

---

**Studien zur Spezifität und Klonalität  
von tumorreaktiven T-Zellen aus  
Triom-immunisierten Mäusen**

**Dissertation**

**der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

erstellt am  
Institut für Molekulare Immunologie  
der GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

vorgelegt von

Konrad Kronenberger  
aus Temeschburg

München, 27. Februar 2002

---

Erstgutachter: Prof. Dr. Walter Schartau

Zweitgutachter: PD Dr. Dirk Eick

Sondervotum: PD Dr. Ralph Mocikat

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.2002

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>I ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>8</b>
<b>II EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Das Immunsystem der Säugetiere .....</b>	<b>11</b>
1.1 B-Zellen .....	12
1.2 T-Zellen .....	13
<b>2. Krebs und Tumoren.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Tumorbekämpfung durch Aktivierung des Immunsystems .....</b>	<b>19</b>
3.1 Der Triomzell-Ansatz .....	20
<b>4. Aufgabenstellung .....</b>	<b>21</b>
<b>III MATERIAL .....</b>	<b>23</b>
<b>1. Molekularbiologie .....</b>	<b>23</b>
1.1 Vektoren, Konstrukte, Bakterien .....	23
1.2 Oligonukleotide .....	23
1.3 Reagenzien, Enzyme, Puffer.....	25
1.4 Geräte und Hilfsmittel .....	27
<b>2. Zellkultur .....</b>	<b>28</b>
2.1 Murine Lymphome .....	28
2.2 Hybridome und Triome .....	29
2.3 Medien .....	29
2.4 Proteine .....	29
2.5 Reagenzien, Enzyme, Puffer.....	30

---

2.6 Geräte und Hilfsmittel .....	30
<b>3. Immunologie .....</b>	<b>31</b>
3.1 Antikörper .....	31
3.2 Reagenzien und Puffer .....	32
3.3 Geräte und Hilfsmittel .....	32
<b>4. Tierexperimente .....</b>	<b>33</b>
4.1 Mäuse .....	33
4.2 Reagenzien .....	33
4.3 Geräte .....	34
<b>IV METHODEN .....</b>	<b>35</b>
<b>1. Molekularbiologie .....</b>	<b>35</b>
1.1 Plasmidtransformation .....	35
1.2 Plasmidisolierung und Linearisierung .....	35
1.3 RNS-Extraktion und Mengenbestimmung .....	36
1.4 Reverse Transkription der RNS in cDNS .....	37
1.5 PCR und Gelelektrophorese .....	37
1.6 Analyse der TZR-V $\beta$ -Repertoires .....	38
1.7 DNS-Extraktion aus Agarosegelen .....	39
1.8 Sequenzierung .....	40
1.8.1 Die cDNS-Doppelstrang-Trennung .....	40
1.8.2 Die Sequenzierreaktion .....	41
1.8.3 Auftrennung der Sequenzierungsansätze im Polyacrylamidgel .....	41
<b>2. Zellkultur .....</b>	<b>42</b>
2.1 Allgemeines .....	42
2.2 Zentrifugation .....	42
2.3 Bestimmung der Zellzahl .....	42
2.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	43

2.5 Wachstumsbedingungen .....	43
2.6 T-Zell-Stimulationen .....	43
2.6.1 Gewinnung von „T-Zellen“ .....	43
2.6.2 Stimulationsansatz.....	44
2.6.3 GM-CSF-Aktivierungsansatz.....	45
2.7 Plasmidtransfektion und Kultivierung der Transfektanten.....	45
2.8 Reklonierung.....	46
<b>3. Immunologie .....</b>	<b>47</b>
3.1 ELISA .....	47
3.1.1 scA20-Kompetitions-ELISA.....	48
3.2 FACS .....	49
<b>4. Tierexperimente .....</b>	<b>50</b>
4.1 <i>In-vivo</i> -Versuche.....	50
4.1.1 Präimmunisierung .....	50
4.1.2 Tumorgabe .....	51
4.1.3 Transferversuche .....	51
4.2 Herstellung einer Zellsuspension aus Milz- bzw. Lymphknotengewebe .....	51
<b>V ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>1. Herstellung von Zielzellen .....</b>	<b>52</b>
1.1 Selektion Id-defizienter A20-Mutanten.....	52
1.1.1 Einzelzellklonierung durch limitierende Verdünnung .....	52
1.1.2 FACS-Sortierung.....	52
1.2 Transfektion von MPC11 mit scA20.....	54
<b>2. Tumorreaktivität von T-Zellen aus immunisierten und nicht immunisierten Mäusen .....</b>	<b>56</b>
2.1 Restimulationen <i>in vitro</i> .....	56
2.2 Untersuchungen zum Aktivierungszustand .....	58
2.2.1 Die <i>in-vitro</i> angereicherten T-Zellen sind tumorspezifisch .....	58

2.2.2 Tumorreaktivität von T-Zellen aus Immun-, Naiv- und Tumormäusen .....	59
2.2.3 Der Einfluss des Idiotyps auf die Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen .....	61
2.2.4 Die T-Zellen aus adoptiven Transfers.....	62
2.2.5 Der „CD4 <sup>+</sup> -T-Zell Klon“.....	64
<b>3. Der Phänotyp der T-Zellen nach <i>In-vitro</i>-Stimulation .....</b>	<b>64</b>
<b>4. Adoptiver Transfer der T-Zellen nach Restimulation .....</b>	<b>68</b>
<b>5. TZR-Repertoires der tumorreaktiven T-Zellen.....</b>	<b>69</b>
5.1 Primerauswahl und Etablierung der Methode .....	70
5.2 Das TZR-V $\beta$ -Repertoire unstimulierter T-Zellen.....	71
5.3 Das TZR-V $\beta$ -Repertoire stimulierter T-Zellen.....	71
5.4 Das Repertoire von tumorreaktiven Th1-Zellen.....	76
<b>VI DISKUSSION .....</b>	<b>78</b>
<b>1. Herstellung von Zielzellen .....</b>	<b>79</b>
<b>2. Untersuchungen zur Tumorreaktivität der T-Zellen.....</b>	<b>79</b>
2.1 Die <i>In-vitro</i> -Restimulationen.....	80
2.2 Die Aktivierung der T-Zellen <i>in vitro</i> .....	80
2.3 Die Rolle des Idiotyps bei der T-Zell-Aktivierung .....	82
<b>3. Phänotypisierung der T-Zellen .....</b>	<b>83</b>
<b>4. Die T-Zellen im adoptiven Transfer .....</b>	<b>83</b>
<b>5. Analyse des TZR-Gebrauchs der T-Zellen.....</b>	<b>85</b>
5.1 Anmerkungen zu den Voruntersuchungen .....	86
5.2 TZR-Repertoire der untersuchten T-Zellen .....	86
5.2.1 Die Ergebnisse vor <i>In-vitro</i> -Stimulation .....	86
5.2.2 Ergebnisse nach <i>In-vitro</i> -Stimulation .....	87
5.3 Die untersuchten Th1-Zellen .....	88

<b>6. Ausblick.....</b>	<b>89</b>
<b>VII ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>VIII ANHANG .....</b>	<b>92</b>
<b>IX LITERATUR .....</b>	<b>96</b>
<b>X DANK .....</b>	<b>105</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>106</b>

## I ABKÜRZUNGEN

μ	Mikro
a	Jahr
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ALF	Fluoreszenzsequenziergerät der Firma Amersham-Pharmacia (Activated Laser Fluorescence)
Amp	Ampicillin
APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
bp	Basenpaar
cDNS	komplementäre DNS
DC	Dendritische Zelle
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleotid-5-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
dNTP	Desoxynukleotid-5-Triphosphat
dT	Deoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Et-OH	Ethanol
F	Farad

---

FACS	Fluoreszenzaktivierter Zell-Sorter (Fluorescence Activated Cell Sorter)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (Gravity)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> Odest.	Destilliertes Wasser
hu	human
Id	Idiotyp
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
KÜ	Kulturüberstand
LB	Luria Bertani
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
Min.	Minute
MoMLV	Moloney murines Leukämievirus
mu	murin
neo	Neomycin-Phosphotransferase
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR-H <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser, autoklaviert
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
Pox	Peroxidase

---

Rest.	Restimulation
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
Strep	Streptomycin
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus (Bakterium)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNS	Transfer-RNS
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Einheit (Unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen

## II EINLEITUNG

### 1. Das Immunsystem der Säugetiere

Betrachtet man das Tierreich, so kann man feststellen, dass alle Metazoa (tierische Vielzeller) ein mehr oder weniger differenziertes System besitzen, mit dem sie sich z.B. vor Bakterien, Viren und Parasiten, aber auch vor Zellen artgleicher Individuen zu schützen versuchen (Du, 2000).

Das Immunsystem der Wirbeltiere, im Speziellen das der Säuger als am weitest entwickelter Gruppe hebt sich in vielen Punkten von dem der Invertebraten ab. Als herausragendes Charakteristikum ist sicherlich die spezifische oder erworbene Immunität zu sehen, die erst durch ein adaptives Immunsystem ermöglicht werden konnte.

Wie viele andere Metazoengruppen besitzen die Säuger neben der spezifischen Immunität eine angeborene, natürliche Immunität. Diese wird durch Komplement, Granulozyten, Makrophagen und Natürliche Killer- (NK-) Zellen vermittelt. Die natürliche Immunität ermöglicht einerseits einen unspezifischen, ersten Schutz gegen Mikroorganismen und andere Eindringlinge. Andererseits spielt sie eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von nachfolgenden, spezifischen Immunantworten des adaptiven Immunsystems.

Die antigenspezifischen Antworten werden durch die Aktivität der Lymphozyten generiert, die in den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten und darmassoziierten lymphatischen Geweben) durch Antigene (Ag) und Antigen-präsentierende Zellen (APC) initiiert wird. Bei Ag handelt es sich um Fremdstoffe, die eine spezifische Immunantwort induzieren oder das Ziel einer solchen sind (Abbas et al., 1997).

Da die Lymphozyten in dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielen, soll nachfolgend näher auf ihre beiden Untergruppen, die B- und T-Zellen, eingegangen werden.

Nach der Bildung im Knochenmark verbleiben die B-Zellen dort, um mit dem Ausreifungsprozess zu beginnen; die T-Zellen dagegen wandern vorher in den Thymus. Während der Reifung werden alle Lymphozyten, die eine Spezifität gegen körpereigene Ag besitzen, eliminiert oder anergisiert (klonale Deletion).

Nach seiner Reifung wandert der Lymphozyt in ein sekundäres lymphatisches Organ, wo er entweder mit einem Ag in Kontakt kommt oder nach einer gewissen Zeit stirbt. Dieses Ag muss an seiner Rezeptorbindungsstelle (Epitop) so beschaffen sein, dass es zum Rezeptor des Lymphozyten passt. Trifft der Lymphozyt ein für ihn spezifisches Ag an, so wird er unter optimalen Bedingungen zur Proliferation angeregt (klonale Selektion). Während der anschließenden klonalen Expansion entstehen viele identische Klone. Diese sind letztendlich für die Beseitigung der Ag bzw. der Ag-tragenden Zellen verantwortlich.

### 1.1 B-Zellen

Eine naive B-Zelle, die so genannte Immunglobulin (Ig)-Moleküle als B-Zell-Rezeptoren (BZR) auf der Zelloberfläche trägt, differenziert nach der klonalen Selektion zu einer Plasmazelle. Als solche produziert sie große Mengen an Ag-spezifischen Proteinen, den Antikörpern (Ak), die in das Medium, das die Zelle umgibt, abgegeben werden. Die Ak binden an die für sie spezifischen Ag-Epitope und induzieren auf verschiedene Art und Weise die Eliminierung des Ag. Da Ak hauptsächlich nur im Blutplasma und in extra-zellulären Flüssigkeiten zu finden sind, wird diese Art der Immunantwort auch humo-rale Antwort genannt.

Dem Aufbau aller Ak oder Immunglobuline liegt das gleiche Schema zugrunde: Zwei schwere und zwei leichte Polypeptidketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Jede der Ketten besteht aus einem variablen (V) und einem konstanten (C) Bereich. In den V-Bereichen liegen die zwei Ag-Bindungsstellen des Ak, mit den C-Bereichen sind Effektorfunktionen verknüpft. Aufgrund der hohen Ag-Spezifität eines Ak besitzt dieser im Bereich der Antigenbindungsstelle eine einzigartige Aminosäure-abfolge, seinen Idiotyp (Id). In Abhängigkeit vom jeweils benutzten C-Region-Gensegment gibt es fünf Ig-Klassen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Diese lassen sich zum Teil in weitere Unterklassen aufteilen. So gibt es in der Maus die IgG-Klassen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3.

Unter dem Selektionsdruck von zahllosen Ag, dem die Säuger im Zuge der Evolution ausgesetzt waren, entwickelte sich die somatische Rekombination. Bei diesem Prozess

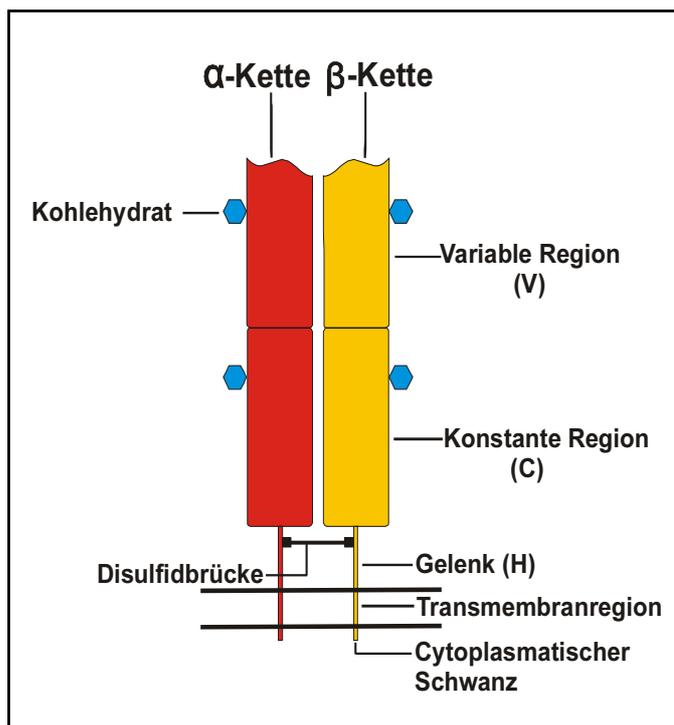
werden einzelne Gensegmente der genomischen DNS, die für die V- und C-Region des Ak kodieren, miteinander verbunden.

Die somatische Rekombination erlaubt es einem Individuum, zusammen mit somatischer Hypermutation, eine außerordentlich hohe Diversität von ungefähr  $10^{11}$  verschiedenen BZR bzw. Ak zu generieren (Davis & Bjorkman, 1988).

Neben der Fähigkeit zur Induktion einer humoralen Immunantwort sind B-Zellen aber auch an anderen Interaktionen des Immunsystems beteiligt. So sind sie in der Lage, als APC der zweiten Lymphozytengruppe, den T-Zellen antigene Peptide zu präsentieren und die T-Zellen zu aktivieren.

## 1.2 T-Zellen

Nach einer erfolgreichen Aktivierung vermitteln T-Zellen eine zelluläre Immunantwort, da ihr Ag-Rezeptor, der T-Zell-Rezeptor (TZR), immer als membrangebundenes Molekül exprimiert wird. Er besteht aus zwei Glykoproteinketten  $\alpha$  und  $\beta$  oder  $\gamma$  und  $\delta$ , die miteinander über eine Disulfidbrücke verbunden sind und jeweils eine variable (V), eine konstante (C), eine Gelenk- (H) und eine Transmembranregion besitzen, an die sich ein cytoplasmatischer Schwanz anschließt (Abbildung II-1).



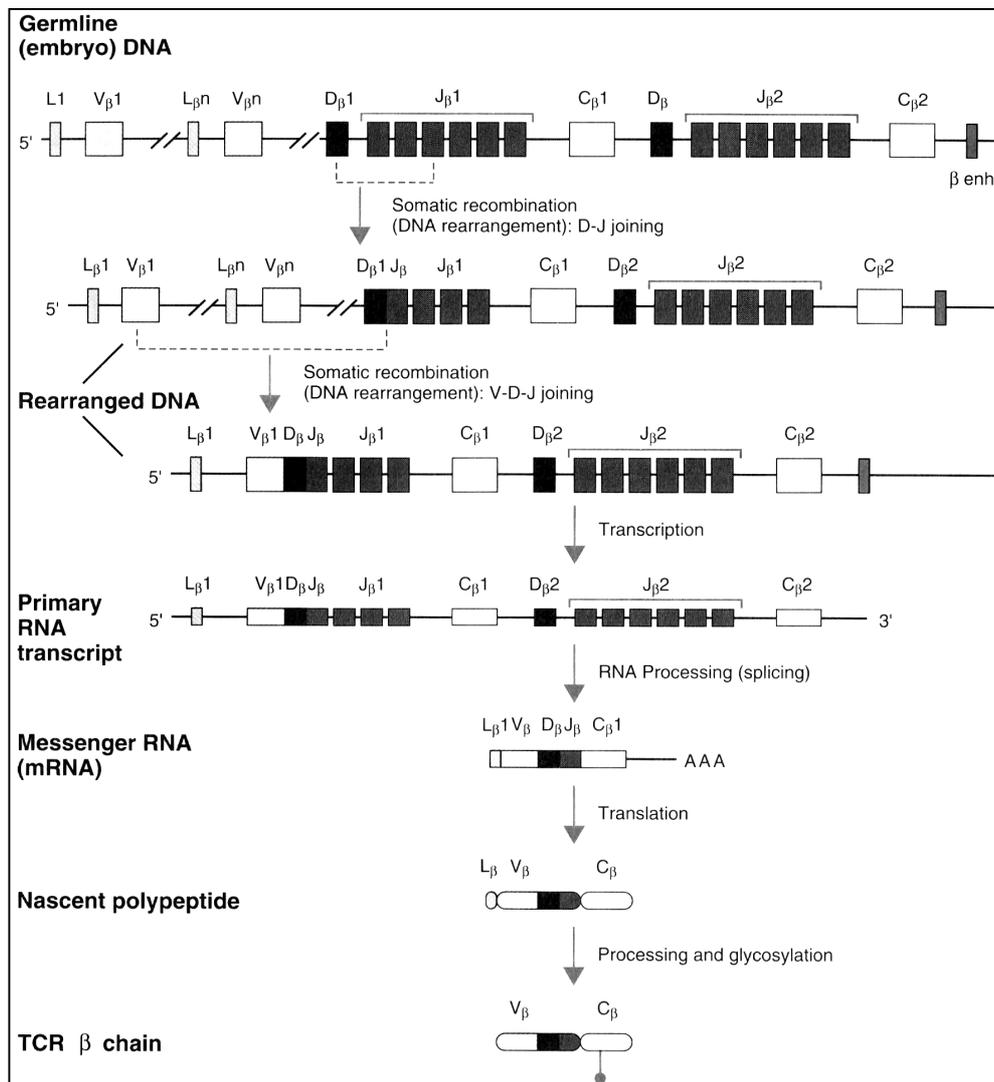
**Abbildung II-1:**

### Struktur eines $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors

Der Rezeptor ist ein membrangebundenes Heterodimer aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind.

(nach Janeway & Travers, 1997).

Die TZR- $\beta$ -Kette der Maus wird aus Anteilen der V- (variable), D- (diversity), J- (joining) und C-(constant) Gensegmente gebildet, die alle räumlich getrennt auf Chromosom 14 liegen (Abbildung II-2). Die V-Region des Rezeptors wird von den V-, D- und J-Gensegmenten kodiert, die C-Region mit dem Gelenk und den Transmembran- und cytoplasmatischen Bereichen von den C-Gensegmenten. Bei der  $\alpha$ -Kette, deren Gensegmente auf Chromosom 6 liegen, fehlen die D-Segmente.



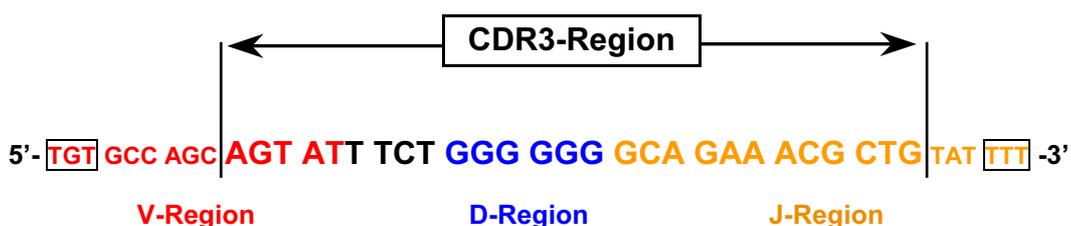
**Abbildung II-2: Rekombination, Transkription und Synthese der  $\beta$ -Kette eines TZR in der Maus**

Nach den Umlagerungen der D-J- und V-D-J-Gensegmente, bei welchen nicht benötigte Segmente deletiert werden, wird das C-Gensegment und die Leader-Peptid-Sequenz durch Spleißen auf RNS-Ebene mit der V-D-J-Gruppe verknüpft.  
 enh: Enhancer; L: Leader-Peptid; (aus Abbas et al., 1997)

Der  $\beta$ -Ketten-Locus, welcher 700-800kb umfasst, enthält im V-Bereich 20 bis 30 Gen-segmente (abhängig vom Mausstamm); an diese schließen sich in 3'-Richtung tandem-artig zwei D-J-C-Gruppen an; jede besteht aus einem D-, sechs J- und einem C-Segment (Abbildung II-2, S. 14).

Bei der somatischen Rekombination wird zuerst ein D- mit einem J-Segment zu einer D-J-Gruppe verknüpft, die dann mit einem V-Segment zu einer V-D-J-Gruppe verbunden wird. Während dieses Umlagerungsprozesses werden an den Verknüpfungsstellen durch die terminale Desoxynukleotidyltransferase sogenannte N-Nukleotide zufällig eingefügt. Durch diese Vorgänge besitzen die Verknüpfungsstellen eine sehr hohe Variabilität.

Da der TZR, genauso wie der BZR, eine Vielzahl von antigenen Strukturen erkennen muss, hat sich hier, analog zur BZR-Situation, die somatische Rekombination als Mechanismus durchgesetzt, um eine hohe TZR-Diversität zu generieren. Jedoch kommt es bei der TZR-Bildung zu keiner somatischen Hypermutation; die Diversität wird vor allem über die Variabilität in der sogenannten CDR3-Region (complementarity-determining region 3) erreicht. Sie erstreckt sich über die Verknüpfungsbereiche der V-, D- und J-Gensegmente und kodiert für die Antigenbindungsstelle (Abbildung II-3).



**Abbildung II-3: Die Lage der CDR3-Region innerhalb der umgelagerten V $\beta$ -Kette eines TZR.**

Die CDR3-Region erstreckt sich über die V-D-J-Verknüpfungsstellen der  $\beta$ -Kette. *Per definitionem* beginnt sie an der dritten AS nach dem konservierten Cys im V-Gensegment (eingerahmt) und endet eine AS vor dem konservierten Phe-Gly-X-Gly-Motiv im J-Gensegment (erste AS eingerahmt). Sie umfasst fünf bis zwölf AS in Abhängigkeit von der Anzahl der eingefügten N-Nukleotide und der Anzahl der deletierten Basen bei den Umlagerungsprozessen. Die großgedruckten Basen sind der CDR3-Region zugehörig, die kleineren gehören zum angrenzenden V- bzw. J-Gensegment. Die eingefügten N-Nukleotide sind schwarz gekennzeichnet. Die Dreiergruppen der Basen entsprechen dem Leseraster.

AS: Aminosäure; Cys: Cystein; Gly: Glycin; Phe: Phenylalanin X: beliebige AS.

