis kit*“, *Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland*) pro 1 µg totaler RNA. Auf dem Thermocycler („*Primus 96*“, *PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland*) lief das folgende thermale Profil: 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C und 5 min bei 85°C. Die RT-qPCR erfolgte mit dem „*CFX96 Real-Time PCR Detection System*“ (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland*) bei folgendem Protokoll: Ein Zyklus über 5 min bei 95 °C, 40 Zyklen über 15 s bei 95°C und 60 s bei 60°C und abschließend ein Zyklus über 5 min bei 72°C. Das

Reaktionsvolumen für die RT-qPCR enthielt 25 µl, bestehend aus 12,5 µl einer kommerziell erhältlichen Reaktionslösung („iScript Supermix“, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland), 0,2 µmol/l jedes Primers, 0,1 µmol/l jeder Sonde und 2 µl cDNA. Die Primer und Gensonden wurden kommerziell synthetisiert (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland). Ihre Sequenzen sind in **Tab. 3** dargestellt (REZVANI *et al.*, 2003).

Die gereinigten PCR-Produkte wurden sequenziert (Sequence Laboratories GmbH, Göttingen, Deutschland). Alle RT-qPCR-Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt und die Ergebnisse als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung berechnet. Die mRNA-Expression von IFN-γ wurde zu der von CD8 normalisiert und der Wert als relative Expression im Vergleich zur Stimulation mit dem irrelevanten Antigen gp100 angegeben.

Tab. 3: Sequenzen der Primer und Gensonden für die RT-qPCR

Primer/Gensonde	Sequenz (5'→3')
IFN-γ (forward)	5'-AGCTCTGCATCGTTTTGGGTT-3'
IFN-γ (reverse)	5'-GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA-3'
IFN-γ (TaqMan-Sonde)	5'-(FAM)-TCTTGGCTGTTACTGCCAGGACCCA-(TAMRA)-3'
CD8 (forward)	5'-CCCTGAGCAACTCCATCATGT-3'
CD8 (reverse)	5'-GTGGGCTTCGCTGGCA-3'
CD8 (TaqMan-Sonde)	5'-(FAM)-CAGCCACTTCGTGCCGGTCTTC-(TAMRA)-3'

2.2.17 Durchflusszytometrie

Für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl. *fluorescence activated cell sorting* = FACS) wurde das Durchflusszytometer „BD FACSCalibur“ (*Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA*) verwendet.

An monoklonale Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden sich durch die Wellenlänge, in der sie ihre maximale Absorption und Emission aufweisen, so dass sich im Falle des „BD FACSCalibur“ zusätzlich zu FSC (engl. *forward scatter*) als Maß der relativen Zellgröße und SSC (engl. *sideward scatter*) als Maß der relativen Granularität vier Fluoreszenzparameter durch Photoelektronenvervielfacher detektieren lassen. In dieser Arbeit wurde für jeden Fluoreszenzkanal (FL) jeweils ein Farbstoff verwendet (**Tab. 4**).

Für die Versuche wurden alle Waschschritte in PBS mit einer Zentrifugation bei 769 x g für 5 min bei RT durchgeführt und alle Inkubationsschritte – sofern nicht anders angegeben – im CO₂-Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

Tab. 4: Fluoreszenzfarbstoffe mit Absorptions- und Emissionsmaxima

Fluoreszenzkanal	Fluoreszenzfarbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
FL-1	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	494 nm	521 nm
FL-2	R-Phycoerythrin (PE)	565 nm	578 nm
FL-3	Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)	490 nm	675 nm
FL-4	Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm

2.2.17.1 Auswertung der durchflusszytometrischen Versuche

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Versuche erfolgte während der Messung am Durchflusszytometer mit dem Programm „CellQuest Pro 4.0.2“, zur grafischen Aufbereitung wurde das Programm „FlowJo 7.6.1“ genutzt. Die erfassten Parameter wurden zweidimensional als *Dot-Plot* („Punktewolke“) dargestellt. Initial wurden FSC und SSC gegeneinander aufgetragen, so dass eine Auftrennung der Blutzellpopulationen zu erkennen war. Anschließend wurden die zu untersuchenden Zellen durch Rahmen (engl. *gates*) eingefasst und anhand spezifischer Oberflächenmoleküle weiter charakterisiert.

2.2.17.2 Dextramerfärbung

Zur durchflusszytometrischen Detektion antigenspezifischer T-Lymphozyten kann die Interaktion zwischen deren T-Zell-Rezeptor (TCR) und den MHC-Peptid-Komplexen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen genutzt werden. Da der einzelne TCR allerdings eine niedrige Affinität zum entsprechenden MHC-Peptid-Komplex besitzt, ist der Nachweis mit monomeren MHC-Peptid-Komplexen schwierig. Eine vereinfachte Detektion ermöglichen Dextramere, die aus einem zentralen Dextran-Gerüst bestehen, an das mehrere Fluorochrome und MHC-Peptid-Komplexe gebunden sind (**Abb. 5**). So wird ein erheblich stärkeres Signal hervorgerufen (BATARD *et al.*, 2006).

Für die Dextramerfärbung wurden zunächst 2×10^6 der zu analysierenden Zellen in 2 ml PBS mit 10 % fetalem bovines Serum (FBS) für 20 min auf Eis geblockt. Nach zwei Waschschrritten wurden zu den Zellen 5 µl der jeweiligen Dextramere (APC) zugegeben und diese bei RT für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrritt wurden 5 µl Anti-CD3-AK (FITC) und 10 µl Anti-CD8-AK (PerCP) zugegeben und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrritt wurden die Zellen in 250 µl PBS mit 1 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Abschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie.

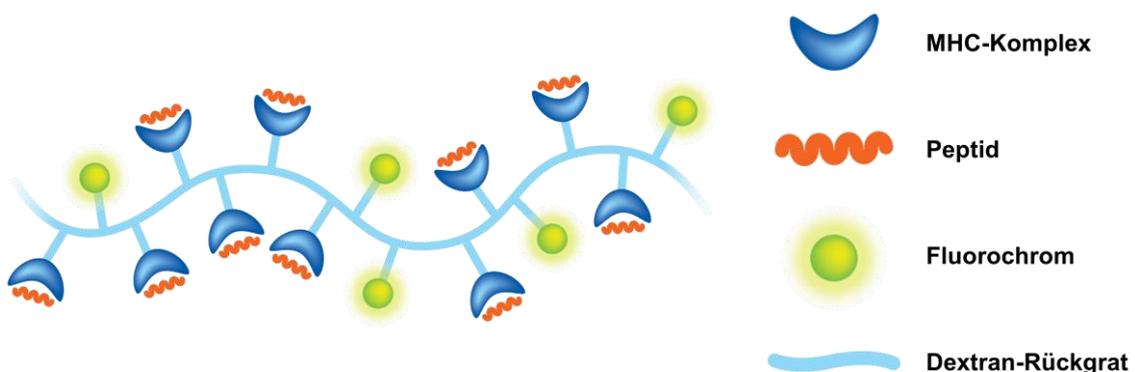


Abb. 5: Zusammensetzung eines Dextramers

Dextramere bestehen aus einem zentralen Dextran-Gerüst, an das Fluorochrome und MHC-Komplexe gebunden werden. Die MHC-Komplexe können mit einem spezifischen Peptid beladen werden.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach einer Grafik, die freundlicherweise von IMMUDEx (Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellt wurde (*schriftliche Genehmigung vorliegend*).

2.2.17.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Zum durchflusszytometrischen Nachweis von intrazellulären Zytokinen wie IFN- γ in aktivierten T-Lymphozyten muss der Transport von Vesikeln vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat durch Brefeldin A (BFA) inhibiert werden (KLAUSNER *et al.*, 1992). Dadurch akkumulieren die Zytokine in der Zelle und können nach der Permeabilisierung der Zellmembran mit monoklonalen Antikörpern angefärbt werden (PICKER *et al.*, 1995).

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung (engl. *intracellular cytokine staining* = ICS) wurden in einer Zellkulturplatte („CELLSTAR“, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) zunächst 1×10^6 PBMCs in 100 μ l Zellkulturmedium vorgelegt und das Volumen dann mit HABS-Medium auf 200 μ l aufgefüllt. Während frische Zellen direkt weiterverarbeitet werden konnten, wurden aufgetaute Zellen zunächst für 24 h im CO₂-Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation der Zellen durch die Zugabe der Peptide (siehe 2.2.14). Nach einer Inkubation von 1 h im CO₂-Brutschrank wurden zu allen Zellen 10 μ l BFA-Stocklösung und zu den Positivkontrollen zusätzlich 10 μ l PMA- und 8 μ l Ionomycin-Stocklösung zugegeben. Danach wurden die Zellen für 19 h im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nun wurden 200 μ l aus jeder Vertiefung in FACS-Röhrchen (A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland) überführt und gewaschen. Anschließend wurden in jedes FACS-Röhrchen 3 μ l Anti-CD3-AK (FITC) und 10 μ l Anti-CD8-AK (PerCP) zugegeben, die Zellen für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und danach erneut gewaschen. Zu allen FACS-Röhrchen wurden 2 ml PBS mit 10 % FACS-Lyselösung hinzupipettiert. Nach einer Inkubation von 10 min im Dunkeln bei RT wurden die Zellen gewaschen und 0,5 ml PBS mit 10 % FACS-Permeabilisierungslösung zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT im Dunkeln erfolgte ein weiterer Waschschrift. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 μ l Anti-IFN- γ -AK (APC) in alle FACS-Röhrchen mit einer nachfolgenden Inkubation für 30 min im Dunkeln bei RT. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 100 μ l PBS mit 1 % PFA fixiert. Abschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse (REZVANI *et al.*, 2003).

2.2.17.4 Degranulationsfärbung

Die Zerstörung von Zellen durch CD8⁺ T-Lymphozyten erfolgt unter anderem durch lytische Substanzen, die in Granulae im Zytoplasma der T-Lymphozyten vorliegen (TRAPANI und SMYTH, 2002). Dabei handelt es sich um sekretorische Lysosomen, die unter anderem Perforin und Granzyme enthalten und mit den lysosomenassoziierten Membranglykoproteinen LAMP-1 (CD107a), LAMP-2 (CD107b) und LAMP-3 (CD63) ausgekleidet sind, die einen Austritt der lytischen Substanzen in das Zytoplasma verhindern. Die antigenspezifische Stimulation des TCR führt zur Fusion der lytischen Granulae mit der Zellmembran, so dass diese ihren Inhalt in die Synapse zwischen dem T-Lymphozyten und der Zielzelle entleeren (PETERS *et al.*, 1991). Durch diese Degranulation sind CD107a und CD107b nun Bestandteil der Zellmembran geworden und lassen sich als Korrelat der antigenspezifischen Aktivierung des T-Lymphozyten durch spezifische Antikörper durchflusszytometrisch nachweisen (BETTS *et al.*, 2003; MITTENDORF *et al.*, 2005).

Für die Degranulationsfärbung wurden zunächst in einer Zellkulturplatte 1 x 10⁶ T2-Zellen pro Vertiefung mit den zu untersuchenden Peptiden beladen und bestrahlt (siehe 2.2.14). Anschließend wurden 1 x 10⁶ CD8⁺ T-Lymphozyten in 200 µl HABS-Medium und gleichzeitig je 5 µl der Anti-CD107a-AK (FITC) und Anti-CD107b-AK (FITC) hinzugegeben. Zu diesem Zeitpunkt wurde außerdem in einer weiteren Vertiefung mit 200 µl HABS-Medium eine Positivkontrolle mit 1 x 10⁶ CD8⁺ T-Lymphozyten, 0,01 µg PMA- (in 10 µl PBS) und 0,4 µg Ionomycin-Stocklösung (in 8 µl PBS) angesetzt. Alternativ zu PMA und Ionomycin wurden auch 2 µg Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) eingesetzt. Nach einer Inkubation von 60 min wurden in alle Wells 15 µl PBS mit 10 % Monensin zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 4 h wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 µl Anti-CD3-AK (APC) und 10 µl Anti-CD8-AK (PerCP) gefärbt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurden die Zellen nochmals gewaschen und dann in 200 µl PBS mit 1 % PFA fixiert. Abschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie.

2.2.18 Interferon- γ -ELISPOT

Der enzymgekoppelte Immunospot-Test (engl. *enzyme-linked immunosorbent spot assay* = ELISPOT) ist ein sensitives Verfahren zum quantitativen Nachweis unter anderem von IFN- γ , das von antigenstimulierten Immunzellen sezerniert wird (CZERKINSKY *et al.*, 1983; **Abb. 6**).

Für den IFN- γ -ELISPOT wurden am ersten Tag zunächst in alle benötigten Vertiefungen einer ELISPOT-Mikrotiterplatte (*Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*) 40 μ l Ethanol pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 min erfolgte ein dreifacher Waschschrift mit 200 μ l PBS pro Vertiefung. Danach wurde der Erstantikörper (anti-IFN- γ) in PBS auf 10 μ g/ml verdünnt und von dieser Lösung wurden 100 μ l in jede Vertiefung pipettiert. Abschließend wurde die Platte mit Verschlussfolie abgedichtet und über Nacht bei 4°C gelagert.

Am zweiten Tag wurde der Überstand verworfen und die Platte fünfmal gewaschen. Nach der Zugabe von 200 μ l HABS-Medium pro Vertiefung wurde die Platte bei 37°C für 3 h im CO₂-Brutschrank (5 % CO₂) inkubiert und der Überstand anschließend verworfen. Danach erfolgte die Zugabe der CD8⁺ T-Lymphozyten und der beladenen T2-Zellen in 200 μ l HABS-Medium (siehe **2.2.14**). Die Platte wurde dann über Nacht bei 37°C (5 % CO₂) inkubiert.

Am dritten Tag wurde die Platte zehnmal gewaschen. Der Zweitantikörper (anti-IFN- γ) wurde in PBS mit 0,5 % FBS auf 1 μ g/ml verdünnt und davon 100 μ l in jede Vertiefung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei RT im Dunkeln wurde die Platte zehnmal gewaschen. Streptavidin-AP wurde in PBS mit 0,5 % FBS auf 1 μ g/ml verdünnt und davon 100 μ l in jede Vertiefung der Platte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT im Dunkeln wurde die Platte wiederum zehnmal gewaschen und anschließend die Schutzfolie auf der Unterseite der Platte entfernt. Anschließend wurden beide Seiten der Platte mit Leitungswasser abgespült und das Wasser abgeschlagen. Dieser Vorgang wurde zwanzig Mal wiederholt. Zur Einleitung der Farbstoffumsetzung wurden nun 100 μ l der ELISPOT-Reaktionslösung in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde bei RT im Dunkeln entwickelt und regelmäßig kontrolliert. Bei einer ausreichenden Färbung der Positivkontrollen wurde die Platte abgespült,

wodurch die Farbstoffumsetzung unterbrochen wurde. Abschließend wurde die Platte über Nacht bei RT im Dunkeln luftgetrocknet. Die Platte konnte im Dunkeln bei RT bis zu fünf Monate gelagert werden.

Ein ELISPOT galt als verwertbar, wenn in der Vertiefung mit der Positivkontrolle mehr als 200 Spots und in der Vertiefung mit der Negativkontrolle weniger als 100 Spots vorlagen. Die Probe in einer Vertiefung galt als positiv, wenn die Anzahl der darin vorliegenden Spots mindestens das Dreifache der Negativkontrolle betrug und in der Vertiefung mindestens 20 Spots vorlagen.

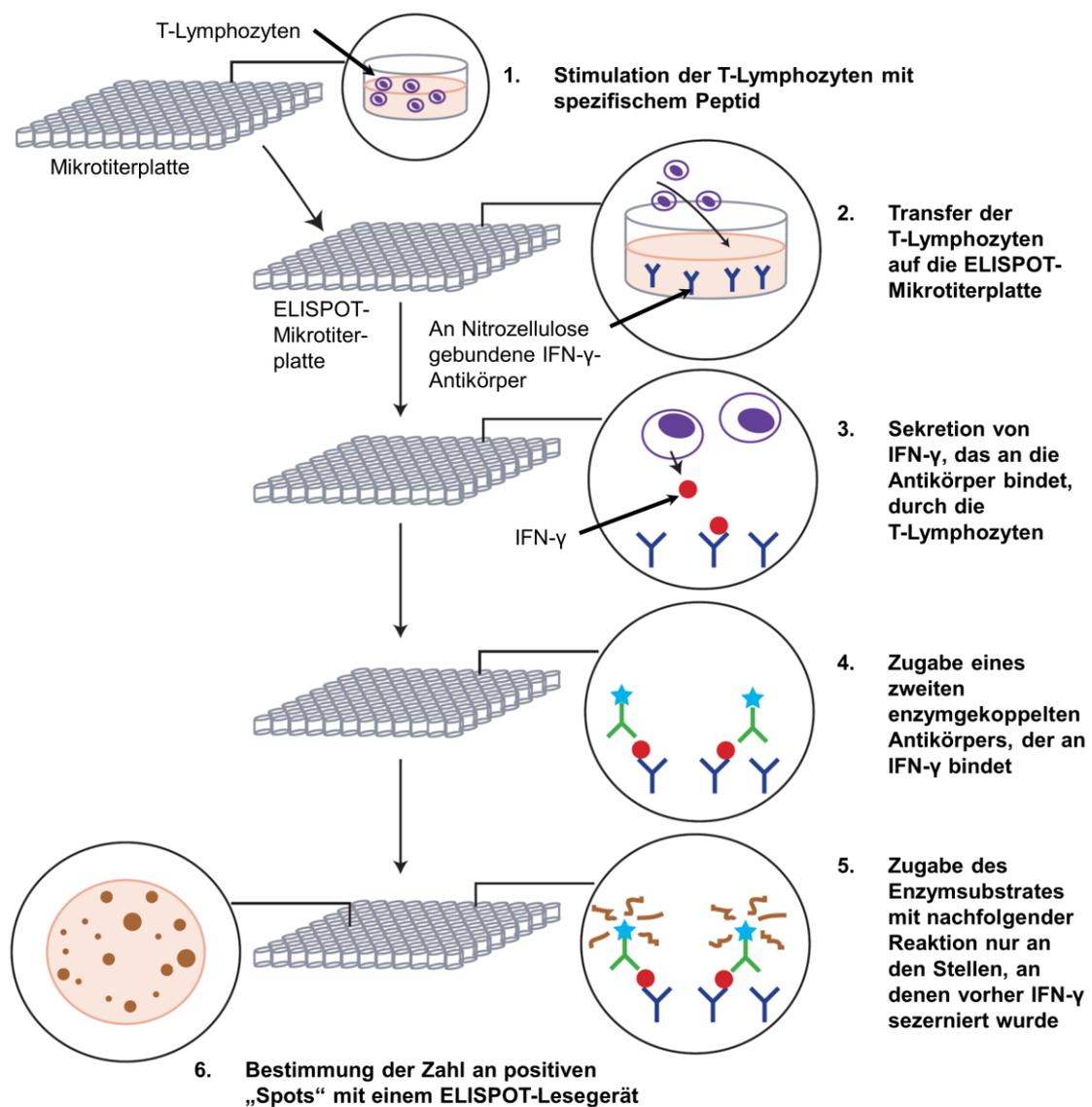


Abb. 6: Prinzip des IFN-γ-ELISPOT

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach HICKLING, 1998 (*schriftliche Genehmigung vorliegend*).

2.2.19 Statistische Auswertung

Die tabellarische Erfassung aller erhobenen Daten erfolgte mit „Excel 2010“, die statistische Auswertung und grafische Darstellung mit „Prism 5.04“.

2.2.19.1 Testverfahren

Die Überprüfung der Stichproben auf Normalverteilung erfolgte jeweils mit dem D'Agostino-Pearson-K2-Omnibus-Test (D'AGOSTINO, 1986), der ab einer Stichprobengröße von mindestens acht Werten zulässig ist. Diese Mindestanzahl war in der vorliegenden Arbeit stets gegeben.

Kategorische Variablen werden in dieser Arbeit als absolute (lat. *numerus* = n) und prozentuale Häufigkeiten dargestellt. Kontinuierliche Variablen werden bei Normalverteilung als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung (engl. *standard deviation* = SD), bei schiefer Verteilung als Median mit der Spannweite von minimalen und maximalen Werten angegeben.

Der Vergleich von unverbundenen Stichproben aus zwei Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Der Vergleich von verbundenen Stichproben aus zwei Gruppen wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt. Der Vergleich von Stichproben aus mehr als zwei Gruppen erfolgte unabhängig von der Verbundenheit der Stichproben mit dem Kruskal-Wallis-Test. Als ergänzender Post-hoc-Test wurde der multiple Vergleichstest nach Dunn durchgeführt (engl. *Dunn's multiple comparison test*). Auf die Anwendung des Friedman-Tests bei verbundenen Stichproben aus mehr als zwei Gruppen wurde verzichtet, da hierbei keine Leerwerte zulässig sind. Bedingt durch fehlende Blutentnahmen in der Hauptgruppe 2 war dies aber regelhaft der Fall. Der Vergleich zwischen der Frequenz von „positiven“ und „negativen“ Immunantworten als kategorische Variablen zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Exakten Test nach Fisher durchgeführt.

Für alle Testverfahren zum Vergleich der Stichproben aus zwei oder mehr Gruppen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit (engl. *probability value* = *p*-Wert) von unter 5 % ($p < 0,05$) als Signifikanzniveau festgelegt.

2.2.19.2 Grafische Darstellung

Die grafische Darstellung von Balken- oder Streudiagrammen wurde entweder um Fehlerbalken mit der Standardabweichung oder um den Median ergänzt. Dies ist jeweils unter den Abbildungen angegeben. Das Signifikanzniveau wird durch Sternsymbole dargestellt, wobei ein Stern (*) einem p -Wert $< 0,05$ und zwei Sterne (**) einem p -Wert $< 0,01$ entsprechen.

Für die grafische Darstellung als Boxplots wurden innerhalb der Boxen 50 % der Werte mit dem oberen und dem unteren Quartil als Begrenzung gewählt. Somit zeigt die Länge einer Box den Interquartilsabstand an. Der Median wird als durchgehender Strich innerhalb der Box dargestellt. Die Antennen (engl. *whiskers*) reichen zum minimalen und maximalen Wert (**Abb. 7**).

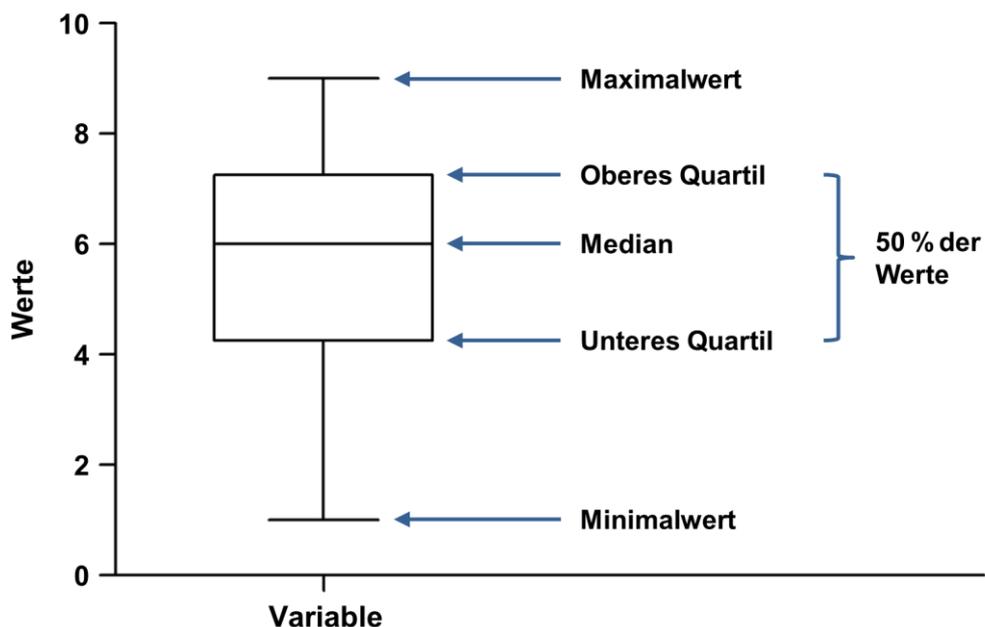


Abb. 7: Darstellung eines Boxplots

Die Boxen werden nach oben vom oberen Quartil und nach unten vom unteren Quartil begrenzt und umfassen damit 50 % aller Werte. Der horizontale Strich innerhalb der Box stellt den Median dar. Der „Whisker“ nach oben reicht bis zum maximalen Wert, nach unten bis zum minimalen Wert.

3 Ergebnisse

3.1 Querschnittsanalyse bei gesunden Blutspendern (Hauptgruppe 1)

3.1.1 Probensammlung

Gemäß dem biometrischen Studiendesign mussten für die drei Subgruppen der gesunden Blutspender (Hauptgruppe 1) jeweils 38 Probanden rekrutiert werden (siehe 2.2.2.1). Hierfür wurden initial 193 Thrombozytenspendern (118 Frauen und 75 Männer), für die bereits eine Grobtypisierung mit dem Nachweis des HLA-A*02-Merkmals vorlag, über die Studie aufgeklärt. Alle 193 potenziellen Probanden stimmten der Teilnahme an der Studie und damit der HLA-Feintypisierung zu. Davon wiesen 13 Spender (7 %) nicht das gesuchte HLA-A*02:01-Merkmal auf, so dass schließlich aus den verbliebenen 180 Spendern (93 %) die notwendigen Probanden rekrutiert wurden.

Bei einigen in die Studie aufgenommenen Probanden war die Gesamtzahl der aus den LRS-Kammern gewonnenen vitalen PBMCs nicht ausreichend. In den meisten dieser Fälle konnte bei einem erneuten Spendetermin eine weitere LRS-Kammer mit einer ausreichenden Zahl vitaler PBMCs gewonnen werden. Da dies allerdings nicht immer möglich war und außerdem zwei zunächst aufgenommene Probanden aufgrund eines nicht passenden HLA-Merkmals nachträglich aus der Studie ausgeschlossen werden mussten, wurden insgesamt 122 Probanden (statt der rechnerischen $3 \times 38 = 114$ Probanden) rekrutiert. Unabhängig von ihrer Zugehörigkeit zu einer Subgruppe erhielten die Probanden eine fortlaufende Nummer nach dem Schema *TM#Zahl*.

Die Rekrutierung der Probanden und die Sammlung der Proben erstreckten sich von der Aufklärung des ersten Probanden bis zur Verarbeitung der letzten Probe über einen Zeitraum von 20 Monaten.

Die Probandencharakteristika der 114 HLA-A*02:01-positiven gesunden Blutspender (Hauptgruppe 1) sind in **Tab. 5** dargestellt. In der Subgruppe der Primi- und Multiparae hatten 31 der 38 Probanden (82 %) mindestens ein männliches Kind, sieben Probanden (18 %) dagegen nur weibliche Kinder.