(Die Sequenz in diesem Beispiel wurde im Rahmen dieser Arbeit bestimmt und stammt aus einer Triom-immunisierten Maus nach neun Stimulationen mit A20-Zellen. Es handelt sich um die V $\beta$ 6- und J $\beta$ 2.3-Gensegmente (s. Tabelle V-5, S. 75).)

Ein weiterer Mechanismus, der für die TZR-Diversität eine bedeutende Rolle spielt, beinhaltet die unterschiedlichen Paarungsmöglichkeiten zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des TZR. Durch das Zusammenwirken aller Komponenten kommt es zu einem TZR-Repertoire von  $10^{15}$  unterschiedlichen Spezifitäten (Davis & Bjorkman, 1988).

Im Gegensatz zur B-Zelle ist die T-Zelle nur in der Lage, ein Ag zu erkennen, wenn ihr dieses Ag in Form prozessierter Peptide durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) präsentiert wird. Damit die T-Zelle aber nicht anergisiert, sondern aktiviert wird, bedarf es zusätzlich eines kostimulatorischen Signals von der APC z.B. über die B7.1/ 7.2- (CD80-/ CD86-) Moleküle, die mit dem CD28-Molekül der T-Zelle in Kontakt treten.

Die von der APC gebildeten Ag-Peptide werden der T-Zelle im Zusammenhang mit sogenannten MHC- (major histocompatibility complex) Molekülen präsentiert.

Diese werden von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes kodiert und in zwei Klassen, MHC-I und MHC-II, eingeteilt. Während MHC-I-Moleküle im Allgemeinen Peptide von intrazellulären Ag präsentieren, werden Ag, deren Peptide von MHC-II-Molekülen präsentiert werden, vorher von APC (Dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen) aus dem Extrazellulärraum durch Endo- oder Phagozytose aufgenommen.

Die Interaktion der T-Zelle mit dem MHC-Peptid-Komplex auf der APC wird durch Korezeptoren stabilisiert. Dabei gibt es für die Moleküle jeder MHC-Klasse eine eigene Korezeptorklasse: An MHC-I bindet der CD8-, an MHC-II bindet der CD4-Rezeptor. Die CD4- und CD8-Moleküle werden auf funktionell unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen exprimiert, die dementsprechend als CD4- bzw. CD8-T-Zellen bezeichnet werden.

Den CD8-T-Zellen kommt bei der Immunantwort hauptsächlich eine zytotoxische Rolle zu. Deswegen werden sie auch als zytotoxische T-Zellen (CTL) bezeichnet. Die CD4-T-Zellen übernehmen größtenteils regulatorische Funktionen und werden auch als T-Helferzellen bezeichnet. Entsprechend dem Zytokinspektrum, das sie freisetzen, werden sie in Th1- und Th2-Zellen eingeteilt. Th1-Zellen führen zu einer zellulären Immunantwort, Th2-Zellen dagegen stimulieren B-Zell-Aktivitäten und dadurch eine humorale Immunantwort.

Durch die B- und T-Zellen besitzt das adaptive gegenüber dem natürlichen Immunsystem einen weiteren Vorteil: Während der erfolgreichen Abwehr eines Eindringlings oder Entfernung eines Ag werden Ag-spezifische Gedächtniszellen gebildet, die über lange Zeiträume im Körper des Individuums verbleiben. Treffen sie erneut auf spezifische antigene Strukturen, können sie eine schnellere und effektivere Immunantwort als beim erstmaligen Aufeinandertreffen mit dem Ag einleiten.

## 2. Krebs und Tumoren

Unter „Krebs“ lassen sich viele verschiedene bösartige Erkrankungen zusammenfassen, bei denen ein klonales Wachstum körpereigener Zellen zur Tumorbildung führt. Durch ihre Entartung entziehen sich diese Zellen den normalen Kontrollmechanismen im Organismus.

Die Tumorentwicklung ist ein fortschreitender Prozess, der formal als Analogie zur Darwinschen Evolutionstheorie gewertet werden kann. Bei diesem Prozess kommt es zu aufeinander folgenden, sich anhäufenden genetischen Veränderungen der Zellen, wobei jede Mutation zu einem unterschiedlich großen Wachstumsvorteil führt. Gleichzeitig vollführen die anfangs normalen Zellen eine progressive Umwandlung zu malignen Krebszellen (Foulds, 1954; Nowell, 1976; Hanahan & Weinberg, 2000).

Die genetischen Veränderungen der Zellen können verschiedene Ursachen haben, z.B.:

- Vererbte Gendefekte
- Karzinogene Substanzen in der Umwelt und UV-Strahlung
- Virusinfektionen

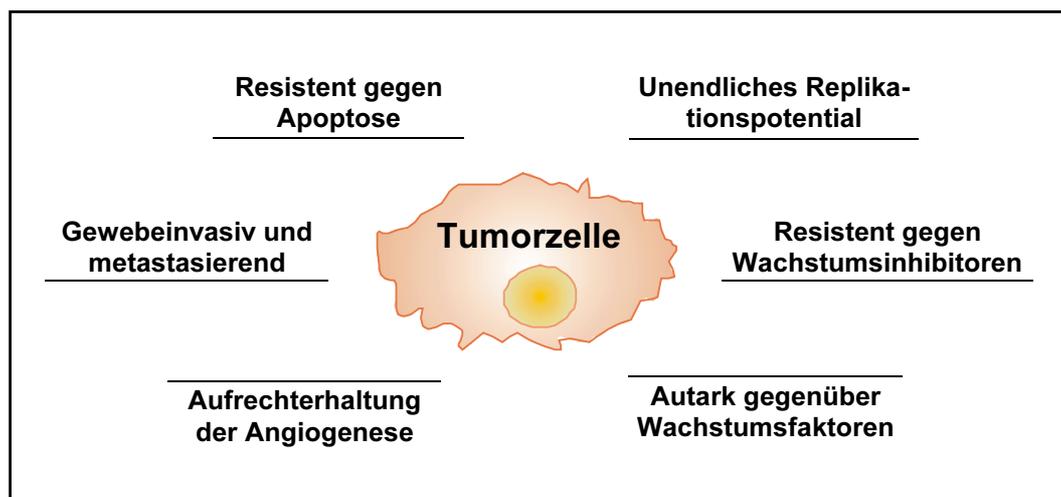
Wenn Gene betroffen sind, die an DNS-Reparaturmechanismen beteiligt sind, kommt es zu erhöhter Mutagenität im Genom und genetischer Instabilität (Lengauer et al., 1998). Zum Beispiel ist inzwischen bekannt, dass in den meisten humanen Krebsformen die p53-Signaltransduktionskette nicht einwandfrei funktioniert (Levine, 2001).

In der malignen Zelle kommt es zu verschiedenen Veränderungen, wie z.B.:

- Hochregulation von Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\alpha$  (tumor growth factor  $\alpha$ ) (Rusch et al., 1977) und Her2/ neu (Slamon et al., 1987)

- Herabregulation des Rezeptors für den Wachstumshemmer TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) (Markowitz et al., 1995)
- Mutationen im p53-Tumorsuppressor-Gen (Harris, 1996)  
Hochregulation des bcl-2-Onkogens (Korsmeyer, 1992)
- Hochregulation des Telomerase-Enzyms (Shay & Bancchetti, 1997)
- Hochregulation des Angiogenese-Wachstumsfaktors VEGF (vascular endothelial growth factor) (Rak et al., 1995)
- Inaktivierung des Zelladhäsionsmoleküls E-cadherin (Christofori & Semb, 1999)

Durch diese Mechanismen erwirbt jede Tumorzelle im Laufe ihrer Entwicklung charakteristische Fähigkeiten, die sich in unterschiedlich starker Ausprägung manifestieren können (Hanahan & Weinberg, 2000); sie sind in Abbildung II-4 dargestellt.



**Abbildung II-4: Die herausragenden Eigenschaften von Krebszellen**  
(nach Hanahan & Weinberg, 2000)

Es ist bekannt, dass viele Tumoren Ag exprimieren, gegen die man eine Immunantwort induzieren kann (Coulie, 1997; van den Eynde & van der Bruggen, 1997).

Diese Ag kann man in unterschiedliche Kategorien einteilen:

- Gewebe-spezifische Ag, z.B. MART-1, Tyrosinase
- Tumorspezifische Ag, z.B. B-Zell-Rezeptor-/ T-Zell-Rezeptor-Id
- Embryonale Proteine, z.B. MAGE-Familie, WT-1
- Alterierte Onkogene oder Tumor-Suppressor-Gene, z.B. p53, HER2/ neu, bcr/ abl

- Mutierte Genprodukte, z.B.  $\beta$ -Catenin, Caspase-8, p53
- Virale Genprodukte, z.B. HPV-16

Eine zentrale Eigenschaft von Krebs ist seine Fähigkeit, sich den regulatorischen Mechanismen des Immunsystems zu entziehen.

Dafür gibt es viele Möglichkeiten, wie z.B.:

- Schwache bis keine Expression von kostimulatorischen Molekülen  
(Schwartz, 1990; Chen et al., 1993; Baskar et al., 1996)
- Herabregulation von MHC-Molekülen (Banat et al., 2001)
- Defekte in der Ag-Prozessierung und -Präsentation (Tsioulis et al., 1993; Kaklamanis et al., 1995)
- Expression von Fas-Ligand an der Zelloberfläche und Resistenz gegen Fas-vermittelte Apoptose  
(Hahne et al., 1996; Gilboa, 1999; O'Connell et al., 1999)
- Produktion von immunsuppressiven Zytokinen, z.B. IL-10 (Groux et al., 1998)

### 3. Tumorbekämpfung durch Aktivierung des Immunsystems

Zusätzlich zu den chirurgischen Behandlungsmethoden, der Strahlentherapie und der Chemotherapie hat sich die Forschung in den letzten Jahren sehr stark auf die Tumorbekämpfung durch Gentherapie und die tumorspezifische Aktivierung des Immunsystems konzentriert. Dabei wurden viele unterschiedliche immuntherapeutische Ansätze entwickelt, die in Abhängigkeit von der behandelten Tumorart mehr oder weniger gute Erfolge einbrachten.

Einige Beispiele seien hier genannt:

- Adoptiver Transfer von tumorspezifischen T-Zellen  
(Rosenberg et al., 1986; Rosenberg et al., 1988; Rosenberg et al., 1994; Egeter et al., 2000)
- Aktive und passive Immunisierung mit modifizierten Ak  
(Tao & Levy, 1993; Hsu et al., 1997; Ruf & Lindhofer, 2001)

- Vakzinierung mit genetisch modifizierten, zytokinsezernierenden Tumorzellen (Dranoff et al., 1993; Tepper & Mule, 1994; Levitsky et al., 1996)
- Vakzinierung mit gentechnisch modifizierten Tumorzellen, die MHC- oder kostimulatorische Moleküle sezernieren (Chen et al., 1992; Plautz et al., 1993)
- Vakzinierung mit Tumor-DNS oder Tumor-Peptiden (Campbell et al., 1990; Irvine et al., 1996; Syrengelas & Levy, 1999)
- Vakzinierung mit DNS-/ RNS-transfizierten oder peptidbeladenen DC (Ashley et al., 1997; Ribas et al., 1999; Heiser et al., 2001a; Heiser et al., 2001b)

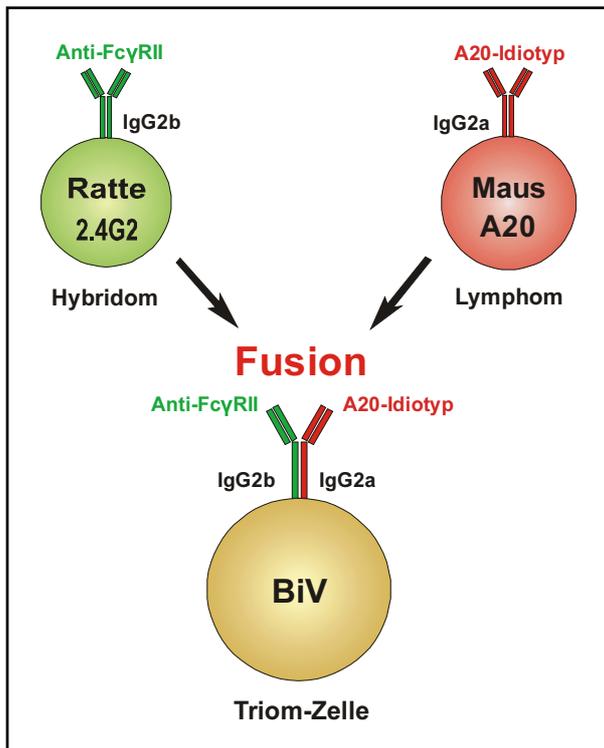
In der Laborgruppe von R. Mocikat wird schon seit mehreren Jahren an der spezifischen Immunisierung gegen B-Zell-Lymphome mit Hilfe sogenannter Triomzellen in präklinischen Mausmodellen gearbeitet.

### 3.1 Der Triomzell-Ansatz

Im Triomzell-Ansatz wird eine Lymphom-Zelle, z.B. das murine A20-B-Zell-Lymphom, mit einer xenogenen Hybridomzelle, dem 2.4G2-Rattenhybridom, fusioniert. Das Fusionsprodukt ist eine sogenannte BiV-Triomzelle. Das Lymphom exprimiert IgG2a mit dem A20-Id; das Hybridom produziert einen IgG2b-Ak (BiV-Protein) mit Spezifität gegen internalisierende Fc-Rezeptoren (Fc $\gamma$ RII) auf APC, die mit hoher Effizienz eine Immunantwort initiieren können (Mocikat et al., 1997).

Ursprünglich sollte in diesem Ansatz der Id des Lymphoms als tumorspezifisches Ag gegen APC redirigiert werden. Die Triomzelle bildet nämlich einen bispezifischen Ak, der aus IgG2a und IgG2b besteht. Wegen der präferenziellen Paarung der IgG2b-Ketten der Ratte mit den IgG2a-Ketten der Maus (Lindhofer et al., 1995) bilden die Triom-Zellen tatsächlich hohe Mengen des bispezifischen Ak (Abbildung II-5, S. 21).

Wenn man mit diesen Triom-Zellen eine Maus vakziniert, werden die bispezifischen Ak an APC redirigiert. Nach Bindung an Fc $\gamma$ RII auf der APC-Oberfläche wird der Id über adsorptive Endozytose von der APC aufgenommen. Das aufgenommene Tumor-Ag wird prozessiert, und Peptide werden über MHC-Moleküle dem Immunsystem präsentiert. T-Zellen werden aktiviert und sind bei einem Zusammentreffen mit Tumorzellen in der Lage, diese zu zerstören.

**Abbildung II-5: Der Triomzell-Ansatz**

Durch Fusion einer Hybridom- mit einer Lymphom-Zelle entsteht eine Triomzelle, die Eigenschaften der parentalen Zellen übernommen hat. 2.4G2: Ratten-Hybridom; A20: Maus-B-Zell-Lymphom; FcγRII: Fc-Rezeptor

Wie *In-vivo*-Mausversuche zeigten, erlangen syngene Mäuse nach einer BiV-Vakzinierung einen Langzeit-Tumorschutz (Mocikat et al., 1997) und können sogar etablierte Tumoren abstoßen (Strehl et al., 1999). Es zeigte sich jedoch, dass der Schutz *in vivo* nicht nur vom Id, sondern vor allem von anderen, noch unbekanntem Tumor-Ag abhängig ist (Kronenberger et al., 2002; R. Mocikat, pers. Mitteilung). Drei Eigenschaften scheinen für einen effektiven Tumorschutz wesentlich zu sein: (1) Die Xenogenität der Triomzelle, die zu deren schneller Lyse und zur verstärkten Präsentation von tumorassoziierten Ag führt, (2) die Bereitstellung einer breiten Palette von Tumor-Ag durch die Triom-Zelle, was eine polyvalente Immunantwort bedingt, (3) die Redirektion der Tumor-Ag, möglicherweise sogar der gesamten Triomzelle an APC.

Von großem Interesse ist nun, durch welche Mechanismen dieser Schutz vermittelt wird.

#### 4. Aufgabenstellung

Es ist gezeigt worden, dass für einen erfolgreichen Tumorschutz im Triomansatz sowohl CD4- als auch CD8-T-Zellen notwendig sind (Mocikat et al., 1997). Eine humo-

rale Antwort gegen den Id ist in geschützten Mäusen zwar nachweisbar, jedoch nur sehr schwach ausgeprägt (Mocikat et al., 1997).

In dieser Arbeit sollten daher Aspekte der zellulären Immunantwort untersucht werden. Grundsätzlich sollte geklärt werden, ob tumorspezifische T-Zellen nach Triom-Immunsierung nachweisbar sind, wie breit das Repertoire der aktivierten T-Zellen ist und ob es Hinweise auf die Ag-Spezifität der zellulären Antwort gibt. Im Einzelnen gab es folgende Fragestellungen:

1. Inwieweit lassen sich durch *In-vitro*-Stimulation tumorspezifische T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen anreichern?

Dazu sollten T-Zellen unterschiedlicher Herkunft auf unterschiedliche Art und Weise *in vitro* stimuliert werden; gleichzeitig sollten sie bezüglich einer tumorspezifischen Aktivierung untersucht werden.

2. Welche Rolle spielt der A20-Id als tumorspezifisches Ag bei der *In-vitro*-Stimulation der T-Zellen?

Diese Frage sollte mit Id-defizienten bzw. ausschließlich den Id exprimierenden Zellen untersucht werden.

3. Wie verhält sich der Phänotyp der T-Zell-Populationen während der *In-vitro*-Stimulation?

In früheren Experimenten war beobachtet worden, dass durch Stimulation *in vitro* sowohl CD8- als auch CD4-T-Zellen entstehen können.

4. Kommt es während der *In-vitro*-Stimulationen zu einer Veränderung im TZR-Repertoire der T-Zellen?

Es ist bekannt, dass durch Ag-spezifische Stimulation das TZR-Repertoire stark eingeschränkt wird. Dies trifft vor allem auf zytotoxische CD8-T-Zellen zu.

5. Wie verhalten sich die *in vitro* stimulierten T-Zellen nach einem adoptiven Transfer *in vivo*?

Man weiß, dass durch *In-vitro*-Stimulation gewonnene T-Zellen auch *in vivo* eine Tumorspezifität zeigen. Diesem Sachverhalt sollte durch adoptive Transferversuche nachgegangen werden.

## III MATERIAL

### 1. Molekularbiologie

#### 1.1 Vektoren, Konstrukte, Bakterien

- BCMGSNeo, Vektor Karasuyama et al., 1990
- pTracer-CMV, Vektor Invitrogen (Karlsruhe)
- scA20, single-chain-Konstrukt aus den variablen Regionen der schweren und leichten Ig-Kette des A20-Lymphoms von M. Hallek, Genzentrum d. LMU
- Kompetente Zellen *E. coli*, JM 83 Vieira und Messing, 1982
- Kompetente Zellen *E. coli*, TOP 10 Invitrogen (Karlsruhe)

#### 1.2 Oligonukleotide

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Oligonukleotide von Herrn Linzner, GSF-Institut für Pathologie, mit einer ABI-Synthesemaschine hergestellt.

Sämtliche Primer sind in 5'→3'-Richtung angegeben.

#### - Primer für die RNS-Umschreibung:

Oligo-dT(15) von Mailhammer, GSF

#### - Primerauswahl I für die TZR-PCR:

5'-Primer:

165: GCT/ CG/ ATGTA~~CT~~TCTGTGC

166: GCTGTGTATCTC/ GTGTGC

167: GCACTGTAC/ GCTCTGTGC

168: GGCTTATATCTCTGTGG

169: GCTGTCTATTTTTGTGC

170: GCCGTTTTTCTCTGTGC

171: TCAGTGTACTTCTGTGC

172: GCCACATACTTCTGTGC

173: ACTGTGTACTTTTTGTGC

174: GTGTTATACCTCTGTGC  
175: GCACTGTACTTGTGCTC  
176: GCGGTGTATCTTTGTGC  
177: GG/ CCAC/ TCTATCTCTGTGC  
178: GCTGTATATTTCTGTGC  
179: TCTG/ TTGTA CT TCTGTGC  
180: TTCATGTACTTCTGGGC  
181: AGTATCTATTTCTGTAG  
182: ACATTGCACTTCTGTGC  
183: GCCATGTACCTCTGTGC  
184: GAGCTATACTTCTGTGC  
185: GGCTTCTACCTCTGTGC  
186: AGAACCTTGTACTGCAC

3'-GC Primer:

CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCC  
GCCCCGCCGGTTTGTTTGCAATTCTGC

alle Labor Mocikat

Die Produktlänge beträgt ca. 145-147bp.

- **Primerauswahl II für die TZR-PCR:**

5'-Primer:

BV1, BV2, BV3.1, BV4, BV5.1, BV5.2, BV6,  
BV7, BV8.1, BV8.2, BV8.3, BV9, BV10, BV11,  
BV12, BV13, BV14, BV15, BV16, BV18, BV20

Pannetier, 1993

3'-Primer:

BC1

Offermans et al., 1995

Am 5'-Ende des 3'-Primers befindet sich eine 40bp lange GC-Klammer (s. oben),  
durch die ein Einsatz der PCR-Produkte in der DGGE ermöglicht wird.

Die Produktlänge beträgt zwischen 188 und 265bp.

**- Primer für das scA20-Konstrukt im pTracer-CMV-Vektor:**

5'-Primer:

ACTTAAGATGGCATCGAACTTCATCATGGT von D. Edbauer

3'-A-Primer:

GCTCTTCTACCGTTTGACTTCCAGCTTGGTGCC von D. Edbauer

Die Produktlänge beträgt 810bp.

3'-B-Primer:

ATTCAAGGCCTCGGCCAGGCTTCTGTTTA Kronenberger

Dieser Primer wurde für die Sequenzierung des pTracer-CMV-Vektors ausgewählt.

**- Primer für die  $\beta$ -Aktin-Kontroll-PCR:**

5'Primer:

GTCACCCACACTGTGCCCATCT Murata et al., 1997

3'-Primer:

ACAGAGTACTTGCGCTCAGGAG Murata et al., 1997

Die Produktlänge beträgt 542 bp.