Tab. 5: Probandencharakteristika der gesunden Blutspender (Hauptgruppe 1)

	Alle Probanden <i>n</i> = 114	Nulligravidae <i>n</i> = 38	Primi- und Multiparae <i>n</i> = 38	Männer <i>n</i> = 38
Alter (Jahre)				
Median	39	28	46	41
Spannbreite	21–63	21–53	28–63	21–56
Serologischer CMV-Status				
positiv	33	10	14	9
negativ	73	27	17	29
<i>n/a</i>	8	1	7	0
Erhalt einer Bluttransfusion in der Anamnese				
ja	2	0	1	1
nein	112	38	37	37
Anzahl der Schwangerschaften (nur Frauen)				
keine	38	38	0	–
eine	10	0	10	–
zwei	18	0	18	–
drei	6	0	6	–
vier	3	0	3	–
fünf	1	0	1	–
Orale Kontrazeption (nur Frauen)				
ja	28	21	7	–
nein	48	17	31	–
Postmenopausaler Zustand* (nur Frauen)				
ja	7	1	6	–
nein	69	37	32	–

* Der postmenopausale Zustand wurde als letzte menstruale Blutung mindestens zwölf Monate vor der Aufnahme in die Studie definiert.

Tabelle modifiziert wiedergegeben nach LUTZ *et al.*, 2015 (*schriftliche Genehmigung vorliegend*).

3.1.2 CD8-positive Gedächtnisimmunantworten gegen die untersuchten tumorassoziierten Antigene

3.1.2.1 Überblick über die gemessenen Immunlevel

Die RT-qPCR-Versuche konnten bei allen 114 Probanden der drei Subgruppen durchgeführt werden, das vorgesehene Programm war aber teilweise aufgrund einer zu niedrigen Zellzahl nicht vollständig. Der maximale Ausfall bei einem TAA betrug drei Proben (MUC1 0,1 $\mu\text{mol/l}$ in der Subgruppe der Männer).

Abb. 8 gibt einen Überblick über die ermittelten Immunlevel (Werte der relativen Expression) gegen die vier TAA bei der Peptidkonzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$.

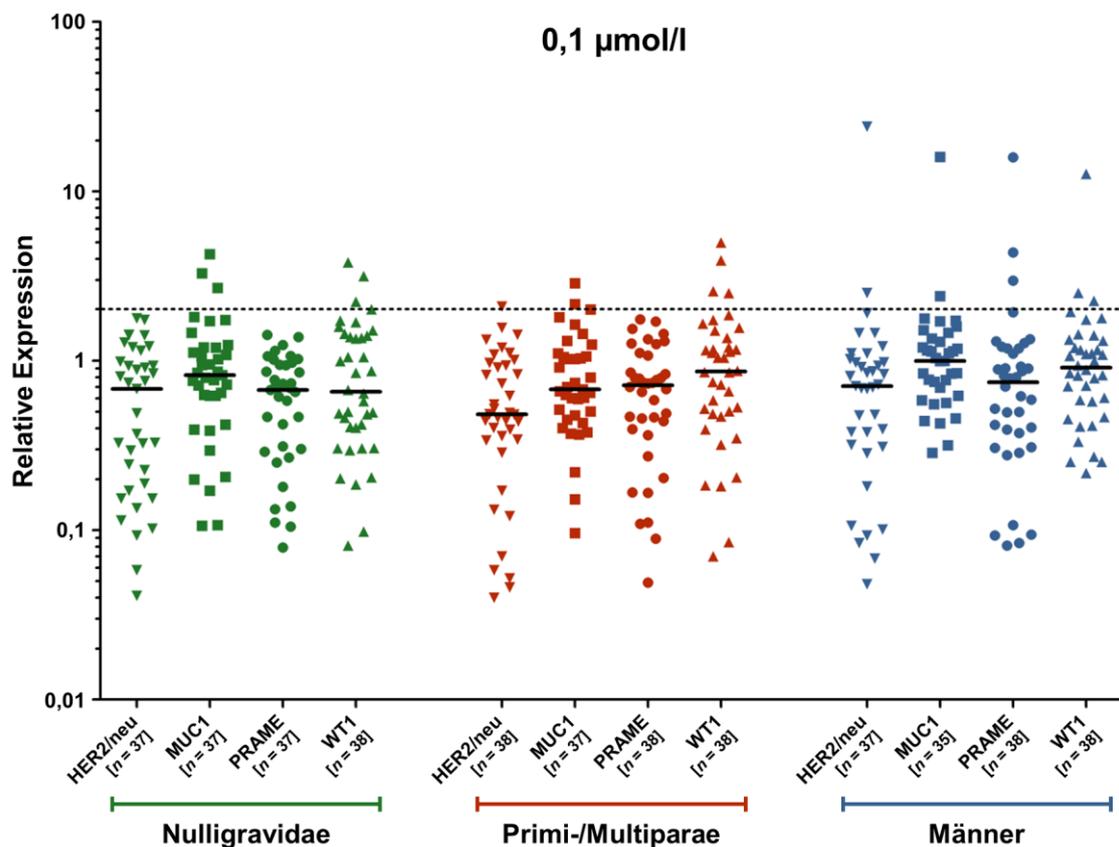


Abb. 8: Immunlevel gegen die TAA (0,1 $\mu\text{mol/l}$) in der Hauptgruppe 1

Logarithmische Darstellung der Immunlevel (relative Expressionswerte) gegen die untersuchten TAA für die Peptidkonzentration 0,1 $\mu\text{mol/l}$ in der Hauptgruppe 1.

Der relative Expressionswert ist für jeden Probanden getrennt nach den drei Subgruppen aufgetragen. Die gepunktete horizontale Linie markiert den Schwellenwert für als „positiv“ definierte Immunantworten (relative Expression $\geq 2,0$), die Balken innerhalb der Subgruppen zeigen den Median an.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach LUTZ *et al.*, 2015 (schriftliche Genehmigung vorliegend).

Abb. 9 gibt einen Überblick über die ermittelten Immunlevel (Werte der relativen Expression) gegen die vier TAA sowie gegen das Kontrollpeptid CMV-pp65 bei der Peptidkonzentration von 10 µmol/l.

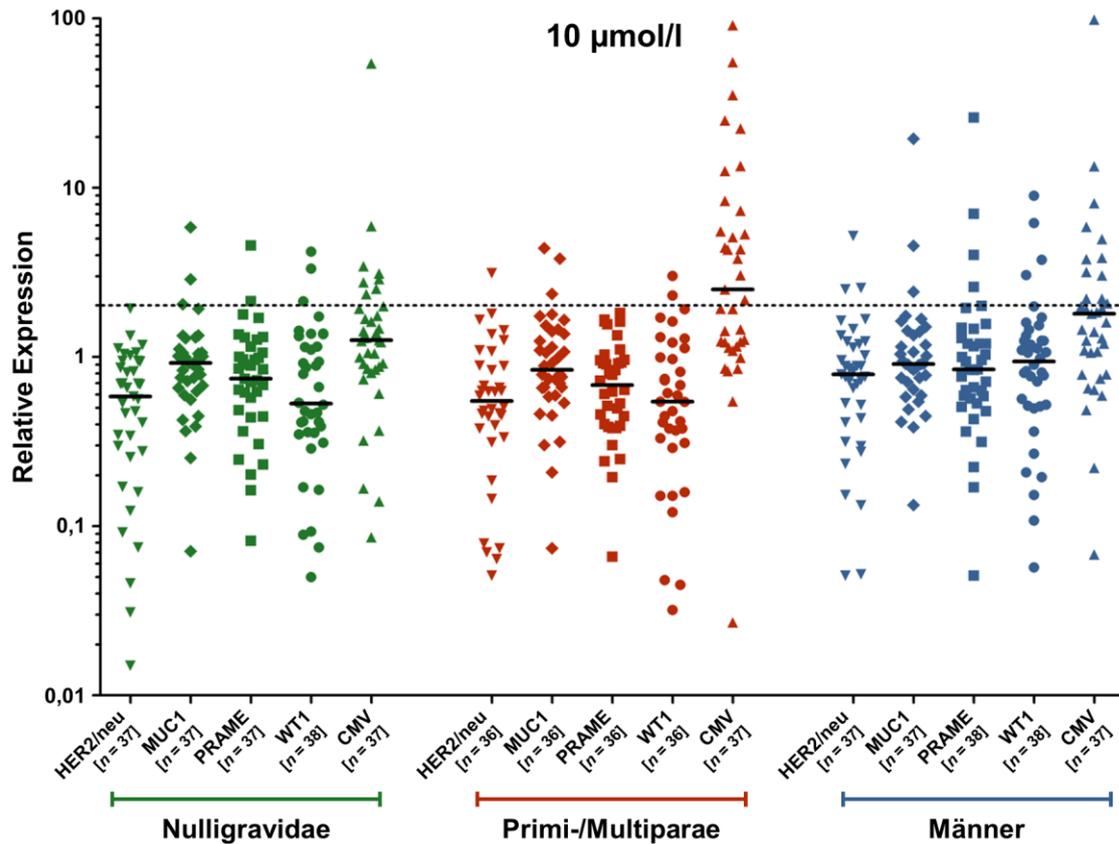


Abb. 9: Immunlevel gegen die TAA (10 µmol/l) in der Hauptgruppe 1

Logarithmische Darstellung der Immunlevel (relative Expressionswerte) gegen die untersuchten TAA sowie gegen das Kontrollpeptid CMV-pp65 für die Peptidkonzentration 10 µmol/l in der Hauptgruppe 1.

Der relative Expressionswert ist für jeden Probanden getrennt nach den drei Subgruppen aufgetragen. Die gepunktete horizontale Linie markiert den Schwellenwert für als „positiv“ definierte Immunantworten (relative Expression $\geq 2,0$), die Balken innerhalb der Subgruppen zeigen den Median an.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach LUTZ *et al.*, 2015 (schriftliche Genehmigung vorliegend).

3.1.2.2 Frequenzen der als positiv definierten Immunantworten

Als Schwellenwert für die Definition einer „positiven“ Immunantwort diente ein Immunlevel (relativer Expressionswert) von $\geq 2,0$. Dies entspricht damit in der RT-qPCR einer mindestens doppelt so hohen IFN- γ -mRNA-Expression nach Antigenstimulation mit dem jeweiligen TAA als nach Stimulation mit dem irrelevanten Antigen gp100.

Unter Anwendung dieser Definition konnten bei einer gemeinsamen Betrachtung aller 114 gesunden Blutspender aus der Hauptgruppe 1 gegen alle vier untersuchten TAA „positive“ Immunantworten nachgewiesen werden.

Dabei zeigten gegen die Peptidkonzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ und/oder 10 $\mu\text{mol/l}$ bei HER2/neu 5 %, bei MUC1 14 %, bei PRAME 7 % und bei WT1 15 % der insgesamt 114 Probanden eine positive Immunantwort (**Tab. 6**).

Interessanterweise wiesen nur wenige Probanden eine „doppelt-positive“ Immunantwort sowohl gegen die Peptidkonzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ als auch 10 $\mu\text{mol/l}$ auf: Bei HER2/neu und MUC1 war dies jeweils nur bei einem Probanden der Fall, bei PRAME bei zwei und bei WT1 bei drei Probanden. Dabei handelte es sich größtenteils um Männer, nur zwei der drei Probanden mit einer „doppelt-positiven“ Immunantwort gegen WT1 waren Frauen (beide aus der Gruppe der Primi- und Multiparae). Ein männlicher Proband (*TM#12*) zeigte sowohl gegen HER2/neu als auch gegen PRAME „doppelt-positive“ Immunantworten.

Tab. 6: Frequenzen der „positiven“ Immunantworten in der Hauptgruppe 1

Peptidkonzentration	0,1 µmol/l		10 µmol/l		0,1 und/oder 10 µmol/l	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
HER2/neu						
Positive Immunantworten	3/112	3	4/110	4	6/114	5
MUC1						
Positive Immunantworten	8/109	7	9/110	8	16/114	14
PRAME						
Positive Immunantworten	3/113	3	7/111	6	8/114	7
WT1						
Positive Immunantworten	11/114	10	9/112	8	17/114	15

Tabelle modifiziert wiedergegeben nach LUTZ *et al.*, 2015 (*schriftliche Genehmigung vorliegend*).

Nachfolgend werden die Immunlevel (relative Expressionswerte) und die Frequenzen der als „positiv“ definierten Immunantworten (Immunlevel $\geq 2,0$) gegen die vier untersuchten TAA für die drei Subgruppen der Hauptgruppe 1 getrennt dargestellt und dabei die beiden eingesetzten Peptidkonzentrationen auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Waren für ein TAA in beiden Peptidkonzentrationen keine als „positiv“ definierten Immunantworten detektiert worden, war ein Vergleich der Kategorien „positive“ und „negative Immunantwort“ nicht möglich, da für Chi-Quadrat-Analysen mindestens ein positiver Wert vorliegen muss.

3.1.2.2.1 Nulligravidae

In der Subgruppe der Nulligravidae ließen sich gegen HER2/neu für keine der beiden Peptidkonzentrationen als „positiv“ definierte Immunantworten nachweisen, für PRAME gelang dies nur für die Konzentration von 10 µmol/l ($2/37 = 5\%$). Gegen MUC1 und WT1 ergaben sich „positive“ Immunantworten mit Frequenzen von 8 % bis 11 %. Weder hinsichtlich der absoluten Immunlevel (relative Expressionswerte) noch hinsichtlich der kategorischen Werte „positive“ und „negative Immunantwort“ ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Peptidkonzentrationen für das jeweilige Peptid (Tab. 7).

Tab. 7: Immunantworten gegen die TAA bei Nulligravidae

	Peptidkonzentration		p-Wert
	0,1 µmol/l	10 µmol/l	
HER2/neu			
Gemessene Proben (n)	37	37	
Median der Immunlevel	0,68	0,58	0,7334
Spannbreite der Immunlevel	0,04–1,78	0,02–1,93	
„Positive“ Immunantworten	0 (0 %)	0 (0 %)	n/a*
MUC1			
Gemessene Proben (n)	37	37	
Median der Immunlevel	0,82	0,92	0,6459
Spannbreite der Immunlevel	0,11–4,26	0,07–5,83	
„Positive“ Immunantworten	3 (8 %)	3 (8 %)	1,0000
PRAME			
Gemessene Proben (n)	37	37	
Median der Immunlevel	0,67	0,75	0,1714
Spannbreite der Immunlevel	0,00–1,42	0,01–4,56	
„Positive“ Immunantworten	0 (0 %)	2 (5 %)	0,4932
WT1			
Gemessene Proben (n)	38	38	
Median der Immunlevel	0,66	0,53	0,4030
Spannbreite der Immunlevel	0,08–3,80	0,05–4,20	
„Positive“ Immunantworten	4 (11 %)	3 (8 %)	1,0000

* Chi-Quadrat-Analysen wie der Exakte Test nach Fisher sind ohne positiven Wert nicht möglich.

3.1.2.2.2 Primi- und Multiparae

In der Subgruppe der Primi- und Multiparae ließen sich gegen PRAME für keine der beiden Peptidkonzentrationen als „positiv“ definierte Immunantworten nachweisen. Gegen die anderen drei TAA betrug die Frequenz der „positiven“ Immunantworten je nach Peptidkonzentration zwischen 3 % und 11 %. Weder hinsichtlich der absoluten Immunlevel (relative Expressionswerte) noch hinsichtlich der kategorischen Werte „positive“ und „negative Immunantwort“ ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Peptidkonzentrationen für das jeweilige Peptid (**Tab. 8**).

Tab. 8: Immunantworten gegen die TAA bei Primi- und Multiparae

	Peptidkonzentration		p-Wert
	0,1 µmol/l	10 µmol/l	
HER2/neu			
Gemessene Proben (n)	38	36	
Median der Immunlevel	0,48	0,55	0,5812
Spannbreite der Immunlevel	0,04–2,09	0,05–3,13	
„Positive“ Immunantworten	1 (3 %)	1 (3 %)	1,0000
MUC1			
Gemessene Proben (n)	37	36	
Median der Immunlevel	0,68	0,84	0,1986
Spannbreite der Immunlevel	0,10–2,86	0,07–4,39	
„Positive“ Immunantworten	3 (8 %)	3 (8 %)	1,0000
PRAME			
Gemessene Proben (n)	38	36	
Median der Immunlevel	0,72	0,68	0,6380
Spannbreite der Immunlevel	0,05–1,76	0,07–1,82	
„Positive“ Immunantworten	0 (0 %)	0 (0 %)	n/a*
WT1			
Gemessene Proben (n)	38	36	
Median der Immunlevel	0,86	0,54	0,0606
Spannbreite der Immunlevel	0,07–4,98	0,03–3,01	
„Positive“ Immunantworten	4 (11 %)	2 (6 %)	0,6749

* Chi-Quadrat-Analysen wie der Exakte Test nach Fisher sind ohne positiven Wert nicht möglich.

3.1.2.2.3 Männer

In der Subgruppe der Männer fanden sich gegen alle vier untersuchten TAA „positive“ Immunantworten, deren Frequenz für die Peptidkonzentration von 0,1 µmol/l zwischen 6 % und 8 % und für die Peptidkonzentration von 10 µmol/l zwischen 8 % und 13 % lag. Weder hinsichtlich der absoluten Immunlevel (relative Expressionswerte) noch hinsichtlich der kategorischen Werte „positive“ und „negative Immunantwort“ ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Peptidkonzentrationen für das jeweilige Peptid (**Tab. 9**).

Tab. 9: Immunantworten gegen die TAA bei Männern

	Peptidkonzentration		p-Wert
	0,1 µmol/l	10 µmol/l	
HER2/neu			
Gemessene Proben (n)	37	37	
Median der Immunlevel	0,71	0,79	0,3581
Spannbreite der Immunlevel	0,05–24,1	0,05–5,19	
„Positive“ Immunantworten	2 (6 %)	3 (8 %)	1,0000
MUC1			
Gemessene Proben (n)	35	37	
Median der Immunlevel	1,00	0,91	0,8791
Spannbreite der Immunlevel	0,29–16,0	0,13–19,5	
„Positive“ Immunantworten	2 (6 %)	3 (8 %)	1,0000
PRAME			
Gemessene Proben (n)	38	38	
Median der Immunlevel	0,75	0,84	0,1307
Spannbreite der Immunlevel	0,08–15,9	0,05–26,0	
„Positive“ Immunantworten	3 (8 %)	5 (13 %)	0,7110
WT1			
Gemessene Proben (n)	38	38	
Median der Immunlevel	0,91	0,94	0,9876
Spannbreite der Immunlevel	0,22–12,7	0,06–8,97	
„Positive“ Immunantworten	3 (8 %)	4 (11 %)	1,0000

3.1.2.3 Nachweis der Immunantworten im IFN- γ -ELISPOT

Zur Verifizierung der in der RT-qPCR erhaltenen Resultate wurden mit den Blutproben ausgewählter Probanden IFN- γ -ELISPOT-Versuche durchgeführt.

Dabei bestand zunächst die Frage, bei welchem in der RT-qPCR erhaltenen Immunlevel (relativen Expressionswert) die Nachweisgrenze des ELISPOT lag. Dafür wurde eine Versuchsreihe angesetzt, in der die im ELISPOT gegen das CMV-pp65-Peptid gemessene IFN- γ -Sekretion in Bezug zu den Resultaten aus der RT-qPCR gesetzt wurde (siehe **3.1.2.3.1**).

Anschließend wurde in einer weiteren Versuchsreihe bei ausgewählten Probanden die IFN- γ -Sekretion nach Stimulation mit den vier untersuchten TAA mittels ELISPOT gemessen (siehe **3.1.2.3.2**).

3.1.2.3.1 Immunantworten gegen CMV im IFN- γ -ELISPOT

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des IFN- γ -ELISPOT in Bezug auf die in der RT-qPCR erhaltenen Immunlevel wurden die CD8⁺ T-Lymphozyten von ausgewählten Probanden mit dem CMV-pp65-Peptid stimuliert. Die Auswahl der Probanden erfolgte anhand ihrer in der RT-qPCR gemessenen Immunlevel gegen das CMV-pp65-Peptid.

Dabei wurden vier Probanden ausgewählt: *TM#24* (Immunlevel von 138 in der RT-qPCR), *TM#91* (Immunlevel von 54), *TM#38* (Immunlevel von 13) und *TM#88* (Immunlevel von 3). Während die ersten drei Probanden damit deutlich „positive“ Immunantworten gegen das CMV-pp65-Peptid aufwiesen, war *TM#88* nur geringfügig „positiv“ und befand sich mit dem Immunlevel in etwa in dem Bereich, den die in der RT-qPCR gegen eines oder mehrere der untersuchten TAA „positiven“ Probanden zeigten.

Die Versuchsreihe wurde in Triplets durchgeführt und zur Auswertung das arithmetische Mittel dieser Ergebnisse berechnet. Pro Vertiefung der ELISPOT-Mikrotiterplatte wurden 1×10^5 CD8⁺ T-Lymphozyten eingesetzt, zusätzlich zur Stimulation mit dem CMV-pp65-Peptid wurden als Negativkontrollen NPC und gp100 und als Positivkontrolle PMA genutzt.

Auf die Präsentation des CMV-pp65-Peptids entwickelten die CD8⁺ T-Lymphozyten von *TM#24* durchschnittlich $565 \pm 54,2$, von *TM#91* $121 \pm 4,7$, von *TM#38* $269 \pm 29,8$ und von *TM#88* $49 \pm 7,2$ IFN- γ -spezifische Spots. Damit waren für *TM#88* auch die IFN- γ -ELISPOT-Resultate per definitionem nur noch grenzwertig „positiv“ (**Abb. 10** und **Abb. 11**).

Diese Versuchsreihe offenbarte damit für den IFN- γ -ELISPOT eine Nachweisgrenze, die in etwa in dem Bereich der in der RT-qPCR als gerade noch „positiv“ bewerteten Immunlevel lag.

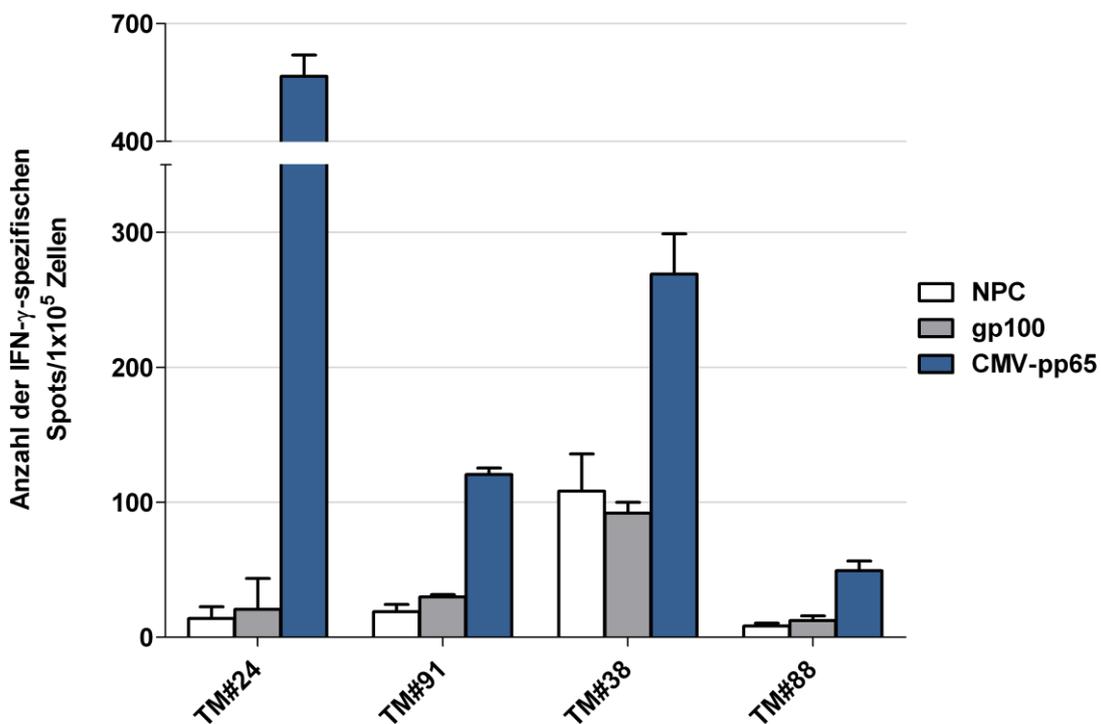


Abb. 10: Resultate der CMV-Versuchsreihe im IFN- γ -ELISPOT

Mittelwerte der jeweils in Triplets gemessenen IFN- γ -spezifischen Spotanzahl. NPC und gp100 dienten als Negativkontrollen, PMA als Positivkontrolle. Die IFN- γ -spezifische Spotanzahl für PMA lag bei allen vier Probanden bei über 1000 Spots und wird in dieser Abbildung der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

Die Anzahl der IFN- γ -spezifischen Spots nach Stimulation mit CMV-pp65 ergab für alle Probanden positive Werte, war bei *TM#88* aber nur grenzwertig positiv ($49 \pm 7,2$ Spots auf CMV-pp65 bei $12 \pm 3,5$ Spots auf gp100 und $8 \pm 2,1$ Spots auf NPC) und spiegelte damit die in der RT-qPCR erhaltenen Resultate wieder.

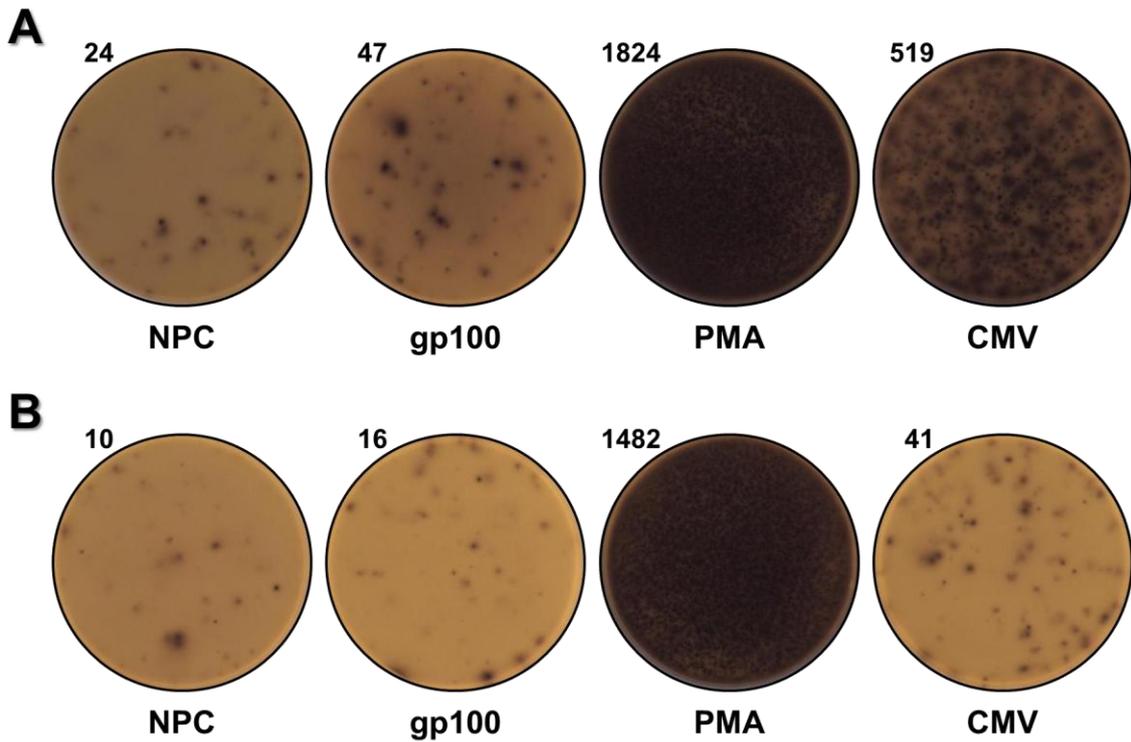


Abb. 11: IFN- γ -spezifische Spots gegen CMV bei den Probanden *TM#24* und *TM#88*

Zu sehen ist jeweils eine von drei für die entsprechende Probe gemessenen Vertiefungen der ELISPOT-Mikrotiterplatte ohne die Markierungen der anschließenden Spotzählung. NPC und gp100 dienen als Negativkontrollen, PMA als Positivkontrolle. Die Zahl der gemessenen IFN- γ -spezifischen Spots ist jeweils links oberhalb der Vertiefung angegeben.

A: Der Proband *TM#24* wies eine deutlich positive Zahl an IFN- γ -spezifischen Spots gegen das CMV-pp65-Peptid auf.

B: Der Proband *TM#88* war dagegen nur noch als grenzwertig positiv gegen das CMV-pp65-Peptid zu werten.

3.1.2.3.2 Immunantworten gegen die untersuchten TAA im IFN- γ -ELISPOT

Die Auswahl der Probanden für die IFN- γ -ELISPOT-Versuchsreihe zur Bestimmung der Immunantworten gegen die untersuchten TAA erfolgte nach zwei Kriterien: Einerseits musste von den Probanden durch eine ertragreiche CD8-Isolation oder die Möglichkeit der mehrmaligen Probengewinnung ausreichendes Zellmaterial vorliegen, andererseits mussten aus der RT-qPCR „positive“ Immunantworten (im Sinne eines Immunlevels $\geq 2,0$) gegen mindestens eines der untersuchten TAA bekannt sein.

Die Versuchsreihe wurde in Triplets durchgeführt, jede Probe wurde also in drei Vertiefungen der ELISPOT-Mikrotiterplatte angesetzt und zur Auswertung das arithmetische Mittel der Ergebnisse dieser drei Vertiefungen berechnet. Pro Vertiefung wurden 1×10^5 CD8⁺ T-Lymphozyten eingesetzt, zusätzlich zur Stimulation mit den TAA wurden als Negativkontrollen NPC und gp100 und als Positivkontrolle PMA genutzt. Hatte der Proband in der RT-qPCR positive Immunantworten gegen CMV-pp65 gezeigt, wurde dieses als zweite Positivkontrolle genutzt.

Als positiv zu wertende Immunantworten konnten lediglich im IFN- γ -ELISPOT des Probanden *TM#64* nachgewiesen werden: Gegen MUC1 wurden $31 \pm 9,3$ und gegen WT1 $25 \pm 15,5$ IFN- γ -spezifische Spots gebildet, was im Abgleich mit der Negativkontrolle gp100 ($14 \pm 2,9$ Spots) als grenzwertig positiv zu werten ist. Die Immunantworten gegen die anderen untersuchten TAA waren dagegen als negativ zu werten (IFN- γ -spezifische Spots gegen HER2/neu: $8 \pm 2,0$; gegen PRAME: $12 \pm 8,3$). In der RT-qPCR betrug der Wert der relativen IFN- γ -Expression bei Präsentation von MUC1 2,4 (0,1 μ mol/l) und bei WT1 1,7 und 3,8 (0,1 und 10 μ mol/l). Prinzipiell konnte damit eine geringfügig positive IFN- γ -Expression auch im IFN- γ -ELISPOT nachgewiesen werden. Allerdings lag der relative Wert der IFN- γ -Expression in der RT-qPCR bei Präsentation der anderen TAA bei *TM#64* teilweise höher, so war zum Beispiel auch PRAME in der Peptidkonzentration von 0,1 μ mol/l mit einem relativen Expressionswert von 4,4 als positiv zu werten. Die Ergebnisse des IFN- γ -ELISPOT beim Probanden *TM#64* sind in **Abb. 12** und **Abb. 13** dargestellt.

Damit konnten die in der RT-qPCR nachgewiesenen „positiven“ Immunantworten zumindest teilweise verifiziert werden. Wie schon nach der Versuchsreihe mit dem CMV-pp65-Peptid vermutet, war nach diesen Ergebnissen davon auszugehen, dass sich die Nachweisgrenze des IFN- γ -ELISPOT in diesem Bereich der relativen Expressionswerte befand. Da somit auch bei weiteren Probanden keine anderen Ergebnisse zu erwarten waren, wurde der IFN- γ -ELISPOT nicht bei allen Probanden, die oben genannte Kriterien erfüllten, eingesetzt.

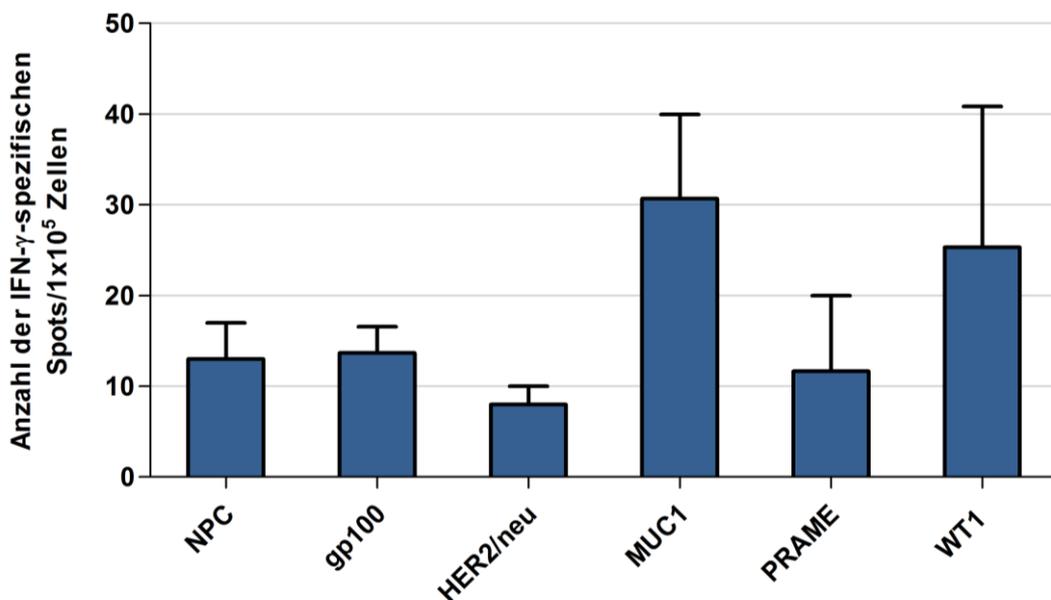


Abb. 12: Resultate des IFN- γ -ELISPOT beim Probanden *TM#64*

Mittelwerte der jeweils in Triplets gemessenen IFN- γ -spezifischen Spotanzahl für den repräsentativen Probanden *TM#64*. NPC und gp100 dienten als Negativkontrollen, PMA und CMV-pp65 als Positivkontrollen. Die IFN- γ -spezifische Spotanzahl für PMA ($1043 \pm 54,8$) und CMV-pp65 ($499 \pm 13,5$) wird der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach Lutz *et al.*, 2015 (*schriftliche Genehmigung vorliegend*).

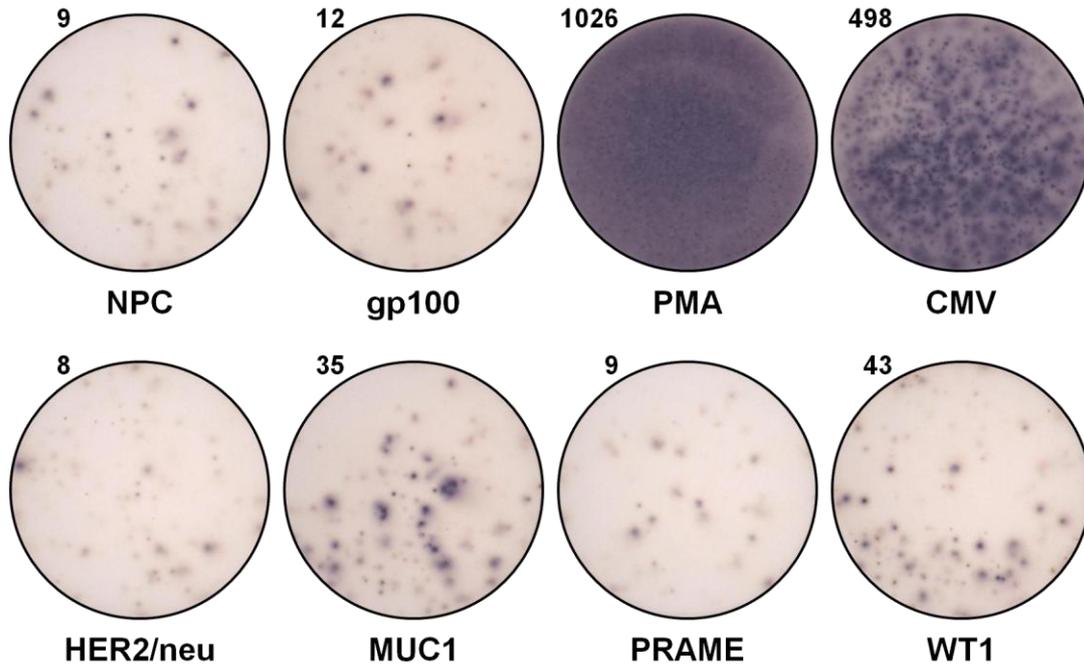


Abb. 13: IFN- γ -spezifische Spots beim Probanden *TM#64*

Zu sehen ist jeweils eine von drei für die entsprechende Probe gemessenen Vertiefungen der ELISPOT-Mikrotiterplatte für den repräsentativen Probanden *TM#64* ohne die Markierungen der anschließenden Spotzählung. Die Zahl der gemessenen IFN- γ -spezifischen Spots ist jeweils links oberhalb der Vertiefung angegeben.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach LUTZ *et al.*, 2015 (*schriftliche Genehmigung vorliegend*).

3.1.2.4 Nachweis der Immunantworten in der Durchflusszytometrie

3.1.2.4.1 Dextramerfärbungen

Dextramerfärbungen wurden fast ausschließlich mit Proben von gesunden Blutspendern aus der Hauptgruppe 1 durchgeführt, da die PBMCs der erstschwangeren Frauen aus der Hauptgruppe 2 in aller Regel vollständig für die RT-qPCR benötigt wurden.

Die Funktionalität der dextramerbasierten FACS-Analyse ließ sich über den Nachweis von Immunantworten gegen das CMV-pp65-Peptid belegen: Deutlich positive Ergebnisse aus der RT-qPCR konnten mit den Dextramerfärbungen nämlich in nahezu allen Fällen bestätigt werden. Gleichzeitig korrelierten diese Resultate auch mit den Resultaten des Enzygnost-ELISA. Die Korrelation mit grenzwertig positiven oder negativen Ergebnissen gelang dagegen nicht immer.

So war beispielsweise für den Probanden *TM#24* in der Datenbank ein CMV-positiver Status eingetragen (Rohwert des Enzygnost-ELISA: 0,968). Sein in der RT-qPCR ermittelter relativer Expressionswert für CMV betrug 137,99. Dieses Ergebnis ließ sich mit einer deutlich abgrenzbaren dextramerpositiven Population in der FACS-Analyse bestätigen (**Abb. 14**).

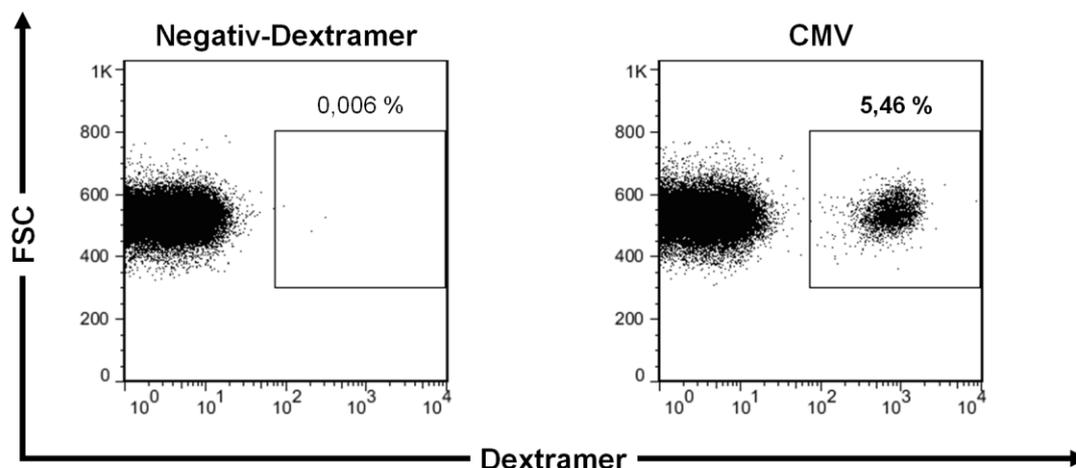


Abb. 14: FACS-Plots der Dextramerfärbung auf CMV beim Probanden *TM#24*

Beim repräsentativen Probanden *TM#24* ließen sich mit den dextramerbasierten FACS-Analysen die positiven Immunantworten aus der RT-qPCR bestätigen: Unter den CD8⁺ T-Lymphozyten fanden sich 5,46 % dextramerpositive Zellen.

Immunantworten gegen die untersuchten TAA HER2/neu, MUC1, PRAME und WT1 ließen sich durch die Dextramerfärbungen dagegen nicht regelhaft nachweisen. Deutlich positive Ergebnisse aus der RT-qPCR konnten zwar teilweise bestätigt werden, allerdings kam es hierbei auch innerhalb der Werte eines Probanden nicht immer zu konstanten Resultaten.

So wie zum Beispiel der Proband *TM#17* in der RT-qPCR in einer oder beiden Peptidkonzentrationen positive Immunantworten gegen alle vier TAA auf, in der Dextramerfärbung ließen sich aber nur die Immunantworten gegen HER2/neu und MUC1 nachweisen (**Tab. 10** und **Abb. 15 A**).

Beim Probanden *TM#19* konnten die positiven Immunantworten gegen MUC1 und PRAME bestätigt werden, daneben wurde auch die fehlende Immunantwort gegen WT1 verifiziert. Die in der RT-qPCR deutlich positive Immunantwort gegen HER2/neu ließ sich dagegen nicht nachweisen (**Tab. 11** und **Abb. 15 B**).

Tab. 10: Korrelation der Immunantworten gegen die TAA beim Probanden *TM#17*

	HER2/neu	MUC1	PRAME	WT1
RT-qPCR (<i>relative Expression</i>)				
0,1 µmol/l	0,850	1,464	15,863	1,084
10 µmol/l	5,190	2,428	7,010	8,971
Dextramerfärbung				
	0,284 %	0,188 %	0,032 %	0,023 %

Positiv zu wertende Ergebnisse sind in fetter Schrift dargestellt.

Tab. 11: Korrelation der Immunantworten gegen die TAA beim Probanden *TM#19*

	HER2/neu	MUC1	PRAME	WT1
RT-qPCR (<i>relative Expression</i>)				
0,1 µmol/l	24,07	15,97	0,277	0,253
10 µmol/l	0,153	19,47	25,97	0,195
Dextramerfärbung				
	0,096 %	0,744 %	0,205 %	0,018 %

Positiv zu wertende Ergebnisse sind in fetter Schrift dargestellt.

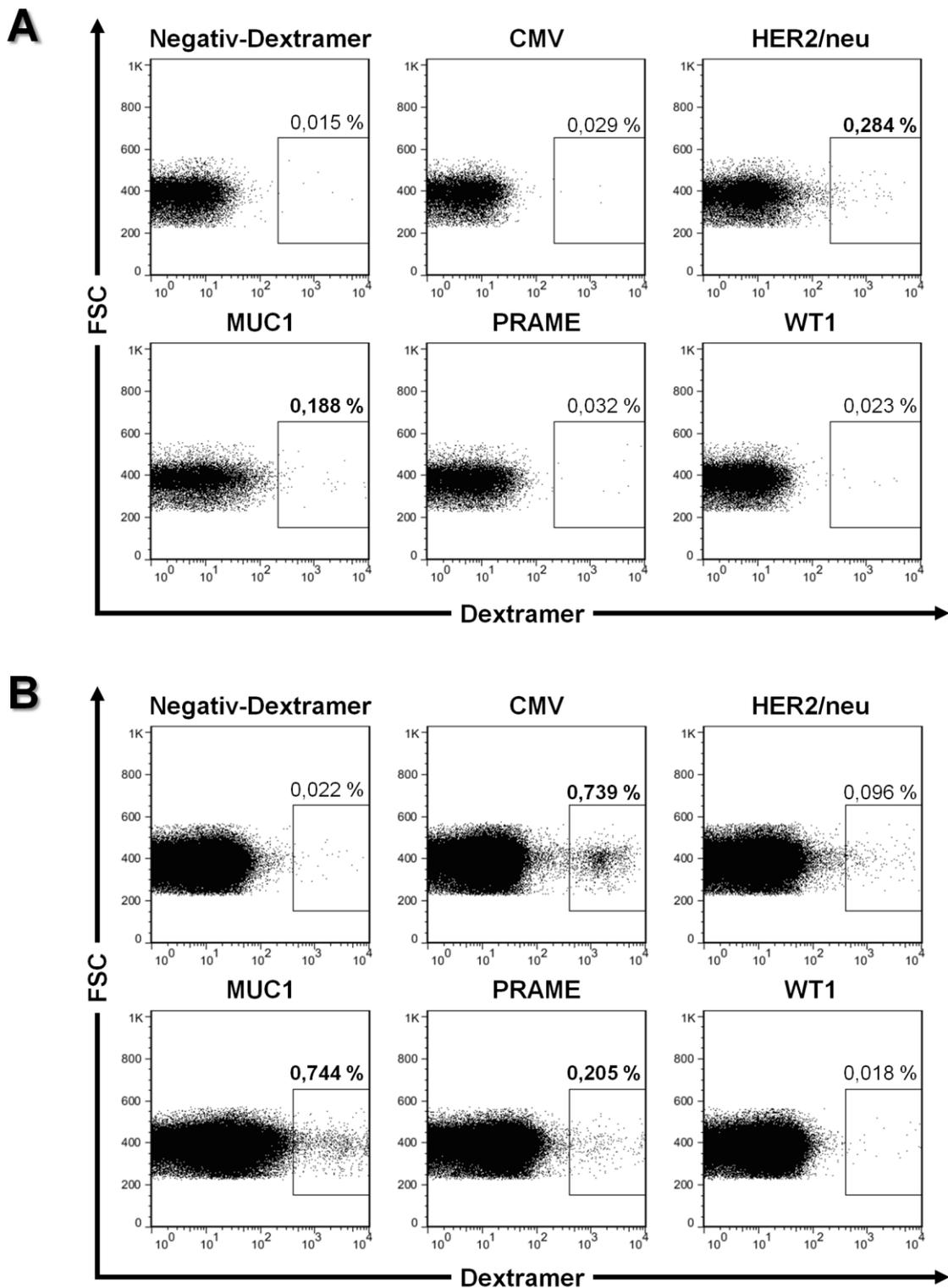


Abb. 15: FACS-Plots der Dextramerfärbungen bei den Probanden *TM#17* und *TM#19*

A: Der Proband *TM#17* wies positive Immunantworten gegen HER2/neu und MUC1 auf, der negative CMV-Status aus dem Enzygnost-ELISA konnte bestätigt werden.

B: Der Proband *TM#19* wies positive Immunantworten gegen MUC1 und PRAME auf, der positive CMV-Status aus dem Enzygnost-ELISA konnte bestätigt werden.

3.1.2.4.2 Intrazelluläre Zytokinfärbungen

Intrazelluläre Zytokinfärbungen (ICS) wurden ausschließlich mit Proben von gesunden Blutspendern (Hauptgruppe 1) durchgeführt, da von den PBMCs der erstschwangeren Frauen (Hauptgruppe 2) nach der RT-qPCR und einer eventuellen Dextramerfärbung keine Zellen mehr zur Verfügung standen.

Die Funktionalität der ICS konnte durch den Nachweis von Immunantworten gegen das CMV-pp65-Peptid belegt werden. So konnten deutlich positive Ergebnisse aus der RT-qPCR bei den meisten Probanden mittels ICS bestätigt werden. In diesen Fällen korrelierten die Ergebnisse der Dextramerfärbungen auch mit den Ergebnissen des Enzygnost-ELISA. Die Korrelation mit grenzwertig positiven oder negativen Ergebnissen gelang dagegen nicht immer.

So war beispielsweise für den Probanden *TM#6* in der Datenbank ein CMV-positiver Status eingetragen (Rohwert des Enzygnost-ELISA: 0,847). Der in der RT-qPCR ermittelte relative Expressionswert für CMV betrug 24,96. Dieses Ergebnis ließ sich mit einer deutlich abgrenzbaren IFN- γ -positiven Population in der FACS-Analyse bestätigen (**Abb. 16**).

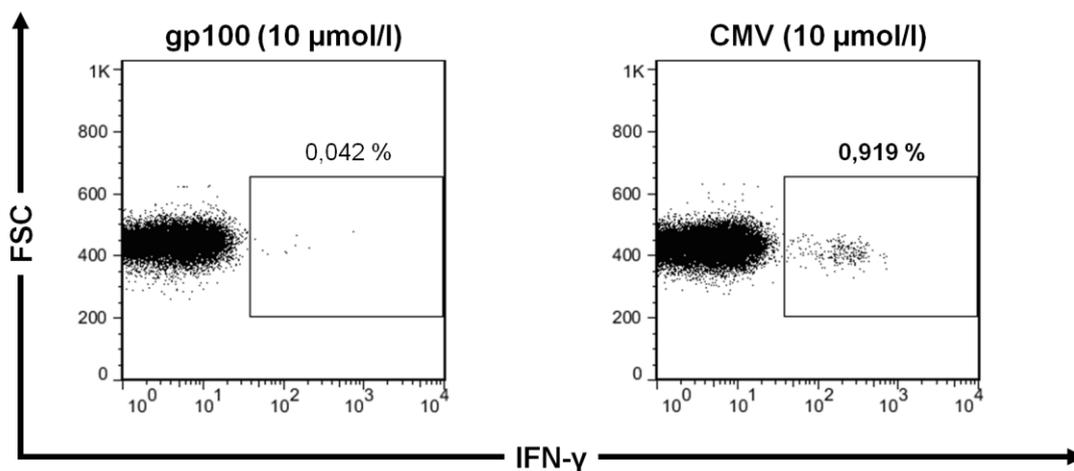


Abb. 16: FACS-Plots der ICS auf CMV beim Probanden *TM#6*

Beim repräsentativen Probanden *TM#6* ließen sich die positiven Immunantworten aus der RT-qPCR mit der intrazellulären Zytokinfärbung bestätigen: Unter den CD8⁺ T-Lymphozyten fanden sich 0,919 % IFN- γ -positive Zellen. Bei der Negativkontrolle gp100 waren dies nur 0,042 %.

Der Nachweis von Immunantworten gegen die untersuchten TAA HER2/neu, MUC1, PRAME und WT1 gelang dagegen bei keinem einzigen Probanden. Der Anteil der IFN- γ -positiven Zellen lag bei den getesteten Probanden im Bereich der Negativkontrolle gp100.

So wurden beispielsweise für den Probanden *TM#14* in der RT-qPCR positive Immunantworten gegen WT1 nachgewiesen (relativer Expressionswert für die Peptidkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$: 6,19), die sich per ICS nicht bestätigen ließen. Die Immunantworten gegen CMV (relativer Expressionswert: 241,12) konnten dagegen nachgewiesen werden (**Abb. 17**).

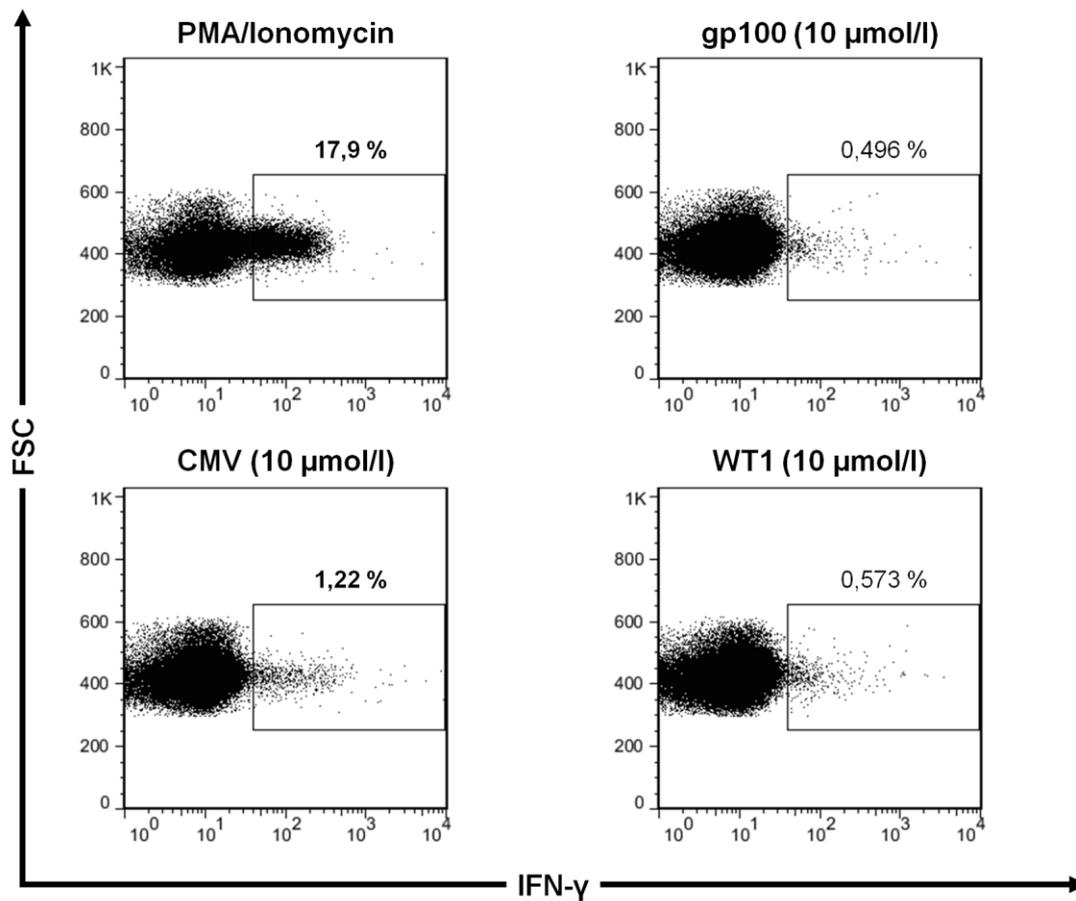


Abb. 17: FACS-Plots der ICS beim Probanden *TM#14*

Beim repräsentativen Probanden *TM#14* ließen sich die in der RT-qPCR ermittelten positiven Immunantworten gegen CMV bestätigen. Die Immunantworten gegen WT1 lagen dagegen im Bereich der Negativkontrolle gp100 und ließen sich somit nicht nachweisen. PMA/Ionomycin diente als Positivkontrolle.