**- Markierte Primer für die Sequenzierung der TZR-Sequenzen:**

Synthese durch Amersham-Pharmacia, Freiburg

3'-biotin: Biot-GCTATAATTGCTCTCCTTGTAGG Offermans et al., 1995

3'-CY5: CY5-CTTGGGTGGAGTCACATTTCTC Kronenberger

**1.3 Reagenzien, Enzyme, Puffer**

1kb-plus DNS-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
10x-Puffer B für die PCR	Promega, Mannheim
Agar	Difco, Detroit (USA)
Agarplatten mit Amp.	nach Mülhardt, 1999
Agarose, Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau, 2%ig	Merck, Darmstadt
1-Brom-3-Chlor-Propan	Sigma, Deisenhofen

BSA	Amersham-Pharmacia, Freiburg
ddNTPs	Amersham-Pharmacia, Freiburg
DEPC	Sigma, Deisenhofen
Dextranblau	Amersham-Pharmacia, Freiburg
dNTPs	Amersham-Pharmacia, Freiburg
DNS-Auftragspuffer, 2x: 0,05% Xylencyanol, 0,05% Bromphenolblau, 70% Glycerin	nach Biorad, München
DTT	Amersham-Pharmacia, Freiburg
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 10mg/ ml	Merck, Darmstadt
Glycerin, 87%ig	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O-DEPC	nach Mülhardt, 1999
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Hefe-tRNS	Roche, Penzberg
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
LB-Medium	nach Mülhardt, 1999
Magnesiumchlorid	Quiagen, Hilden
Magnetpartikel Dynabeads M-280 Streptavidin	Dynal, Oslo
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, 1M	Merck, Darmstadt
Polyacrylamid-Gel ReproGel™-high resolution	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Q-Solution	Quiagen, Hilden
Restriktionsenzym PvuI + Puffer 3	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Reverse Transkriptase Superscript II + First Strand-Puffer + DTT	Invitrogen, Karlsruhe
Ribonukleasehemmer RNasin	Promega, Mannheim
Salzsäure, 1M	Merck, Darmstadt
T7 DNS-Polymerase	Amersham-Pharmacia, Freiburg

TAE, 1x	nach Mülhardt, 1999
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
TBE, 1x	nach Mülhardt, 1999
TE-Puffer	nach Mülhardt, 1999
TRI-Reagent™	Molecular Research Center, Cincinnati (USA)
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	10mM, pH 8,5
Trypton	Difco, Detroit (USA)
Xylencyanol, 2%ig	Merck, Darmstadt

#### 1.4 Geräte und Hilfsmittel

Brutschrank BM 400	Memmert, Schwabbach
Einmalpipetten, 5/ 10/ 25ml	Greiner, Frickenhausen
Eismaschine AF 100AS	Scotsman, Mailand, (Italien)
Gefriertruhe/ -schrank	Liebherr, Ochsenhausen
Gelapparatur DNA Sub Cell	Biorad, München
Gelapparatur Geltray	Renner, Dannstadt
Geldokumentationssystem Gelprint 2000i	Biophotonics, Ann Arbor (USA)
Heizblock, DB-2A	Techne, Cambridge (UK)
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Laborwaage B6	Mettler, Giessen
Laborwaage P 120	Mettler, Giessen
Laborwaage PC 440	Mettler, Giessen
Magnetrührer IKA RCT	Bachofer, Reutlingen
Magnetschiene	Dynal, Oslo
Mikrowellengerät FM 3510	Moulinex, Frankreich
Netzgerät Consort E 425	Bachofer, Reutlingen
QuiaQuick Gel-Extraktions-Kit	Quiagen, Hilden
PCR-Thermocycler Hybaid TouchDown	Labsystems, Frankfurt

pH-Meter pH391	WTW, Weilheim
Parafilm M	Am. National Can, Chicago (USA)
Pipetten Eppendorf/ Gilson	GSF-Zentrallager Neuherberg
Pipettenspitzen Gilson/ Greiner	GSF-Zentrallager Neuherberg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra, Eschenbach, Schweiz
Plasmid Midi Kit	Quiagen, Hilden
Polymerisationsgerät ReproSet™	Amersham- Pharmacia, Freiburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttler TR 125	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Schüttler Vortex Genie 2	Bachofer, Reutlingen
Sequenziergerät ALFexpress™	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Spektralphotometer DU 640	Beckmann, München
Terasaki-Platten	Greiner, Frickenhausen
Thermodrucker UP-D860E	Sony, Köln
Tischzentrifuge Hettich Mikroliter	Bachofer, Reutlingen
Tischzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, München
UV-Transilluminator, 366nm	Bachofer, Reutlingen
Wasserbad Julabo U3	Bachofer, Reutlingen
Zentrifuge IEC 6000B	IEC, Bedfordshire (UK)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, München
Zentrifuge Sorvall RC 5B + Rotor SS34	DuPont, Bad Homburg

## 2. Zellkultur

### 2.1 Murine Lymphome

A20: B-Zell-Lymphom; Ak-Isotyp: IgG2a	Kim et al., 1979 (ATTC TIB-208)
A20Id: A20-Idiotypverlustmutante	Kronenberger & Ellwart
MPC11: B-Zell-Lymphom; Ak-Isotyp: IgG2b	Laskov & Scharf, 1970 (ATTC CCL-167)
EL4: T-Zell-Lymphom	Shevach et al., 1972 (ATTC TIB-39)

## 2.2 Hybridome und Triome

2.4G2: Hybridom mit Spezifität gegen

Maus FcγRII, Isotyp: Ratte-IgG2b Unkeless, 1979 (ATTC HB-197)

BiV: Triom aus Rattenhybridom 2.4G2 und A20 Mocikat et al., 1997

Ag20: Hybridom aus Ag8-Mausmyelom und A20 A. Dieckmann, pers. Mitteilung

## 2.3 Medien

Einfrüermedium: 90% FKS inakt. + 10% DMSO

Basismedium: RPMI 1640 ohne L-Glutamin  
5% FKS inaktiviert  
100U/ ml Pen/ Strep  
5ml L-Glutamin (200mM)  
5ml Natriumpyruvat ( 100mM)  
5ml nichtess. Aminosäuren (100x)  
500µl 2-Merkaptoethanol ( 50mM)

T-Zell-Medium: Basismedium,  
jedoch mit 10% FKS inakt.

Zeocin-Selektionsmedium für MPC11-  
scA20-Transfektanten: Basismedium, jedoch mit 10%  
FKS inakt. und 400µg/ ml Zeocin

G418- Selektionsmedium für MPC11-  
scA20/ BCMGSNeo-Transfektanten: Basismedium, jedoch mit 10%  
FKS inakt. und 800µg/ ml Geneticin

## 2.4 Proteine

**BiV-Protein:** Ak der BiV-Zellen, durch Säulenchromatografie aufgereinigt, für die T-  
Zell Stimulation *in vitro*.

**Ag20-Protein:** Ak des A20-Lymphoms, der von Ag20-Zellen produziert wird, durch Säulenchromatografie aufgereinigt, für die T-Zell Stimulation *in vitro*.

## 2.5 Reagenzien, Enzyme, Puffer

2-Merkaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Geneticin	Invitrogen, Karlsruhe
IL-2, human	Amersham-Pharmacia, Freiburg und ICN, Eschwege
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Lysepuffer, NH <sub>4</sub> Cl, 10x	nach Becton-Dickinson, Heidelberg
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.6 Geräte und Hilfsmittel

Bestrahlungsanlage <sup>137</sup> Cs, HWM-D-2000	Gammacell, Ottawa (Kanada)
Brutschrank, Auto-Zero	Heraeus, München
Einmalpipetten, 5/ 10/ 25ml	Greiner, Frickenhausen
Elektroporator, Gene Pulser	Biorad, München
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Handschuhe, Latex	SafeSkin, Neufahrn
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Kulturplatten, 6-/ 24-/ 96-Loch	Greiner, Frickenhausen

Lichtmikroskop, Auflicht	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop, Durchlicht	Zeiss, Göttingen
Mehrkanalpipette, Transferpette	Brand, Wertheim
Mehrkanalpipette, Multistepper	Labsystems, Helsinki (Finnland)
Neubauer-Zählkammer	Laborteam K&K, München
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipetten, Gilson	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Pipettierhilfe, Pipetus akku	Hirschmann, Eberstadt
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Sterilfilter, 0,2µm	Nalgene, Rochester (USA)
Wasserbad	Memmert, Schwabbach
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, München

### 3. Immunologie

#### 3.1 Antikörper

##### Spezies-Spezifität, Markierung (Klon)

Hamster-anti-Maus-TZR $\alpha/ \beta$ , FITC (H57)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Hamster-anti-Maus-TZR $\gamma/ \delta$ , PE (GL3)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Hamster-anti-Maus-CD3, PE (145-2C11)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Maus-anti-Maus-MHC I, FITC (HB87)	ATCC, Manassas (USA)
Maus-anti-Maus-MHC II, FITC (HB3)	ATCC, Manassas (USA)
Ratte-anti-human-CD11a, FITC (25.3)	Beckman-Coulter, Krefeld
Ratte-anti-Maus-A20Id, unmarkiert (6C10)	Kremmer, GSF-Hämatologikum
Ratte-anti-Maus-A20Id, Biotin (6C10)	Kremmer, GSF-Hämatologikum
Ratte-anti-Maus-CD3, FITC (17A2)	R. McDonald
Ratte-anti-Maus-CD4, PE (GK1.5)	Dianova, Hamburg
Ratte-anti-Maus-CD8, PE (Ly2)	Becton-Dickinson, Heidelberg

Ratte-anti-Maus-CD40, Biotin (3/ 23)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Ratte-anti-Maus-CD80, Biotin (1G10)	Dianova, Hamburg
Ratte-anti-Maus-CD86, Biotin (GL 1)	ATCC, Manassas (USA)
Ratte-anti-Maus-GM-CSF, unim. (MP1-22E9)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Ratte-anti-Maus-GM-CSF, Biotin (MP1-31G6)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Ratte-anti-Maus-IgG2a, Biotin (R19-15)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Ratte-anti-Maus-IgG (H+L), Pox	Jackson, West Grove (USA)
Ratte-anti-Maus-Pan-NK-Zellen, PE (DX5)	Becton-Dickinson, Heidelberg

### 3.2 Reagenzien und Puffer

1,2-Benzoldiamindihydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Ak-Puffer	90% PBS + 10% FKS
Avidin-Pox	Becton-Dickinson, Heidelberg
Carbonatpuffer für ELISA	0,1M NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,5
FACS-Puffer	98% PBS + 2% FKS + 1% Azid
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30% ig	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
Substratpuffer für ELISA	0,1M Tris-Citrat, pH 5,0
PBS	Biochrom, Berlin
Propidiumjodid	ICN, Eschwege
Streptavidin-PE	Dianova, Hamburg
Tween 20	ICN, Eschwege
Waschpuffer für ELISA	2‰ Tween in PBS

### 3.3 Geräte und Hilfsmittel

Brutschrank BM 400	Memmert, Schwabbach
CellQuest, FACS-Software	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipetten, 5/ 10/ 25ml	Greiner, Frickenhausen
ELISA-Lesegerät, Easy Reader SFplus	SLT, Altdorf (Österreich)
ELISA-Platten, Maxi-Sorp	Nunc, Wiesbaden

FACS-Röhrchen	M&B Stricker, Oberschleißheim
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzcytometer, FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Magnetrührer IKA RCT	Bachofer, Reutlingen
Mehrkanalpipette, Transferpette	Brand, Wertheim
pH-Meter pH391	WTW, Weilheim
Pipetten Eppendorf/ Gilson	GSF-Zentrallager Neuherberg
Pipettenspitzen Gilson/ Greiner	GSF-Zentrallager Neuherberg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra, Eschenbach, Schweiz
Plattenzentrifuge Labofuge 6000	Heraeus, München
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttler Vortex Genie 2	Bachofer, Reutlingen
Tischzentrifuge Hettich Mikroliter	Bachofer, Reutlingen

## 4. Tierexperimente

### 4.1 Mäuse

Es wurde mit einem Inzuchtstamm gearbeitet; alle zu einem Stamm gehörigen Mäuse besitzen denselben Genotyp, sie sind syngen. Alle Mausversuche wurden im Tierstall des Hämatologikums durchgeführt.

Stamm:	BALB/ c
MHC I/ II-Haplotyp:	H-2 <sup>d</sup> / I-A <sup>d</sup>
Theta-Allotyp:	Thy-1.2
Bezug:	Bomholtgaard, Ry (Dänemark)

### 4.2 Reagenzien

Et-OH	GSF-Zentrallager Neuherberg
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbeccos ME-Medium (1x)	Invitrogen, Karlsruhe

### 4.3 Geräte

Einmalspritze	Braun Melsungen, Melsungen
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanüle	Becton Dickinson, Heidelberg
Petrischale	Greiner, Frickenhausen
Pinzette	Laborteam K&K, München
Schere	Laborteam K&K, München
Sieb	Laborteam K&K, München

## IV METHODEN

### 1. Molekularbiologie

Soweit nachfolgend nicht anders angegeben, wurden alle Proben und Lösungen bei -20°C aufbewahrt.

Alle Pipettierschritte wurden auf Eis ausgeführt, soweit in den entsprechenden Protokollen nicht anders angegeben.

#### 1.1 Plasmidtransformation

Die Transformationen wurden nach dem von Invitrogen für E.coli-TOP10-Zellen angegebenen Protokoll durchgeführt.

Während für die erste Transformation *E. coli* JM83 verwendet wurden, die vorher kompetent gemacht worden waren, kamen für die zweite bereits kompetente *E. coli* TOP10 zum Einsatz.

Für das Ausplattieren der Bakterien wurden LB-Medium-Agarplatten verwendet, denen als Selektionsreagenz Ampicillin (100µg/ml) zugesetzt worden war. Es wurden 10µl bzw. 100µl Bakteriensuspension je Platte ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Frühestens am darauf folgenden Nachmittag wurde eine Übernachtskultur angesetzt, die mit einer einzigen Bakterienkolonie von der Agarplatte beimpft worden war. Diese wurde für die Plasmidisolierung verwendet.

#### 1.2 Plasmidisolierung und Linearisierung

Die Isolierung wurde mit dem Plasmid-Midi-Kit nach Quiagen-Protokoll durchgeführt. Das Prinzip basiert auf der alkalischen Lyse mit NaOH und SDS, wobei die Plasmid-DNS anschließend über ein Anionenaustauscherharz gebunden und von den restlichen Zellbestandteilen getrennt wird.

Das Sediment wurde nach Et-OH-Waschung in 100µl TrisHCl, 10mM, pH 8,5 gelöst.

Von dem darin enthaltenen Plasmid wurden 5µg nach folgendem Protokoll linearisiert:

In einem 50µl-Ansatz wurde das 5µg entsprechende Volumen zusammen mit 5µl BSA (Endkonzentration 100ng/µl), 5µl Puffer 3 (10x), 2µl Pvu I (5U/µl) und H<sub>2</sub>O dest. ad 50µl bei 37°C 90 bis 180 Min inkubiert.

Anschließend wurden davon 5µl auf ein 1%-Agarosegel geladen, um die Effizienz des Verdau feststellen zu können.

Die Plasmidfällung erfolgte nach Zugabe von 0,1 Volumenteilen 3M K-Acetat, pH 5,8 und 0,6 Volumenteilen Isopropanol bei Raumtemperatur innerhalb von 5 Min..

Danach wurde nach 15-minütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm in der Tischzentrifuge das Sediment mit 2 Volumenteilen Et-OH 70% gewaschen. Nach 10 Min. Zentrifugation wurde das Sediment in 20µl TE-Puffer gelöst.

### 1.3 RNS-Extraktion und Mengenbestimmung

Die RNS-Extraktion erfolgte aus  $2 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen, je nach zur Verfügung stehender Zellzahl.

Als Isolierungsreagens wurde TRI-Reagent™ verwendet, in dem Phenol und Guanidin-Iso-Thiocyanat enthalten sind (bis zu  $10^6$  Zellen in 200µl). Damit ist eine Trennung der Zellbestandteile in RNS, DNS und Proteine möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nur die RNS isoliert. Zur verbesserten Sedimentation der RNS während der Extraktion wurden nach Zugabe des TRI-Reagent™ 3µl Hefe-tRNS (entsprechend 12µg) zugesetzt.

Die Extraktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Die Zellen wurden abzentrifugiert, in TRI-Reagent™ aufgenommen und lysiert. Nach Extraktion mittels Brom-Chlor-Propan (Chloroformersatz) wurde die RNS mit Isopropanol gefällt, mit Et-OH gewaschen und schließlich in H<sub>2</sub>O-DEPC aufgenommen. Zur vollständigen Lösung der RNS wurde 15 Min. bei 56°C in einem Heizblock inkubiert. Gelagert wurde die RNS bei -80°C.

Die RNS-Menge wurde über die Extinktion bei 260nm im Photometer bestimmt, wobei eine OD von 1 mit 40µg RNS pro ml gleichgesetzt wurde.

### 1.4 Reverse Transkription der RNS in cDNS

Die Umschreibung erfolgte mit Reverser Transkriptase „Superscript II“ (aus MoMLV) im 50µl-Ansatz nach folgendem Schema:

1,5-2,0µg RNS wurden mit Oligo-dT-Primer (Endkonzentration: 1µM) und PCR-H<sub>2</sub>O auf 15µl aufgefüllt und 10 Min. bei 70°C inkubiert.

Dazu wurden gegeben: 10µl First-Strand-Puffer (5x), 5µl DTT (0,1M), 1µl RNasin (40U/ µl), 2,5µl dNTPs (10mM), 2µl Superscript (200 U/ µl) und 14,5µl PCR-H<sub>2</sub>O. Inkubiert wurde 70 Min. bei 42°C und abschließend zur Enzyminaktivierung 5 Min. bei 95°C.

### 1.5 PCR und Gelelektrophorese

Für sämtliche Amplifikationen im 50µl-Ansatz wurden verwendet:

10x-Puffer, dNTPs (10mM), Taq-Polymerase (5U/ µl), PCR-H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub> (25mM) bzw. Q-Solution (5x) und entsprechende 5’-/ 3’-Primer und cDNS bzw. Plasmid. Die eingesetzten Mengen ergeben sich jeweils aus Tabelle IV–1 und die PCR-Bedingungen aus Tabelle IV–2.

Der 10x-Puffer beinhaltet: 500mM KCl, 100mM TrisHCl (ph 9.0), 15mM MgCl<sub>2</sub> und 1% Triton X-100. Q-Solution ist eine Salzmischung, die die Spezifität und Effektivität der PCR erhöht. Die Amplifizierungen wurden mit Deckelheizung des PCR-Gerätes durchgeführt, so dass auf eine Übersichtung der Proben mit Mineralöl verzichtet werden konnte.

**Tabelle IV–1: PCR-Komponenten**

	cDNS	10x-Puffer	dNTPs	Taq-Pol.	MgCl <sub>2</sub>	Q-Solution	5'-Primer	3'-Primer	PCR-H <sub>2</sub> O
<b>TZR-Expr.</b>	2,5µl	5,0µl	1,0µl	0,5µl	0,5µl	-	3,0µl	3,5µl	34,0µl
<b>scA20-Tr.</b>	4,0µl	5,0µl	1,0µl	0,5µl	-	10,0µl	5,0µl	3,0µl	21,5µl
<b>scA20-Pl.</b>	1,0µl	5,0µl	1,0µl	0,5µl	-	10,0µl	5,0µl	5,0µl	22,5µl
<b>β-Aktin-Ko.</b>	4,0µl	5,0µl	1,0µl	0,5µl	-	10,0µl	5,0µl	5,0µl	19,5µl

TZR-Expr.: PCR mit cDNS aus T-Zell Stimulationen;

scA20-Tr.: PCR mit cDNS aus scA20-Transfektionen;

scA20-Pl.: PCR mit scA20-Plasmid als Positivkontrolle;

β-Aktin-Ko.: PCR mit β-Aktin-Primern als Kontrolle für die Funktionalität der cDNS

Tabelle IV–2: PCR-Bedingungen

	Anfangsdenaturierung 2 Min.	Denaturierung 30 Sek.	Primeranlagerung 45 Sek.	Elongation 60 Sek.	Finale Elongation 10 Min.	Zyklenzahl
<b>TZR-Expr.</b>	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	35
<b>scA20-Tr.</b>	94°C	94°C	59°C	72°C	72°C	33
<b>scA20-PI.</b>	94°C	94°C	59°C	72°C	72°C	33
<b>β-Aktin-Ko.</b>	94°C	94°C	59°C	72°C	72°C	33

Um die PCR-Produkte analysieren zu können, wurden jeweils 10µl eines PCR-Ansatzes zusammen mit 2µl DNS-Auftragspuffer in die Tasche eines 2,5%igen Agarose-Gels (120ml 1xTAE, 3g Agarose, 10µl Ethidiumbromid) gefüllt. Als Größenmarker wurde eine 1kb-plus Leiter verwendet, von der 0,7µl zusammen mit 10µl PCR-H<sub>2</sub>O und 2µl Auftragspuffer zugegeben wurden. Die Produktbanden wurden nach einer Laufzeit von 40 Min. in einer Sub-Cell-Gelapparatur in 1xTAE bei einer Spannung von 130V auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

### 1.6 Analyse der TZR-Vβ-Repertoires

Das TZR-Vβ-Repertoire wurde mittels RT-PCR und Sequenzierung untersucht. Die 5'-Primer repräsentieren die 18 Familien der variablen (V-)Region der TZR-β-Kette der BALB/ c-Maus. Die Familien Vβ3, Vβ5 und Vβ8 sind in Unterfamilien aufgeteilt (Tabelle IV–3; Nomenklatur aus Arden et al., 1995).

Tabelle IV–3: Nomenklatur der 18 Vβ-Gensegment-Familien in der BALB/c-Maus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Vβ-Familie</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3.1</b>	<b>4</b>	<b>5.1</b>	<b>5.2</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8.1</b>	<b>8.2</b>	<b>8.3</b>
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	–
<b>Vβ-Familie</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	–

Es wurde die Nomenklatur aus Arden et al., 1995 verwendet.

Die 21 5'-Primer für die PCR wurden in der Primerauswahl II (Kap. III 1.2 , S. 23) so ausgewählt, dass sie jeweils nur in einer der 21 Vβ-Familien/ Unterfamilien spezifisch binden. Der spezifische Primer erhielt dabei den gleichen Namen wie die Familie.

Dazu wurde ein 3'-Primer ausgewählt, der im 5'-Bereich der konstanten Region der  $\beta$ -Kette (C-Region) bindet. In jeder PCR gab es 22 Parallelansätze; in jedem wurde ein anderer 5'-Primer mit dem 3'-Primer eingesetzt. Die so erhaltenen Amplifikate haben eine Länge von 188 bis 265 bp. Ein Parallelansatz diente als Negativkontrolle und beinhaltete keine cDNS.

Durch die Primerwahl wurde erreicht, dass in der PCR DNS-Fragmente der rearrangierten V $\beta$ -Ketten amplifiziert wurden, innerhalb derer sich sowohl ein Teil der V-, die sich daran anschließenden D- und J-Regionen und der 5'-Bereich der C-Region befanden (Abbildung IV-1).



**Abbildung IV-1: Primerbindungsstellen innerhalb der rearrangierten V $\beta$ -Kette des TZR.**

Für die RT-PCR der TZR-Repertoires wurden 21 5'-Primer und ein 3'-Primer ausgesucht. Die 5'-Primer sind jeweils zu einem bestimmten Bereich der V-Region komplementär, der 3'-Primer bindet im 5'-Bereich der C-Region. Der dazwischenliegende DNS-Bereich enthält neben der D- auch die J-Region.

Für die J-Region kodieren 12 Gensegmente in zwei Clustern (Tabelle IV-4; Nomenklatur für J $\beta$ 1 aus Gascoigne et al., 1984, für J $\beta$ 2 aus Malissen et al., 1984).

**Tabelle IV-4: Nomenklatur der 12 J $\beta$ -Gensegmente in der BALB/c-Maus**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>J<math>\beta</math>-Familie</b>	<b>1.1</b>	<b>1.2</b>	<b>1.3</b>	<b>1.4</b>	<b>1.5</b>	<b>1.6</b>	<b>2.1</b>	<b>2.2</b>	<b>2.3</b>	<b>2.4</b>	<b>2.5</b>	<b>2.7</b>

Es wurde die Nomenklatur aus Gascoigne et al., 1984 und Malissen et al., 1984 verwendet.

Durch Sequenzierung der gewonnenen Amplifikate kann auch die Basenabfolge der beteiligten D- und J-Regionen ermittelt werden, die beide ebenfalls entscheidend zur Variabilität des TZR beitragen.

### 1.7 DNS-Extraktion aus Agarosegelen

Für die Auftragssequenzierung der PCR-Amplifikate wurde die spezifische DNS-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem Quiagen-Gelextraktions-Kit nach der beiliegenden Anleitung eluiert und in PCR-H<sub>2</sub>O gelöst.

## 1.8 Sequenzierung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden sowohl außer Haus an einem ABI-Sequenziergerät, als auch in Eigenregie an einem ALFexpress-Gerät durchgeführt.

### 1.8.1 Die cDNS-Doppelstrang-Trennung

Für die selbst durchgeführten Sequenzierreaktionen musste die PCR-amplifizierte Doppelstrang-DNS zuerst einzelsträngig gemacht werden. Dafür wurde in der PCR ein 3'-Primer benutzt, der an seinem 5'-Ende biotinyliert ist; somit ist der gesamte Komplementärstrang nach der Amplifikation am 5'-Ende biotinmarkiert und kann nach einem Denaturierungsschritt über Streptavidin-gekoppelte Magnetpartikel vom Matrizenstrang abgetrennt werden. Dieser kann dann, als Einzelstrang vorliegend, für die Sequenzierreaktion weiterverwendet werden.

Die cDNS-Doppelstrang-Trennung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Die Partikel aus 30µl der Dynabeads-Magnetpartikel-Lösung werden mit 30µl Bindungspuffer (BP) gewaschen.

Die Abtrennung der Magnetpartikel aus der Lösung erfolgt, indem das Gemisch 30 Sek. an die Dynabeads-Magnetleiste angebracht wird.

Danach werden die Partikel in 40µl BP aufgenommen, und 42µl aus dem 50µl-PCR-Ansatz, der die cDNS enthält, werden zupipettiert. Nach 20 Min. Rollen bei Raumtemperatur werden die Magnetpartikel mit der angekoppelten cDNS aus der Lösung zurückgehalten, und nach einem Waschschrift mit 120µl BP wird mit 120µl TE pH 8,0 nochmals gewaschen. Danach wird das Magnetpartikel-cDNS-Konglomerat in 8µl 0,1M NaOH 8 bis 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert; anschließend wird an der Magnetleiste nur der Überstand abgenommen und zu 4µl 0,2M HCl pipettiert. Abschließend kommen zu dieser Lösung 0,75µl 1M Tris-HCl pH 7,6. Dieser Ansatz kann direkt in der Sequenzierung eingesetzt werden.

Bindungspuffer (BP): 2M NaCl; 10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH 8,0;

### 1.8.2 Die Sequenzierreaktion

Bei den selbst durchgeführten enzymatischen Sequenzierungen nach F. Sanger (1981) handelt es sich um eine sog. Kettenabbruchmethode. In einer Sequenzierreaktion wird von einem einsträngigen cDNS-Matrizenstrang durch eine T7-DNS-Polymerase, am 3'-Ende eines 5'-Cy5-markierten Primers beginnend, ein Komplementärstrang synthetisiert. Die Synthese erfolgt in vier Parallelansätzen. In jedem Ansatz wird neben dem normalen dNTP-Mix jeweils ein 2,3-Dideoxy-NTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) im Verhältnis von jeweils 50:1 bis 200:1 zugesetzt. Während der Komplementärstrangsynthese kommt es in jedem der Ansätze zu einem gezielten, statistisch verteilten Einbau der jeweiligen ddNTP, wodurch Kettenabbrüche und unterschiedlich lange DNS-Fragmente entstehen.

Die Sequenzierreaktion erfolgte mit dem Auto-Read™-Sequencing-Kit von Amersham-Pharmacia nach folgendem Protokoll:

Der komplementäre cDNS-Strang (13µl aus der Doppelstrangtrennung) wird zuerst zusammen mit 2µl Anlagerungspuffer und 2µl 5'-Cy5-Primer (1,5µM) bei 65°C 7 Min. und anschließend 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach kommen 1µl Extensionspuffer und 2µl verdünnte T7-DNS-Polymerase ( 2,5µl T7-Polymerase in 10µl T7-Puffer) hinzu. In einer Terasaki-Platte werden von jedem ddNTP je 2,5µl pro Vertiefung auf Eis vorgelegt. Nach Erwärmung auf 37°C werden je 4,5µl aus der cDNS-Polymerase-Mischung zügig zupipettiert und bei 37°C 5 Min. inkubiert. Abschließend kommen pro Vertiefung je 5µl Stopplösung hinzu; dieses Gemisch wird auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Anlagerungspuffer: 1M Tris-HCl pH 7,6; 100mM MgCl<sub>2</sub>;

Extensionspuffer: 304mM Natriumzitat pH 7,5; 324mM DTT; 40mM MnCl<sub>2</sub> pH 7,5;

T7-Puffer: 20mM Tris-HCl pH 7,5; 5mM DTT; 100µg/ ml BSA; 5% (v/ v) Glycerin;

Stopplösung: 5mg/ ml Dextranblau in deionisiertem Formamid;

### 1.8.3 Auftrennung der Sequenzierungsansätze im Polyacrylamidgel

Die in der Sequenzierreaktion erhaltenen DNS-Fragmente durchwandern im Sequenzierautomaten ein denaturierendes Polyacrylamidgel in vier Parallelsuren (entspre-

chend den vier ddNTP). Dies geschieht in Abhängigkeit von ihrer Länge unterschiedlich schnell. Dabei passieren sie einen Helium-Neon-Laserstrahl (632,8nm) der am 5'-Cy5 des Komplementärstranges Fluoreszenzsignale generiert. Diese werden über Photodioden detektiert, durch eine Software ausgewertet und zu einer Sequenz zusammengesetzt.

Im Sequenzierautomaten herrschten folgende Bedingungen:

Das verwendete Gel enthält 8% (w/v) Acryl-/ Bisacrylamid mit denaturierendem Agens (Repro-Gel™-high resolution) und wird aus zwei Fertiglösungen gegossen; es kann nach zehnmütiger UV-Polymerisation im ReproSet™ verwendet werden.

Als Laufpuffer wird 1xTBE-Puffer verwendet; das Gel wird auf 55°C erwärmt, dann wird der Kamm gezogen. Die Geltaschen werden mit TBE-Puffer gespült und anschließend mit 4-10µl der vorher 2 Min. bei 90°C denaturierten Proben befüllt.

Die Einstellungswerte für den Laser betragen: 1500V; 60mA; 30W;

Die Gesamtlaufzeit wird auf 420 Min. gestellt.

## **2. Zellkultur**

### **2.1 Allgemeines**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Auf entsprechenden Schutz und Kleidung wurde geachtet.

Eine Zellcharge wurde maximal acht Wochen in Kultur gehalten, danach wurde bei Bedarf eine weitere Charge aufgetaut. Dadurch sollte die Anreicherung von Mutanten verhindert werden.

### **2.2 Zentrifugation**

Für die Zentrifugation wurden die Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt und in einer Heraeus-Megafuge 1.0R bei 250g 5 Min. bei 4°C zentrifugiert.

### **2.3 Bestimmung der Zellzahl**

Für das Zählen wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau versetzt, um tote Zellen von lebenden abgrenzen zu können. In einer Neubauer-Zählkammer wurden mindes-

tens 32 Kleinquadrate, die zwei Großquadraten entsprechen, ausgezählt. Daraus wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung die Lebendzellzahl pro ml berechnet:

$$\text{gezählte Zellzahl pro Großquadrat} \times 10.000 \times 2 \text{ (Verdünnung)}$$

## 2.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden bei 37°C zügig aufgetaut, sofort vorsichtig mit 10ml Basismedium gemischt und 5 Min. bei 250g zentrifugiert. Das Sediment wurde daraufhin in 5-10ml 10% FKS-Basismedium resuspendiert und in einer kleinen Kulturflasche im Brutschrank inkubiert. Nach 5-6 Stunden wurden die Zellen kontrolliert und mit frischem Medium aufgefüllt.

Zum Einfrieren wurden  $3\text{-}5 \times 10^6$  Zellen zügig in 1ml Einfriermedium (4°C) aufgenommen und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Dieses wurde in Styropor bei -80°C langsam tiefgefroren und bei Bedarf nach 24h in flüssigen Stickstoff überführt.

## 2.5 Wachstumsbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten, entsprechend ihrem Proliferationsverhalten geteilt und mit frischem Medium versorgt. Die A20-, A20Id-, MPC11-, EL4- und BiV-Zellen wurden in Petrischalen (85mm Ø) in 5% FKS-Basismedium gehalten. Die T-Zell-Stimulationen wurden in T-Zell-Medium durchgeführt, und die MPC11-scA20-Transfektanten wurden im entsprechenden Selektionsmedium kultiviert.

## 2.6 T-Zell-Stimulationen

### 2.6.1 Gewinnung von „T-Zellen“

Die Zellen für die *In-vitro*-Stimulationen wurden aus Milz- bzw. Lymphknotenzellsuspensionen (s. Kap. IV 4.2 ) generiert. Sowohl die Zellen als auch alle Reagenzien wurden bis zur Inkubation im Brutschrank bzw. bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gehalten.

Zuerst wurden große Gewebestücke durch natürliche Sedimentation aus der Suspension entfernt. Danach wurden die beiden Ansätze getrennt weiterverarbeitet, da aus der Milzzellsuspension zuerst die Erythrozyten entfernt werden mussten.

Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach Zentrifugation (250g, 5 Min., 4°C) vorsichtig in 2,5ml 1x-Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Min. wurden weitere 7,5ml PBS zugegeben und zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit PBS, der auch bei der Lymphknotensuspension durchgeführt wurde. Danach wurden die Zellen in PBS resuspendiert, zusammengeführt und gezählt.

### 2.6.2 Stimulationsansatz

Für die Stimulationen wurden jeweils  $4 \times 10^6$  zu stimulierende Zellen in einem Loch einer 24-Loch-Platte zusammen mit dem jeweiligen Stimulator ( $5 \times 10^5$  A20-Zellen, bestrahlt mit 100Gy, oder  $5 \mu\text{g/ml}$  Ag20-Protein bzw. BiV-Protein) in 2ml T-Zell-Medium inkubiert.

Nach 6 Tagen wurde eine weitere Stimulation durchgeführt: Die stimulierten Zellen wurden vereinigt, gezählt und in einer Dichte von  $3-4 \times 10^6$  Zellen pro Loch wieder ausplattiert. Dazu kamen die Stimulatoren und  $10^6$  Milzzellen (APC-Spender; bestrahlt mit 30Gy). Nach 48h wurde IL-2 als Wachstumsfaktor zugegeben (30U/ml).

Jede weitere Restimulation (Rest.) wurde 10 Tage nach der vorangegangenen nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt, wobei ab der 3. Restimulationsrunde in der Regel  $1-2 \times 10^6$  T-Zellen pro Loch ausplattiert wurden.

Vor jeder Stimulation wurden je nach Zellzahl  $2 \times 10^5-10^6$  T-Zellen für die TZR-Repertoire-Analysen abzentrifugiert und in einem Falcon-Röhrchen bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren (s. Kap. IV 1.3, S. 36).

Für die Bestimmung der tumorspezifischen Aktivität der T-Zellen wurde die jeweils erforderliche Zellmenge vor einer neuen Rest. abgezweigt und im GM-CSF-Proliferationsansatz eingesetzt (s. unten).

Die für FACS-Untersuchungen benötigten T-Zellen wurden vor der Weiterverarbeitung in FACS-Puffer aufgenommen (s. Kap. IV 3.2).

Für *In-vivo*-Mausversuche wurden die benötigten T-Zellen einmal in PBS gewaschen und danach in dem für die entsprechende Endkonzentration notwendigen Volumen PBS aufgenommen (s. Kap. III 4. , S. 33).

### 2.6.3 GM-CSF-Aktivierungsansatz

Um die tumorspezifische Aktivität der T-Zellen zu bestimmen, wurde die Menge des in den Kulturüberstand (KÜ) sezernierten GM-CSF nach 72h Koinkubation mit den jeweiligen Zielzellen im ELISA gemessen (s. Kap. IV 3.1 , S. 47).

Der Aktivierungsansatz wurde in einer 96-Loch-Rundbodenplatte in 200µl Gesamtvolumen pro Loch angesetzt. Die T-Zellen wurden jeweils in drei Parallelansätzen in vier log<sub>2</sub>-Verdünnungsschritten ausplattiert, angefangen mit 250.000 Zellen pro Loch bis zu 15.625 Zellen pro Loch. Dazu kamen entweder 50.000 bestrahlte (100Gy) A20- oder A20Id-Zellen als Zielzellen oder 50.000 bestrahlte (100Gy) MPC11-Zellen als Kontrolle eins oder nur T-Zell-Medium als Kontrolle zwei.

### 2.7 Plasmidtransfektion und Kultivierung der Transfektanten

Um die A20-Immunglobulin-V-Gene, die für den Id kodieren (scA20-Konstrukt) in die MPC11-Zielzellen einzubringen, wurde eine Transfektion mittels Elektroporation durchgeführt. Dabei sollte das Konstrukt im pTracer-CMV Vektor, der ein Zeocin-Resistenzgen enthält, in die Mauszellen eingeschleust und dadurch in das Mausgenom integriert werden.

In den Transfektionsansätzen I und II wurden zu  $5 \times 10^6$  Zellen in 700µl Medium in einer Küvette auf Eis 5µg nichtlinearisierte Plasmid-DNS zugegeben und vorsichtig gemischt. Für den Stromstoß wurde eine Spannung von 220V und eine Kapazität von 500µF angelegt. Die Suspension wurde 10 Min. auf Eis gestellt und danach mit 500ml 10%FKS-Basismedium sorgfältig gemischt. Die Zellen wurden auf fünf 96-Loch-Platten verteilt, so dass sich schließlich in einem Loch 10.000 Zellen in einem Volumen von 100µl befanden.

Nach 48h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium durch frisches Medium mit dem Selektionsmittel Zeocin in einer Dosis von 200µg/ml ersetzt. Nach weiteren 48h wurde das Medium abermals durch frisches Medium mit 400µg/ml Zeocin ersetzt.

Proliferierende Zellen sollten nach mehrtägiger Kultivierung mittels RT-PCR auf das Vorhandensein des scA20-Konstrukts getestet werden (s. Kap. IV 1.5 , S. 37). In Ansatz II wurde vorher eine Reklonierung durchgeführt (s. Kap. IV 2.8 , S. 46), um ein monoklonales Wachstum sicherzustellen.

Bei der Transfektion III wurden 5µg linearisierte Plasmid-DNS zu  $5 \times 10^6$  Zellen zugegeben. Zusätzlich wurde bei der Ausplattierung der Zellen die Anfangskonzentration variiert: Neben einer Platte mit 10.000 Zellen pro Loch wurde eine Platte mit 5.000 und vier Platten mit je 1.000 Zellen pro Loch angesetzt. Der weitere Ablauf war entsprechend Ansatz I.

In Ansatz IV wurden zwei Kotransfektionen durchgeführt: Für acht 96-Loch-Platten wurden  $8 \times 10^6$  Zellen, entsprechend 10.000 Zellen pro Loch, mit 8µg linearisiertem scA20-Plasmid und 0,4µg des BCMGSNeo-Vektors transfiziert. Für weitere 8 Platten wurde die gleiche Menge nichtlinearisiertes Plasmid für die Kotransfektion verwendet. Der Vektor BCMGSNeo enthält ein Gen, das Resistenz gegen Geneticin (G418) vermittelt. Zellen, die den BCMGSNeo Vektor aufgenommen und somit eine Resistenz gegen G418 erworben haben, sollten auch das scA20-Konstrukt aufgenommen haben. Nach 48h Inkubation der Transfektanten wurde G418 in einer Konzentration von 400µg/ml zugesetzt und nach weiteren 48h wurde die Konzentration auf 800µg/ml verdoppelt. Der übrige Versuchsablauf entsprach den vorausgegangenen Ansätzen.

In Ansatz V wurden zusammen mit 8µg scA20-Plasmid 0,8µg des BCMGSNeo-Vektors kotransfiziert. Es wurden insgesamt acht 96-Loch-Platten angesetzt, die im weiteren Verlauf wie Ansatz IV behandelt wurden.

## 2.8 Reklonierung

In einem Reklonierungsansatz werden in die Löcher von Flachboden-96-Loch-Platten durch entsprechende Verdünnung statistisch 10, 5, 1, 0,5 und 0,1 Zellen pro Loch ausgebracht. Nach 2-3 Wochen werden die einzelnen Vertiefungen auf das Wachstum von Klonen untersucht, wobei nur Vertiefungen mit Monoklonen weiter kultiviert werden.

Für anspruchsvolle bzw. schwierig zu kultivierende Zellen, beispielsweise nach Transfektion, kann man zur Wachstumsunterstützung Makrophagen einsetzen. Dabei werden Makrophagen aus der Peritonealhöhle einer Maus mit Kulturmedium herausgewaschen. Auf vier Platten werden 40ml Makrophagensuspension (100µl pro Loch) pipetiert. Dazu kommen 100µl der Suspension mit den zu reklonierenden Zellen.

### 3. Immunologie

Alle immunologischen Versuche wurden unsteril durchgeführt.

#### 3.1 ELISA

Im ELISA wird ein bestimmtes Epitop auf einem Ag von einem dagegen spezifischen Ak erkannt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Ansätze bei Raumtemperatur durchgeführt.

Eine ELISA-Platte wurde mit dem entsprechenden unmarkierten Fänger-Ak in einer Konzentration von 5µg/ml in 50µl CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-Puffer beschichtet und entweder 16h bei 4°C oder 2h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen, alle Löcher mit je 400µl Ak-Puffer abgedeckt und 2h geschüttelt.

Nach einem Waschschrift mit Waschpuffer wurden 50µl KÜ (s. Kap. IV 2.6.3, S. 45) zugegeben und 30Min. geschüttelt.

Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der POX-markierte Detektions-Ak in einer 1:1000-Verdünnung in 50µl Ak-Puffer zugegeben und 30Min. geschüttelt.

Wenn der Detektions-Ak biotinyliert war, musste zusätzlich 30Min. mit Avidin-Pox 1:1000 inkubiert werden.

Währenddessen wurde im sog. Substratansatz eine Tablette 1,2-Benzoldiamindihydrochlorid (10mg) in 15ml Substratpuffer im Dunkeln gelöst. Kurz vor Zugabe in die Platte wurden 7µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben.

**Tabelle IV-5: In den unterschiedlichen ELISA-Ansätzen verwendete KÜ und Ak.**

	<b>A20Id<sup>+</sup> aus Klonierung</b>	<b>A20Id<sup>+</sup> aus FACS</b>	<b>GM-CSF Sekretion</b>	<b>scA20-Kompetition</b>
<b>Fänger-Ak</b>	$\alpha$ Id (6C10) unmarkiert	$\alpha$ Id (6C10) unmarkiert	$\alpha$ GM-CSF unmarkiert	$\alpha$ Id (6C10) unmarkiert
<b>Detektions-Ak</b>	$\alpha$ IgG (H+L) Pox	$\alpha$ IgG (H+L) Pox	$\alpha$ GM-CSF Biotin	$\alpha$ IgG2a Biotin
<b>Avidin-Pox</b>	-	-	+	+

A20Id<sup>+</sup> aus Klonierung: KÜ aus dem A20Id<sup>+</sup>-Klonierungsansatz (Kap. V 1.1.1, S. 52)

A20Id<sup>+</sup> aus FACS: KÜ nach der A20Id<sup>+</sup>-FACS-Sortierung (Kap. V 1.1.2, S. 52)

GM-CSF-Sekretion: KÜ aus den GM-CSF-Aktivierungsansätzen der T-Zellen (Kap. V 2.2.2, S. 59)

scA20-Kompetition: ELISA zur Detektion von scA20-Fragmenten in MPC11-scA20-Transfektanten (Kap. V 1.2, S. 54)

KÜ: Kulturüberstand

Nach mindestens siebenmaligem Waschen und anschließendem sorgfältigem Trockenklatzen der Platte wurden aus dem Substratansatz 100 $\mu$ l je Loch zupipettiert und 10 bis 20Min. geschüttelt, bis eine konstante Farbentwicklung zu erkennen war. Danach wurde die Extinktion im ELISA-Lesegerät bei 405nm gemessen.

In der doppelt angesetzten Negativkontrolle wurde die Hintergrundextinktion bestimmt, indem der Detektions-Ak weggelassen wurde bzw. bei der GM-CSF Sekretion anstatt Kulturüberstand Medium bzw. FCS/ PBS verwendet wurde.

### **scA20-Kompetitions-ELISA**

Da das scA20-Protein keinen Fc-Teil besitzt, über den eine Bindung an einen Detektions-Ak möglich wäre, wurde ein Ansatz entworfen, in dem das Protein die Bindung eines spezifischen Ak an den Fänger-Ak kompetitiv inhibieren sollte.

Das Prinzip dieses Kompetitions-ELISA ist folgendes: Nach Beschichtung der ELISA-Platte mit dem Id-spezifischen Ak 6C10 wird das Zellysate der Transfektanten zugegeben. Die darin enthaltenen scA20-Proteine sollten sich an die Bindungsstellen des Fänger-Ak anheften und somit die spezifische Bindung von Ag20-Protein verhindern. Wenn das Protein nicht bindet, wird im nächsten Schritt der IgG2a-spezifische Ak auch nicht binden und somit mit Avidin-Pox auch keine Farbreaktion auslösen können. Dadurch sollte ein ELISA-Versuch, der ohne scA20-Protein-Fragmente positiv war, zumindest eine deutliche Verringerung der Extinktion zeigen.

In Vorversuchen war die scA20-Protein- bzw. Ag20-Protein-Konzentration ermittelt worden, die in einem ELISA ohne Konkurrenz jeweils zu einem positiven Ergebnis geführt hatte.

### 3.2 FACS

Im FACS kann man Zellen auf unterschiedliche intra- oder extrazellulär vorhandene Moleküle fluoreszenzdurchflusszytometrisch untersuchen. Dabei werden die interessanten Strukturen mit einem an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Ak markiert. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionsspektren können die verschiedenen Farbstoffe voneinander unterschieden werden.

Die Zellgröße wird im Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) gemessen, die Granularität wird im Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC) gemessen. Die Emission des FITC-Farbstoffs wird im Fluoreszenzkanal 1 (FL1) gemessen, die des PE-Farbstoffs wird in FL2 gemessen und die von Propidiumjodid in FL3.

In dieser Arbeit wurden nur Strukturen auf der Zelloberfläche untersucht.

Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen, bevor sie für die weiteren Untersuchungen eingesetzt wurden.

Soweit eine ausreichende Anzahl an Zellen zur Verfügung stand, wurden in einem FACS-Röhrchen in einem 50µl-Ansatz mit FACS-Puffer  $5 \times 10^5$  Zellen aufgenommen. In einigen Ansätzen wurden die Zellen in 2.4G2-KÜ inkubiert. Dies sollte alle auf den Zelloberflächen vorhandenen Fc-Rezeptoren blockieren, um später eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Danach wurden 50µl FACS-Puffer mit dem die Oberflächenstruktur erkennenden Ak in der vom Hersteller angegebenen oder zuvor ermittelten optimalen Konzentration zugegeben und 30Min. bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurde 1ml FACS-Puffer zum Waschen hinzugefügt, und nach 5 Min. Zentrifugation bei 1600rpm (Heraeus Labofuge 6000) der Überstand bis auf 50µl abgesaugt. Falls der Detektions-Ak Biotin-markiert war, musste zusätzlich 30Min. mit Streptavidin-PE 1:1000 inkubiert werden.

Nach einem weiteren Waschschrift mit Zentrifugation und der Zugabe von 250µl FACS-Puffer wurde das Sediment auf dem Vortex-Schüttler resuspendiert.

Kurz vor der Messung der Proben im FACS wurde Propidiumjodid ( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ) im Verhältnis 1:100 zugegeben, um die toten von den lebenden Zellen abgrenzen zu können. Bei toten Zellen mit Membranschäden kann das Propidiumjodid mit der DNS interkalieren und über sein spezifisches Emissionsspektrum detektiert werden.

Die Negativkontrolle bestand bei direkt markierten Ak aus einem Ak mit gleichem Iso-  
typ, jedoch irrelevanter Spezifität. Bei biotinmarkierten Ak wurde in der Negativ-  
kontrolle nur mit Streptavidin-PE inkubiert.

Die Untersuchung der Zellen erfolgte an einem Durchflusszytometer von Becton-  
Dickinson aufgrund der Verschiebung der Fluoreszenzmaxima der markierten Ober-  
flächenmoleküle. Es wurde die CellQuest-Software verwendet.