3.1.2.4.3 Degranulationsfärbungen

Der Beleg für die Funktionalität der Degranulationsfärbungen gelang durch den Nachweis von aus der RT-qPCR bekannten positiven Immunantworten gegen das CMV-pp65-Peptid. Dagegen konnten mit diesem Verfahren bei keinem einzigen Probanden Immunantworten gegen eines der untersuchten TAA nachgewiesen werden.

So wurden beispielsweise für den Probanden *TM#14* in der RT-qPCR positive Immunantworten gegen WT1 nachgewiesen (relativer Expressionswert für die Peptidkonzentration von 10 µmol/l: 6,19), die sich per Degranulationsfärbung nicht bestätigen ließen. Die Immunantworten gegen CMV (241,12) waren dagegen nachweisbar (**Abb. 18**).

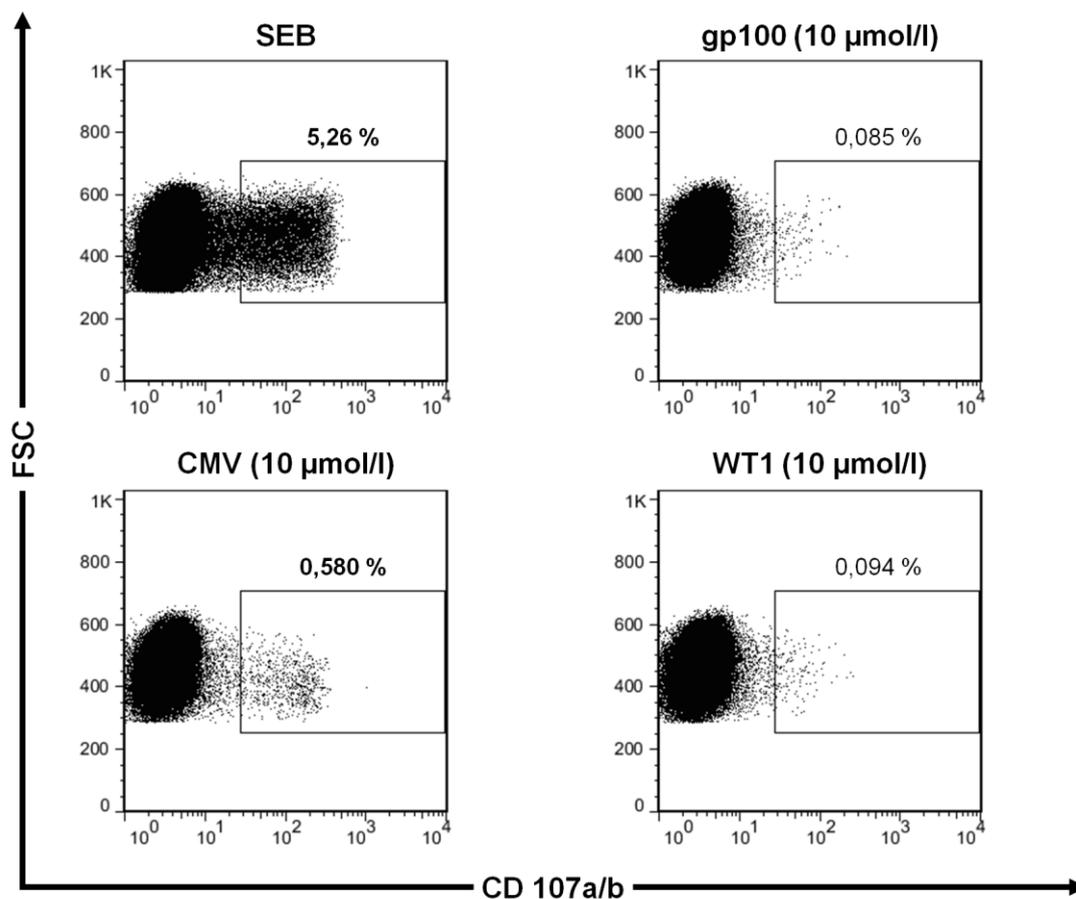


Abb. 18: FACS-Plots der Degranulationsfärbung beim Probanden *TM#14*

Beim repräsentativen Probanden *TM#14* ließen sich die in der RT-qPCR ermittelten positiven Immunantworten gegen CMV bestätigen. Die Immunantworten gegen WT1 lagen dagegen im Bereich der Negativkontrolle. SEB diente als Positivkontrolle.

3.1.3 TAA-spezifische Gedächtnisimmunantworten im Vergleich zwischen Frauen und Männern

Für den Vergleich der TAA-spezifischen Gedächtnisimmunantworten zwischen den beiden Geschlechtern aus der Gruppe der gesunden Blutspender (Hauptgruppe 1) wurden zunächst alle Frauen (Subgruppe der Nulligravidae sowie Subgruppe der Primi- und Multiparae) zu einer Gruppe zusammengefasst.

Dabei ergaben sich bei der Peptidkonzentration von 0,1 µmol/l für alle untersuchten TAA keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern. Bei der Peptidkonzentration von 10 µmol/l dagegen wiesen Männer gegen HER2/neu und WT1 jeweils signifikant höhere relative Expressionswerte als Frauen auf ($p < 0,05$).

Abb. 19 zeigt die Gedächtnisimmunantworten im Sinne der Immunlevel (relative Expressionswerte) gegen diese zwei TAA im Vergleich zwischen Frauen und Männern.

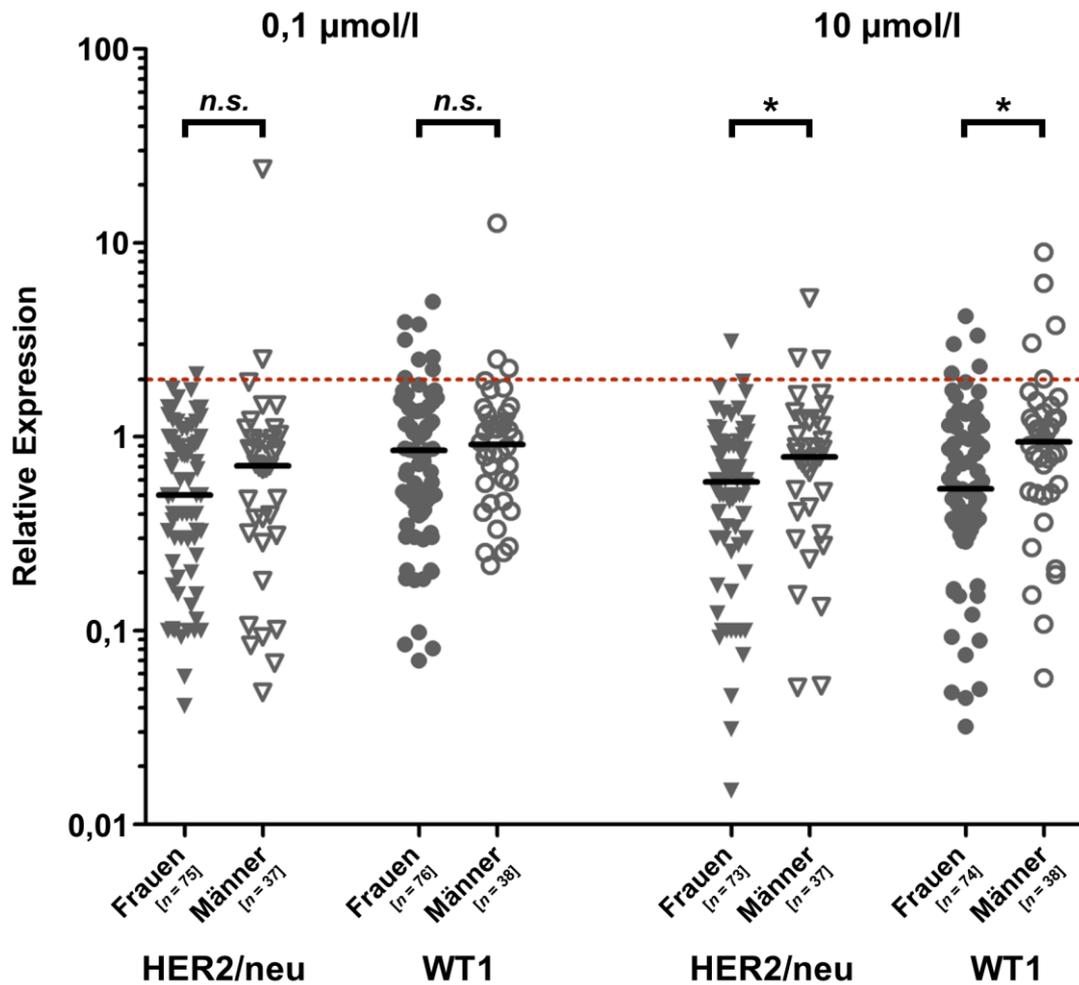


Abb. 19: Immunantworten gegen HER2/neu und WT1 im Geschlechtervergleich

Logarithmische Darstellung der Immunlevel (relative Expressionswerte) gegen HER2/neu und WT1 im Vergleich zwischen den Frauen (beide Subgruppen) und den Männern aus der Gruppe der gesunden Blutspender (Hauptgruppe 1).

Die gepunktete horizontale Linie markiert den Schwellenwert für als „positiv“ definierte Immunantworten (relative Expression $\geq 2,0$), die Balken innerhalb der Subgruppen zeigen den Median an. * $p < 0,05$.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach Lutz et al., 2015 (schriftliche Genehmigung vorliegend).

3.2 Longitudinalanalyse bei erstschwangeren Frauen (Hauptgruppe 2)

3.2.1 Probensammlung

Dem biometrischen Studiendesign entsprechend mussten für die Gruppe der erstschwangeren Frauen (Hauptgruppe 2) mindestens 38 Probanden rekrutiert werden (siehe **2.2.2.1**).

Hierfür wurden zunächst insgesamt 104 erstschwangere Frauen über die Studie aufgeklärt, von denen 11 Frauen (11 %) nach der Aufklärung die Teilnahme an der Studie ablehnten. Bei den verbliebenen 93 Probanden (89 %) wurde eine HLA-Typisierung durchgeführt. Davon wiesen 50 Probanden (54 %) das gesuchte HLA-A*02:01-Merkmal auf. Drei Probanden lehnten anschließend die Aufnahme in die Studie ab, so dass letztlich 47 Probanden in die Studie aufgenommen wurden. Diese erhielten nach dem Zeitpunkt ihrer Aufnahme in die Studie eine fortlaufende Nummer nach dem Schema *Gyn#Zahl*. Die weiteren Entnahmezeitpunkte wurden mit einer fortlaufenden Zahl nach der Probandennummer gekennzeichnet. Drei von den initial aufgenommenen 47 Probanden wurden nachträglich aus der Studie ausgeschlossen: Zwei Probanden (*Gyn#1*, *Gyn#4*) waren schon früher schwanger gewesen und erfüllten damit das Kriterium der Primigravidität nicht, in einem Fall (*Gyn#33*) zeigte sich erst nach der Aufnahme in die Studie, dass nicht das gesuchte HLA-A*02:01-Merkmal vorlag.

Von der Aufklärung der ersten bis zur letzten potenziellen Studienteilnehmerin vergingen 20 Monate, von der Akquisition der ersten Probe (Entnahme 1 bei *Gyn#2*) bis zur letzten Probe (Entnahme 4 bei *Gyn#44*) 33 Monate.

Das mediane Alter der 44 Frauen lag zum Zeitpunkt ihrer Aufnahme in die Studie bei 28 (19–39) Jahren, sie befanden sich dabei im Median in der Woche 22 (11–34) ihrer Schwangerschaft. Keine Studienteilnehmerin hatte in ihrem bisherigen Leben eine Bluttransfusion erhalten.

Das für die erstschwangeren Frauen aus der Hauptgruppe 2 vorgesehene Arbeitsprogramm (Blutbildbestimmungen, Bestimmung der Hormonspiegel sowie RT-qPCR-basierte Versuche) konnte teilweise wegen fehlenden oder nicht ausreichenden Probenmaterials zu den vier Entnahmezeitpunkten nicht vollständig durchgeführt werden (**Tab. 12**).

Tab. 12: Durchgeführtes Arbeitsprogramm in der Hauptgruppe 2

	Entnahme 1 <i>(1. bis 2. Trimenon)</i>	Entnahme 2 <i>(1 bis 4 Tage post partum)</i>	Entnahme 3 <i>(6 bis 8 Wochen post partum)</i>	Entnahme 4 <i>(nach dem Abstillen)</i>
Probanden <i>(von insgesamt 44)</i>	43	34	34	15
Blutbildbestimmungen	8	16	27	15
Bestimmung der Hormonspiegel	43	34	34	15
RT-qPCR-basierte Versuche	43	31	34	14

3.2.2 Evaluation der Schwangerschaft

Um eine Beeinflussung der immunologischen Situation der erstschwangeren Frauen durch die veränderten Verhältnisse während ihrer Schwangerschaft auszuschließen, wurden im Verlauf der vier Entnahmezeitpunkte zusätzlich die hämatologische Konstitution und der hormonelle Status erfasst.

3.2.2.1 Hämatologische Konstitution

Zur Bewertung der hämatologischen Konstitution wurden sechs Parameter aus den Blutbildbestimmungen herangezogen: Die absolute Erythrozytenzahl und der Hämoglobinspiegel als Kennzeichen der erythrozytären Versorgungssituation, die absolute Zahl an Leukozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten als Kennzeichen der Immunkonstitution und die absolute Zahl an Thrombozyten als Kennzeichen der Blutgerinnung. Als Referenz diente eine Gruppe von ausschließlich weiblichen gesunden Blutspendern aus der Hauptgruppe 1 ($n = 10$, darunter sowohl Nulligravidae als auch Primi- und Multiparae), bei denen ebenfalls eine Blutbildbestimmung durchgeführt worden war.

Bei den erstschwangeren Frauen fielen die absolute Zahl der Erythrozyten und der Hämoglobinspiegel bis zur Entnahme 2 ab und stiegen dann über die Werte der Referenzgruppe an. Die absolute Leukozytenzahl stieg bedingt durch die neutrophilen Granulozyten bis zur Entnahme 2 an und fiel danach auf die Werte der Referenzgruppe ab. Die absolute Zahl der Thrombozyten stieg bis zur Entnahme 3 an und fiel dann auf das Referenzniveau ab (**Abb. 20**).

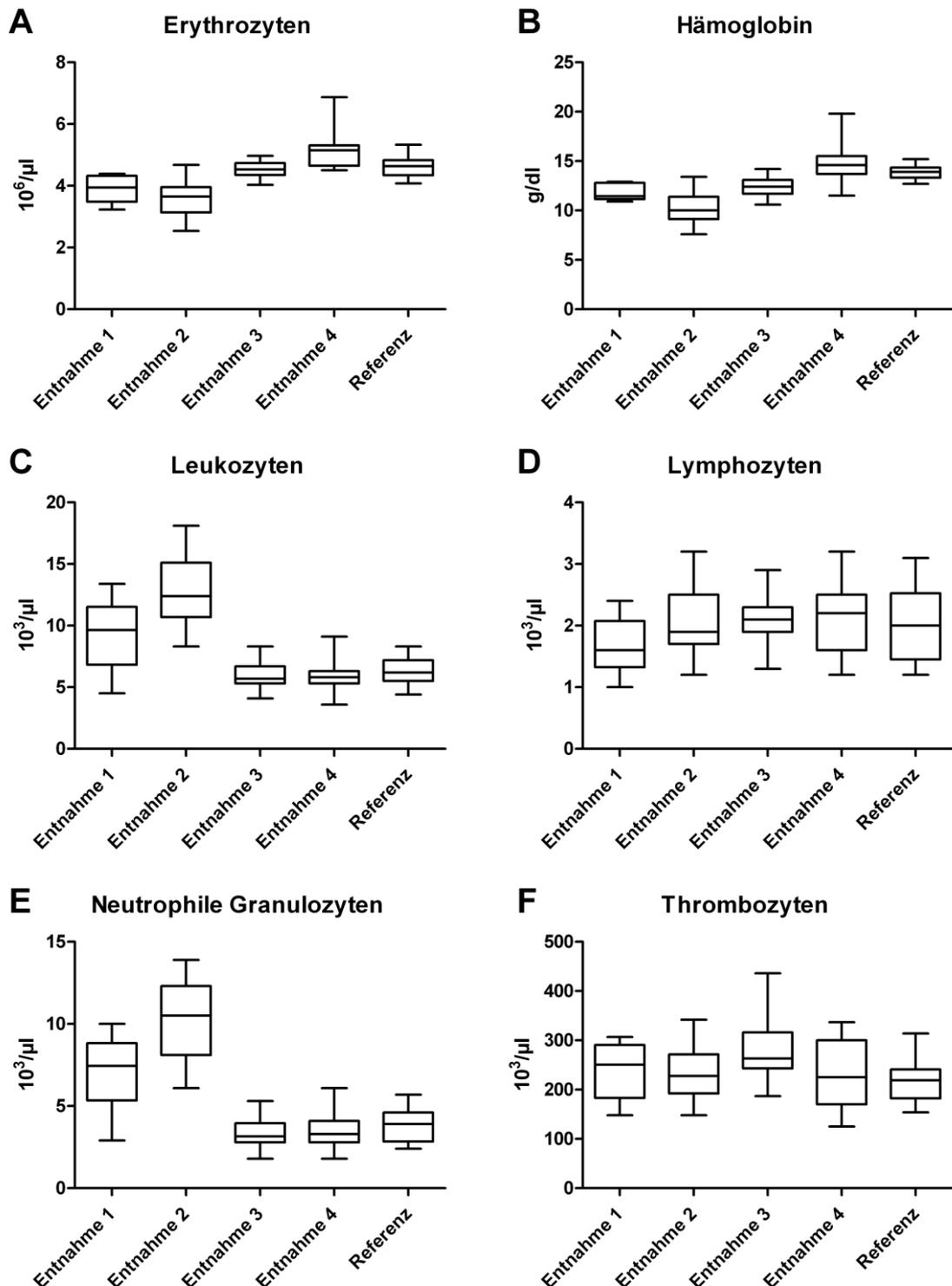


Abb. 20: Hämatologische Konstitution der erstschwangeren Frauen

Die absolute Zahl an Erythrozyten (A) und der Hämoglobinspiegel (B) sowie die absolute Zahl an Leukozyten (C), Lymphozyten (D), neutrophilen Granulozyten (E) und Thrombozyten (F) dienen als Kennwerte für die hämatologische Konstitution der erstschwangeren Frauen zur Entnahme 1 ($n = 8$), 2 ($n = 16$), 3 ($n = 27$) und 4 ($n = 15$). Als Referenz diente eine Gruppe ausschließlich weiblicher gesunder Blutspender (sowohl Nulligravidae als auch Primi- und Multiparae) aus der Hauptgruppe 1 ($n = 10$).

3.2.2.2 Hormoneller Status

Zur Bewertung des hormonellen Status der erstschwangeren Frauen wurden die Mediane der schief verteilten Plasmaspiegel von β -HCG, Estradiol, Progesteron und Prolaktin betrachtet.

Der β -HCG-Spiegel sank von 17.477 (Spannbreite 1202–103.863) mU/ml bei der Entnahme 1 auf nicht messbare Werte bei der Entnahme 4, der Estradiol-Spiegel von 9343 (1269–25.770) pg/ml bei der Entnahme 1 auf 28,7 (5,0–234,0) pg/ml bei der Entnahme 4. Der Progesteron-Spiegel sank von der Entnahme 1 bis zur Entnahme 4 von 56,9 (12,2–605,0) ng/ml auf 0,56 (0,1–20,1) ng/ml ab. Der Prolaktin-Spiegel lag zur Entnahme 1 bei 124,7 (0,5–271,7) ng/ml, stieg dann an und fiel bis zur Entnahme 4 auf 7,8 (5,0–22,9) ng/ml ab (**Abb. 21**). Damit lagen alle gemessenen Hormonspiegel in den für eine physiologische Schwangerschaft zu erwartenden Bereichen.

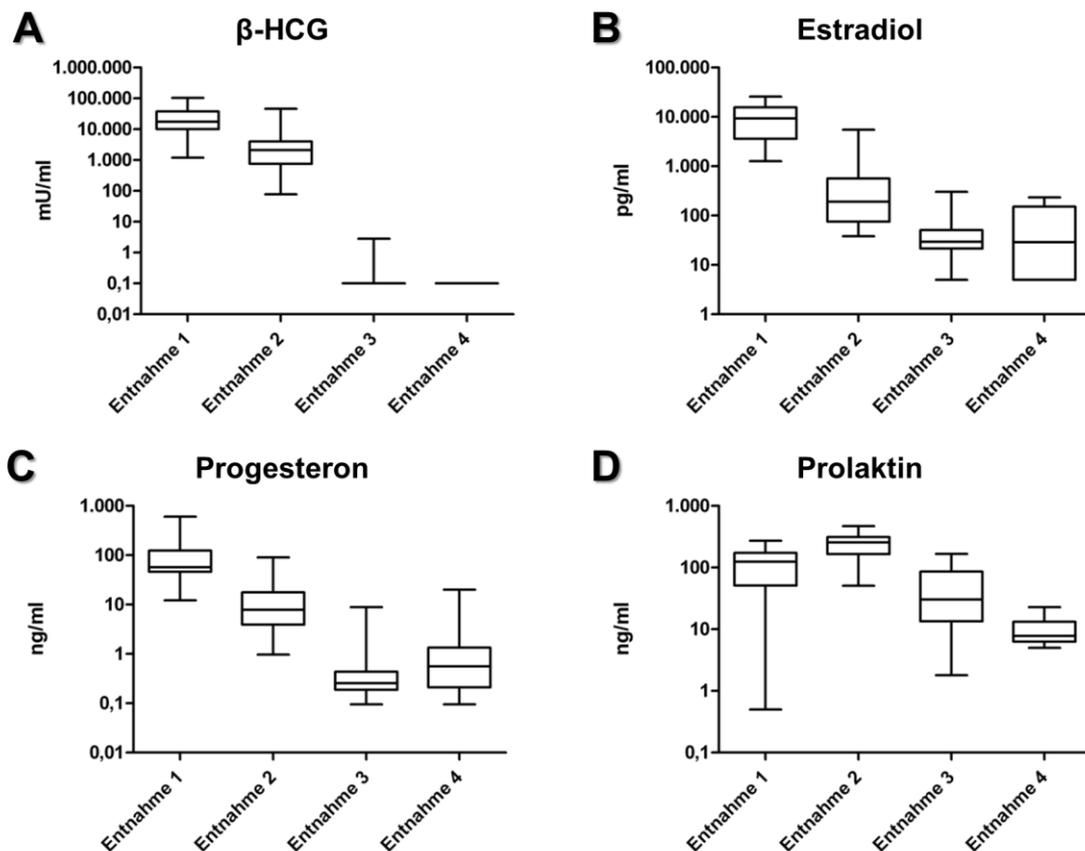


Abb. 21: Hormoneller Status der erstschwangeren Frauen

Gemessene Hormonspiegel von β -HCG (**A**), Estradiol (**B**), Progesteron (**C**) und Prolaktin (**D**) zur Entnahme 1 ($n = 43$), 2 ($n = 34$), 3 ($n = 34$) und 4 ($n = 15$).

3.2.3 CD8-positive Gedächtnisimmunantworten gegen die untersuchten tumorassoziierten Antigene

3.2.3.1 Überblick über die gemessenen Immunlevel

Die RT-qPCR-Versuche konnten nicht bei allen erstschwangeren Frauen zu allen Entnahmezeitpunkten durchgeführt werden (vgl. **Tab. 12**), daneben war die Zellzahl teilweise nicht für die Messung des vollen Programms ausreichend.

Für die Peptidkonzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ betrug der maximale Ausfall für ein TAA sieben Proben (MUC1 zur Entnahme 1). **Abb. 22** zeigt für jedes TAA die Immunlevel (relative Expressionswerte) bei der Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$.

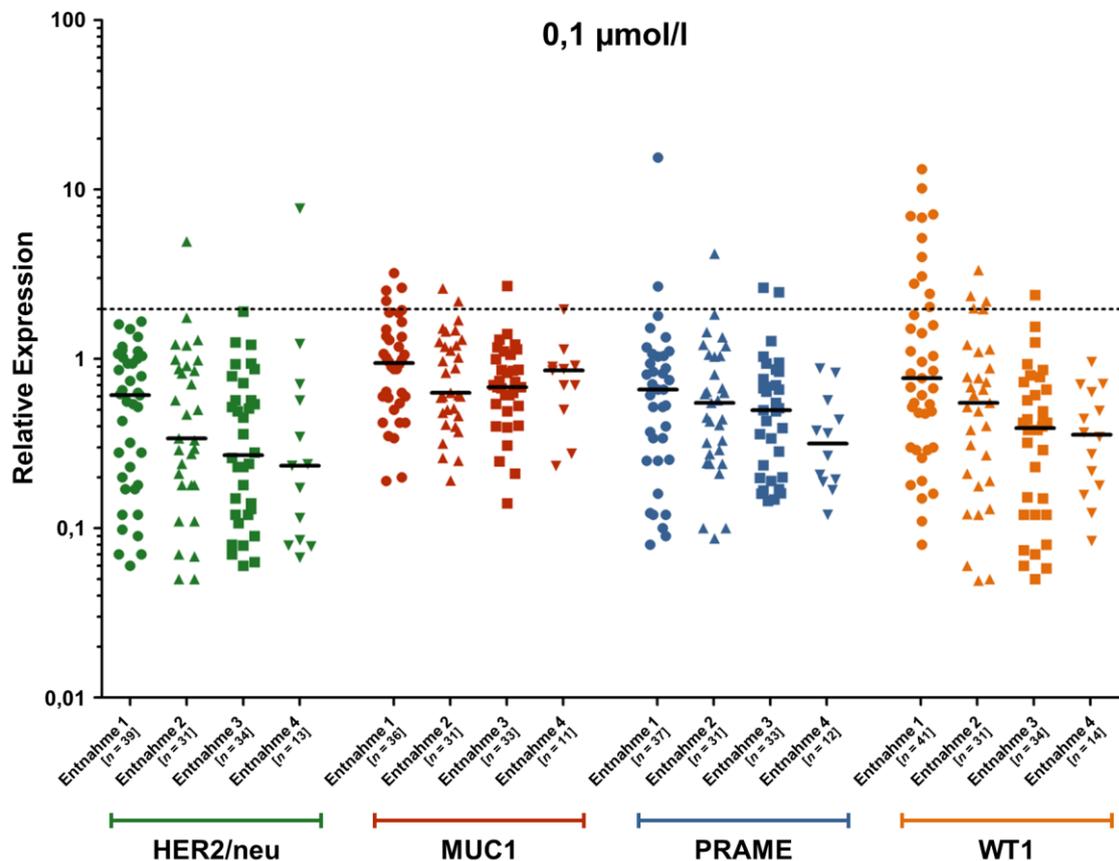


Abb. 22: Immunlevel gegen die TAA (0,1 $\mu\text{mol/l}$) in der Hauptgruppe 2

Logarithmische Darstellung der Immunlevel (relative Expressionswerte) gegen die untersuchten TAA für die Peptidkonzentration 0,1 $\mu\text{mol/l}$ in der Hauptgruppe 2.

Der relative Expressionswert ist für jeden Probanden getrennt nach den Entnahmezeitpunkten aufgetragen. Die gepunktete horizontale Linie markiert den Schwellenwert für als „positiv“ definierte Immunantworten (relative Expression $\geq 2,0$), die Balken innerhalb der Subgruppen zeigen den Median an.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach LUTZ *et al.*, 2015 (schriftliche Genehmigung vorliegend).

Für die Peptidkonzentration von 10 µmol/l betrug der maximale Ausfall für ein TAA elf Proben (MUC1 zur Entnahme 1 und 2 sowie PRAME zur Entnahme 2). Für CMV-pp65 war dieser Ausfall teilweise noch höher, weil die Messung der Immunantworten gegen dieses Peptid die niedrigste Priorität hatte. **Abb. 23** zeigt die ermittelten Immunlevel (relative Expressionswerte) gegen die vier untersuchten TAA sowie gegen das Kontrollpeptid CMV-pp65 bei der Peptidkonzentration von 10 µmol/l.

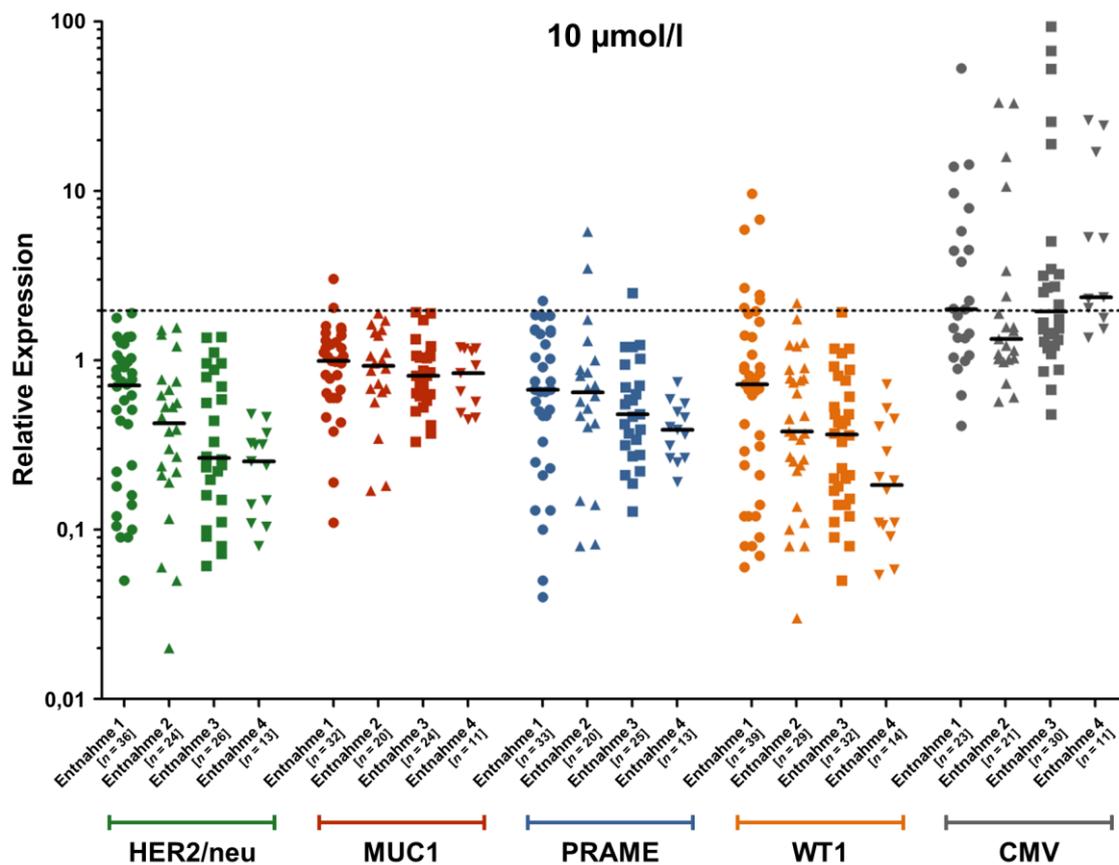


Abb. 23: Immunlevel gegen die TAA (10 µmol/l) in der Hauptgruppe 2

Logarithmische Darstellung der Immunlevel (relative Expressionswerte) gegen die untersuchten TAA sowie gegen das Kontrollpeptid CMV-pp65 für die Peptidkonzentration 10 µmol/l in der Hauptgruppe 2.

Der relative Expressionswert ist für jeden Probanden getrennt nach den Entnahmezeitpunkten aufgetragen. Die gepunktete horizontale Linie markiert den Schwellenwert für als „positiv“ definierte Immunantworten (relative Expression $\geq 2,0$), die Balken innerhalb der Subgruppen zeigen den Median an.

Abbildung modifiziert wiedergegeben nach LUTZ *et al.*, 2015 (schriftliche Genehmigung vorliegend).

3.2.3.2 Frequenzen der als positiv definierten Immunantworten

Als Schwellenwert für die Definition einer „positiven“ Immunantwort diente bei den erstschwangeren Frauen ebenso wie schon bei den gesunden Blutspendern ein Immunlevel von 2,0. Dies entspricht damit einer mindestens doppelt so hohen Expression von IFN- γ -mRNA in der RT-qPCR im Vergleich zu dem irrelevanten Antigen gp100.

Die Immunantworten werden in **Tab. 13** für jedes untersuchte TAA zu den vier Entnahmezeitpunkten als Median der Immunlevel und als Frequenz der „positiven“ Immunantworten dargestellt.

Gegen HER2/neu ließen sich kaum „positive“ Immunantworten nachweisen. Bei der Peptidkonzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ fanden sich zur zweiten und vierten Entnahme jeweils eine „positive“ Immunantwort, bei 10 $\mu\text{mol/l}$ waren alle Immunantworten negativ.

Gegen MUC1 waren für 0,1 $\mu\text{mol/l}$ zur ersten Entnahme 11 % „positive“ Immunantworten nachweisbar, die dann bis zur vierten Entnahme auf 0 % abfielen. Für 10 $\mu\text{mol/l}$ waren dagegen nur zur ersten Entnahme 5 % „positive“ Immunantworten zu finden, danach waren alle Immunantworten negativ.

Gegen PRAME ließen sich für beide Peptidkonzentrationen zu den ersten drei Entnahmezeitpunkten „positive“ Immunantworten mit einer Frequenz von 3 % bis 10 % finden, die zur vierten Entnahme jeweils vollständig negativ waren.

Gegen WT1 lag die Frequenz der „positiven“ Immunantworten bei 0,1 $\mu\text{mol/l}$ zur ersten Entnahme bei 27 % und fiel zur vierten Entnahme bis auf 0 % ab. Gegen die Peptidkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ fanden sich zur ersten Entnahme 17 % „positive“ Immunantworten, die schon zur dritten Entnahme auf 0 % abfielen.

Der Vergleich der „positiven“ Immunantworten zwischen den beiden Peptidkonzentrationen eines Entnahmezeitpunktes erfolgte mit dem Exakten Test nach Fisher. Bei allen vier untersuchten TAA bestand dabei zu keinem Entnahmezeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Frequenz der „positiven“ Immunantworten zwischen den beiden Peptidkonzentrationen.

Ergebnisse

Tab. 13: TAA-spezifische Immunantworten in der Hauptgruppe 2

	Peptidkonzentration						p-Wert der „positiven“ Immunantworten
	0,1 µmol/l			10 µmol/l			
	n	Median (Spannbreite)	„Positive“ Immunantworten	n	Median (Spannbreite)	„Positive“ Immunantworten	
HER2/neu							
Entnahme 1	39	0,61 (0,06–1,67)	0 (0 %)	36	0,71 (0,05–1,90)	0 (0 %)	n/a*
Entnahme 2	31	0,34 (0,05–4,94)	1 (3 %)	24	0,43 (0,02–1,56)	0 (0 %)	1,0000
Entnahme 3	34	0,27 (0,06–1,90)	0 (0 %)	26	0,27 (0,06–1,37)	0 (0 %)	n/a*
Entnahme 4	13	0,23 (0,07–7,73)	1 (8 %)	13	0,25 (0,08–0,48)	0 (0 %)	1,0000
MUC1							
Entnahme 1	36	0,95 (0,19–3,21)	4 (11 %)	32	0,99 (0,11–3,02)	2 (5 %)	0,6764
Entnahme 2	31	0,63 (0,19–2,61)	2 (6 %)	20	0,93 (0,17–1,89)	0 (0 %)	0,5137
Entnahme 3	34	0,69 (0,14–2,69)	1 (3 %)	24	0,81 (0,33–1,92)	0 (0 %)	1,0000
Entnahme 4	11	0,85 (0,23–1,96)	0 (0 %)	11	0,84 (0,45–1,19)	0 (0 %)	n/a*
PRAME							
Entnahme 1	37	0,66 (0,08–15,4)	2 (5 %)	33	0,67 (0,04–2,24)	1 (3 %)	1,0000
Entnahme 2	31	0,55 (0,09–4,18)	1 (3 %)	20	0,65 (0,08–5,75)	2 (10 %)	0,5534
Entnahme 3	33	0,49 (0,15–2,63)	2 (6 %)	25	0,48 (0,13–2,49)	1 (3 %)	1,0000
Entnahme 4	12	0,32 (0,12–0,88)	0 (0 %)	13	0,39 (0,19–0,74)	0 (0 %)	n/a*
WT1							
Entnahme 1	41	0,77 (0,08–13,2)	11 (27 %)	39	0,72 (0,06–9,63)	7 (17 %)	0,4258
Entnahme 2	31	0,55 (0,05–3,34)	3 (10 %)	29	0,38 (0,03–2,18)	1 (3 %)	0,6128
Entnahme 3	34	0,39 (0,05–2,38)	1 (3 %)	32	0,37 (0,05–1,92)	0 (0 %)	1,0000
Entnahme 4	14	0,36 (0,08–0,95)	0 (0 %)	14	0,18 (0,05–0,72)	0 (0 %)	n/a*

* Chi-Quadrat-Analysen wie der Exakte Test nach Fisher sind ohne positiven Wert nicht möglich.

3.2.3.3 Vergleich der Immunlevel im zeitlichen Verlauf

Zur Analyse der Immunlevel gegen die untersuchten TAA im zeitlichen Verlauf vor, während und nach der Schwangerschaft wurde neben den vier Entnahmezeitpunkten bei den erstschwangeren Frauen aus der Hauptgruppe 2 zusätzlich auch die Subgruppe der Nulligravidae aus der Hauptgruppe 1 als Bezugspunkt „vor“ der Schwangerschaft herangezogen.

Für HER2/neu war bei der Peptidkonzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ kein signifikanter Unterschied festzustellen. Bei 10 $\mu\text{mol/l}$ waren die Immunlevel zur vierten Entnahme signifikant niedriger als zur ersten Entnahme, zwischen allen anderen Zeitpunkten bestanden keine signifikanten Unterschiede (**Abb. 24**).

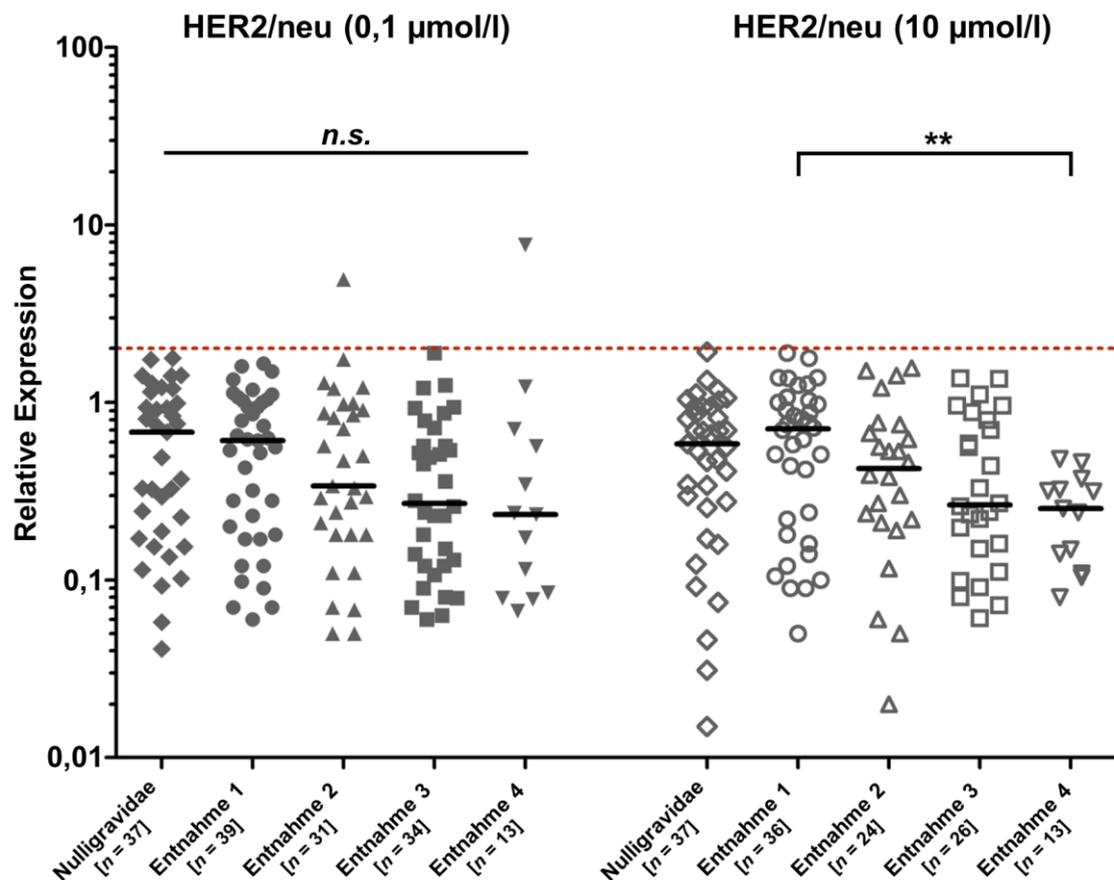


Abb. 24: Longitudinaler Verlauf der Immunlevel gegen HER2/neu

Logarithmische Darstellung der Immunlevel (relative Expressionswerte) gegen HER2/neu im zeitlichen Verlauf (links 0,1 $\mu\text{mol/l}$; rechts 10 $\mu\text{mol/l}$).

Die gepunktete horizontale Linie markiert den Schwellenwert für als „positiv“ definierte Immunantworten (relative Expression $\geq 2,0$), die Balken innerhalb der Subgruppen zeigen den Median an. ** $p < 0,01$.

Bei den Immunleveln gegen WT1 zeigten sich für beide Peptidkonzentrationen signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf: Für 0,1 $\mu\text{mol/l}$ waren die Immunlevel zur ersten Entnahme signifikant höher als zur dritten ($p < 0,01$) und als zur vierten ($p < 0,05$) Entnahme. Für 10 $\mu\text{mol/l}$ waren die Immunlevel zum vierten Entnahmezeitpunkt signifikant niedriger als bei den Nulligravidae ($p < 0,01$) und als zum ersten Entnahmezeitpunkt ($p < 0,01$). Die Immunlevel gegen WT1 im zeitlichen Verlauf vor, während und nach der Schwangerschaft sind in **Abb. 25** dargestellt.

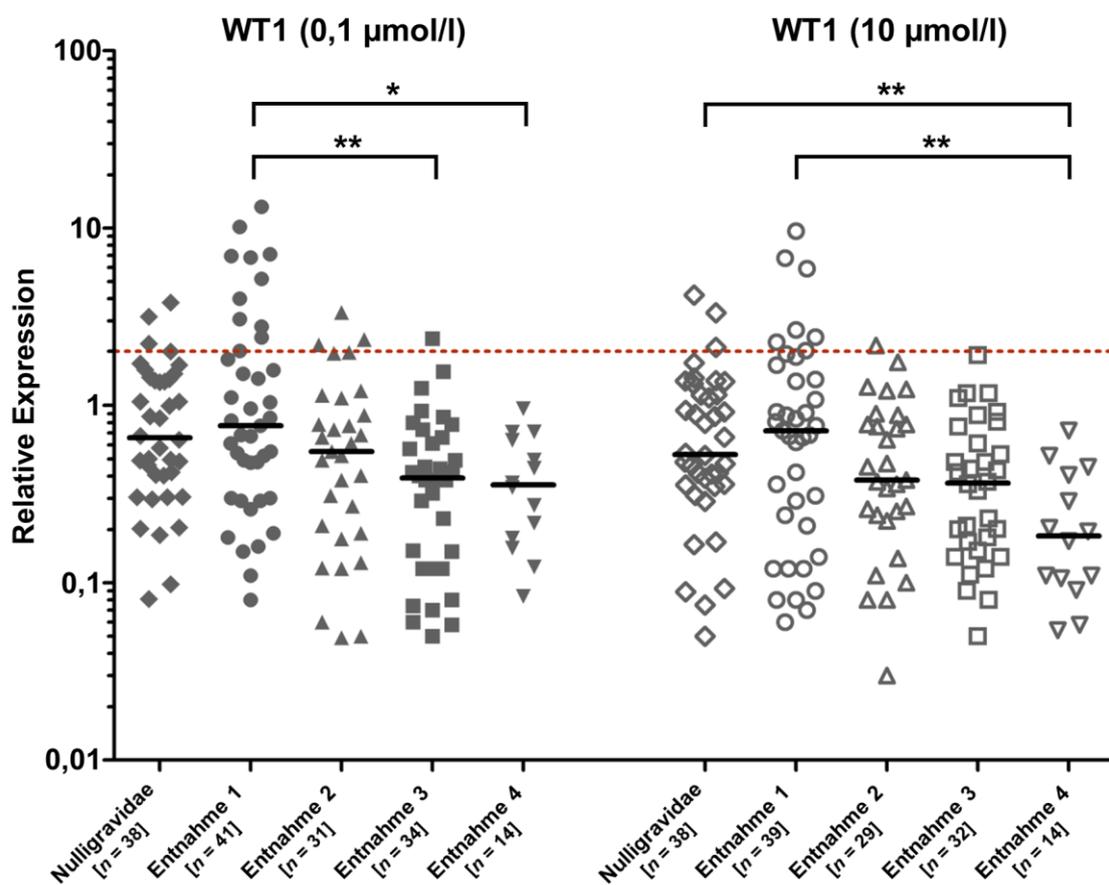


Abb. 25: Longitudinaler Verlauf der Immunlevel gegen WT1

Logarithmische Darstellung der Immunlevel (relative Expressionswerte) gegen WT1 im zeitlichen Verlauf (links 0,1 $\mu\text{mol/l}$; rechts 10 $\mu\text{mol/l}$).

Die gepunktete horizontale Linie markiert den Schwellenwert für als „positiv“ definierte Immunantworten (relative Expression $\geq 2,0$), die Balken innerhalb der Subgruppen zeigen den Median an. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Für die anderen in dieser Arbeit untersuchten tumorassoziierten Antigene ergaben sich dagegen weder für die Peptidkonzentration von 0,1 µmol/l noch von 10 µmol/l signifikante Unterschiede der Immunlevel im zeitlichen Verlauf vor, während und nach der Schwangerschaft.

Hiermit konnte zum ersten Mal die zeitliche Dynamik von Immunantworten gegen mehrere TAA im Verlauf von Schwangerschaft und Geburt gezeigt werden. Nach einem initialen Anstieg der Immunlevel während der Schwangerschaft kam es nach der Geburt zu einem Abfall, der auch nach dem Abstillen und damit der Rückkehr zu einer normalen hormonellen Situation anhielt. Da sich dieser Effekt nicht für die Immunantworten gegen das virale CMV-pp65-Peptid zeigte, scheint es sich dabei um ein spezifisches und kein generelles Immunphänomen zu handeln.

4 Diskussion

Die allogene HSZT stellt ein Standardtherapieverfahren zur Behandlung von hämatologischen und lymphatischen Neoplasien sowie von aplastischen Anämien und Immundefekten dar (COPELAN, 2006; PASSWEG *et al.*, 2014). Dabei unterlag ihre Bedeutung in den letzten Dekaden einem prinzipiellen Wandel: Stand anfangs noch der myeloablativ Effekt einer aggressiven Chemo- und/oder Strahlentherapie im Vordergrund, rückt mit der Entwicklung von intensitätsreduzierten und minimalen Konditionierungsverfahren zunehmend der immuntherapeutische Effekt in den Vordergrund (BARRETT, 2008; THOMAS *et al.*, 1957).

Entscheidende Grundlage bildet hierbei der GvL-Effekt, der durch im Rahmen der HSZT übertragene Lymphozyten des Spenders zustande kommt (GOLDMAN *et al.*, 1988; HOROWITZ *et al.*, 1990; SULLIVAN *et al.*, 1989; WEIDEN *et al.*, 1979). Diese richten sich gegen im Körper des Patienten verbliebene maligne Zellen und tragen damit entscheidend zum Erfolg der allogenen HSZT bei. Während lange Zeit vor allem Minorhistokompatibilitätsantigene wie zum Beispiel die Y-chromosomal codierten H-Y-Minorantigene als Zielstrukturen für diese lymphozytären Immunantworten galten (SIMPSON und ROOPENIAN, 1997), wurde in diesem Zusammenhang inzwischen auch die Bedeutung von TAA erkannt (MOLLIDREEM *et al.*, 2000).

Das Auftreten einer schweren GvHD erfordert den intensiven Einsatz von Immunsuppressiva, kompromittiert dadurch entscheidend die positiven GvL-Effekte nach der allogenen HSZT und ist gleichzeitig selbst mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (GARNETT *et al.*, 2013; INAMOTO *et al.*, 2011). Daher befassen sich derzeit verschiedene Forschungsansätze mit der Rekrutierung von TAA als Zielstrukturen für eine antineoplastische Immuntherapie ohne relevante GvHD-Reaktionen (KOTSIU und DAVIES, 2013; WARREN und DEEG, 2013). Gleichwohl bietet die derzeitige Studienlage kaum Erkenntnisse über die Herkunft und Frequenz dieser T-lymphozytären Immunantworten gegen TAA bei gesunden Blutspendern.

4.1 Immunantworten gegen tumorassoziierte Antigene bei gesunden Blutspendern

In dieser Arbeit wurden – nach bestem Kenntnisstand – erstmals systematisch die Frequenzen von CD8-positiven Gedächtnisimmunantworten gegen mehrere TAA in einem großen Kollektiv von gesunden Blutspendern untersucht. Bisherige Studien hatten sich mit gesunden Probanden nur als Kontrollgruppen von geringer Kohortengröße beschäftigt.

Bei den insgesamt 114 gesunden Blutspendern der Hauptgruppe 1 konnten gegen alle vier in dieser Arbeit untersuchten TAA als „positiv“ definierte Immunantworten im Sinne der relativen IFN- γ -mRNA-Expression nach Antigenstimulation nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte etwa ein Drittel aller Probanden gegen mindestens ein TAA in einer oder beiden gewählten Peptidkonzentrationen eine „positive“ Immunantwort. So ließen sich bei 14 % der Probanden „positive“ Immunantworten gegen MUC1 (in einer oder beiden Peptidkonzentrationen) zeigen. Das geht mit vorhergehenden Resultaten konform (SNIJDEWINT *et al.*, 1999). Gegen WT1 betrug dieser Wert 15 % und ist damit ebenfalls konsistent mit den Resultaten bisheriger Studien. Zwar hatten SCHEIBENBOGEN *et al.* bei 15 gesunden Probanden keine „positiven“ CD8-lymphozytären Immunantworten gegen WT1 nachweisen können, REZVANI *et al.* gelang dies aber in zwei nachfolgenden Studien bei 5 von 18 (28 %) beziehungsweise 3 von 12 (25 %) gesunden Spendern (REZVANI *et al.*, 2005; REZVANI *et al.*, 2003; SCHEIBENBOGEN *et al.*, 2002). Deutlich niedrigere Frequenzen ergaben sich für HER2/neu (5 %) und PRAME (7 %). Während sich die Resultate für HER2/neu im Einklang mit bisherigen Studien befinden, in denen keine oder nur wenige „positive“ Immunantworten gegen HER2/neu bei gesunden Probanden nachweisbar waren (INOKUMA *et al.*, 2007; NAGORSEN *et al.*, 2000; NAGORSEN *et al.*, 2003), fanden REZVANI *et al.* gegen PRAME „positive“ Immunantworten bei 30 % der gesunden Spender (REZVANI *et al.*, 2009). GRIFFIOEN *et al.* konnten dagegen nur bei einem von 14 gesunden Probanden „positive“ Immunantworten gegen das auch in dieser Studie untersuchte PRAME-Peptid nachweisen und ermittelten damit exakt dieselbe Frequenz von 7 % (GRIFFIOEN *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden somit

Frequenzen von CD8-positiven Gedächtnisimmunantworten nachgewiesen, die mit der bisherigen Studienlage vereinbar sind. Wie eingangs erwähnt, ist hierbei die in allen Fällen erheblich geringere Kohortengröße der zum Vergleich herangezogenen Studien zu berücksichtigen.

Da in dieser Arbeit CD8-positive Gedächtnisimmunantworten sowohl gegen die niedrigere als auch die höhere Konzentration der entsprechenden Peptide nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass bei gesunden Spendern funktionell niedrig- wie auch mittel- bis hochavide T-lymphozytäre Immunantworten gegen TAA existieren. CD8-positive T-Lymphozyten von niedriger funktioneller Avidität werden nämlich erst bei hohen Konzentrationen eines angebotenen Peptides aktiviert und weisen erst dann eine entsprechende immunologische Antwort auf. Vice versa reagieren funktionell hochavide T-Lymphozyten bereits auf niedrige Peptidkonzentrationen und werden bei steigenden Konzentrationen dagegen tendenziell inhibiert (ALEXANDER-MILLER *et al.*, 1996; BOS *et al.*, 2012; VIGANO *et al.*, 2012). Diese Unterschiede in der funktionellen Avidität beruhen vor allem auf unterschiedlicher Ausstattung der T-Lymphozyten mit T-Zell-Rezeptoren (TCR), daneben aber auch auf kostimulatorischen oder inhibitorischen Signalen (LABRECQUE *et al.*, 2001; VIGANO *et al.*, 2012). Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass mit niedrigen Peptidkonzentrationen eher funktionell hoch- und mit hohen Peptidkonzentrationen eher funktionell niedrigavide T-lymphozytäre Immunantworten detektiert werden können. Damit vereinbar fanden sich in dieser Arbeit nahezu keine Probanden mit „doppelt-positiven“ Immunantworten gegen beide Peptidkonzentrationen eines TAA. Gleichzeitig bestand auch kein signifikanter Unterschied in der Frequenz der positiven Immunantworten im Vergleich der beiden Peptidkonzentrationen. Hierbei könnte eine gegenseitige Beeinflussung von funktionell niedrig- und hochaviden T-Lymphozyten eine Rolle spielen. Das genaue Wechselspiel in der Regulation der Avidität von T-Lymphozyten ist zwar noch nicht verstanden (GRAY *et al.*, 2003), doch es gibt erste Hinweise darauf, dass funktionell niedrig- und hochavide T-Lymphozyten jeweils inhibierend auf den Gegenpart einwirken können (CHUNG *et al.*, 2014).