## 4. Tierexperimente

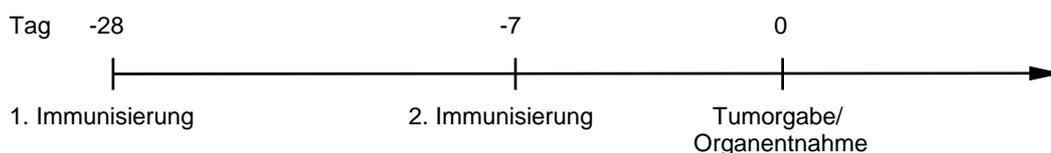
### 4.1 *In-vivo*-Versuche

Alle Zellen wurden vor der Gabe in die Maus einmal in PBS gewaschen, anschließend pro Maus in  $300\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und auf Eis gestellt.

Eine Versuchsgruppe bestand aus sechs Mäusen, die Kontrollgruppe aus jeweils vier Tieren. Alle Injektionen wurden i.p. durchgeführt. Die Tiere wurden eingeschläfert, sobald sie klinische Auffälligkeiten zeigten.

#### 4.1.1 Präimmunisierung

Für die Triomzellvakzinierung einer Maus wurden jeweils  $10^5$  BiV-Zellen gespritzt und zwar 28 und sieben Tage vor der Tumorgabe bzw. Organentnahme (Abbildung IV-2).



**Abbildung IV-2: Applikationsschema bei der Präimmunisierung**

Einer zweifachen Immunisierung am Tag -28 bzw. -7 folgte am Tag 0 eine Tumorgabe bzw. die Entnahme von Milz und Lymphknoten.

#### 4.1.2 Tumorgabe

Bei der Gabe von A20-Tumorzellen wurden  $3\text{-}5 \times 10^5$  Zellen verabreicht, was beim A20-Lymphom einer letalen Dosis entspricht. Für die Organentnahme aus sogenannten Tumormäusen wurden diesen acht Tage vorher  $5 \times 10^5$  A20-Zellen gegeben.

Bei den A20Id-Zellen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen als letale Dosis injiziert.

#### 4.1.3 Transferversuche

In diesen präventiven Simultanansätzen wurden unbehandelten Mäusen  $3\text{-}5 \times 10^5$  A20-Tumorzellen zusammen mit  $5 \times 10^5$  *in vitro* restimulierten T-Zellen verabreicht.

#### 4.2 Herstellung einer Zellsuspension aus Milz- bzw. Lymphknotengewebe

Nachdem eine Maus mit CO<sub>2</sub> eingeschlüpfert und in Et-OH getaucht worden war, wurde unter sterilen Bedingungen das Fell auf der Ventralseite abgezogen und die Inguinallymphknoten herauspräpariert. Danach wurde der Bauchraum eröffnet und Mesenteriallymphknoten und Milz wurden herauspräpariert. Die Lymphknoten wurden mit einem Spritzenstempel durch ein Sieb in 10ml MEM-Medium passiert und nach sorgfältiger Resuspension in ein Falcon-Röhrchen auf Eis überführt. Mit der Milz wurde genauso verfahren, die Suspension wurde in ein separates Röhrchen gefüllt.

## V ERGEBNISSE

Um die Tumorreaktivität von T-Zellen aus präimmunisierten Mäusen zu untersuchen, mussten die Zellen *in vitro* kultiviert und restimuliert werden. Gleichzeitig wurden sie auf ihre Tumorspezifität hin untersucht; als Indikator wurden Zielzellen mit unterschiedlichen Charakteristika benötigt.

### 1. Herstellung von Zielzellen

#### 1.1 Selektion Id-defizienter A20-Mutanten

Um Aussagen über den Anteil des Id bei der zellulären Immunantwort gegen das A20-Lymphom machen zu können, wurden unter anderem Id-defiziente A20-Lymphomzellen benötigt. Diese sollten durch zwei unterschiedliche Ansätze gewonnen werden.

##### 1.1.1 Einzelzellklonierung durch limitierende Verdünnung

Für die Klonierungsversuche wurden 3072 Vertiefungen entsprechend 32 96-Loch-Platten angesetzt. Durch die limitierenden Verdünnungsansätze mit statistisch 2 Zellen pro Loch, 1 Zelle pro Loch, 0,5 Zellen pro Loch, 0,2 Zellen pro Loch und 0,1 Zelle pro Loch sollten in mehreren der Löcher Einzelzellklone heranwachsen.

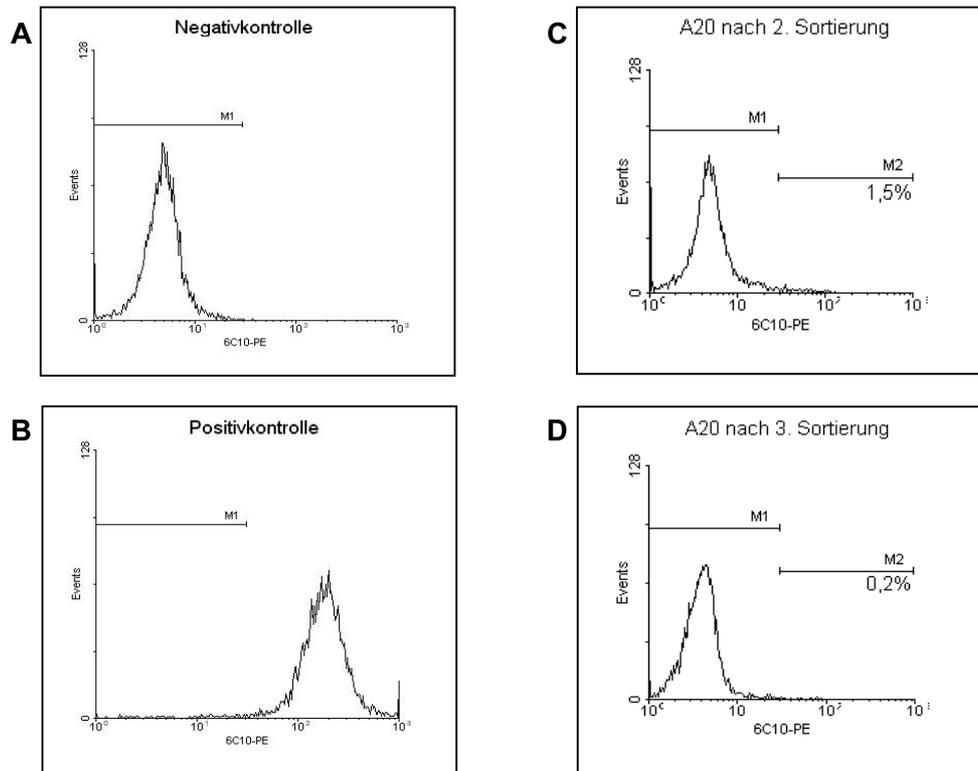
Von allen Monoklonen wurden nach Weiterkultivierung je 50 µl Kulturüberstand abgenommen. Diese wurden im ELISA mit dem monoklonalen, Id-spezifischen Antikörper 6C10 auf Id-Negativität getestet (Tabelle IV-5, S. 48). Da jedoch alle Kulturüberstände eine positive Reaktion zeigten, wurde diese Strategie aus Effektivitätsgründen nicht weiter verfolgt.

##### 1.1.2 FACS-Sortierung

Im zweiten Ansatz sollten Id-defiziente Mutanten mit Hilfe des 6C10-Antikörpers im FACS detektiert und von der Id-positiven Population abgetrennt werden.

Bei der ersten Sortierung konnten dadurch aus einer A20-WT-Population mit  $8 \times 10^7$  Zellen 15.000 Id-negative Zellen abgetrennt werden. Diese Subpopulation wurde weiterkultiviert, und nach 14 Tagen wurde eine zweite Sortierung durchgeführt. Dabei wurden aus  $2 \times 10^7$  Zellen  $3 \times 10^6$  Id-negative Mutanten abgetrennt.

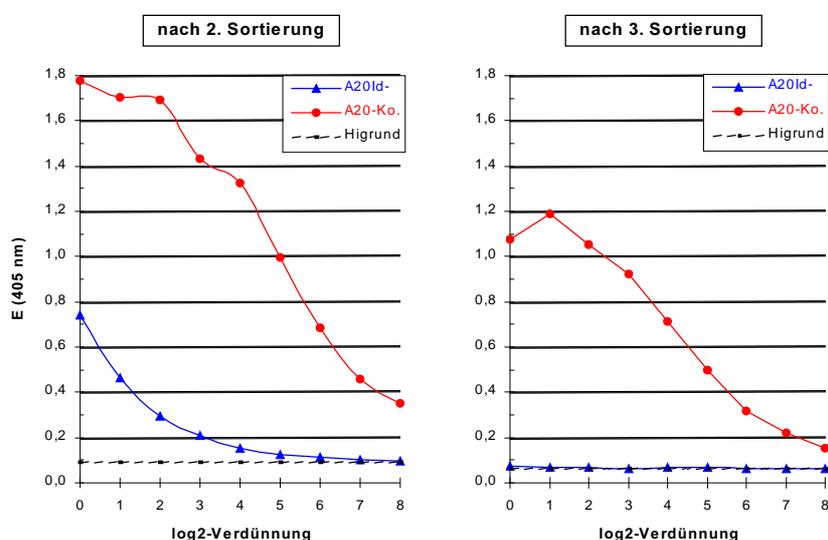
Nach dreiwöchiger Kultivierung wurde diese Population im FACS auf die Expression des Id auf der Zelloberfläche untersucht (Abbildung V-1). Im Vergleich zur Negativkontrolle waren 1,5% der Zellen Id-positiv.



**Abbildung V-1: Expression des Id auf A20-Zellen nach 2. bzw. 3. FACS-Sortierung**  
 Nach Selektion auf Id-Mutanten wurde die Zellpopulation mit Hilfe des Id-spezifischen, biotinylierten Ak 6C10 im FACS auf Oberflächenexpression des Id untersucht. Es wurden nur die lebenden Zellen analysiert. Als Kontrolle für die Funktion des Ak diente eine WT-A20-Population (B). Die Markierung M1 diente jeweils zur Abgrenzung der Id-negativen Zellen und wurde von der Negativkontrolle (A) in die Diagramme mit den Probenmessungen (C+D) übertragen. Alle in M2 liegenden Ereignisse wurden als Id-positiv gewertet.

Ebenso wurde mit dem in acht log<sub>2</sub>-Stufen verdünnten Kulturüberstand ein Id-spezifischer ELISA durchgeführt und eine Titrationskurve erstellt (Abbildung V-2, S. 54). Auch hier war im Vergleich zu WT-A20 noch eine deutliche Extinktion zu erkennen. Deshalb wurde die Id-Population nach weiteren zwei Wochen abermals sortiert. Aus  $2 \times 10^7$  Zellen wurden  $1,7 \times 10^7$  negative Zellen aussortiert und eine Woche lang weiter kultiviert. Danach wurde eine weitere FACS-Untersuchung durchgeführt, bei welcher neben der Id-Expression die Oberflächenmoleküle IgG2a, MHC I, MHC II, CD40, CD80 und CD86 untersucht wurden.

### A20-Id-Nachweis im KÜ nach Negativselektion im FACS



**Abbildung V-2: A20Id-ELISA aus dem KÜ nach 2. bzw. 3. FACS-Sortierung**

Der KÜ von A20-Zellen, die zuvor einer Id-Negativselektion unterzogen worden waren (A20Id<sup>-</sup>), wurde in einem ELISA mit dem Id-spezifischen Ak 6C10 untersucht. Dafür wurde eine achtfache log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe angelegt. Als Positivkontrolle diente der KÜ von WT-A20-Zellen (A20-Ko.). Die Hintergrundextinktion (Higrund) wurde bestimmt, indem im ELISA-Ansatz der Detektions-Ak weggelassen wurde. KÜ: Kulturüberstand

Bezüglich des Id zeigten noch 0,2% der Zellen eine positive Markierung (Abbildung V-1, S. 53), die IgG2a-Expression jedoch war die gleiche wie bei den WT-A20-Zellen. Auch die anderen Moleküle zeigten im Vergleich zu WT-A20 keine relevanten Expressionsunterschiede.

Bei den ELISA-Analysen des Kulturüberstandes der Id-Zellen ließ sich im Vergleich zur zweiten Sortierung keine Id-Expression nachweisen (Abbildung V-2).

Die so generierten Id-negativen A20-Zellen wurden A20Id<sup>-</sup> genannt und bei den folgenden T-Zell-Aktivierungsversuchen eingesetzt.

## 1.2 Transfektion von MPC11 mit scA20

Gegen A20 aktivierte T-Zellen erwiesen sich gegenüber MPC11-Lymphomzellen als nicht reaktiv (Kap. V 2.2, S. 58). Aufgrund dieser Tatsache ließe sich durch die Transfektion der A20-Immunglobulin-V-Gene, die für den Id kodieren (scA20-Konstrukt), in MPC11 ein System generieren, mit dem es möglich sein sollte, die Aktivierung der T-Zellen gegen den Id allein zu untersuchen.

Dazu wurden fünf Transfektionsansätze durchgeführt. In drei Ansätzen konnte kein Zellwachstum festgestellt werden. Aus den 1.000-Zell-Platten in Ansatz III konnten hingegen drei Einzelklone weiterexpandiert werden, die nach acht Wochen in der RT-PCR untersucht wurden. Ebenso wurden acht Monoklone aus einer anderen Transfektion weiterkultiviert, expandiert und nach acht Wochen ebenfalls in der RT-PCR untersucht.

#### **Nachweis auf Proteinebene mittels „Kompetitions- ELISA“**

In den transfizierten Zellen sollte die Expression des scA20-Konstruktes auf Proteinebene mittels Kompetitions-ELISA (Kap. IV 3.1 , S. 48) nachgewiesen werden. Dabei sollte die Bindung des aufgereinigten A20-Ig an den anti-Id-Ak 6C10 durch Lysate der transfizierten Zellen inhibiert werden. In Vorexperimenten zeigte sich jedoch, dass es zu keinen signifikanten Veränderungen der Extinktionswerte kam, auch nicht nach Variation der scA20- bzw. Ag20-Konzentrationen und der Inkubationszeiten.

Da also ein Nachweis auf Proteinebene nicht durchführbar war, wurden die Transfektanten zusätzlich auf Transkriptionsebene mittels RT-PCR untersucht.

#### **Nachweis auf transkriptioneller Ebene**

Voraussetzung hierfür war, dass die DNS-Sequenz des scA20-Produktes und des Vektors bekannt waren. Die Umschreibung erfolgte mit einem oligo-dT-Primer; die Primer für die PCR wurden so gewählt, dass die gesamte scA20-Sequenz amplifiziert wurde. Als Positivkontrolle diente das pTracer-CMV-scA20-Plasmid. Die PCR-Amplifikate wurden im Agarosegel analysiert und zusätzlich sequenziert. Als Kontrolle für die Funktionalität der cDNS der transfizierten Zellen wurde ein Teilstück der Sequenz des  $\beta$ -Actin-Haushaltsgens amplifiziert und ebenfalls im Agarosegel analysiert. Das positive PCR-Ergebnis konnte darin nachgewiesen werden. In den PCR-Produkten der Transfektionsansätze ließ sich jedoch kein scA20-spezifisches Amplifikat nachweisen.

Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass das scA20-Konstrukt nicht stabil in das Mausgenom integriert und somit auch nicht exprimiert worden ist.

## 2. Tumorreaktivität von T-Zellen aus immunisierten und nicht immunisierten Mäusen

### 2.1 Restimulationen *in vitro*

Im Winn-Versuch, wurden einer Naivmaus Milz- und Lymphknotenzellen aus einer Triom-immunisierten Maus zusammen mit Tumorzellen verabreicht. Dabei hatte sich gezeigt, dass auf diese Weise kein Tumorschutz vermittelt werden konnte, da die Frequenz tumorspezifischer T-Zellen zu gering war (R. Mocikat, pers. Mitteilung).

Um die Frequenz zu erhöhen und das Verhalten der T-Zellen aus den triomimmunisierten Mäusen zu untersuchen und zu charakterisieren, wurden diese *in vitro* restimuliert. Parallel hierzu wurden auch T-Zellen anderer Herkunft untersucht.

Die in dieser Arbeit untersuchten T-Zellen kamen jeweils:

- Aus einer zuvor mit BiV-Triomzellen immunisierten Maus
- Aus einer unbehandelten Maus
- Aus einer Maus mit einer sieben Tage alten Tumorlast (Tumormaus)
- Aus einer Maus, die eine letale Tumordosis mit der simultanen Gabe von tumorspezifischen CD4-T-Zellen überlebt hat
- Aus einer Maus, die von einer sieben Tage alten Tumorlast durch adoptiven Transfer von CD4-T-Zellen geheilt wurde.
- Aus einer Maus, die eine letale Tumordosis mit der simultanen Gabe von CD8-T-Zellen überlebt hat.
- „CD4-T-Zell Klon“, generiert durch *In-vitro*-Restimulation und limitierende Verdünnung von T-Zellen aus einer Triom-immunisierten Maus.

Insgesamt wurden *in vitro* elf Stimulationsansätze durchgeführt (Tabelle V-1, S. 57). Als Stimulatoren für die T-Zellen wurden A20-Zellen eingesetzt. Da aber auch die Rolle des Idiotyps (Id) als tumorspezifisches Ag untersucht werden sollte, wurde einerseits mit Ag20-Protein stimuliert, das als einziges Antigen den Id von A20 trägt (Kap. III 2.4 , S. 29)

Andererseits wurde BiV-Protein eingesetzt, das neben dem Idiotyp aus A20 auch eine Spezifität gegen internalisierende Fc-Rezeptoren besitzt. Die Präsentation der Antigene an die T-Zellen sollte über APCs aus der zugegebenen Milzzellpopulation erfolgen.

Bei den Stimulationen zeigte sich, dass die T-Zellen nicht immer gleich gut zu kultivieren waren. In jedem Stimulationsansatz war zu erkennen, dass sich nach der zweiten Restimulation die Zellzahl stark reduzierte, wahrscheinlich weil alle nicht spezifischen T-Zellen nicht weiter proliferierten und starben. Deshalb wurde bei späteren Stimulationsansätzen darauf geachtet, dass die Anfangszellzahl groß genug war. Eine kontinuierliche und für weitere Untersuchungen ausreichende Zellvermehrung ab der zweiten bis dritten Restimulation war leider nicht in allen Ansätzen zu beobachten.

**Tabelle V–1: Bedingungen für die *In-vitro*-T-Zell-Stimulationen**

<b>Maus, aus der die T-Zellen stammen</b>	<b>Stimulator <i>in vitro</i></b>	<b>Anzahl der Stimulationen</b>
Naiv	A20-Zellen	9
BiV-immunisiert	A20-Zellen	8
BiV-immunisiert	BiV-Protein	9
BiV-immunisiert	Ag20-Protein	5
Tumortragend	A20-Zellen	6
Tumortragend	BiV-Protein	6
Tumortragend	Ag20-Protein	6
Maus, die eine letale Tumordosis mit der simultanen Gabe von tumorspezifischen CD4-T-Zellen überlebte (Prävention)	A20-Zellen	4
Maus, die von einer sieben Tage alten Tumorlast durch adoptiven Transfer von CD4-T-Zellen geheilt wurde (Therapie)	A20-Zellen	4
Maus, die eine letale Tumordosis mit der simultanen Gabe von CD8-T-Zellen überlebte	A20-Zellen	5
„CD4-T-Zell Klon“	A20-Zellen	9

## 2.2 Untersuchungen zum Aktivierungszustand

Um eine Aussage über die *In-vitro*-Antwort der T-Zellen auf die Tumorzellen machen zu können, wurde entweder ihre Proliferation gemessen oder die Zytokinproduktion, d.h. die Produktion von GM-CSF.

Bei der Messung des <sup>3</sup>H-Einbaus als Proliferationsindikator fiel jedoch auf, dass die Schwankungsbreite sehr groß war. Daher wurde auf die Proliferationsmessung in den folgenden Versuchen verzichtet und statt dessen ein Zytokinfreisetzungstest durchgeführt.

Für die Analyse der Zytokinproduktion liegt in unserem Labor mit dem sog. GM-CSF-Sekretions-ELISA ein elegantes und etabliertes Verfahren vor. Die Vorteile dieser Methode liegen in der Messung der spezifischen, TZR-vermittelten Aktivierung, in ihrer Reproduzierbarkeit und im Verzicht auf radioaktive Substanzen.

Um die Rolle des Id bei der *In-vitro*-Aktivierung der T-Zellen zu ermitteln, wurden als Zielzellen im GM-CSF-Ansatz neben A20- auch A20Id-Zellen eingesetzt. Falls der Id die dominante Rolle spielt, sollte die Aktivierung mit den A20Id-Zielzellen viel schwächer ausfallen als mit den WT-A20-Zellen.

Wenn genügend T-Zellen vorhanden waren, wurde nach jeder Stimulationsrunde bzw. unmittelbar vor einer neuen Stimulation die Zytokinproduktion der T-Zellen gemessen. Eine hohe GM-CSF-Menge entsprechend einer hohen Extinktion in der ELISA-Messung korreliert mit einer starken Aktivierung.

### 2.2.1 Die *in vitro* angereicherten T-Zellen sind tumorspezifisch

Eine wichtige Frage war, ob die angereicherten T-Zellen eine tumorspezifische Reaktion zeigten. Um dies zu untersuchen, wurden in den GM-CSF-Inkubationsansätzen parallel zu den A20- und A20Id-Zielzellen auch MPC11-Zellen eingesetzt. Diese sollten von T-Zellen, die mit A20-Antigenen stimuliert worden waren, nicht erkannt werden, und diese T-Zellen sollten deshalb auch kein GM-CSF produzieren. Ebenso wenig sollten die T-Zellen aktiviert werden, wenn sie allein mit T-Zell-Medium inkubiert wurden. Wie sich zeigte, waren diese Annahmen richtig: Die ELISA-Messwerte für MPC11 und Medium lagen selbst nach vielfachen T-Zell-Restimulationen, nach denen die Werte

mit den A20-Zielzellen hoch waren, immer im Bereich der ELISA-Hintergrundextinktion (Abbildung V-5, S. 62). Der Hintergrund wurde ermittelt, indem im ELISA anstatt T-Zell-Kulturüberstand aus den GM-CSF-Ansätzen nur T-Zell-Medium verwendet wurde.

Somit eigneten sich MPC11-Zellen und T-Zell-Medium als Negativkontrolle bei der Bestimmung des T-Zell-Aktivierungszustandes. Da die Werte dieser beiden Kontrollen jedoch immer auf vergleichbarem Niveau lagen (Abbildung V-3, S. 60) und die Anzahl der zur Verfügung stehenden T-Zellen ein limitierender Faktor war, wurde in späteren GM-CSF-Sekretionsansätzen auf die Kontrolle mit MPC11-Zellen verzichtet.

Um die Messwerte aus unterschiedlichen Stimulationsrunden und damit unterschiedlichen ELISA-Ansätzen zu vergleichen, wurde der Aktivierungsquotient (AQ) aus dem Ergebnis des Ansatzes mit Zielzellen und dem Ergebnis der Negativkontrolle gebildet, bei einem Effektor- zu Zielzellenverhältnis von 2,5:1 und 1,25:1 (Anhang, S. 92).