Eine in dieser Arbeit nicht geklärte Frage besteht darin, ob die nachgewiesenen „positiven“ Immunantworten auf einer gestiegenen Zahl von CD8-positiven T-Lymphozyten bei gleicher funktioneller Avidität beruhen oder vice versa auf einer gestiegenen funktionellen Avidität der gleich gebliebenen Zahl von T-Lymphozyten. In einer Versuchsanordnung zur Klärung dieser Frage wäre dabei auch auf den Unterschied zwischen der generellen und der funktionellen Avidität zu achten: Während die generelle Avidität nur darüber Aufschluss gibt, wie stark die Affinität eines TCR zu einem definierten, per MHC präsentierten Peptid ist, lässt die funktionelle Avidität auf die tatsächlichen Verhältnisse *in vivo* schließen. So könnte zum Beispiel ein Klon generell hochavider T-Lymphozyten bedingt durch inhibitorische Signale nur eine eingeschränkte funktionelle Avidität ausüben (BOS *et al.*, 2012; VIGANO *et al.*, 2012).

4.2 Geschlechterspezifischer Unterschied der Immunantworten gegen tumorassoziierte Antigene

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals in einer großen Studienpopulation ein geschlechterspezifischer Unterschied in TAA-spezifischen Immunantworten aufgezeigt. Dabei konnte die ursprüngliche Arbeitshypothese, nach der Frauen mit einer positiven Geburtenanamnese häufiger Immunantworten gegen TAA aufweisen als Frauen ohne Schwangerschaften oder als Männer, nicht bestätigt werden. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass Männer tendenziell stärkere CD8-positive Gedächtnisimmunantworten gegen die untersuchten TAA aufwiesen als aktuell nicht schwangere Frauen. Dieser Effekt ließ sich sowohl im Sinne von höheren absoluten Werten der relativen IFN- γ -mRNA-Expression als auch im Sinne von höheren Frequenzen der als „positiv“ definierten Immunantworten zeigen. Statistische Signifikanz erreichten diese Unterschiede bei Immunantworten gegen die höhere Peptidkonzentration von HER2/neu und WT1, was – wie unter 4.1 beschrieben – als Immunreaktion niedriger funktioneller Avidität zu interpretieren ist (ALEXANDER-MILLER *et al.*, 1996).

Erhöhte Werte von „positiven“ Immunantworten gegen TAA basieren in aller Regel auf einer Stimulation durch körpereigenes Gewebe, welches das entsprechende TAA in einem hohen Maße exprimiert. So wurden bei Patienten sowohl mit hämatologischen Neoplasien wie lymphatischen oder myeloischen Leukämien als auch mit soliden Tumoren erhöhte Frequenzen von T-lymphozytären Immunantworten gegen WT1 nachgewiesen (GILLMORE *et al.*, 2006; REZVANI *et al.*, 2005). Da für die entsprechenden Malignome gleichzeitig eine Überexpression von WT1 bekannt ist, wird dieser Effekt als Reaktivität gegen das in den malignen Zellen überexprimierte TAA verstanden (INOUE *et al.*, 1997; REZVANI *et al.*, 2008). Bei Frauen wurde auch die Schwangerschaft als Ursprung erhöhter Frequenzen von Immunantworten gegen TAA identifiziert. Hier werden die entsprechenden TAA wie zum Beispiel HER2/neu vor allem in der Plazenta überexprimiert und gelangen dann in der Folge in den maternalen Blutkreislauf (MEDEN *et al.*, 1997). So konnte bei postpartalen Frauen eine höhere Proliferation von T-Lymphozyten nach Stimulation mit MUC1 als bei Männern und als bei Frauen ohne Kinder nachgewiesen werden.

Derselbe Effekt ließ sich auch im intraindividuellen Vergleich bei Frauen zeigen, die zunächst vor und dann während des ersten Trimenons ihrer ersten Schwangerschaft untersucht wurden (AGRAWAL *et al.*, 1995).

Im Umkehrschluss ist der erhöhte Nachweis von CD8-positiven Gedächtnisimmunantworten gegen TAA bei Männern wohl als Autoreaktivität gegen kontinuierlich exprimierte TAA zu interpretieren. Eine mögliche Quelle lässt sich im Hodengewebe finden, das bei gesunden Männern bestimmte Keimbahnantigene (CTA) nahezu exklusiv exprimiert (JUNGBLUTH *et al.*, 2007). Unter pathologischen Umständen können diese CTA dagegen auch in malignen Zellen anderer Gewebetypen nachgewiesen werden, wobei auch in dieser Situation für viele CTA eine stärkere Expression bei Männern als bei Frauen aufgezeigt wurde (CHEN *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2012).

Neben diesen klassischen CTA werden auch verschiedene TAA im Hodengewebe exprimiert. So ist für alle vier in der vorliegenden Arbeit untersuchten TAA eine testikuläre Expression nachweisbar (GENDLER, 2001; IKEDA *et al.*, 1997; OHMINAMI *et al.*, 2000; PRESS *et al.*, 1990) und PRAME wird darüber hinaus teilweise sogar zu der eng umschriebenen Gruppe der CTA gerechnet (WADELIN *et al.*, 2010). Dieses Expressionsmuster der untersuchten TAA könnte im Zusammenspiel mit dem im Vergleich zu Frauen fehlenden immunsuppressiven hormonellen Einfluss im Hodengewebe die Ursache für die aufgezeigten stärkeren Immunantworten gegen TAA bei Männern bilden.

4.3 Immunantworten gegen tumorassoziierte Antigene im Verlauf von Schwangerschaft und Stillzeit

Die Überexpression von TAA in den malignen Zellen hämatologischer und solider Neoplasien führt bei den betroffenen Patienten zu einer erhöhten Frequenz von Autoimmunantworten gegen diese körpereigenen Antigene (siehe 4.2). Basierend auf diesem Erkenntnis wurde bei der Planung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie die Hypothese aufgestellt, dass die Schwangerschaft einen Einfluss auf die Generierung von TAA-spezifischen Immunantworten haben könnte. Hintergrund dieser Überlegung war die bekannte Überexpression verschiedener TAA im fetalen wie auch plazentaren Gewebe, die im Rahmen des feto-maternalen Transfers in den Blutkreislauf der Mutter übertreten und dort zur Entwicklung von Immunantworten gegen die entsprechenden TAA führen könnten (FEINGOLD *et al.*, 1998; IKEDA *et al.*, 1997; JESCHKE *et al.*, 2002; MEDEN *et al.*, 1997; MÜHLHAUSER *et al.*, 1993). Daher war einerseits eine erhöhte Frequenz TAA-spezifischer CD8-positiver Gedächtnisimmunantworten bei Frauen mit Schwangerschaft im Vergleich zu Frauen ohne Schwangerschaft zu erwarten und andererseits eine „Konversion“ dieser Immunantworten bei longitudinaler Betrachtung von Frauen während ihrer Schwangerschaft.

Interessanterweise waren bei den in dieser Studie untersuchten Frauen mit stattgehabten Schwangerschaften aus der Hauptgruppe 1 keine höheren Frequenzen der positiven Immunantworten im Vergleich zu den Nulligravidae nachzuweisen, so dass eine stattgehabte Schwangerschaft regelhaft keine dauerhafte Immunität gegen TAA zu bewirken scheint. Diese Resultate konnten in der longitudinal untersuchten Hauptgruppe 2 bestätigt werden: Frauen mit bis dato negativer Schwangerschaftsanamnese zeigten intraindividuell über die Zeit der Schwangerschaft und Geburt bis zum Abstillen einen kontinuierlichen Abfall der TAA-spezifischen Immunlevel. Dieser Abfall über die Zeit wies für HER2/neu in der höheren und für WT1 in beiden Peptidkonzentrationen eine statistische Signifikanz auf. Unter Berücksichtigung der Nulligravidae aus der Hauptgruppe 1 als Repräsentanten des Status „vor“ einer Schwangerschaft ließ

sich nur zu Beginn der Schwangerschaft eine Tendenz zu einem Anstieg der TAA-spezifischen Immunlevel nachweisen.

Dieser initiale Anstieg der CD8-positiven Gedächtnisimmunantworten zu Beginn der Schwangerschaft ist höchstwahrscheinlich auf das wachsende fetale wie auch plazentare Gewebe zurückzuführen, das verschiedene TAA in hohem Maße exprimiert (JUNGBLUTH *et al.*, 2007). Der anschließende Abfall der TAA-spezifischen Immunantworten im Verlauf von Schwangerschaft, Geburt und Stillzeit ist möglicherweise durch den über die Zeit zwar abfallenden, dennoch aber kontinuierlich vorhandenen immunsuppressiven Einfluss der weiblichen Geschlechtshormone bedingt (JANSSON und HOLMDAHL, 1998; LAHITA, 1992). Hierbei ergab die Bestimmung der Hormonspiegel für β -HCG, Estradiol, Progesteron und Prolaktin zu jedem Entnahmezeitpunkt Werte, die in dem für eine physiologische Schwangerschaft und Stillzeit zu erwartenden Bereich lagen (WILSON und PARSONS, 1996). Daneben dürfte auch der Verlust der TAA-exprimierenden Zielzellen eine Erklärung für den Abfall der Immunantworten im Lauf der Zeit bieten: So ist zum Beispiel für die plazentare Expression von MUC1 eine Herabregulierung im Laufe der Schwangerschaft belegt (REDZOVIC *et al.*, 2013). Spätestens durch die Geburt kommt es dann zu einem vollständigen Verlust der TAA-überexprimierenden Zielzellen der fetoplazentaren Einheit. Interessanterweise ließ sich dieser Abfall der CD8-positiven Immunantworten im longitudinalen Verlauf nicht für das als Positivkontrolle eingesetzte CMV-Peptid nachweisen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Verlauf nicht auf einer generellen Veränderung des maternalen Immunsystems beruht, sondern spezifisch für die untersuchten TAA ist. Diese Vermutung lässt sich auch dadurch untermauern, dass die gemessenen Blutbilder im Laufe von Schwangerschaft, Geburt und Stillzeit keinen Abfall der absoluten Lymphozytenzahl aufwiesen. Vielmehr lag die absolute Zellzahl während der Schwangerschaft am niedrigsten und stieg dann nach der Geburt geringfügig an, wobei sie sogar höhere Werte als eine zum Vergleich herangezogene Referenzgruppe erreichte. Diese Entwicklung der absoluten Lymphozytenzahl ist für eine physiologische Schwangerschaft und Stillzeit charakteristisch (VALDIMARSSON *et al.*, 1983).

4.4 Implikationen der Resultate für die Immuntherapie

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass etwa ein Drittel eines großen Probandenkollektivs von gesunden Blutspendern über CD8-positive Gedächtnisimmunantworten gegen mindestens ein klinisch relevantes TAA verfügt. Bei Einzelbetrachtung der vier untersuchten TAA HER2/neu, MUC1, PRAME und WT1 schwankt diese Frequenz zwischen fünf und fünfzehn Prozent. Diese Resultate untermauern die Annahme, dass autoreaktive T-Lymphozyten im Körper keine Ausnahme darstellen (POLETAEV *et al.*, 2012). Dabei stellt sich die Frage, wie diese Zellen dem Selektionsprozess im Thymus entkommen konnten und wie in der Peripherie eine Autoreaktivität dieser Zellen begrenzt wird. Es kann davon ausgegangen werden, dass hierbei Mechanismen der peripheren Toleranz – allen voran regulatorische T-Lymphozyten – einen inhibitorischen Einfluss ausüben (VERNERIS, 2013).

Die Herkunft der aufgezeigten autoreaktiven Immunantworten bleibt zu klären. Die hohe Expression von TAA im fetalen und plazentaren Gewebe hat eine Entwicklung derartiger Immunantworten bei Frauen während ihrer Schwangerschaft zur Folge, die nach der Geburt und Stillzeit aber nicht erhalten bleiben. Hierbei scheinen der immunsuppressive hormonelle Einfluss und der Verlust der Zielantigene der fetoplazentaren Einheit im Rahmen der Geburt und Nachgeburt eine entscheidende Rolle zu spielen. Da außerdem gezeigt werden konnte, dass Männer stärkere Immunantworten gegen die untersuchten TAA aufweisen, ist von anderen Auslösern dieser Immunität auszugehen. Möglicherweise bilden sich die entsprechenden T-Lymphozyten schon in der Kindheit und persistieren nur unter bestimmten Umständen bis in das Erwachsenenalter.

Die nachgewiesenen Immunantworten werden sowohl von T-Lymphozyten niedriger als auch hoher funktioneller Avidität vermittelt, wobei diese interessanterweise kaum synchron vorhanden zu sein scheinen. Vor allem für die niedrigaviden T-Lymphozyten dürften für eine Überwindung der peripheren Toleranz mit konsekutiver Expansion ein proinflammatorisches Immunmilieu und ein möglichst hohes Expressionsmaß der Zielantigene notwendig sein

(MOLLIDREM *et al.*, 2002; MORRIS *et al.*, 2003). So konnten WEBER *et al.* durch die repetitive Stimulation von isolierten CD8⁺ T-Lymphozyten bei neun von zehn gesunden Blutspendern WT1-spezifische Immunantworten induzieren (WEBER *et al.*, 2009). Ähnliche Resultate ließen sich zum Beispiel auch beim Einsatz von PRAME finden (QUINTARELLI *et al.*, 2008). Tierversuche mit Vakzinierungsstrategien zeigten weiterhin, dass diese T-Lymphozyten mit Reaktivität zum Beispiel gegen WT1 expandieren und Tumorzellen zerstören können (KOHRT *et al.*, 2011). Daneben ist bekannt, dass transferierte WT1-spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten bei Patienten nach einer allogenen HSZT eine antileukämische Aktivität vermitteln und in den Empfängern persistieren können (CHAPUIS *et al.*, 2013).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate könnten zur Optimierung der Spenderselektion für eine allogene HSZT beitragen: Interessant wären vor allem potenzielle Spender, bei denen TAA-spezifische CD8-positiv Gedächtnisimmunantworten nachgewiesen werden konnten. Durch das einzigartige Immunmilieu nach einer allogenen HSZT, das durch die Präsenz von proinflammatorischen Zytokinen und eine Lymphodepletion geprägt ist, könnte es zu einer homöostatischen Expansion dieser T-Lymphozyten kommen (DUMMER *et al.*, 2002; REZVANI und BARRETT, 2008). Da die ermittelten Resultate darauf schließen lassen, dass die Gegenwart der Zielantigene eine entscheidende Bedeutung für die Ausbildung derartiger Immunantworten besitzt, müssten entsprechende Erhaltungs- und Optimierungsstrategien entwickelt werden. Hierbei könnte einerseits der Verlust von Zielantigenen im Empfängerorganismus zum Beispiel durch den Einsatz von Tumorvakzinierungen überwunden werden (BUONAGURO *et al.*, 2011; ESTCOURT *et al.*, 2002; SMYTH *et al.*, 2012). Andererseits könnte das Immunmilieu durch die Depletion von regulatorischen T-Lymphozyten oder den Einsatz von Immunmodulatoren wie Lenalidomid so beeinflusst werden, dass insbesondere auch die TAA-spezifischen T-Lymphozyten von niedriger Avidität rekrutiert werden könnten (ALSINA *et al.*, 2014; HOBEIKA *et al.*, 2011; MIELKE *et al.*, 2005; NISHIKAWA und SAKAGUCHI, 2014). Diese Kombination aus optimierter Spenderselektion und Maßnahmen zur Rekrutierung von präexistenten TAA-

spezifischen Immunantworten könnte zur Beherrschung der zugrundeliegenden hämatologischen Neoplasie beitragen und damit einen positiven Einfluss auf das Überleben von Patienten nach einer allogenen HSZT haben.

Daneben könnten die nachgewiesenen TAA-spezifischen T-Lymphozyten aber auch im Rahmen einer autologen HSZT rekrutiert werden. Wurde nämlich noch bis vor einiger Zeit davon ausgegangen, dass der autologe Charakter des Therapieverfahrens jeglichen immuntherapeutischen Effekt ausschließt, zeigen neuere Studien, dass GvL-Effekte auch im Rahmen der Immunrestitution nach einer autologen HSZT vermittelt werden können (PORRATA, 2016; SUZUKI *et al.*, 2013). Dabei kommt es nach der therapieinduzierten Lymphodepletion zu einer anschließenden homöostatischen Expansion von T-Lymphozyten, die unter anderem durch Wechselwirkungen mit Autoantigenen ihr antigenspezifisches Repertoire verändern und dadurch gegen TAA gerichtete GvL-Effekte vermitteln können (DUMMER *et al.*, 2002; WRZESINSKI und RESTIFO, 2005). Dieser Effekt wird sowohl durch den durch die Hochdosischemotherapie geschaffenen Raum im Knochenmark als auch durch die begleitende Depletion von regulatorischen T-Lymphozyten unterstützt (BRODY *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2013). Somit könnte durch entsprechende Vakzinierungsstrategien das Potenzial der Hochdosischemotherapie mit der anschließenden autologen HSZT um einen immuntherapeutischen Effekt ergänzt und so die Resultate des Therapieverfahrens verbessert werden.

4.5 Limitationen der Studie und Methodenkritik

Trotz ihrer großen Probandenzahl und der Vielzahl an eingesetzten Methoden besitzt diese Arbeit Limitationen, die eine direkte Übertragung der erhaltenen Resultate auf die klinische Praxis einschränken.

Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Frage nach der Funktionalität der nachgewiesenen TAA-spezifischen Immunantworten. So konnte mittels RT-qPCR und ELISPOT bei den als „positiv“ gewerteten Immunantworten zwar nachgewiesen werden, dass die entsprechenden T-Lymphozyten sowohl mRNA als auch Protein des immunstimulatorischen IFN- γ produzieren, der entsprechende Einfluss auf ihre Zielzellen ließ sich aber nicht nachweisen. Die Anwendung der Degranulationsfärbung scheiterte an der zu geringen Anzahl der primär vorhandenen TAA-spezifischen T-Lymphozyten. Hierbei wäre der Einsatz einer TAA-spezifischen Expansionstechnik von Nutzen: In zusätzlichen Versuchen, die in derselben Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, gelang der Nachweis einer Degranulation von WT1-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten nach einer vorhergehenden Expansion der PBMCs unter dem Einsatz von Stimulations- und Restimulationstechniken mit CD3-/CD28-Beads über 21 Tage (LUTZ *et al.*, 2015). Unter Berücksichtigung dieser Resultate kann davon ausgegangen werden, dass die ermittelten Immunantworten auch funktionelle Aktivität aufweisen: Die Degranulationsfärbung dient nämlich als Surrogat der Ausschüttung von lytischen Substanzen mit konsekutiver Zerstörung der das Zielantigen exprimierenden Zellen (BETTS *et al.*, 2003; MITTENDORF *et al.*, 2005; PETERS *et al.*, 1991).

Aufgrund des in dieser Arbeit angewandten Protokolls zur Restimulation antigenspezifischer T-Lymphozyten, das nur eine einmalige Peptidstimulation über lediglich drei Stunden umfasste, wurde davon ausgegangen, dass die nachgewiesenen Immunantworten von Gedächtnis-T-Lymphozyten vermittelt wurden (REZVANI *et al.*, 2003). Gleichwohl wurde dafür kein immunphänotypischer Nachweis erbracht. So könnte durch die durchflusszytometrische Detektion von spezifischen Oberflächenmarkern wie CD45RA, CD45RO, CD27, CD28 oder CCR7 eine Differenzierung zwischen

naiven und Gedächtnis-T-Lymphozyten erreicht werden (HAMANN *et al.*, 1997; REZVANI *et al.*, 2003; WILLS *et al.*, 2002).

Verschiedene Versuche, darunter vor allem die durchflusszytometrischen und ELISPOT-basierten Verfahren, konnten in der Gruppe der longitudinal untersuchten erstschwangeren Frauen aufgrund einer zu geringen Zahl von CD8⁺ T-Lymphozyten nicht durchgeführt werden. Da die Techniken der Dichtegradientenzentrifugation und CD8-positiven Isolation in dieser Arbeitsgruppe etabliert und optimiert sind, ist nicht davon auszugehen, dass die Zellausbeute entscheidend erhöht werden kann. So bestünde die einzige Möglichkeit in der Entnahme einer größeren Menge von Vollblut. Diese Maßnahme ist allerdings unter den Bedingungen von Schwangerschaft und Stillzeit unter ethischen Gesichtspunkten als äußerst kritisch anzusehen.

5 Zusammenfassung

Der Erfolg der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) als Immuntherapie basiert neben den Minorantigendifferenzen zwischen Spender und Empfänger entscheidend auf einer spendervermittelten Immunität gegen tumorassoziierte Antigene (TAA), über deren Herkunft und Frequenz bei gesunden Blutspendern die derzeitige Studienlage kaum Informationen bietet. Da für viele klinisch relevante TAA eine Expression im fetalen und plazentaren Gewebe bekannt ist, wurde in dieser Arbeit die Schwangerschaft als möglicher Auslöser dieser T-lymphozytären Gedächtnisimmunantworten im Sinne eines Tumor- und Transplantationsmodells untersucht.

Hierfür wurden insgesamt 114 gesunde Blutspender in drei Subgruppen aus 38 Frauen mit negativer Schwangerschaftsanamnese, 38 Frauen mit positiver Geburtenanamnese und 38 Männern in einer Querschnittsstudie betrachtet, daneben wurden 44 Frauen longitudinal während und nach ihrer ersten Schwangerschaft untersucht. Dabei wurden die CD8⁺ T-Lymphozyten der Probanden isoliert, mit Peptiden der vier klinisch relevanten TAA HER2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*), MUC1 (*Mucin 1*), PRAME (*preferentially expressed antigen of melanoma*) und WT1 (*Wilms tumor protein 1*) stimuliert und die Produktion von IFN- γ -mRNA mittels RT-qPCR gemessen. Daneben wurden zum Vergleich durchflusszytometrische und ELISPOT-basierte Verfahren durchgeführt.

Bei den gesunden Blutspendern konnten CD8⁺ Gedächtnisimmunantworten von niedriger und/oder hoher funktioneller Avidität gegen alle vier untersuchten TAA gemessen werden: Die Frequenz der dabei als „positiv“ definierten Immunantworten betrug bei HER2/neu 5 %, bei MUC1 14 %, bei PRAME 7 % und bei WT1 15 %. Männer wiesen insgesamt höhere absolute Level der Immunantworten gegen die untersuchten TAA auf, was auf eine testikuläre Expression dieser Antigene zurückzuführen sein könnte. In der Longitudinalanalyse bei den erstschwangeren Frauen ließen sich die stärksten Immunantworten zu Beginn der Schwangerschaft nachweisen, so dass es hier zu einem „Boost“ präexistenter TAA-spezifischer Autoimmunität zu kommen

scheint. Durch das immunsuppressive hormonelle Milieu im Verlauf der Schwangerschaft und den Verlust der Zielantigene der fetoplazentaren Einheit durch die Geburt und Nachgeburt scheint diese Immunität aber nicht zu persistieren. Dadurch erklärt sich auch die Beobachtung, dass Frauen mit einer positiven Geburtenanamnese keine stärkeren Immunantworten gegen die untersuchten TAA aufwiesen als Frauen mit einer negativen Schwangerschaftsanamnese. Die Schwangerschaft hinterlässt diesbezüglich also ohne die Anwesenheit der vermittelnden Antigene keinen regelhaft bleibenden Effekt.

Diese Resultate decken sich mit Beobachtungen aus der Tumorummuntherapie, bei denen Vakzinierungen gegen TAA zwar eine kurzfristige Immunität generieren konnten, die aber nicht persistierte. Im Rahmen der HSZT kann eine solche TAA-spezifische Immunität vom Spender auf den Empfänger transferiert werden und vermag dann aufgrund des proinflammatorischen Immunmilieus sehr wohl zu expandieren und in einem begrenzten Ausmaß auch zu persistieren.

Dementsprechend ergeben sich aus den in dieser Arbeit gewonnenen Resultaten relevante Implikationen für die allogene und – in geringerem Ausmaß – die autologe HSZT, daneben aber auch für innovative Tumorthérapien wie die Immuncheckpoint-Blockade, da die Persistenz von tumorspezifischer Immunität letztendlich hochrelevant für eine langfristige Tumorkontrolle und damit für ein tumorfreies Überleben ist. Das vorliegende Modell trägt somit zum Verständnis der komplexen immunregulatorischen Vorgänge bei der Tumorkontrolle bei. Ob die hierbei aufgezeigten Immunantworten generell zu einer verbesserten TAA-spezifischen Immunrekonstitution und konsekutiv zu einem besseren klinischen Ergebnis beitragen, bleibt offen und wird in klinischen Studien geklärt werden müssen.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Agrawal, B., Reddish, M. A., Krantz, M. J. and Longenecker, B. M. (1995). "Does pregnancy immunize against breast cancer?" Cancer Res **55**(11): 2257-61.
- Alexander-Miller, M. A., Leggatt, G. R. and Berzofsky, J. A. (1996). "Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4102-7.
- Alsina, M., Becker, P. S., Zhong, X., Adams, A., Hari, P., Rowley, S., Stadmauer, E. A., Vesole, D. H., Logan, B., Weisdorf, D., Qazilbash, M., Popplewell, L. L., McClune, B., Bensinger, W., Riches, M., Giral, S. A. and Pasquini, M. C. (2014). "Lenalidomide maintenance for high-risk multiple myeloma after allogeneic hematopoietic cell transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **20**(8): 1183-9.
- Ansell, S. M. (2015). "Targeting immune checkpoints in lymphoma." Curr Opin Hematol **22**(4): 337-42.
- Appelbaum, F. R. (2007). "Hematopoietic-cell transplantation at 50." N Engl J Med **357**(15): 1472-5.
- Appelbaum, F. R., Herzig, G. P., Ziegler, J. L., Graw, R. G., Levine, A. S. and Deisseroth, A. B. (1978). "Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma." Blood **52**(1): 85-95.
- Bakker, A. B., Schreurs, M. W., de Boer, A. J., Kawakami, Y., Rosenberg, S. A., Adema, G. J. and Figdor, C. G. (1994). "Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes." J Exp Med **179**(3): 1005-9.
- Barnes, D. W., Corp, M. J., Loutit, J. F. and Neal, F. E. (1956). "Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication." Br Med J **2**(4993): 626-7.
- Barnes, D. W. and Loutit, J. F. (1957). "Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II." Br J Haematol **3**(3): 241-52.
- Barrett, A. J. (1995). "Strategies to enhance the graft-versus-malignancy effect in allogeneic transplants." Ann N Y Acad Sci **770**: 203-12.
- Barrett, A. J. (2008). "Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect." Br J Haematol **142**(6): 877-88.

- Batard, P., Peterson, D. A., Devevre, E., Guillaume, P., Cerottini, J. C., Rimoldi, D., Speiser, D. E., Winther, L. and Romero, P. (2006). "Dextramers: new generation of fluorescent MHC class I/peptide multimers for visualization of antigen-specific CD8+ T cells." J Immunol Methods **310**(1-2): 136-48.
- Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M. and Koup, R. A. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." J Immunol Methods **281**(1-2): 65-78.
- Billingham, R. E. (1966). "The biology of graft-versus-host reactions." Harvey Lect **62**: 21-78.
- Bos, R., Marquardt, K. L., Cheung, J. and Sherman, L. A. (2012). "Functional differences between low- and high-affinity CD8(+) T cells in the tumor environment." Oncoimmunology **1**(8): 1239-1247.
- Bosch, G. J., Joosten, A. M., Kessler, J. H., Melief, C. J. and Leeksa, O. C. (1996). "Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide." Blood **88**(9): 3522-7.
- Böyum, A. (1968). "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g." Scand J Clin Lab Invest Suppl **97**: 77-89.
- Brody, J. D., Goldstein, M. J., Czerwinski, D. K. and Levy, R. (2009). "Immunotransplantation preferentially expands T-effector cells over T-regulatory cells and cures large lymphoma tumors." Blood **113**(1): 85-94.
- 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**(12): 4309-17.
- Buonaguro, L., Petrizzo, A., Tornesello, M. L. and Buonaguro, F. M. (2011). "Translating tumor antigens into cancer vaccines." Clin Vaccine Immunol **18**(1): 23-34.
- Burgstaler, E. A., Winters, J. L. and Pineda, A. A. (2004). "Paired comparison of Gambro Trima Accel versus Baxter Amicus single-needle plateletpheresis." Transfusion **44**(11): 1612-20.
- Call, K. M., Glaser, T., Ito, C. Y., Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Rose, E. A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W. H. and et al. (1990). "Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus." Cell **60**(3): 509-20.

- Chapuis, A. G., Ragnarsson, G. B., Nguyen, H. N., Chaney, C. N., Pufnock, J. S., Schmitt, T. M., Duerkopp, N., Roberts, I. M., Pogosov, G. L., Ho, W. Y., Ochsenreither, S., Wolf, M., Bar, M., Radich, J. P., Yee, C. and Greenberg, P. D. (2013). "Transferred WT1-reactive CD8+ T cells can mediate antileukemic activity and persist in post-transplant patients." Sci Transl Med **5**(174): 174ra27.
- Chen, X.-F., Wang, M., Yue, D.-L., Liu, J.-Y., Huang, L., Li, F., Zhao, S., Qi, Y., Hu, W., Li, X.-N. and Zhang, Y. (2013). "Expression of cancer-testis antigen in patients with non-small cell lung cancer and its clinical relevance." J Immunother Cancer **1**(Suppl 1): P246.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Chung, B., Stuge, T. B., Murad, J. P., Beilhack, G., Andersen, E., Armstrong, B. D., Weber, J. S. and Lee, P. P. (2014). "Antigen-Specific Inhibition of High-Avidity T Cell Target Lysis by Low-Avidity T Cells via Trogocytosis." Cell Rep **8**(3): 871-82.
- Cook, A. M., Lesterhuis, W. J., Nowak, A. K. and Lake, R. A. (2016). "Chemotherapy and immunotherapy: mapping the road ahead." Curr Opin Immunol **39**: 23-9.
- Copelan, E. A. (2006). "Hematopoietic stem-cell transplantation." N Engl J Med **354**(17): 1813-26.
- Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. and Boon, T. (2014). "Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy." Nat Rev Cancer **14**(2): 135-46.
- Couriel, D. R., Saliba, R., Escalon, M. P., Hsu, Y., Ghosh, S., Ippoliti, C., Hicks, K., Donato, M., Giralt, S., Khouri, I. F., Hosing, C., de Lima, M. J., Andersson, B., Neumann, J. and Champlin, R. (2005). "Sirolimus in combination with tacrolimus and corticosteroids for the treatment of resistant chronic graft-versus-host disease." Br J Haematol **130**(3): 409-17.
- 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**(1-2): 109-21.
- D'Agostino, R. B. (1986). "Tests for normal distribution." *In*: D'Agostino, R. B. and Stephens, M. A. "Goodness-of-fit techniques." Marcel Dekker, New York.

- Dausset, J. and Brecy, H. (1957). "Identical nature of the leucocyte antigens detectable in monozygotic twins by means of immune iso-leucoagglutinins." Nature **180**(4599): 1430.
- Dawson, C. W., Port, R. J. and Young, L. S. (2012). "The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC)." Semin Cancer Biol **22**(2): 144-53.
- De Smet, C., Lurquin, C., De Plaen, E., Brasseur, F., Zarour, H., De Backer, O., Coulie, P. G. and Boon, T. (1997). "Genes coding for melanoma antigens recognised by cytolytic T lymphocytes." Eye (Lond) **11** (Pt 2): 243-8.
- De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V. and Boon, T. (1999). "DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter." Mol Cell Biol **19**(11): 7327-35.
- Deeg, H. J. (2007). "How I treat refractory acute GVHD." Blood **109**(10): 4119-26.
- Dietz, A. B., Bulur, P. A., Emery, R. L., Winters, J. L., Epps, D. E., Zubair, A. C. and Vuk-Pavlovic, S. (2006). "A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers." Transfusion **46**(12): 2083-9.
- Dummer, W., Niethammer, A. G., Baccala, R., Lawson, B. R., Wagner, N., Reisfeld, R. A. and Theofilopoulos, A. N. (2002). "T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity." J Clin Invest **110**(2): 185-92.
- Estcourt, M. J., Ramsay, A. J., Brooks, A., Thomson, S. A., Medveckzy, C. J. and Ramshaw, I. A. (2002). "Prime-boost immunization generates a high frequency, high-avidity CD8(+) cytotoxic T lymphocyte population." Int Immunol **14**(1): 31-7.
- Fefer, A., Sullivan, K. M., Weiden, P., Buckner, C. D., Schoch, G., Storb, R. and Thomas, E. D. (1987). "Graft versus leukemia effect in man: the relapse rate of acute leukemia is lower after allogeneic than after syngeneic marrow transplantation." Prog Clin Biol Res **244**: 401-8.
- Feingold, M., Zilberstein, M., Srivastava, R. K., Seibel, M. M., Bar-Ami, S. and Hambartsoumian, E. (1998). "Expression of Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in term human trophoblast: regulation by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate." J Clin Endocrinol Metab **83**(7): 2503-8.
- Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P. and Holler, E. (2009). "Graft-versus-host disease." Lancet **373**(9674): 1550-61.
- Filipovich, A. H., Weisdorf, D., Pavletic, S., Socie, G., Wingard, J. R., Lee, S. J., Martin, P., Chien, J., Przepiorka, D., Couriel, D., Cowen, E. W., Dinndorf,

- P., Farrell, A., Hartzman, R., Henslee-Downey, J., Jacobsohn, D., McDonald, G., Mittleman, B., Rizzo, J. D., Robinson, M., Schubert, M., Schultz, K., Shulman, H., Turner, M., Vogelsang, G. and Flowers, M. E. (2005). "National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report." Biol Blood Marrow Transplant **11**(12): 945-56.
- 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**(6): 2109-17.
- Flowers, M. E., Apperley, J. F., van Besien, K., Elmaagacli, A., Grigg, A., Reddy, V., Bacigalupo, A., Kolb, H. J., Bouzas, L., Michallet, M., Prince, H. M., Knobler, R., Parenti, D., Gallo, J. and Greinix, H. T. (2008). "A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease." Blood **112**(7): 2667-74.
- Flowers, M. E., Inamoto, Y., Carpenter, P. A., Lee, S. J., Kiem, H. P., Petersdorf, E. W., Pereira, S. E., Nash, R. A., Mielcarek, M., Fero, M. L., Warren, E. H., Sanders, J. E., Storb, R. F., Appelbaum, F. R., Storer, B. E. and Martin, P. J. (2011). "Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria." Blood **117**(11): 3214-9.
- Garnett, C., Apperley, J. F. and Pavlu, J. (2013). "Treatment and management of graft-host disease: improving response and survival." Ther Adv Hematol **4**(6): 366-378.
- Gendler, S. J. (2001). "MUC1, the renaissance molecule." J Mammary Gland Biol Neoplasia **6**(3): 339-53.
- Gillmore, R., Xue, S. A., Holler, A., Kaeda, J., Hadjiminias, D., Healy, V., Dina, R., Parry, S. C., Bellantuono, I., Ghani, Y., Coombes, R. C., Waxman, J. and Stauss, H. J. (2006). "Detection of Wilms' tumor antigen--specific CTL in tumor-draining lymph nodes of patients with early breast cancer." Clin Cancer Res **12**(1): 34-42.
- Giralt, S., Estey, E., Albitar, M., van Besien, K., Rondon, G., Anderlini, P., O'Brien, S., Khouri, I., Gajewski, J., Mehra, R., Claxton, D., Andersson, B., Beran, M., Przepiorka, D., Koller, C., Kornblau, S., Korbling, M., Keating, M., Kantarjian, H. and Champlin, R. (1997). "Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy." Blood **89**(12): 4531-6.

- Gluckman, E., Broxmeyer, H. A., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P. and et al. (1989). "Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling." N Engl J Med **321**(17): 1174-8.
- Glucksberg, H., Storb, R., Fefer, A., Buckner, C. D., Neiman, P. E., Clift, R. A., Lerner, K. G. and Thomas, E. D. (1974). "Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors." Transplantation **18**(4): 295-304.
- Goldman, J. M., Gale, R. P., Horowitz, M. M., Biggs, J. C., Champlin, R. E., Gluckman, E., Hoffmann, R. G., Jacobsen, S. J., Marmont, A. M., McGlave, P. B. and et al. (1988). "Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion." Ann Intern Med **108**(6): 806-14.
- Goldman, J. M., Th'ng, K. H., Park, D. S., Spiers, A. S., Lowenthal, R. M. and Ruutu, T. (1978). "Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukaemia in blast-cell transformation." Br J Haematol **40**(2): 185-95.
- Gratwohl, A., Pasquini, M. C., Aljurf, M., Atsuta, Y., Baldomero, H., Foeken, L., Gratwohl, M., Bouzas, L. F., Confer, D., Frauendorfer, K., Gluckman, E., Greinix, H., Horowitz, M., Iida, M., Lipton, J., Madrigal, A., Mohty, M., Noel, L., Novitzky, N., Nunez, J., Oudshoorn, M., Passweg, J., van Rood, J., Szer, J., Blume, K., Appelbaum, F. R., Kadera, Y. and Niederwieser, D. (2015). "One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study." Lancet Haematol **2**(3): e91-e100.
- Gray, P. M., Parks, G. D. and Alexander-Miller, M. A. (2003). "High avidity CD8+ T cells are the initial population elicited following viral infection of the respiratory tract." J Immunol **170**(1): 174-81.
- Griffioen, M., Kessler, J. H., Borghi, M., van Soest, R. A., van der Minne, C. E., Nouta, J., van der Burg, S. H., Medema, J. P., Schrier, P. I., Falkenburg, J. H., Osanto, S. and Melief, C. J. (2006). "Detection and functional analysis of CD8+ T cells specific for PRAME: a target for T-cell therapy." Clin Cancer Res **12**(10): 3130-6.
- Guillaudeux, T., Gomez, E., Onno, M., Drenou, B., Segretain, D., Alberti, S., Lejeune, H., Fauchet, R., Jegou, B. and Le Bouteiller, P. (1996). "Expression of HLA class I genes in meiotic and post-meiotic human spermatogenic cells." Biol Reprod **55**(1): 99-110.
- Hamann, D., Baars, P. A., Rep, M. H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S. R., Klein, M. R. and van Lier, R. A. (1997). "Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells." J Exp Med **186**(9): 1407-18.

- Haspel, R. L. and Miller, K. B. (2008). "Hematopoietic stem cells: source matters." Curr Stem Cell Res Ther **3**(4): 229-36.
- Hickling, J. K. (1998). "Measuring human T-lymphocyte function." Expert Rev Mol Med **1998**: 1-20.
- Hobeika, A. C., Morse, M. A., Osada, T., Peplinski, S., Lyerly, H. K. and Clay, T. M. (2011). "Depletion of human regulatory T cells." Methods Mol Biol **707**: 219-31.
- Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J., Kolb, H. J., Rimm, A. A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B. and et al. (1990). "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation." Blood **75**(3): 555-62.
- Ikeda, H., Lethe, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J. F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T. and Coulie, P. G. (1997). "Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor." Immunity **6**(2): 199-208.
- Inamoto, Y., Flowers, M. E., Lee, S. J., Carpenter, P. A., Warren, E. H., Deeg, H. J., Storb, R. F., Appelbaum, F. R., Storer, B. E. and Martin, P. J. (2011). "Influence of immunosuppressive treatment on risk of recurrent malignancy after allogeneic hematopoietic cell transplantation." Blood **118**(2): 456-63.
- Inokuma, M., dela Rosa, C., Schmitt, C., Haaland, P., Siebert, J., Petry, D., Tang, M., Suni, M. A., Ghanekar, S. A., Gladding, D., Dunne, J. F., Maino, V. C., Disis, M. L. and Maecker, H. T. (2007). "Functional T cell responses to tumor antigens in breast cancer patients have a distinct phenotype and cytokine signature." J Immunol **179**(4): 2627-33.
- Inoue, K., Ogawa, H., Sonoda, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., Tatekawa, T., Soma, T., Kishimoto, T. and Sugiyama, H. (1997). "Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia." Blood **89**(4): 1405-12.
- Jacobson, L. O., Simmons, E. L. and Bethard, W. F. (1950). "Studies on hematopoietic recovery from radiation injury." J Clin Invest **29**(6): 825.
- Jansson, L. and Holmdahl, R. (1998). "Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases." Inflamm Res **47**(7): 290-301.
- Jeschke, U., Richter, D. U., Hammer, A., Briese, V., Friese, K. and Karsten, U. (2002). "Expression of the Thomsen-Friedenreich antigen and of its putative carrier protein mucin 1 in the human placenta and in trophoblast cells in vitro." Histochem Cell Biol **117**(3): 219-26.

- Jungbluth, A. A., Silva, W. A., Jr., Iversen, K., Frosina, D., Zaidi, B., Coplan, K., Eastlake-Wade, S. K., Castelli, S. B., Spagnoli, G. C., Old, L. J. and Vogel, M. (2007). "Expression of cancer-testis (CT) antigens in placenta." Cancer Immun **7**: 15.
- Kessler, J. H., Beekman, N. J., Bres-Vloemans, S. A., Verdijk, P., van Veelen, P. A., Kloosterman-Joosten, A. M., Vissers, D. C., ten Bosch, G. J., Kester, M. G., Sijts, A., Wouter Drijfhout, J., Ossendorp, F., Offringa, R. and Melief, C. J. (2001). "Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis." J Exp Med **193**(1): 73-88.
- Kharfan-Dabaja, M. A., Mhaskar, A. R., Djulbegovic, B., Cutler, C., Mohty, M. and Kumar, A. (2009). "Efficacy of rituximab in the setting of steroid-refractory chronic graft-versus-host disease: a systematic review and meta-analysis." Biol Blood Marrow Transplant **15**(9): 1005-13.
- Kim, Y. D., Park, H. R., Song, M. H., Shin, D. H., Lee, C. H., Lee, M. K. and Lee, S. Y. (2012). "Pattern of cancer/testis antigen expression in lung cancer patients." Int J Mol Med **29**(4): 656-62.
- 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**(5): 1071-80.
- Kohrt, H. E., Muller, A., Baker, J., Goldstein, M. J., Newell, E., Dutt, S., Czerwinski, D., Lowsky, R. and Strober, S. (2011). "Donor immunization with WT1 peptide augments antileukemic activity after MHC-matched bone marrow transplantation." Blood **118**(19): 5319-29.
- Kolb, H. J., Mittermüller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M. and Wilmanns, W. (1990). "Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients." Blood **76**(12): 2462-5.
- König, U. (2004). "Moderne Zellaggregationsanalyse in der zertifizierten Zellzahl-/Vitalitätsbestimmung." BIOforum **27**(11): 34-35.
- Koreth, J., Matsuoka, K., Kim, H. T., McDonough, S. M., Bindra, B., Alyea, E. P., 3rd, Armand, P., Cutler, C., Ho, V. T., Treister, N. S., Bienfang, D. C., Prasad, S., Tzachanis, D., Joyce, R. M., Avigan, D. E., Antin, J. H., Ritz, J. and Soiffer, R. J. (2011). "Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease." N Engl J Med **365**(22): 2055-66.
- Kotsiou, E. and Davies, J. K. (2013). "New ways to separate graft-versus-host disease and graft-versus-tumour effects after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation." Br J Haematol **160**(2): 133-45.

- 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**(1): 71-82.
- Lahita, R. G. (1992). "The effects of sex hormones on the immune system in pregnancy." Am J Reprod Immunol **28**(3-4): 136-7.
- Laskarin, G., Redzovic, A., Medancic, S. S. and Rukavina, D. (2010). "Regulation of NK-cell function by mucins via antigen-presenting cells." Med Hypotheses **75**(6): 541-3.
- Lawrence, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S. L., Stewart, C., Mermel, C. H., Roberts, S. A., Kiezun, A., Hammerman, P. S., McKenna, A., Drier, Y., Zou, L., Ramos, A. H., Pugh, T. J., Stransky, N., Helman, E., Kim, J., Sougnez, C., Ambrogio, L., Nickerson, E., Shefler, E., Cortes, M. L., Auclair, D., Saksena, G., Voet, D., Noble, M., DiCara, D., Lin, P., Lichtenstein, L., Heiman, D. I., Fennell, T., Imielinski, M., Hernandez, B., Hodis, E., Baca, S., Dulak, A. M., Lohr, J., Landau, D. A., Wu, C. J., Melendez-Zajgla, J., Hidalgo-Miranda, A., Koren, A., McCarroll, S. A., Mora, J., Lee, R. S., Crompton, B., Onofrio, R., Parkin, M., Winckler, W., Ardlie, K., Gabriel, S. B., Roberts, C. W., Biegel, J. A., Stegmaier, K., Bass, A. J., Garraway, L. A., Meyerson, M., Golub, T. R., Gordenin, D. A., Sunyaev, S., Lander, E. S. and Getz, G. (2013). "Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes." Nature **499**(7457): 214-8.
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M. E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R. M., Bacigalupo, A., Fibbe, W. and Ringden, O. (2008). "Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study." Lancet **371**(9624): 1579-86.
- Lee, S. J., Vogelsang, G. and Flowers, M. E. (2003). "Chronic graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **9**(4): 215-33.
- Levey, R. H., Gelfand, E. W., Klemperer, M. R., Sanderson, A. R., Bachelor, J. R., Berkel, A. I. and Rosen, F. S. (1971). "Bone-marrow transplantation in severe combined immunodeficiency syndrome." Lancet **2**(7724): 571-5.
- Linhares, Y. P., Pavletic, S. and Gale, R. P. (2013). "Chronic GVHD: Where are we? Where do we want to be? Will immunomodulatory drugs help?" Bone Marrow Transplant **48**(2): 203-9.
- Lohr, J. G., Stojanov, P., Carter, S. L., Cruz-Gordillo, P., Lawrence, M. S., Auclair, D., Sougnez, C., Knoechel, B., Gould, J., Saksena, G., Cibulskis, K., McKenna, A., Chapman, M. A., Straussman, R., Levy, J., Perkins, L. M., Keats, J. J., Schumacher, S. E., Rosenberg, M., Getz, G. and Golub, T. R. (2014). "Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy." Cancer Cell **25**(1): 91-101.

- Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T. R. and Shelton, E. (1951). "Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections." J Natl Cancer Inst **12**(1): 197-201.
- Luft, T., Rizkalla, M., Tai, T. Y., Chen, Q., MacFarlan, R. I., Davis, I. D., Maraskovsky, E. and Cebon, J. (2001). "Exogenous peptides presented by transporter associated with antigen processing (TAP)-deficient and TAP-competent cells: intracellular loading and kinetics of presentation." J Immunol **167**(5): 2529-37.
- Lundgren, A., Suri-Payer, E., Enarsson, K., Svennerholm, A. M. and Lundin, B. S. (2003). "Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals." Infect Immun **71**(4): 1755-62.
- Lundin, B. S., Johansson, C. and Svennerholm, A. M. (2002). "Oral immunization with a Salmonella enterica serovar typhi vaccine induces specific circulating mucosa-homing CD4(+) and CD8(+) T cells in humans." Infect Immun **70**(10): 5622-7.
- Lutz, M. and Mielke, S. (2016). "New perspectives on the use of mTOR inhibitors in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and graft-versus-host disease." Br J Clin Pharmacol **82**(5): 1171-1179.
- Lutz, M., Worschech, A., Alb, M., Gahn, S., Bernhard, L., Schwab, M., Obermeier, S., Einsele, H., Kämmerer, U., Heuschmann, P., Klinker, E., Otto, C. and Mielke, S. (2015). "Boost and loss of immune responses against tumor-associated antigens in the course of pregnancy as a model for allogeneic immunotherapy." Blood **125**(2): 261-72.
- Magenau, J., Runaas, L. and Reddy, P. (2016). "Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease." Br J Haematol **173**(2): 190-205.
- Martin, P. J., Schoch, G., Fisher, L., Byers, V., Anasetti, C., Appelbaum, F. R., Beatty, P. G., Doney, K., McDonald, G. B., Sanders, J. E. and et al. (1990). "A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment." Blood **76**(8): 1464-72.
- Mathé, G., Jammet, H., Pendic, B., Schwarzenberg, L., Duplan, J. F., Maupin, B., Latarjet, R., Larrieu, M. J., Kalic, D. and Djukic, Z. (1959). "Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation." Rev Fr Etud Clin Biol **4**(3): 226-38.
- Matte, C. C., Liu, J., Cormier, J., Anderson, B. E., Athanasiadis, I., Jain, D., McNiff, J. and Shlomchik, W. D. (2004). "Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL." Nat Med **10**(9): 987-92.

- Meden, H., Mielke, S., Schauer, A. and Kuhn, W. (1997). "Serum levels of the c-erbB-2 (HER2/neu) encoded oncoprotein fragment p105 in normal pregnancies." In Vivo **11**(1): 51-4.
- Mielke, S., Lutz, M., Schmidhuber, J., Kapp, M., Ditz, D., Ammer, J., Einsele, H., Grigoleit, G. U., Holler, E. and Wolff, D. (2014). "Salvage therapy with everolimus reduces the severity of treatment-refractory chronic GVHD without impairing disease control: a dual center retrospective analysis." Bone Marrow Transplant **49**(11): 1412-8.
- Mielke, S., McIver, Z. A., Shenoy, A., Fellowes, V., Khuu, H., Stroncek, D. F., Leitman, S. F., Childs, R., Battiwalla, M., Koklanaris, E., Haggerty, J., Savani, B. N., Rezvani, K. and Barrett, A. J. (2011). "Selectively T cell-depleted allografts from HLA-matched sibling donors followed by low-dose posttransplantation immunosuppression to improve transplantation outcome in patients with hematologic malignancies." Biol Blood Marrow Transplant **17**(12): 1855-61.
- Mielke, S., Solomon, S. R. and Barrett, A. J. (2005). "Selective depletion strategies in allogeneic stem cell transplantation." Cytotherapy **7**(2): 109-15.
- Mittendorf, E. A., Storrer, C. E., Shriver, C. D., Ponniah, S. and Peoples, G. E. (2005). "Evaluation of the CD107 cytotoxicity assay for the detection of cytolytic CD8+ cells recognizing HER2/neu vaccine peptides." Breast Cancer Res Treat **92**(1): 85-93.
- Molldrem, J. J., Komanduri, K. and Wieder, E. (2002). "Overexpressed differentiation antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions." Curr Opin Hematol **9**(6): 503-8.
- Molldrem, J. J., Lee, P. P., Wang, C., Felio, K., Kantarjian, H. M., Champlin, R. E. and Davis, M. M. (2000). "Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia." Nat Med **6**(9): 1018-23.
- Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M. and Rosenberg, S. A. (2010). "Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2." Mol Ther **18**(4): 843-51.
- Morris, E. C., Bendle, G. M. and Stauss, H. J. (2003). "Prospects for immunotherapy of malignant disease." Clin Exp Immunol **131**(1): 1-7.
- Mühlhauser, J., Crescimanno, C., Kaufmann, P., Höfler, H., Zaccheo, D. and Castellucci, M. (1993). "Differentiation and proliferation patterns in human trophoblast revealed by c-erbB-2 oncogene product and EGF-R." J Histochem Cytochem **41**(2): 165-73.