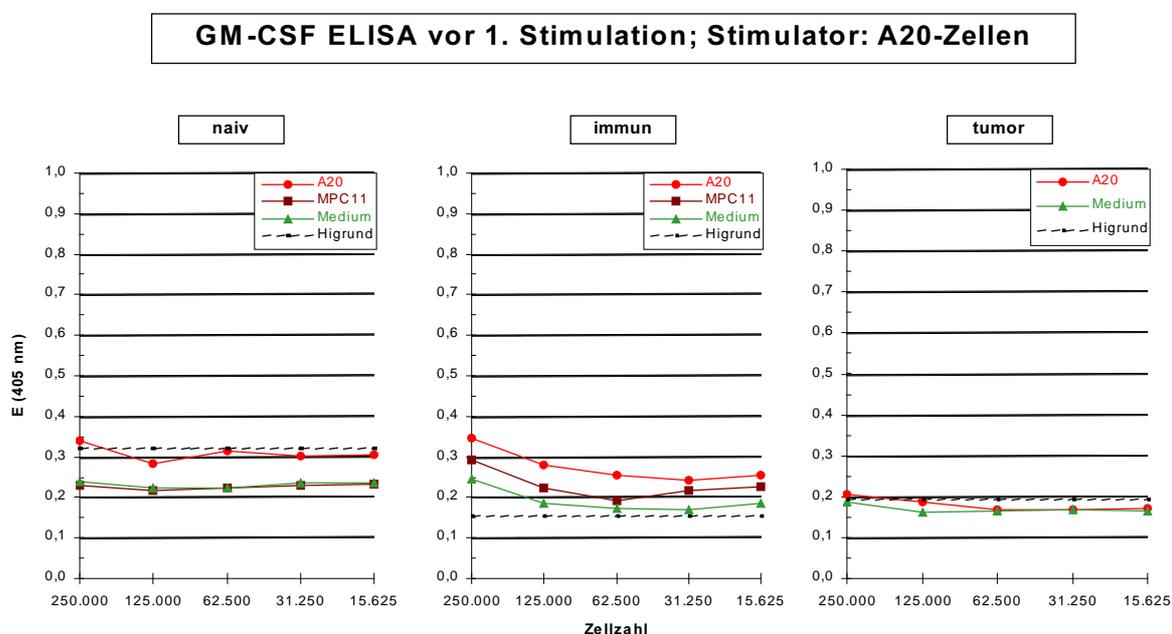
### **2.2.2 Tumorreaktivität von T-Zellen aus Immun-, Naiv- und Tumormäusen**

Zuerst wurden die T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen im Vergleich zu den T-Zellen aus Naivmäusen und tumortragenden Mäusen analysiert. Ohne Stimulation zeigten die T-Zellen keine A20-spezifische Aktivierung, unabhängig davon, aus welcher Maus sie stammten. Die Extinktionswerte lagen im Bereich der Negativkontrollen (Abbildung V-3, S. 60). Die T-Zellen aus der immunisierten Maus hatten zwar leicht höhere Werte als die anderen, diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Auch zwischen A20- und A20Id-Zielzellen waren keine Unterschiede zu erkennen (Abbildung V-4: naiv, S. 61).

Wenn man das Verhalten der T-Zellen im Verlauf der *In-vitro*-Stimulationen analysiert, stellt man fest, dass es in Abhängigkeit von der Herkunft deutliche Unterschiede gibt: Die Zellen aus der Triom-immunisierten Maus (immun) zeigten schon nach der zweiten Restimulation eine deutliche Aktivität, die sich in den folgenden Stimulationen weiter steigerte, wobei es bis zur dritten Restimulation keinen signifikanten Unterschied zwischen A20-Zell- und Protein-Stimulation gab (Abbildung V-4, S. 61 und Anhang, S. 92). Ab der vierten Restimulation stieg der Aktivierungsquotient der mit A20-Zellen stimulierten T-Zellen jedoch weniger stark an als der Aktivierungsquotient der T-

Zellen aus der Stimulation mit BiV- bzw. Ag20-Protein. Die höchsten Werte wurden in der Stimulation mit BiV-Protein erreicht (Anhang, S. 92).

Betrachtet man hingegen die T-Zellen aus der Naivmaus (naiv), so kann man erkennen, dass bis zur dritten Restimulation keine Aktivierung stattfand (Abbildung V-4, S. 61). Erst nach der vierten Restimulation ist eine deutliche Aktivitätssteigerung zu erkennen, die auf gleichem Niveau mit der Aktivität der Zellen aus der Triom-immunisierten Maus liegt und während der darauf folgenden Stimulationen erhalten bleibt (Abbildung V-5, S. 62 und Anhang, S. 92).



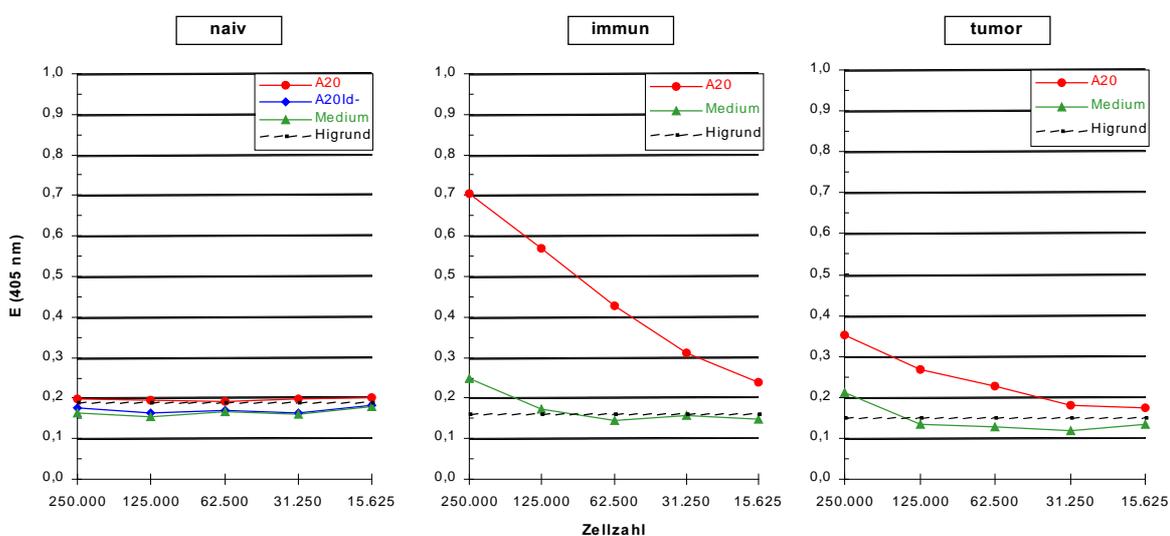
**Abbildung V-3: Aktivierungszustand der T-Zellen vor Stimulation *in vitro***

In einem GM-CSF-Sekretions-ELISA wurden T-Zellen aus einer Triom-immunisierten Maus (immun) hinsichtlich ihrer GM-CSF-Produktion mit denen aus einer Naiv- (naiv) bzw. tumortragenden Maus (tumor) verglichen. Ausgehend von 250.000 T-Zellen wurden vier log<sub>2</sub>-Verdünnungsstufen angesetzt. Als Stimulatoren bei der darauf folgenden ersten Stimulation wurden A20-Zellen verwendet. Als Zielzellen im ELISA-Ansatz dienen A20-Zellen (A20). Als Negativkontrolle wurden MPC11-Zellen (MPC11) herangezogen oder es wurde T-Zell-Medium allein (Medium) zugegeben. Für die Hintergrundmessung (Higrund) im ELISA wurde anstatt des jeweiligen T-Zell-Überstandes aus dem GM-CSF-Ansatz nur T-Zell-Medium verwendet.

Die T-Zellen aus der tumortragenden Maus (tumor) hingegen zeigten bis zur dritten Restimulation eine leicht ansteigende Aktivierung, die aber deutlich unter der der Zellen aus der Triom-immunisierten Maus lag (Abbildung V-4, S. 61 und Anhang, S. 92). Auch hier war die Stimulationsart nicht ausschlaggebend (Anhang, S. 92).

Man kann also festhalten, dass die T-Zellen aus den Triom-immunisierten Mäusen, Naivmäusen und tumortragenden Mäusen vor Stimulation *in vitro* keine GM-CSF-Produktion aufweisen, dass aber die T-Zellen aus Immunmäusen *in vitro* schneller aktiviert werden können als T-Zellen aus Naiv- oder Tumormäusen.

**GM-CSF ELISA vor 3. Restimulation; Stimulator: A20-Zellen**



**Abbildung V-4: Aktivierungszustand der T-Zellen nach zwei Restimulationsrunden *in vitro***

In einem GM-CSF-Sekretions-ELISA wurden T-Zellen aus einer Triom-immunisierten Maus (immun) hinsichtlich ihrer GM-CSF-Produktion mit denen aus einer Naiv- (naiv) bzw. tumortragenden Maus (tumor) verglichen. Ausgehend von 250.000 T-Zellen wurden vier log<sub>2</sub>-Verdünnungsstufen angesetzt. Als Stimulatoren dienten A20-Zellen. Als Zielzellen im ELISA-Ansatz wurden sowohl A20- als auch A20Id-Zellen verwendet. Als Negativkontrolle wurde mit T-Zell-Medium allein (Medium) inkubiert. Für die Hintergrundmessung (Higrund) im ELISA wurde anstatt des jeweiligen T-Zell-Überstandes aus dem GM-CSF-Ansatz nur T-Zell-Medium verwendet.

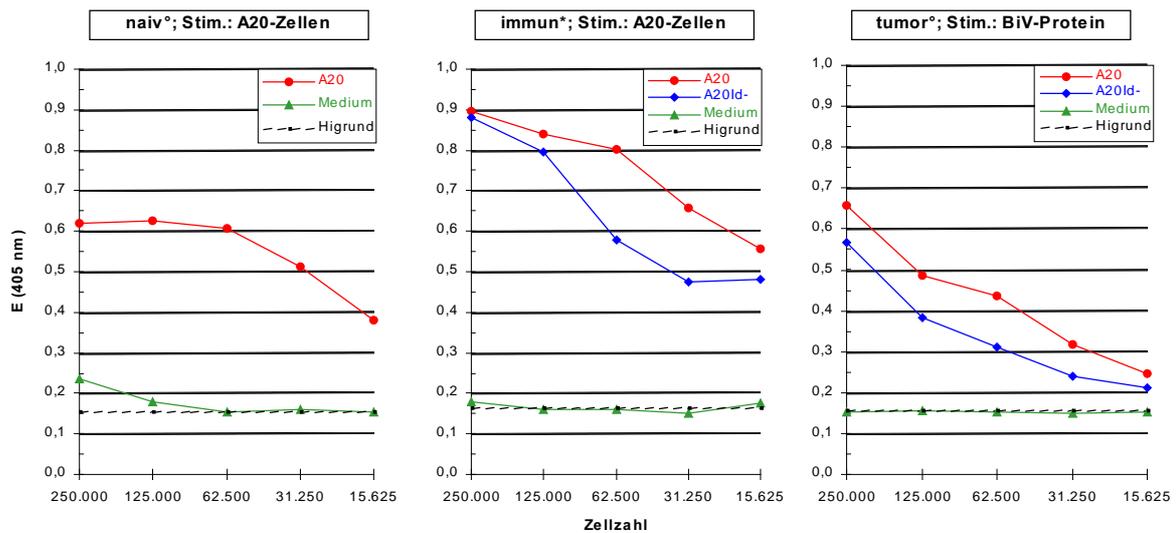
**2.2.3 Der Einfluss des Idiotyps auf die Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen**

Betrachtet man die Extinktionswerte aus den Ansätzen mit A20Id-Zielzellen, so kann man feststellen, dass sie sich prinzipiell so verhalten wie die Ergebnisse mit A20-Zielzellen, unabhängig davon welche Stimulatoren verwendet wurden und woher die stimulierten T-Zellen stammten (Abbildung V-5, S. 62). Auffällig ist, dass die Aktivierungsquotienten immer niedriger sind als die bei A20-Zielzellen, was durch das Fehlen des Id erklärt werden kann.

Den obigen Ergebnissen kann man entnehmen, dass der Id bei der T-Zell-Aktivierung *in vitro* zwar eine Rolle spielen könnte, dass er aber nicht essenziell ist. Für die T-Zell-

Aktivierung sind noch weitere, bisher unbekannte Tumorantigene verantwortlich, die zusammen an der *In-vitro*-Aktivierung von T-Zellen einen größeren Anteil besitzen als der Id.

**GM-CSF ELISA vor 5.<sup>\*</sup> bzw. nach 6.<sup>o</sup> Restimulation**



**Abbildung V-5: Aktivierungszustand der T-Zellen nach vier bzw. sechs Restimulationsrunden *in vitro***

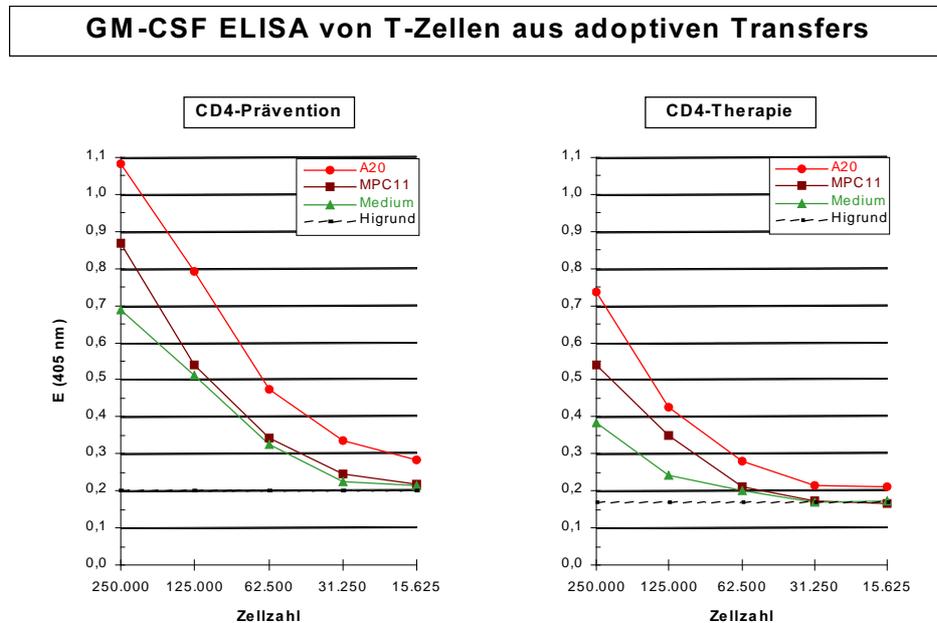
In einem GM-CSF-Sekretions-ELISA wurden T-Zellen aus einer Triom-immunisierten Maus (immun) hinsichtlich ihrer GM-CSF-Produktion mit denen aus einer Naiv- (naiv) bzw. tumortragenden Maus (tumor) verglichen. Ausgehend von 250.000 T-Zellen wurden vier log<sub>2</sub>-Verdünnungsstufen angesetzt. Bei den T-Zellen aus Naiv- und Immunmaus dienten A20-Zellen als Stimulatoren. Die T-Zellen aus der Tumormaus wurden mit BiV-Protein stimuliert. Die T-Zellen aus der Naiv- und Tumormaus wurden jeweils sechsmal restimuliert (\*), die aus der Immunmaus viermal (\*). Als Zielzellen im ELISA-Ansatz wurden A20- und A20Id-Zellen verwendet. Die Negativkontrolle wurde mit T-Zell-Medium (Medium) inkubiert. Für die Hintergrundmessung (Higrund) im ELISA wurde anstatt des jeweiligen T-Zell-Überstandes nur T-Zell-Medium verwendet.

**2.2.4 Die T-Zellen aus adoptiven Transfers**

Es wurde gezeigt, dass durch einen adoptiven T-Zell-Transfer aus Triom-immunisierten Mäusen Naivmäuse vor Tumorwachstum geschützt werden können (A. Dieckmann, pers. Mitteilung). Deshalb war es von Interesse, ob T-Zellen aus diesen geheilten Mäusen vor *In-vitro*-Stimulation ein anderes Aktivitätsverhalten zeigten, als die Zellen aus der Naivmaus, Triom-immunisierten Maus und Tumormaus. Die T-Zellen aus den adoptiven Transfers stammen aus Mäusen, die eine Tumordinjektion mit gleichzeitigem adoptivem CD4- oder CD8-T-Zell-Transfer überlebt (CD4-/ CD8-Prävention)

oder einen etablierten Tumor nach adoptivem CD4-T-Zell-Transfer abgestoßen haben (Therapie).

Im Gegensatz zu den Zellen aus Triom-immunisierten und tumortragenden Mäusen zeigten die Zellen aus der CD4-Prävention und -Therapie bereits vor Stimulation eine Aktivierung. Jedoch zeigten auch die mit MPC11-Zellen versetzten T-Zell-Ansätze, die als Kontrolle für unspezifische Aktivierung gelten sollten, eine sich deutlich vom ELISA-Hintergrund abhebende GM-CSF-Produktion (Abbildung V-6). Es brachten also bereits alle Zellen eine mehr oder weniger hohe eigene Aktivität mit, selbst wenn sie keine Zielzellen, wie in der „Medium-Kontrolle“, zur Verfügung hatten.



**Abbildung V-6: Aktivierungszustand von T-Zellen aus adoptiven Transfers vor *In-vitro*-Stimulation**

In einem GM-CSF-Sekretions-ELISA wurden T-Zellen aus einer Maus, die eine Tumorgabe mit gleichzeitigem adoptivem T-Zell-Transfer überlebt hatte (Prävention), hinsichtlich ihrer GM-CSF-Produktion mit denen aus einer Maus, die einen 7 Tage alten Tumor nach adoptivem T-Zell-Transfer abgestoßen hatte (Therapie), verglichen. Ausgehend von 250.000 T-Zellen wurden vier log<sub>2</sub>-Verdünnungsstufen angesetzt. Als Zielzellen dienen A20-Zellen (A20). In der Negativkontrolle wurden MPC11-Zellen (MPC11) als Zielzellen herangezogen oder es wurde T-Zell-Medium allein (Medium) zugegeben. Für die Hintergrundmessung (Higrund) im ELISA wurde anstatt des jeweiligen T-Zell-Überstandes nur T-Zell-Medium verwendet.

Die T-Zellen aus den CD8-Präventionsversuchen zeigten bei ihren Aktivierungsquotienten vor Stimulation ähnliche Werte wie die T-Zellen aus den Naiv-, Tumor-

und Triom-immunisierten Mäusen vor Stimulation (Anhang, S. 92). Auch die Kontrollen für Tumorspezifität mit den MPC11-Zellen und dem T-Zell-Medium verhielten sich unauffällig und verliefen auf Hintergrundniveau.

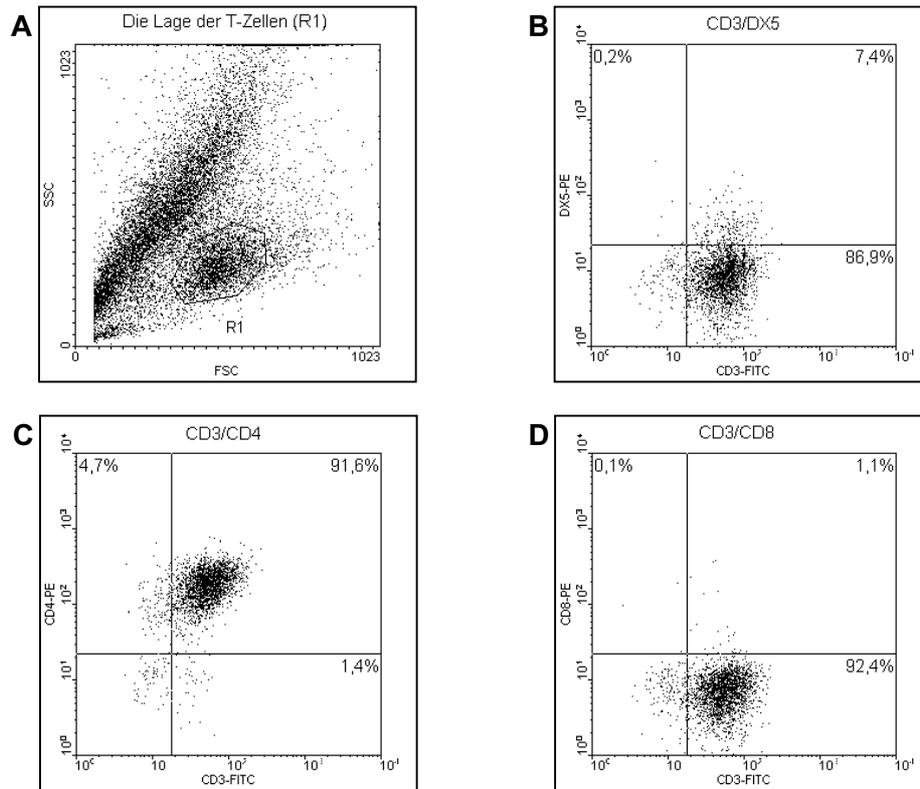
### 2.2.5 Der „CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Klon“

Aus Triom-immunisierten Mäusen war durch *In-vitro*-Stimulationen und limitierende Verdünnung ein T-Zell-Klon etabliert worden, der als CD4-positiv identifiziert wurde (A. Dieckman, unveröffentlicht). Dieser Klon wurde im Rahmen dieser Arbeit auf seine A20-spezifische Aktivität nach weiteren neun Restimulationsrunden *in vitro* mit A20-Zellen untersucht. Man musste jedoch feststellen, dass die T-Zellen selbst nach so vielen Restimulationen keine tumorspezifische Aktivität zeigten (Anhang, S. 92).

## 3. Der Phänotyp der T-Zellen nach *In-vitro*-Stimulation

Zur weiteren Charakterisierung der *in vitro* restimulierten T-Zellen wurden diese, soweit genügend Zellen vorhanden waren, nach mehreren Stimulationen auf die Expression der Oberflächenmoleküle CD3, CD4, CD8, DX5 (NK-Marker),  $\alpha/\beta$ -TZR und  $\gamma/\delta$ -TZR untersucht:

Bei den untersuchten Stimulationsansätzen, in denen die T-Zellen aus Naiv-, Tumormäusen und Triom-immunisierten Mäusen stammten, war zu erkennen, dass die Zellpopulation nach fünf Restimulationen (bei der Triom-immunisierten Maus) bzw. sechs Restimulationen (bei der Naiv-/ Tumormaus) immer zum Großteil aus CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen bestand. Nur ein kleiner Anteil der Zellen war CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Abbildung V-7, S. 65 und Tabelle V-2, S. 67). Auch waren nur wenige CD3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup> Zellen, die dem NK-T-Zell-Typ angehören könnten (Hammond et al., 1999), sowie CD3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>-Zellen, die einen NK-Phänotyp besitzen, vorhanden (Abbildung V-7, S. 65 und Tabelle V-2, S. 67).

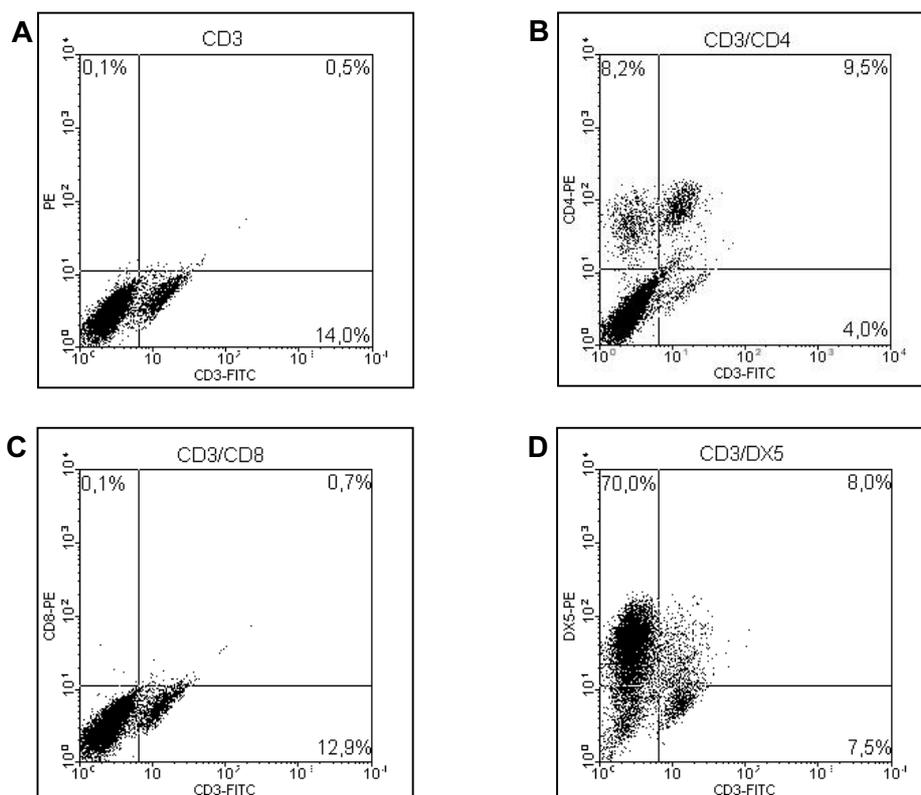


**Abbildung V-7: Phänotyp der T-Zellen aus der Triom-immunisierten Maus nach fünf Restimulationen *in vitro***

Bei der Charakterisierung der T-Zellen im FACS wurde die Expression von CD3, CD4, CD8 und DX5 an doppelmarkierten Zellen untersucht. Die Ereignisse in den Abbildungen B, C und D beziehen sich auf die lebenden Zellen in Region 1 (R1 in Abb. A). Das Fadenkreuz wurde aus den Einstellungen mit der Negativkontrolle nach B, C und D übertragen.

Wie erwartet verringerte sich in den beiden Ansätzen Naivmaus/ Triom-immunisierte Maus nach der neunten Restimulation die Anzahl der CD3<sup>+</sup>- und CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-Zellen, ebenso wie bei den BiV-Protein-stimulierten Zellen aus der Tumormaus. Dies hängt wahrscheinlich mit nachlassender Proliferationsfähigkeit der T-Zellen bei hohen Stimulationszahlen zusammen.

In allen bisher analysierten Ansätzen ließen sich keine CD3<sup>+</sup>-Zellen mit  $\gamma/\delta$ -TZR nachweisen.



**Abbildung V-8: Phänotyp des „CD4<sup>+</sup>-Klons“ nach neun Restimulationen *in vitro***

Bei der Charakterisierung des „CD4<sup>+</sup>-Klons“ im FACS wurde die Expression von CD3, CD4, CD8, DX5,  $\alpha/\beta$ -TZR (ohne Abb.) und  $\gamma/\delta$ -TZR (ohne Abb.) an doppelmarkierten Zellen untersucht. Die Ereignisse in allen Abbildungen beziehen sich auf lebende Zellen, die vorher abgegrenzt worden sind. Die CD3-Einfachmarkierung in A diente für die Messungen in B, C und D als Negativkontrolle für die Positionierung des Fadenkreuzes.

In Stimulationsansatz des „CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Klons“ zeigte sich nach der 9. Restimulation, dass die Zellpopulation zu 70% aus CD3-DX5<sup>+</sup>-NK-Zellen bestand und dass nur noch wenige Zellen CD3<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> waren (Abbildung V-8 und Tabelle V-2, S. 67). 3,4% der CD3<sup>+</sup>-Zellen besaßen  $\gamma/\delta$ -TZR. Anscheinend waren durch die wiederholten Restimulationen in der Population fast ausschließlich NK-Zellen zur Proliferation angeregt worden.

Tabelle V-2: Phänotypisierung der T-Zellen in unterschiedlichen Restimulationsstadien

Maus, aus der die T-Zellen stammen	Restimulationsanzahl	Stimulator <i>in vitro</i>	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /DX5 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> /DX5 <sup>+</sup>	TZR $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> von CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>	TZR $\gamma/\delta$ <sup>+</sup> von CD3 <sup>+</sup>
Naiv	6	A20-Zellen	96,7%	95,8%	1,5%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Naiv	9	A20-Zellen	73,3%	64,1%	0,4%	0,2%	0,1%	85,3%	0%
BiV-immunisiert	5	BiV-Protein	93,3%	91,6%	1,1%	7,4%	0,2%	n.d.	n.d.
BiV-immunisiert	9	BiV-Protein	85,7%	79,6%	0%	2,1%	0,3%	97,5%	n.d.
BiV-immunisiert	5	Ag20-Protein	88,1%	86,2%	2,1%	5,3%	1,0%	n.d.	n.d.
Tumortragend	6	A20-Zellen	92,2%	52,2%	12,7%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tumortragend	6	BiV-Protein	48,5%	11,1%	2,7%	3,3%	1,5%	n.d.	n.d.
Tumortragend	6	Ag20-Protein	82,3%	75,0%	0%	4,6%	0,7%	n.d.	n.d.
„CD4-T-Zell-Klon“	9	A20-Zellen	14,0%	9,5%	0,7%	8,0%	70,0%	47,9%	3,4%

In der Tabelle sind alle Restimulationsansätze aufgeführt, bei denen die T-Zellen einer FACS-Untersuchung unterworfen wurden. Die TZR  $\alpha/\beta$ <sup>+</sup>-Werte in der vorletzten Spalte beziehen sich auf die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Population aus Spalte fünf. Die TZR  $\gamma/\delta$ <sup>+</sup>-Werte in der letzten Spalte beziehen sich auf die CD3<sup>+</sup>-T-Zell-Population aus Spalte vier. Alle anderen Werte beziehen sich auf die lebende T-Zell-Population.  
n.d.: keine Messung durchgeführt

#### 4. Adoptiver Transfer der T-Zellen nach Restimulation

Nachdem sich die T-Zellen aus den *In-vitro*-Restimulationsansätzen bezüglich ihres tumorspezifischen Aktivierungspotenzials ähnlich verhalten hatten, sollte auch ihre tumor-protective Wirkung *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden drei Parallelansätze durchgeführt.

Die T-Zellen stammten in Ansatz eins aus einer Triom-immunisierten Maus und waren *in vitro* fünfmal mit BiV-Protein stimuliert worden; in Ansatz zwei kamen die T-Zellen aus einer Naivmaus und waren sechsmal mit A20-Zellen restimuliert worden während sie in Ansatz drei aus einer tumortragenden Maus entnommen und ebenfalls sechsmal mit BiV-Protein stimuliert worden waren. In einem adoptiven Transfer wurde mit  $5 \times 10^5$  T-Zellen jeweils eine Naivmaus behandelt. Die T-Zellen wurden präventiv, zusammen mit einer letalen Dosis Tumorzellen verabreicht. (Abbildung V-9, S. 69).

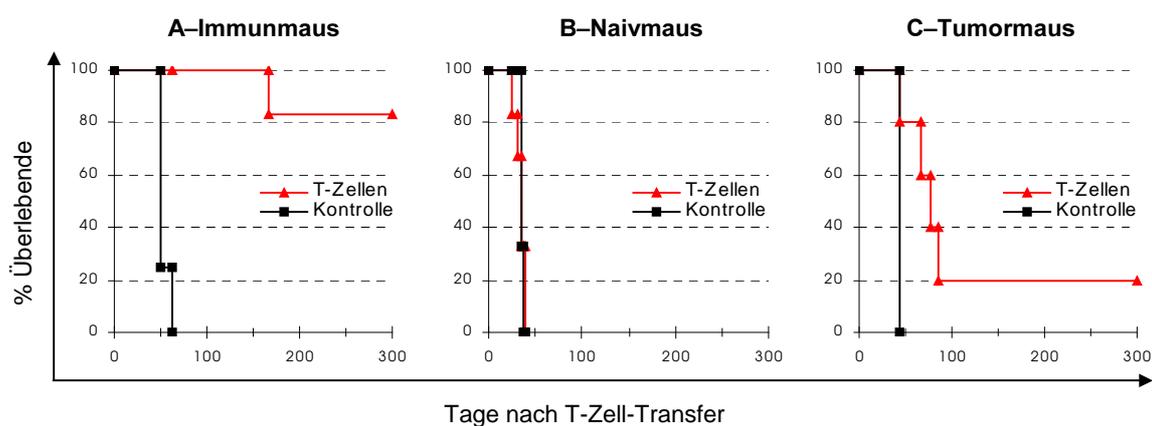
Es zeigte sich, dass alle Mäuse, die T-Zellen aus der Triom-immunisierten Maus erhalten hatten, 165 Tage lang überlebten. Die Mäuse aus der Kontrollgruppe hingegen zeigten schon 53 bis 66 Tage nach Versuchsbeginn klinische Auffälligkeiten und mussten eingeschläfert werden. Alle T-Zell-Rezipienten waren also sogenannte Langzeitüberleber (Lebensdauer nach Versuchsbeginn >150 Tage). Fünf von sechs Mäusen lebten sogar bis zum Ende der veranschlagten Versuchszeit.

Die Mäuse, die T-Zellen aus der Naivmaus bekommen hatten, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine verlängerte Lebensdauer.

Hingegen konnte man bei fünf der sechs Mäuse, die T-Zellen aus der Tumormaus erhalten hatten, eine verlängerte Lebensdauer beobachten. Im Vergleich zu den Mäusen aus der Kontrollgruppe mussten vier der fünf T-Zell-Empfänger erst nach 43 bis 86 Tagen eingeschläfert werden. Eine Maus war sogar ein Langzeitüberleber bis zum Versuchsende.

Anhand dieser Daten kann man bei den T-Zellen, die bei der *In-vitro*-Restimulation alle ein ähnliches tumorspezifisches Aktivitätsverhalten gezeigt hatten, bezüglich ihrer Fähigkeit, Tumorprotektivität *in vivo* zu vermitteln, eine Dreiteilung vornehmen: Naive T-Zellen können keinen Tumorschutz vermitteln; im Gegensatz dazu führen T-Zellen

aus tumortragenden Mäusen zu verlangsamtem Tumorwachstum, können es aber nicht vollständig unterbinden. Nur T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen sind in der Lage, einen langdauernden und effektiven Schutz vor Tumorwachstum zu vermitteln, obwohl alle T-Zellen, unabhängig von ihrer Herkunft, *in vitro* ähnliches tumorspezifisches Aktivierungsverhalten zeigen.



**Abbildung V-9: Adoptiver Transfer *in vitro* restimulierter T-Zellen als Tumorphävention**

Unbehandelte Mäuse bekamen zusammen mit einer letalen Dosis von A20-Tumorzellen je  $5 \times 10^5$  *in vitro* restimierte T-Zellen (▲ T-Zellen). Die in Grafik **A** verwendeten T-Zellen stammen aus einer triomimmunisierten Maus und wurden *in vitro* fünfmal mit BiV-Protein stimuliert. Die T-Zellen in Grafik **B** stammen aus einer unbehandelten Maus und wurden *in vitro* sechsmal mit A20-Zellen stimuliert. Die in Grafik **C** verwendeten T-Zellen sind aus einer tumortragenden Maus und wurden *in vitro* sechsmal mit BiV-Protein stimuliert. Die Kontrollgruppe (■ Kontrolle) bekam jeweils eine letale Dosis A20-Zellen zeitgleich zum adoptiven T-Zell-Transfer.

Um zu erfahren, ob die T-Zellen aus der Naivmaus nach vielen Restimulationen mit A20-Zellen eine Tumorphävention *in vivo* vermitteln können, wurde mit diesen Zellen nach neun Stimulationsrunden nochmals ein adoptiver Transfer nach obigem Schema durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass die Zellen auch zu diesem Zeitpunkt keinen Tumorschutz gewähren konnten.

## 5. TZR-Repertoires der tumorreaktiven T-Zellen

Die *in vitro* restimulierten T-Zellen zeigten *in vivo* ein voneinander abweichendes tumorprotektives Verhalten, obwohl die Aktivitätstests *in vitro* ein ähnliches Muster aufgezeigt hatten. Um zu prüfen, ob die Unterschiede im *In-vivo*-Verhalten auf der Verwendung von unterschiedlichen T-Zell-Rezeptoren beruhten, wurde das TZR-

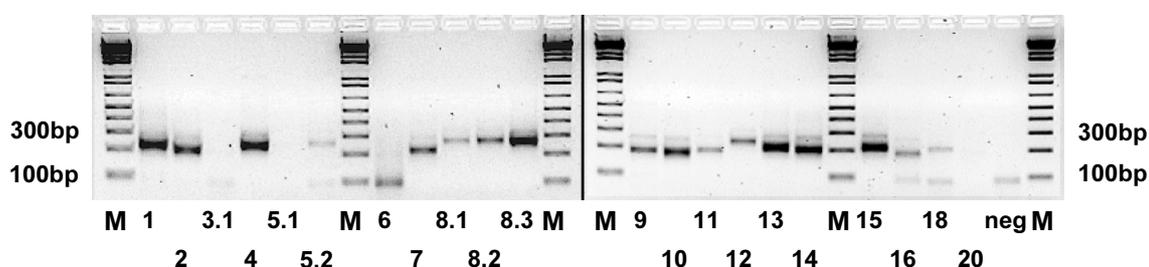
Repertoire der T-Zellen auf transkriptioneller Ebene mittels RT-PCR und anschließender Sequenzierung der Amplifikate untersucht.

Das TZR-Repertoire umfasst alle in einer T-Zell-Population vorkommenden TZR. Da auf einer T-Zelle immer nur ein TZR-Typ exprimiert wird, kann man über das Repertoire der Rezeptoren auf die Klonalität der Zellpopulation schließen.

### 5.1 Primerauswahl und Etablierung der Methode

In der Etablierungsphase der TZR-PCR wurde cDNS aus der RNS von Lymphknoten- und Milzzellen aus unbehandelten Mäusen verwendet; man geht davon aus, dass eine normale naive Maus T-Zellen mit sämtlichen TZR- $\beta$ -Ketten besitzt.

Für die PCR wurde ausschließlich die Primergruppe II verwendet (Kap. IV 1.6, S. 38), da die Primergruppe I an einen  $V\beta$ -Bereich banden, der zwischen den einzelnen V-Gen-Familien sehr stark konserviert ist. Die Primer der Gruppe II jedoch zeigen eine Spezifität für jeweils nur eine  $V\beta$ -Familie bzw. Unterfamilie. Die daraus resultierenden DNS-Fragmente sind zwischen 188 und 265bp lang (Abbildung V-10).



**Abbildung V-10:  $V\beta$ -TZR-PCR aus einer Naivmaus**

Von jedem der 22 PCR-Ansätze (50 $\mu$ l) wurden 10 $\mu$ l auf ein Agarosegel aufgetragen und zwar in aufsteigender Reihenfolge der Familiennummer der V-Region. In der letzten Tasche vor dem Marker befindet sich die Negativkontrolle (neg). Bei den Banden im 100bp-Bereich handelt es sich um Primer-Dimere.

In den PCR-Ergebnissen kann man erkennen, dass eine Naivmaus nicht, wie vermutet, alle V-Familien/Unterfamilien der  $\beta$ -Ketten besitzt:  $V\beta$ 3.1,  $V\beta$ 5.1,  $V\beta$ 6 und  $V\beta$ 20 sind nicht vorhanden. Zusätzlich unterscheiden sich die Banden in ihrer Stärke, obwohl in jede Geltasche das gleiche Volumen an PCR-Produkt eingefüllt wurde. Das Spektrum reicht von „kaum vorhanden“, z.B.  $V\beta$ 5.2,  $V\beta$ 8.1,  $V\beta$ 11 und  $V\beta$ 18, bis zu „sehr stark“ bei z.B.  $V\beta$ 1,  $V\beta$ 4,  $V\beta$ 8.3,  $V\beta$ 13,  $V\beta$ 14, und  $V\beta$ 15. Die Primer-Dimere, die in manchen

Reaktionsansätzen im Bereich von 100bp zu erkennen sind, beeinflussen die Reaktion nicht und können deshalb vernachlässigt werden. In allen folgenden PCR-Untersuchungen wurden die Bandenstärken in die Stufen +++, ++, + oder – eingeteilt.

Als Positivkontrolle für Monoklonalität diente eine RT-PCR mit der RNS aus dem T-Zell-Klon EL-4. In dieser PCR sollte nur ein einziges Primerpaar ein Produkt generieren. Dies bestätigte sich; eine Bande war nur mit dem Primer für V $\beta$ 12 zu erkennen. In der Sequenzierung bestätigte sich das PCR-Ergebnis ebenfalls; auch im J-Bereich war nur eine dominante Sequenz zu erkennen: J $\beta$ 2.3.

## 5.2 Das TZR-V $\beta$ -Repertoire unstimulierter T-Zellen

Nach erfolgreicher Etablierung der Methode konnte mit den eigentlichen Probenuntersuchungen begonnen werden.

Als Ausgangspunkt wurde das Repertoire von unstimulierten T-Zellen herangezogen. Es stellte sich heraus, dass sich die TZR-Repertoires von Naivmaus und Triom-immunisierte Maus kaum unterscheiden. Eine Ausnahme stellt Bande 6 dar, die in der Naivmaus überhaupt nicht, aber in der Triom-immunisierten Maus sehr deutlich zu sehen ist. Bande 5.2 und 8.1 sind in der Naivmaus nur sehr schwach sichtbar, jedoch nicht mehr in der Triom-immunisierten Maus (Tabelle V-3, S. 74). Bestimmte TZR-Familien waren jedoch in beiden Fällen dominant und stimmten sogar in ihrer Bandenstärke weitestgehend überein, z.B. V $\beta$ 1, V $\beta$ 4, V $\beta$ 8.3, V $\beta$ 13, V $\beta$ 14, und V $\beta$ 15.

Auf eine zusätzliche Sequenzierung der PCR-Produkte wurde verzichtet. Aufgrund des kaum eingeschränkten V $\beta$ -Repertoires der unstimulierten Zellen war zu erwarten, dass für das Rearrangement der  $\beta$ -Kette viele unterschiedliche V- und J-Gensegmente verwendet würden; eine Sequenzierung würde daher eine kaum lesbare Mischsequenz aller vorhandenen J-Gensegmente ergeben.

## 5.3 Das TZR-V $\beta$ -Repertoire stimulierter T-Zellen

Bei den *in vitro* stimulierten T-Zellen sollte die Entwicklung des Repertoires mit fortschreitender Stimulationsanzahl verfolgt werden, da aus den *In-vivo*-Versuchen bekannt war, dass sich die T-Zellen ihrer Herkunft entsprechend unterschiedlich verhielten.

Deshalb wurde das TZR-Repertoire der T-Zellen, die im adoptiven Transfer eingesetzt wurden, nach der zweiten, fünften bzw. neunten Restimulation (falls durchgeführt) bestimmt. Dazu wurden zum Vergleich T-Zellen aus der Triom-immunisierten Maus untersucht, die mit A20-Zellen stimuliert worden waren. In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass diese schon nach wenigen, aber auch noch nach neun Restimulationen *in vitro* einen Tumorschutz *in vivo* vermitteln konnten.

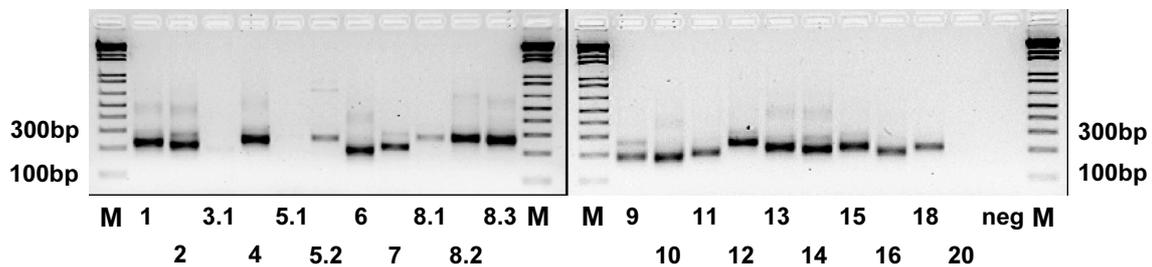
In den Repertoires ist zu erkennen (Tabelle V-4, S. 74), dass bestimmte V $\beta$ -Genfamilien für die TZR-Bildung kaum verwendet werden (3.1, 5.1, 18, 20), wie das bereits vor Stimulation auch schon der Fall war; andere dagegen werden bevorzugt (1, 4, 6, 8.3, 13, 14, 15). Generell kann man erkennen, dass bis einschließlich zur fünften Restimulation kaum eine Repertoire-Einschränkung stattfindet, d.h. dass sich die Repertoires der stimulierten T-Zellen nur in wenigen TZR von denen unstimulierter T-Zellen unterscheiden (V $\beta$ 7 und V $\beta$ 12 bei der Naivmaus, V $\beta$ 5.2, V $\beta$ 8.2 und V $\beta$ 12 bei der Triom-immunisierten Maus). Auffallend ist bei den T-Zellen der Naivmaus, dass durch die Stimulation V $\beta$ 6 zu einer deutlichen Expression angeregt wurde.

Vergleicht man die T-Zellen unterschiedlicher Herkunft zum Zeitpunkt des adoptiven Transfers miteinander (nach fünf/ sechs Restimulationen), so zeigen die Zellen aus der Triom-immunisierten Maus, die im adoptiven Transferversuch einen langdauernden Schutz vermitteln konnten, einige Abweichungen im Bandenmuster. Ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu den Zellen aus der Naivmaus ist bei den Banden für V $\beta$ 7, V $\beta$ 8.2 und V $\beta$ 18 zu erkennen. Im Vergleich zum Repertoire aus der tumortragenden Maus ist eine deutliche Abweichung bei V $\beta$ 4, V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 9, V $\beta$ 12 und V $\beta$ 18 zu sehen.

Ein Beispielgel mit den Banden der TZR-PCR-Produkte aus der Triom-immunisierten Maus nach fünf Restimulationen zeigt Abbildung V-11, S. 73.

Nur in den Repertoires der neunmal restimulierten T-Zellen ist eine starke Repertoire-Einschränkung zu erkennen. Die T-Zellen aus der Triom-immunisierten Maus, die mit A20-Zellen restimuliert waren, zeigen eine sehr starke Oligoklonalität der verwendeten TZR: Nur V $\beta$ 4 und V $\beta$ 6 sind dominant ausgeprägt, V $\beta$ 1 ist nur noch schwach zu erkennen. Diese Zellen zeigten *in vivo* eine tumorprotektive Wirkung.

Die neunmal mit BiV-Protein stimulierten T-Zellen aus der Triom-immunisierten Maus zeigen dagegen keine so starke Einengung des Repertoires wie die, welche mit A20-Zellen stimuliert waren. Es ist jedoch eine deutliche Einschränkung im Vergleich zum Repertoire nach fünf Restimulationen zu erkennen: Die meisten Banden sind nur schwach ausgeprägt oder nicht vorhanden. Ausnahmen stellen die Rezeptoren 1, 2, 4, 8.3, 10, 13, 14 und 15 dar, die dominant exprimiert sind.



**Abbildung V-11: V $\beta$ -TZR-PCR aus einer Triom-immunisierten Maus nach fünf Restimulationen mit BiV-Protein**

Von jedem der 22 PCR-Ansätze (50 $\mu$ l) wurden 10 $\mu$ l auf ein Agarosegel aufgetragen und zwar in aufsteigender Reihenfolge der Familiennummer der V-Region. In der letzten Tasche vor dem Marker befindet sich die Negativkontrolle (neg).

Vergleicht man die Zellen aus der Naivmaus nach neun und fünf Restimulationen, so kann man keinen nennenswerten Unterschied feststellen. Diese Beobachtung korreliert mit dem nicht protektiven *In-vivo*-Verhalten, das sich durch die wiederholten Stimulationen ebenfalls nicht verändert hat.