- Nagorsen, D., Bargou, R., Ruttinger, D., Kufer, P., Baeuerle, P. A. and Zugmaier, G. (2009). "Immunotherapy of lymphoma and leukemia with T-cell engaging BiTE antibody blinatumomab." Leuk Lymphoma **50**(6): 886-91.
- Nagorsen, D., Keilholz, U., Rivoltini, L., Schmittel, A., Letsch, A., Asemissen, A. M., Berger, G., Buhr, H. J., Thiel, E. and Scheibenbogen, C. (2000). "Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer." Cancer Res **60**(17): 4850-4.
- Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Schaller, G., Leigh, B., Schmittel, A., Letsch, A., Thiel, E. and Keilholz, U. (2003). "Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients." Int J Cancer **105**(2): 221-5.
- Nath, S. and Mukherjee, P. (2014). "MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression." Trends Mol Med **20**(6): 332-42.
- Niederwieser, D., Baldomero, H., Szer, J., Gratwohl, M., Aljurf, M., Atsuta, Y., Bouzas, L. F., Confer, D., Greinix, H., Horowitz, M., Iida, M., Lipton, J., Mohty, M., Novitzky, N., Nunez, J., Passweg, J., Pasquini, M. C., Kadera, Y., Apperley, J., Seber, A. and Gratwohl, A. (2016). "Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey." Bone Marrow Transplant **51**(6): 778-85.
- Nishikawa, H. and Sakaguchi, S. (2014). "Regulatory T cells in cancer immunotherapy." Curr Opin Immunol **27**: 1-7.
- Ohminami, H., Yasukawa, M. and Fujita, S. (2000). "HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide." Blood **95**(1): 286-93.
- Oka, Y., Elisseeva, O. A., Tsuboi, A., Ogawa, H., Tamaki, H., Li, H., Oji, Y., Kim, E. H., Soma, T., Asada, M., Ueda, K., Maruya, E., Saji, H., Kishimoto, T., Udaka, K. and Sugiyama, H. (2000). "Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1) product." Immunogenetics **51**(2): 99-107.
- Oka, Y., Tsuboi, A., Oji, Y., Kawase, I. and Sugiyama, H. (2008). "WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer." Curr Opin Immunol **20**(2): 211-20.
- Pass, H. A., Schwarz, S. L., Wunderlich, J. R. and Rosenberg, S. A. (1998). "Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay." Cancer J Sci Am **4**(5): 316-23.
- Passweg, J. R., Baldomero, H., Peters, C., Gaspar, H. B., Cesaro, S., Dreger, P., Duarte, R. F., Falkenburg, J. H., Farge-Bancel, D., Gennery, A.,

- Halter, J., Kroger, N., Lanza, F., Marsh, J., Mohty, M., Sureda, A., Velardi, A. and Madrigal, A. (2014). "Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation." Bone Marrow Transplant **49**(6): 744-50.
- Patriarca, F., Skert, C., Sperotto, A., Zaja, F., Falletti, E., Mestroni, R., Kikic, F., Calistri, E., Fili, C., Geromin, A., Cerno, M. and Fanin, R. (2006). "The development of autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation is related with chronic graft-vs-host disease and immune recovery." Exp Hematol **34**(3): 389-96.
- Peters, P. J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J. W. and Geuze, H. J. (1991). "Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes." J Exp Med **173**(5): 1099-109.
- Picker, L. J., Singh, M. K., Zdraveski, Z., Treer, J. R., Waldrop, S. L., Bergstresser, P. R. and Maino, V. C. (1995). "Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry." Blood **86**(4): 1408-19.
- Poletaev, A. B., Churilov, L. P., Stroeve, Y. I. and Agapov, M. M. (2012). "Immunophysiology versus immunopathology: Natural autoimmunity in human health and disease." Pathophysiology **19**(3): 221-31.
- Porrata, L. F. (2016). "Autologous Graft-versus-Tumor Effect: Reality or Fiction?" Adv Hematol **2016**: 5385972.
- Press, M. F., Cordon-Cardo, C. and Slamon, D. J. (1990). "Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues." Oncogene **5**(7): 953-62.
- Qian, L., Wu, Z. and Shen, J. (2013). "Advances in the treatment of acute graft-versus-host disease." J Cell Mol Med **17**(8): 966-75.
- Quintarelli, C., Dotti, G., De Angelis, B., Hoyos, V., Mims, M., Luciano, L., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Pane, F. and Savoldo, B. (2008). "Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia." Blood **112**(5): 1876-85.
- Redzovic, A., Laskarin, G., Dominovic, M., Haller, H. and Rukavina, D. (2013). "Mucins help to avoid alloreactivity at the maternal fetal interface." Clin Dev Immunol **2013**: 542152.
- Reshef, R., Luger, S. M., Hexner, E. O., Loren, A. W., Frey, N. V., Nasta, S. D., Goldstein, S. C., Stadtmauer, E. A., Smith, J., Bailey, S., Mick, R., Heitjan, D. F., Emerson, S. G., Hoxie, J. A., Vonderheide, R. H. and Porter, D. L.

- (2012). "Blockade of lymphocyte chemotaxis in visceral graft-versus-host disease." N Engl J Med **367**(2): 135-45.
- Ressing, 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**(11): 5934-43.
- Rezvani, K. and Barrett, A. J. (2008). "Characterizing and optimizing immune responses to leukaemia antigens after allogeneic stem cell transplantation." Best Pract Res Clin Haematol **21**(3): 437-53.
- Rezvani, K., Brenchley, J. M., Price, D. A., Kilical, Y., Gostick, E., Sewell, A. K., Li, J., Mielke, S., Douek, D. C. and Barrett, A. J. (2005). "T-cell responses directed against multiple HLA-A*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: identification, quantification, and characterization." Clin Cancer Res **11**(24 Pt 1): 8799-807.
- Rezvani, K., Grube, M., Brenchley, J. M., Sconocchia, G., Fujiwara, H., Price, D. A., Gostick, E., Yamada, K., Melenhorst, J., Childs, R., Hensel, N., Douek, D. C. and Barrett, A. J. (2003). "Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8+ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation." Blood **102**(8): 2892-900.
- Rezvani, K., Yong, A. S., Mielke, S., Savani, B. N., Musse, L., Superata, J., Jafarpour, B., Boss, C. and Barrett, A. J. (2008). "Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies." Blood **111**(1): 236-42.
- Rezvani, K., Yong, A. S., Tawab, A., Jafarpour, B., Eniafe, R., Mielke, S., Savani, B. N., Keyvanfar, K., Li, Y., Kurlander, R. and Barrett, A. J. (2009). "Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia." Blood **113**(10): 2245-55.
- Salter, R. D., Howell, D. N. and Cresswell, P. (1985). "Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids." Immunogenetics **21**(3): 235-46.
- Sarantopoulos, S., Stevenson, K. E., Kim, H. T., Bhuiya, N. S., Cutler, C. S., Soiffer, R. J., Antin, J. H. and Ritz, J. (2007). "High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease." Clin Cancer Res **13**(20): 6107-14.

- Scheibenbogen, C., Letsch, A., Thiel, E., Schmittel, A., Mailaender, V., Baerwolf, S., Nagorsen, D. and Keilholz, U. (2002). "CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia." Blood **100**(6): 2132-7.
- Seremet, T., Brasseur, F. and Coulie, P. G. (2011). "Tumor-specific antigens and immunologic adjuvants in cancer immunotherapy." Cancer J **17**(5): 325-30.
- Simpson, E. and Roopenian, D. (1997). "Minor histocompatibility antigens." Curr Opin Immunol **9**(5): 655-61.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. and et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." Science **244**(4905): 707-12.
- Slavin, S., Nagler, A., Naparstek, E., Kapelushnik, Y., Aker, M., Cividalli, G., Varadi, G., Kirschbaum, M., Ackerstein, A., Samuel, S., Amar, A., Brautbar, C., Ben-Tal, O., Eldor, A. and Or, R. (1998). "Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases." Blood **91**(3): 756-63.
- Smith, C. and Cerundolo, V. (2001). "Immunotherapy of melanoma." Immunology **104**(1): 1-7.
- Smyth, K., Garcia, K., Sun, Z., Tuo, W. and Xiao, Z. (2012). "Repetitive peptide boosting progressively enhances functional memory CTLs." Biochem Biophys Res Commun **424**(3): 635-40.
- Snijdewint, F. G., von Mensdorff-Pouilly, S., Karuntu-Wanamarta, A. H., Verstraeten, A. A., van Zanten-Przybysz, I., Hummel, P., Nijman, H. W., Kenemans, P. and Hilgers, J. (1999). "Cellular and humoral immune responses to MUC1 mucin and tandem-repeat peptides in ovarian cancer patients and controls." Cancer Immunol Immunother **48**(1): 47-55.
- Snover, D. C., Weisdorf, S. A., Vercellotti, G. M., Rank, B., Hutton, S. and McGlave, P. (1985). "A histopathologic study of gastric and small intestinal graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation." Hum Pathol **16**(4): 387-92.
- Socie, G., Stone, J. V., Wingard, J. R., Weisdorf, D., Henslee-Downey, P. J., Bredeson, C., Cahn, J. Y., Passweg, J. R., Rowlings, P. A., Schouten, H. C., Kolb, H. J. and Klein, J. P. (1999). "Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late Effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry." N Engl J Med **341**(1): 14-21.

- Sullivan, K. M., Kopecky, K. J., Jocom, J., Fisher, L., Buckner, C. D., Meyers, J. D., Counts, G. W., Bowden, R. A., Peterson, F. B., Witherspoon, R. P. and et al. (1990). "Immunomodulatory and antimicrobial efficacy of intravenous immunoglobulin in bone marrow transplantation." N Engl J Med **323**(11): 705-12.
- Sullivan, K. M., Storb, R., Buckner, C. D., Fefer, A., Fisher, L., Weiden, P. L., Witherspoon, R. P., Appelbaum, F. R., Banaji, M., Hansen, J. and et al. (1989). "Graft-versus-host disease as adoptive immunotherapy in patients with advanced hematologic neoplasms." N Engl J Med **320**(13): 828-34.
- Sung, A. D. and Chao, N. J. (2013). "Concise review: acute graft-versus-host disease: immunobiology, prevention, and treatment." Stem Cells Transl Med **2**(1): 25-32.
- Suzuki, K., Aida, K., Miyakawa, R., Narumi, K., Udagawa, T., Yoshida, T., Ohshima, Y. and Aoki, K. (2013). "Preimmunization of donor lymphocytes enhances antitumor immunity of autologous hematopoietic stem cell transplantation." Cancer Med **2**(5): 636-45.
- Thomas, E. D. and Ferrebee, J. W. (1962). "Transplantation of marrow and whole organs: experiences and comments." Can Med Assoc J **86**: 435-44.
- Thomas, E. D., Lochte, H. L., Jr., Cannon, J. H., Sahler, O. D. and Ferrebee, J. W. (1959). "Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man." J Clin Invest **38**: 1709-16.
- Thomas, E. D., Lochte, H. L., Jr., Lu, W. C. and Ferrebee, J. W. (1957). "Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy." N Engl J Med **257**(11): 491-6.
- Thomas, E. D., Storb, R., Clift, R. A., Fefer, A., Johnson, L., Neiman, P. E., Lerner, K. G., Glucksberg, H. and Buckner, C. D. (1975). "Bone-marrow transplantation (second of two parts)." N Engl J Med **292**(17): 895-902.
- Trapani, J. A. and Smyth, M. J. (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." Nat Rev Immunol **2**(10): 735-47.
- Valdimarsson, H., Mulholland, C., Fridriksdottir, V. and Coleman, D. V. (1983). "A longitudinal study of leucocyte blood counts and lymphocyte responses in pregnancy: a marked early increase of monocyte-lymphocyte ratio." Clin Exp Immunol **53**(2): 437-43.
- van Rood, J. J., Eernisse, J. G. and van Leeuwen, A. (1958). "Leucocyte antibodies in sera from pregnant women." Nature **181**(4625): 1735-6.
- Veenstra van Nieuwenhoven, A. L., Heineman, M. J. and Faas, M. M. (2003). "The immunology of successful pregnancy." Hum Reprod Update **9**(4): 347-57.

- Verneris, M. R. (2013). "Natural killer cells and regulatory T cells: how to manipulate a graft for optimal GVL." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2013**: 335-41.
- Vigano, S., Utzschneider, D. T., Perreau, M., Pantaleo, G., Zehn, D. and Harari, A. (2012). "Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells?" Clin Dev Immunol **2012**: 153863.
- Vogelsang, G. B., Lee, L. and Bensen-Kennedy, D. M. (2003). "Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant." Annu Rev Med **54**: 29-52.
- Wadelin, F., Fulton, J., McEwan, P. A., Spriggs, K. A., Emsley, J. and Heery, D. M. (2010). "Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia." Mol Cancer **9**: 226.
- Wagner, J. E., Thompson, J. S., Carter, S. L. and Kernan, N. A. (2005). "Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial." Lancet **366**(9487): 733-41.
- Warren, E. H. and Deeg, H. J. (2013). "Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies." Tissue Antigens **81**(4): 183-93.
- Weber, G., Karbach, J., Kuci, S., Kreyenberg, H., Willasch, A., Koscielniak, E., Tonn, T., Klingebiel, T., Wels, W. S., Jager, E. and Bader, P. (2009). "WT1 peptide-specific T cells generated from peripheral blood of healthy donors: possible implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation." Leukemia **23**(9): 1634-42.
- Weiden, P. L., Flournoy, N., Sanders, J. E., Sullivan, K. M. and Thomas, E. D. (1981). "Antileukemic effect of graft-versus-host disease contributes to improved survival after allogeneic marrow transplantation." Transplant Proc **13**(1 Pt 1): 248-51.
- Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D. and Storb, R. (1979). "Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts." N Engl J Med **300**(19): 1068-73.
- 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**(11): 7569-79.
- Wills, M. R., Okecha, G., Weekes, M. P., Gandhi, M. K., Sissons, P. J. and Carmichael, A. J. (2002). "Identification of naive or antigen-experienced

- human CD8(+) T cells by expression of costimulation and chemokine receptors: analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8(+) T cell response." J Immunol **168**(11): 5455-64.
- Wilson, L. J. and Parsons, M. (1996). "Endocrinology of human gestation." *In*: Adashi, E. Y., Rock, J. A. and Rosenwaks, Z. "Reproductive endocrinology, surgery, and technology." Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Wood, W. A., Chai, X., Weisdorf, D., Martin, P. J., Cutler, C., Inamoto, Y., Wolff, D., Pavletic, S. Z., Pidala, J., Palmer, J. M., Arora, M., Arai, S., Jagasia, M., Storer, B., Lee, S. J. and Mitchell, S. (2013). "Comorbidity burden in patients with chronic GVHD." Bone Marrow Transplant **48**(11): 1429-36.
- Wrzesinski, C. and Restifo, N. P. (2005). "Less is more: lymphodepletion followed by hematopoietic stem cell transplant augments adoptive T-cell-based anti-tumor immunotherapy." Curr Opin Immunol **17**(2): 195-201.
- Xylinas, E., Cha, E. K., Khani, F., Kluth, L. A., Rieken, M., Volkmer, B. G., Hautmann, R., Kufer, R., Chen, Y. T., Zerbib, M., Rubin, M. A., Scherr, D. S., Shariat, S. F. and Robinson, B. D. (2014). "Association of oncofetal protein expression with clinical outcomes in patients with urothelial carcinoma of the bladder." J Urol **191**(3): 830-41.
- Yoshimi, A., Suzuki, R., Atsuta, Y., Iida, M., Lu, D. P., Tong, W., Ghavamzadeh, A., Alimoghaddam, K., Lie, A. K., Liang, R., Chan, L. L., Haipeng, L., Tan, P. L., Hwang, W. Y., Chiou, T. J., Chen, P. M., Van Binh, T., Minh, N. N., Min, C. K., Hwang, T. J. and Kodaera, Y. (2010). "Hematopoietic SCT activity in Asia: a report from the Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation Group." Bone Marrow Transplant **45**(12): 1682-91.
- Zeiser, R., Penack, O., Holler, E. and Idzko, M. (2011). "Danger signals activating innate immunity in graft-versus-host disease." J Mol Med (Berl) **89**(9): 833-45.
- Zou, X., Lin, X., Luo, W. and Wei, J. (2016). "Donor-Derived Regulatory T Cells Attenuate the Severity of Acute Graft-Versus-Host Disease after Cord Blood Transplantation." Tohoku J Exp Med **239**(3): 193-202.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über die verschiedenen Kategorien von Tumorantigenen....	15
Abb. 2: Übersicht über die Studiengruppen.....	29
Abb. 3: Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation	34
Abb. 4: Schema zum Ablauf der Isolation von CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	38
Abb. 5: Zusammensetzung eines Dextramers.....	43
Abb. 6: Prinzip des IFN- γ -ELISPOT	47
Abb. 7: Darstellung eines Boxplots.....	49
Abb. 8: Immunlevel gegen die TAA (0,1 μ mol/l) in der Hauptgruppe 1.....	52
Abb. 9: Immunlevel gegen die TAA (10 μ mol/l) in der Hauptgruppe 1.....	53
Abb. 10: Resultate der CMV-Versuchsreihe im IFN- γ -ELISPOT	60
Abb. 11: IFN- γ -spezifische Spots gegen CMV bei den Probanden <i>TM#24</i> und <i>TM#88</i>	61
Abb. 12: Resultate des IFN- γ -ELISPOT beim Probanden <i>TM#64</i>	63
Abb. 13: IFN- γ -spezifische Spots beim Probanden <i>TM#64</i>	64
Abb. 14: FACS-Plots der Dextramerfärbung auf CMV beim Probanden <i>TM#24</i>	65
Abb. 15: FACS-Plots der Dextramerfärbungen bei den Probanden <i>TM#17</i> und <i>TM#19</i>	67
Abb. 16: FACS-Plots der ICS auf CMV beim Probanden <i>TM#6</i>	68
Abb. 17: FACS-Plots der ICS beim Probanden <i>TM#14</i>	69
Abb. 18: FACS-Plots der Degranulationsfärbung beim Probanden <i>TM#14</i>	70
Abb. 19: Immunantworten gegen HER2/neu und WT1 im Geschlechtervergleich.....	72
Abb. 20: Hämatologische Konstitution der erstschwangeren Frauen	76
Abb. 21: Hormoneller Status der erstschwangeren Frauen.....	77
Abb. 22: Immunlevel gegen die TAA (0,1 μ mol/l) in der Hauptgruppe 2.....	78
Abb. 23: Immunlevel gegen die TAA (10 μ mol/l) in der Hauptgruppe 2.....	79
Abb. 24: Longitudinaler Verlauf der Immunlevel gegen HER2/neu	82
Abb. 25: Longitudinaler Verlauf der Immunlevel gegen WT1	83

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Kategorien der akuten und chronischen GvHD	4
Tab. 2: Staging und Grading der akuten GvHD.....	6
Tab. 3: Sequenzen der Primer und Gensonden für die RT-qPCR.....	41
Tab. 4: Fluoreszenzfarbstoffe mit Absorptions- und Emissionsmaxima	42
Tab. 5: Probandencharakteristika der gesunden Blutspender (Hauptgruppe 1)	51
Tab. 6: Frequenzen der „positiven“ Immunantworten in der Hauptgruppe 1	55
Tab. 7: Immunantworten gegen die TAA bei Nulligravidae	56
Tab. 8: Immunantworten gegen die TAA bei Primi- und Multiparae	57
Tab. 9: Immunantworten gegen die TAA bei Männern	58
Tab. 10: Korrelation der Immunantworten gegen die TAA beim Probanden <i>TM#17</i>	66
Tab. 11: Korrelation der Immunantworten gegen die TAA beim Probanden <i>TM#19</i>	66
Tab. 12: Durchgeführtes Arbeitsprogramm in der Hauptgruppe 2.....	74
Tab. 13: TAA-spezifische Immunantworten in der Hauptgruppe 2	81

6.4 Abkürzungsverzeichnis

6.4.1 Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ABL1	engl. <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
AFP	α -Fetoprotein
aGvHD	Akute Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATG	Antithymozytenglobulin
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BCR	engl. <i>breakpoint cluster region</i>
BFA	Brefeldin A
β -HCG	β -humanes Choriongonadotropin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD	Differenzierungsantigen (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cGvHD	Chronische Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung
CMV	Cytomegalievirus
CML	Chronische myeloische Leukämie
CNI	Calcineurininhibitor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTA	Tumor-Hoden-Antigen (engl. <i>cancer/testis antigen</i>)
DLI	Donorlymphozyteninfusion
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ELISPOT	Enzymgekoppelter Immunospot-Test (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent spot assay</i>)
engl.	englisch
F _{ab}	Antigenbindendes Fragment (engl. <i>fragment antigen binding</i>)
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FBS	Fetales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
G	Guanin
GI-Trakt	Gastrointestinaler Trakt
gp100	Glykoprotein 100
GTC	Guanidiniumthiocyanat
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. <i>graft-versus-host disease</i>)
GvL-Effekt	Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (engl. <i>graft-versus-leukemia effect</i>)
HABS	Humanes AB-Serum
HER2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HGB	Hämoglobin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papillomavirus

H-Y	Männerspezifisches Minorhistokompatibilitätsantigen
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
ICS	Intrazelluläre Zytokinfärbung (engl. <i>intracellular cytokine staining</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPA	Isopropylalkohol (2-Propanol)
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
LAMP	Lysosomenassoziiertes Membranglykoprotein
lat.	lateinisch
LMP	Latente Membranproteine
LRS	Leukozytenreduktionssystem
LSM	Lymphozytenseparationsmedium
MHC	Majorhistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MiHA	Minorhistokompatibilitätsantigen
MMF	Mycophenolat-Mofetil
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	engl. <i>mechanistic target of rapamycin</i>
MTX	Methotrexat
MUC1	Mucin 1
n	Anzahl (lat. <i>numerus</i>)
n/a	nicht verfügbar (engl. <i>not available</i>)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NIH	Nationales Gesundheitsinstitut der USA (engl. <i>National Institutes of Health</i>)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NPC	Non-Peptid-Kontrolle (engl. <i>non peptide control</i>)
n.s.	nicht signifikant
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzelle (engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i>)

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität (lat. <i>potentia hydrogenii</i>)
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRAME	engl. <i>preferentially expressed antigen of melanoma</i>
p-Wert	engl. <i>probability value</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium 1640
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (engl. <i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>sideward scatter</i>)
T	Thymin
TAA	Tumorassoziertes Antigen
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TAP	engl. <i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. <i>T-cell receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
TSA	Tumorspezifisches Antigen
vgl.	vergleiche
WT1	Wilms-Tumor-Protein 1

6.4.2 Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde(n)
kV	Kilovolt
l	Liter
mA	Milliampere
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde(n)
U	Enzymeinheit (engl. <i>enzyme unit</i>)
x g	Vielfaches der konstanten Schwerebeschleunigung der Erde

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. med. Stephan Mielke** möchte ich meinen allergrößten Dank nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch für seine äußerst intensive Unterstützung über die gesamte Zeit der Promotionsarbeit ausdrücken. Nur durch sein Engagement wurde ich mit einem Promotionsstipendium gefördert und konnte an verschiedenen Fachkongressen teilnehmen. Ich kann jedem anderen Doktoranden eine derartige Betreuung nur wünschen.

Herrn **Prof. Dr. med. Hermann Einsele** danke ich für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg durchführen zu können.

Meiner Betreuerin Frau **Dr. rer. nat. Andrea Guennoun** sei ein riesiges Dankeschön nicht nur für ihre immer entgegenkommende fachliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, sondern auch für die äußerst angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre ausgesprochen.

Für die tolle menschliche und fachliche Zusammenarbeit sei dem Team aus dem Labor für translationale Tumor- und Transplantationsimmunologie (AG Mielke) herzlich gedankt: Frau **Dr. rer. nat. Miriam Alb, Laura Bernhard, Julia Lange, Stefanie Obermeier, Silke Rebhan** und **Frederik „Freddy“ Weil** – es war eine schöne Zeit im Gebäude „C11“!

Herrn **Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto** gilt ein riesiger Dank nicht nur für die äußerst gewissenhafte Planung der Studie und die gute Zusammenarbeit, sondern auch für seine stetige wissenschaftliche Anleitung und freundliche Diskussionsbereitschaft. **Sabine Gahn** und **Monika Koospal** aus seinem Team der experimentellen Transplantationsimmunologie am Universitätsklinikum Würzburg möchte ich für ihr enormes Arbeitspensum, das sie für die Studie geleistet haben, ganz herzlich danken.

Ein riesiges „Dankeschön“ möchte ich **Lidia Bujok, Angelika „Gele“ Ertl, Stefan Gebauer, Martina Hofmann, Gabriele Müller, Sabine Otterbein, Marion Sippach, Katja Strauß, Gabriele Veit, Gabriele Wegmann** und **Heiko Zeidler** von der Anmeldung, Spende und Therapie sowie Herrn **Prof. Dr. med. Markus Böck**, Frau **Dr. med. Erdwine Klinker**, Frau **Dr. med. Sabine Kuhn** und Frau **Dr. med. Evelyn Putz** vom ärztlichen Team des Institutes für Transfusionsmedizin und Klinische Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg aussprechen: Sowohl für ihre unglaubliche Unterstützung bei der Probandenrekrutierung und Probengewinnung als auch für ihre tolle menschliche Art – ich habe mich bei meinen ungezählten „Besuchen“ dort immer sehr wohl gefühlt! Aus demselben Institut möchte ich mich außerdem beim **Team des HLA-Labors**, das unsere Blutproben typisierte, und beim **Team der Steuerstelle**, das teilweise die Bestrahlung unserer Zellen übernahm, bedanken.

Frau **Dr. med. Silvia Hobert** und ihren Arzthelferinnen **Isabell Geißler, Roswitha Klein** und **Ulrike Schumacher** gilt ein unglaublich großer Dank für die unermüdliche Unterstützung bei der Rekrutierung von schwangeren Probandinnen. Wie stressig die Momente auch waren, in denen ich in ihrer gynäkologischen Praxis aufgetaucht bin, das gesamte Team stand immer freundlich und hilfsbereit zur Stelle!

Mein Dank für die Rekrutierung schwangerer Probandinnen in ihren gynäkologischen Praxen gilt außerdem Frau **Prof. Dr. med. Jael Backe**, Herrn **Dr. med. Helmut Spingler**, Frau **Renate Vieth-Laßmann** und Herrn **Dr. med. Martin Witteler** mit ihren Arzthelferinnen.

Bei Frau **Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Kämmerer**, Herrn **Dr. Michael Schwab** und Frau **Marianne Ahmed** von der Frauenklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg möchte ich mich für die gute Kooperation im Rahmen des Projektes herzlich bedanken.

Danksagung

Ferner sei den unzähligen mir nicht namentlich bekannten ärztlichen und pflegerischen Mitarbeitern aus den verschiedenen gynäkologischen Kliniken im Großraum Würzburg gedankt, die sich trotz der Hektik einer Geburt mit vollem Einsatz um die Blutentnahme nach der Entbindung gekümmert haben.

Für die Unterstützung bei den Messungen der Hormonspiegel gilt Frau **Anita Pietschmann** vom Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg mein herzlicher Dank.

Herrn **Prof. Dr. Peter U. Heuschmann** und Herrn **Dr. rer. nat. Uwe Mäder** danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Vorbereitung und Auswertung der Studie.

Der Vorsitzenden Frau **Gabriele Nelkenstock** und allen Mitgliedern und Förderern des Vereins „**Hilfe im Kampf gegen Krebs e.V.**“ in Würzburg gilt ein riesiger Dank für das Promotions- und Reisetipendium, das mir mein Forschungssemester und die Teilnahme an einem Kongress ermöglicht hat.

Dem **Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung** der Julius-Maximilians-Universität Würzburg möchte ich für die Förderung des Projektes, in dessen Rahmen meine Promotionsarbeit entstanden ist, sowie für die Übernahme von Reisekosten zur Teilnahme an einem Kongress meinen herzlichen Dank aussprechen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern **Martina** und **Maximilian Lutz**, meiner Freundin **Eva-Johanna Csef**, meinen Schwestern **Anna Lisa** (mit **Jakob**), **Paulina**, **Justina** und **Marie Lena**, meinem Cousin **Daniel**, meiner gesamten weiteren Familie und allen Freundinnen und Freunden, die mich über die Zeit begleitet, unterstützt und – teilweise sicherlich auch unbewusst – immer wieder angetrieben haben. Im Besonderen sei meinen Eltern für ihre unglaubliche Unterstützung über das gesamte Studium gedankt.

Im Gedenken an **Patrick Sachsenweger**. Möge er in Frieden ruhen.