Um die Zusammensetzung der kodierenden Sequenzen für die TZR auch im J-Bereich zu beurteilen, wurden ausgewählte PCR-Produkte mit dominanten Banden einer Sequenzierung unterzogen (Tabelle V-5, S. 75). Die Produkte, deren Sequenzen bestimmt wurden, sind in Tabelle V-4, (S. 74) eingerahmt. Als Beispiel sind im Anhang (S. 95) die Sequenzen der PCR-Produkte V $\beta$ 4 und V $\beta$ 6 aus der Triom-immunisierten Maus nach neun Restimulationen mit A20-Zellen und BiV-Protein abgebildet.

Tabelle V-3: TZR-Vβ-Repertoires von T-Zellen aus Naivmaus und Triom-immunisierter Maus vor *In-vitro*-Stimulation

Maus, aus der die T-Zellen stammen	1	2	3.1	4	5.1	5.2	6	7	8.1	8.2	8.3	9	10	11	12	13	14	15	16	18	20
Naiv	+++	++	—	+++	—	+	—	++	+	++	+++	++	++	+	+	+++	+++	+++	+	+	—
Triom-immunisiert	+++	++	—	+++	—	—	+++	++	—	+	+++	++	+++	+	+	++	+++	+++	+	+	—

Tabelle V-4: TZR-Vβ-Repertoires von T-Zellen aus Naivmaus, Triom-immunisierter Maus und Tumormaus nach *In-vitro*-Restimulation

Maus, aus der die T-Zellen stammen	Restimulationsanzahl	Stimulator <i>in vitro</i>	1	2	3.1	4	5.1	5.2	6	7	8.1	8.2	8.3	9	10	11	12	13	14	15	16	18	20
Naiv	2	A20-Zellen	+	+	—	+++	—	+	++	+	+	+	+++	++	++	+	+	+++	+++	+++	+	—	—
Naiv	5	A20-Zellen	+++	++	—	+++	—	+	++	—	+	+	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Naiv	9	A20-Zellen	+++	+++	—	+++	—	+	++	—	+	+	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Triom-immunisiert	2	A20-Zellen	+++	+++	—	+++	—	+	+++	+	+	+	+++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+	+	—
Triom-immunisiert	5	A20-Zellen	+++	++	+	+++	—	++	+++	+	+	++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
Triom-immunisiert	9	A20-Zellen	+	—	—	+++	—	—	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Triom-immunisiert	5	BiV-Protein	+++	+++	+	+++	—	+	+++	++	+	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	—
Triom-immunisiert	9	BiV-Protein	+++	++	—	+++	—	—	+	—	—	—	+++	+	++	+	—	+++	+++	++	—	—	—
Tumortragend	6	BiV-Protein	++	++	—	+	—	—	+++	++	+	+	+++	—	++	++	—	++	++	++	++	—	—

Grau unterlegte Felder zeigen eine Einschränkung des Repertoires an, die sich in mehr als zwei Stufen von den entsprechenden Familienprodukten in Tab. V-3 unterscheiden. Von den PCR-Produkten der umrahmten Felder wurde die Sequenz bestimmt.

In vielen Ansätzen, vor allem nach wenigen Stimulationen, zeigte sich, dass oft mehrere J-Segmente mit einem V-Segment rearrangierten. Das machte sich beim Sequenzieren als Mischsequenz bemerkbar und war nicht auswertbar. Nur V $\beta$ 14 zeigte in allen sequenzierten Stimmulationsansätzen ein Rearrangement mit einem eindeutig identifizierbaren J-Segment.

**Tabelle V-5: Die J $\beta$ -Gensegmente der sequenzierten PCR-Produkte**

Maus, aus der die T-Zellen stammen	Restimulationsanzahl	Stimulator <i>in vitro</i>	V $\beta$ 1	V $\beta$ 2	V $\beta$ 4	V $\beta$ 6	V $\beta$ 8.2	V $\beta$ 8.3	V $\beta$ 12	V $\beta$ 13	V $\beta$ 14	V $\beta$ 15
Naiv	9	A20-Zellen	misch	n.d.	<b>J2.3</b>	misch	n.d.	<b>J1.1 (+J1.6)</b>	n.d.	<b>J2.6 (+J2.1)</b>	<b>J1.2</b>	n.d.
Triom-immunisiert	2	A20-Zellen	n.d.	n.d.	misch	misch	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Triom-immunisiert	5	A20-Zellen	misch	misch	misch	misch	misch	misch	misch	misch	<b>J1.3</b>	misch
Triom-immunisiert	9	A20-Zellen	n.d.	n.d.	<b>J1.3</b>	<b>J2.3</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Triom-immunisiert	5	BiV-Protein	misch	misch	misch	<b>J2.4/ J2.5</b>	<b>J2.5</b>	<b>J2.5</b>	misch	misch	<b>J1.3</b>	misch
Triom-immunisiert	9	BiV-Protein	misch	<b>J1.5</b>	<b>J2.3</b>	n.d.	n.d.	misch	n.d.	misch	<b>J2.4</b>	n.d.

Von den dominanten PCR-Produkten wurden die Sequenzen der J-Regionen bestimmt. J-Gensegmente, die in der Sequenz nur als schwacher Hintergrund zu erkennen sind, stehen in Klammern.

misch: Es lag eine Mischsequenz aus mehreren J-Gensegmenten vor, die nicht lesbar war. n.d.: Probe wurde nicht sequenziert;

Allein die T-Zellen aus der Triom-immunisierten Maus zeigten nach neun Restimulationen mit A20-Zellen eine Repertoire-Einschränkung auf drei Populationen: Das V $\beta$ 4-Gen war an J $\beta$ 1.3 umgelagert und V $\beta$ 6 an J $\beta$ 2.3. Die V $\beta$ 1-Bande war sehr schwach und wurde nicht sequenziert. Es ist auffallend, dass die Repertoires dieser Zellen nach fünf und neun Restimulationen völlig unterschiedlich voneinander sind; trotzdem konnten die Zellen in beiden Stadien einen Tumorschutz *in vivo* vermitteln.

Um ein vollständiges Bild über den bereits weiter oben (Kap. V 2.2, S. 58) eingeführten „CD4<sup>+</sup>-Klon“ zu bekommen, in dem nur noch wenige T-Zellen vorhanden waren, wurde auch mit diesen Zellen (nach sechs Restimulationen) eine TZR-PCR mit anschließender Sequenzierung der Produkte durchgeführt.

Im Agarosegel konnten nur PCR-Produkte mit den Primern 8.2 und 8.3 erkannt werden, sowie eine schwache Bande mit Primer 2. Bei der Sequenzierung dieser drei Produkte wurde jedoch deutlich, dass alle die gleiche Sequenz V $\beta$ 8.3-J $\beta$ 1.4 besaßen.

#### 5.4 Das Repertoire von tumorreaktiven Th1-Zellen

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Röcken (Dermatologische Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität) konnten aus Triom-immunisierten Mäusen auch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vom Th1-Typ generiert werden. Hierzu wurden Milzzellen *ex vivo* mit CpG-Oligonukleotiden, IL-2, anti-IL-4-Ak und APC zweimal restimuliert (Egeter et al., 2000). Die Th1-Zellen zeigten spezifische Tumorprotektion *in vivo*, wenn sie aus Triom-immunisierten Mäusen stammten; aus unbehandelten Tieren erzeugte Th1-Zellen waren wesentlich weniger wirksam, obwohl sie sich *in vitro* nicht von den Th1-Zellen aus den Naivmäusen unterschieden. Daher war es von Interesse, ob in diesen Zellen die Unterschiede bei der *In-vivo*-Wirksamkeit durch unterschiedliche TZR-Benutzung zustande kamen.

Die Ergebnisse zeigt Tabelle V-6, S. 77. Alle miteinander verglichenen Repertoires zeigen ein ähnliches, polyklonales Bandenmuster. Bestimmte V $\beta$ -Segmente sind in allen Repertoires stark vertreten (1, 2, 4, 6, 8.3, 10, 13, 14, und 15), andere zeigen nur sehr schwache Banden (3.1 zum Teil, 5.2, 8.1, 11, 16 und 18) oder sind überhaupt nicht an der TZR-Bildung beteiligt (5.1 und 20). Bei den Zellen zweier Triom-immunisierter Mäuse gibt es eine stärker exprimierte V $\beta$ 11-Bande und eine hervortretende V $\beta$ 12-Bande (s. Tabelle V-6, S. 77).

In der Verwendung der TZR-V $\beta$ -Ketten gibt es zwischen den einzelnen Zellpopulationen also kaum Unterschiede.

Tabelle V-6: TZR-V $\beta$ -Repertoires von Th1-Zellen, die bei adoptiven Transfers eingesetzt worden waren.

Maus, aus der die T-Zellen stammen	Restimulationsanzahl	1	2	3.1	4	5.1	5.2	6	7	8.1	8.2	8.3	9	10	11	12	13	14	15	16	18	20
Triom-immunisiert	2	+++	++	—	+++	—	+	++	+	+	+	+++	++	+++	+	+	+++	+++	+++	+	+	—
Triom-immunisiert	2	+++	++	+	+++	—	+	++	+	+	+	++	+	++	+	+	++	++	+++	+	+	—
Triom-immunisiert	2	+++	++	—	+++	—	—	++	+	+	+	++	++	+++	+++	+	+++	++	+++	+	+	—
Triom-immunisiert	2	+++	++	—	+++	—	+	++	++	+	+	+++	++	++	+	+++	+++	+++	+++	+	+	—
Naiv	2	+++	++	—	+++	—	+	+	++	+	+	+++	+	++	+	+	++	+++	+++	+	+	—

## VI DISKUSSION

Trotz neuester Fortschritte in der Strahlen- und Chemotherapie sind B-Zell-Lymphome immer noch nicht heilbar. Deswegen haben immuntherapeutische Ansätze für die Behandlung von niedrig malignen Lymphomen hohe Aufmerksamkeit erlangt. Ein absolut tumorspezifisches Zielantigen von entarteten B-Zellen ist der auf deren Oberfläche exprimierte Immunglobulin-Idiotyp (Ig-Id) (Stevenson et al., 1990). Er entsteht durch das Rearrangement der Gensegmente der variablen Regionen der schweren und leichten Kette.

Sowohl in Tiermodellen als auch in Patienten wurden in der Vergangenheit bereits viele Studien mit monoklonalen Antikörpern (Ak) gegen idiotypische Determinanten durchgeführt, welche die Wirksamkeit dieses Ansatzes zeigen konnten (z.B. Miller et al., 1982; Maloney et al., 1992). In klinischen Studien konnten sogar langdauernde Remissionen beobachtet werden. Jedoch kam es auch zu vielen Rückfällen, da es im Bereich der variablen Gensegmente des Ig zu somatischen Mutationen gekommen war. Dadurch wurde der Tumor durch den therapeutischen Ak nicht mehr erkannt (Meeker et al., 1985).

Es wird angenommen, dass diese Einschränkung durch die Induktion einer polyklonalen Immunantwort gegen viele Epitope umgangen werden kann. Dies ist durch den Einsatz von aktiven Immunisierungsstrategien möglich (Caspar et al., 1997). Da der Id jedoch nur ein schwaches Tumor-Ag darstellt, war für eine erfolgreiche Immunisierung, sowohl in Mausmodellen (Kaminski et al., 1987; Campbell et al., 1988; George et al., 1988; Campbell et al., 1990) als auch in klinischen Studien (Kwak et al., 1992; Hsu et al., 1993; Nelson et al., 1996), eine Kopplung an Trägerproteine oder die Zugabe von Adjuvantien notwendig. Auch eine Kopplung an Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierenden-Faktor war im Mausmodell erfolgreich (Tao & Levy, 1993).

Das bis dato effektivste Immunisierungsprotokoll ist jedoch der Triom-Ansatz im murinen System, in dem der Id an Antigen-präsentierende Zellen (APC) redirigiert wird (Mocikat et al., 1997). Der Triom-Ansatz hat sich als sehr potente Möglichkeit erwiesen, um gegen das A20-B-Zell-Lymphom in BALB/c-Mäusen *in vivo* präventiv und auch therapeutisch vorzugehen (Mocikat et al., 1997; Strehl et al., 1999).

Wie bei vielen anderen molekularimmunologischen Ansätzen zur Tumorbekämpfung, sind die in diesem System beteiligten Partner und ihre Wirkungsweisen jedoch noch nicht vollständig bekannt. Um die Mechanismen für den Erfolg dieses Ansatzes zu ergründen, sollte in dieser Arbeit ein Aspekt, die zelluläre Immunantwort in Triom-immunisierten Mäusen, untersucht werden.

Eine wichtige Frage ist, welche Rolle der Id dabei spielt, der ein optimaler Kandidat für alle Antitumor-Strategien wäre.

Um über die zelluläre Immunantwort im Triom-Ansatz mehr zu erfahren, wurden T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen *in vitro* stimuliert und ihre tumorspezifische Aktivität gegen Id-positive und Id-negative Tumorzellen verfolgt.

## 1. Herstellung von Zielzellen

Eine wichtige Frage betraf den Anteil, den der Id an der Immunogenität des A20-Lymphoms hat.

Hierfür wurden Id-negative Zellen verwendet. Wenn die generierte Immunantwort Id-reaktiv ist, sollte die T-Zell-Aktivität mit Id-negativen Zielzellen sehr viel geringer sein als mit Id-positiven WT-A20-Zellen.

In einem zweiten Ansatz sollte die Rolle des Id als einziges Ag bei der T-Zell-Aktivierung untersucht werden. Dazu wurde eine Transfektion des Id als single-chain-Konstrukt in MPC11-Zellen durchgeführt, da sich zeigte, dass die anti-A20-Antwort nicht mit MPC11 kreuzreaktiv ist. Aus unbekanntem Gründen war es jedoch nicht möglich, den A20-Id in MPC11-Zellen zur Expression zu bringen.

## 2. Untersuchungen zur Tumorreaktivität der T-Zellen

Nach Vakzinierung einer Maus mit BiV-Triom-Zellen bildet diese eine zelluläre Immunantwort mit Spezifität gegen die mit der Vakzine eingebrachten Ag. Wenn man Milz- und Lymphknotenzellen dieser vakzinierten Maus zusammen mit vitalen Tumorzellen nach dem Winn-Prinzip (Syrengeles & Levy, 1999) in eine Naivmaus überträgt, erkennen die T-Zellen die Ag der Tumorzellen wieder und können die Tumorzellen eliminieren. Dies war hier jedoch nicht der Fall, das Tumorstadium konnte nicht un-

terbunden werden (R. Mocikat, pers. Mitteilung). Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass die Frequenz tumorspezifischer T-Zellen in den entnommenen Organen der Triom-immunisierten Mäuse so gering war, dass sie gegen die Überzahl an Tumorzellen nichts auszurichten vermochten.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden mit den Milz- und Lymphknotenzellen aus Triom-immunisierten Mäusen *In-vitro*-Restimulationsversuche durchgeführt.

### 2.1 Die *In-vitro*-Restimulationen

Zusätzlich zu den Untersuchungen der T-Zellen aus der Triom-immunisierten Maus wurden auch T-Zellen aus einer Naivmaus und einer tumortragenden Maus hinzugezogen. Die T-Zell-Population aus der Triom-immunisierten bzw. einer tumortragenden Maus sollte Vertreter beinhalten, die in der Lage sind, die Tumorzellen zu erkennen bzw. auf eine Stimulation mit Tumor-Ag schneller zu reagieren, da sie vorher schon mit den Tumor-Ag Kontakt hatten. Andererseits könnten in einer tumortragenden Maus T-Zellen entstehen, die zwar Tumorspezifität zeigen, jedoch *in vivo* anergisiert werden (Sotomayor et al., 1999).

Als *In-vitro*-Stimulatoren wurden WT-A20-Zellen den gereinigten Ig aus BiV-Zellen (Biv-Protein) und A20-Zellen (Ag20-Protein) gegenübergestellt. Dabei stehen die A20-Zellen für einen polyvalenten Stimulator. Das A20-Ig enthält als immunogenen Bestandteil nur den Id. Das BiV-Protein enthält zusätzlich eine Spezifität gegen den internalisierenden Rezeptor Fc $\gamma$ RII auf APC (Snider & Segal, 1989; Serre et al., 1998), wodurch der Id effektiver aufgenommen und präsentiert wird.

Während der Expansion der unterschiedlichen T-Zell-Populationen konnte man sehr gut erkennen, wie durch den antigenen Selektionsdruck zu Beginn der *In-vitro*-Restimulation die Zellzahlen stark abnahmen, da nur Zellen proliferierten und überlebten, die auch einen spezifischen antigenen Stimulus erhielten.

### 2.2 Die Aktivierung der T-Zellen *in vitro*

Der <sup>3</sup>H-Einbau ist eine etablierte Standardmethode als Maß für die Zellproliferation *in vitro* (Hellerstein, 1999). Jedoch kann man bei dieser Methode nicht zwischen spezifi-

scher und unspezifischer Proliferation unterscheiden, vor allem wenn die Kultur unterschiedliche Zellpopulationen enthält.

Im Gegensatz dazu bietet die Messung der Zytokinproduktion, wie z.B. GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-4 und TNF- $\alpha$  bei T-Zellen eine gute Möglichkeit, um die spezifische Aktivierung der Zelle durch das Ag über den TZR zu verfolgen (Romagnani, 1995; Romero et al., 1998; Noppen et al., 2000).

In allen durchgeführten Aktivierungstests wurde die GM-CSF-Produktion im ELISA gemessen, da dies eine sehr empfindliche Methode ist, die sowohl bei CD4- als auch bei CD8-T-Zellen angewendet werden kann (Zeng et al., 2000; Maeurer et al., 2002).

Um bei der GM-CSF-Produktion zwischen unspezifischer Grundsekretion ohne Stimulation und tumorspezifischer Sekretion nach Aktivierung zu unterscheiden, wurden Negativkontrollen durchgeführt, in denen nur Medium zu den T-Zellen zugegeben wurde. Diese Werte veränderten sich nicht, wenn MPC11 als Zielzellen in einem weiteren Kontrollansatz zugegeben wurden. T-Zellen, die gegen A20 aktiviert worden waren, zeigten also gegen MPC11 keine Aktivierung.

Bei den Untersuchungen der T-Zellen aus der Naivmaus, der tumortragenden und der Triom-immunisierten Maus vor Stimulation ließ sich keinerlei Aktivierung feststellen, was bei den Zellen aus Triom-immunisierter und tumortragender Maus insofern überraschend war, als diese mit Tumor-Ag schon in Kontakt gekommen waren und deswegen schon eine bestimmte Menge an Ag-spezifischen T-Zellen besitzen sollten. Möglicherweise ist die Frequenz tumorspezifischer Zellen ohne Restimulation so gering, dass sie nicht detektiert werden konnten. Nach mehreren Restimulationsrunden zeigte sich nämlich eine T-Zell-Aktivierung, die zuerst bei den Zellen aus der Triom-immunisierten Maus festzustellen war, dann bei den T-Zellen aus der tumortragenden Maus und zuletzt bei denen aus der Naivmaus auftauchte. Offensichtlich sind in der tumortragenden Maus die T-Zellen durch die Tumorzellen nicht beeinträchtigt worden, was aus anderen Tumormodellen bekannt ist (Sotomayor et al., 1999).

Interessant war, dass die Art der Stimulation nur einen geringen Einfluss auf die Höhe der Zytokinproduktion hatte. Bis zur fünften Restimulationsrunde machte es keinen Unterschied, ob mit A20-Zellen, BiV- oder Ag20-Protein stimuliert wurde.

In vielen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass adoptive Transfers von tumorspezifischen T-Zellen naive Mäuse vor letalen Tumordosen schützen können (z. B. Greenberg, 1991; Egeter et al., 2000). Da diese Ag-spezifischen T-Zellen während der Tumorbekämpfung eine klonale Expansion durchlaufen und dabei auch Ag-spezifische Gedächtniszellen gebildet werden, sollten sich in einer solchen geheilten Maus entsprechende Mengen an Ag-spezifischen T-Zellen befinden.

T-Zell-Populationen aus solchen geheilten Mäusen wurden ebenfalls auf ihre Aktivierungsfähigkeit *in vitro* getestet. Die Mäuse waren durch adoptiven CD4- bzw. CD8-T-Zell-Transfer aus Triom-immunisierten Mäusen geheilt worden. Es zeigte sich, dass die T-Zellen aus der CD4-Prävention (T-Zellen und Tumor wurden zeitgleich verabreicht) und CD4-Therapie (die T-Zellen wurden sieben Tage nach Tumorgabe verabreicht) in allen Ansätzen, selbst in den Negativkontrollansätzen, eine gewisse Menge an GM-CSF produzierten. Dieses Verhalten wurde als Eigenaktivität der T-Zellen interpretiert, wobei nicht bekannt ist, ob CD4-Gedächtnis-T-Zellen nicht *per se* GM-CSF ausschütten. Auch könnte das Zytokin von anderen in der Zellpopulation vorhandenen Zellen gebildet worden sein.

### 2.3 Die Rolle des Idiotyps bei der T-Zell-Aktivierung

In der Literatur wurde dem Ig-Id als tumorspezifisches Ag in malignen B-Zellen für zukünftige Immuntherapien schon immer ein hoher Stellenwert beigemessen (Pardoll, 1993; Hawkins et al., 1994; Bogen et al., 2000; Wen et al., 2001). Was jedoch die Induktion einer Immunantwort betrifft, gibt es unterschiedliche Ergebnisse: Zum Beispiel konnten Syrengelas & Levy (1999) im 38C13-B-Zell-Lymphom zeigen, dass durch eine DNS-Vakzinierung nur eine humorale, tumorprotektive Immunantwort induziert werden konnte, jedoch keine CTL-Antwort. In anderen Studien konnten jedoch auch zelluläre Immunantworten nachgewiesen werden (Chakrabarti & Ghosh, 1992; Bogen et al., 1995).

Deshalb sollte in dieser Arbeit der Einfluss des Id auf die Triom-vermittelte Aktivierung von tumorspezifischen T-Zellen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Id für eine Aktivierung der T-Zellen nicht notwendig ist. Auch A20Id-Zellen

wurden von T-Zellen erkannt, unabhängig davon, mit welchem der drei Stimulatoren diese vorher in Kontakt gekommen waren.

Dass der Id zur *In-vitro*-Aktivierung einen gewissen Beitrag leistet, war daran zu erkennen, dass durch die Id-negativen Zielzellen die Aktivierung der T-Zellen geringer ausfiel als durch die WT-A20-Zellen.

Dies ist auch eine Erklärung für die Reaktivität von T-Zellen gegenüber A20Id<sup>-</sup>, die nur mit A20- oder BiV-Protein stimuliert worden waren. Möglicherweise erkennen diese T-Zellen andere Ig-Epitope als das durch den 6C10-Ak erkannte.

Dass der Id für die Tumorimmunität nicht allein verantwortlich ist, zeigte sich nicht nur in den *In-vitro*-Stimulationsversuchen, sondern auch bei *In-vivo*-Protektionsexperimenten (Kronenberger et al., 2002): Nach Immunisierung mit Triom-Zellen wurden auch A20Id-Zellen erfolgreich abgestoßen (nicht gezeigt).

### 3. Phänotypisierung der T-Zellen

Im Zusammenhang mit der Charakterisierung der *in-vitro* stimulierten T-Zellen wurden diese auch bezüglich des Phänotyps untersucht. Es zeigte sich, dass in jedem Stimulationsansatz die Zahl an CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Population deutlich höher war als die Zahl der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen. Dies war eine überraschende Beobachtung, da sich in früheren Untersuchungen bei *In-vitro*-Stimulationen von T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen gezeigt hatte, dass die T-Zell-Populationen hauptsächlich CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> waren (A. Dieckmann, pers. Mitteilung). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die unterschiedlich hohe Konzentration des zugesetzten IL-2.

Die Abnahme der T-Zell-Zahl nach neun Restimulationen war nicht überraschend, da bekannt ist, dass T-Zellen mit steigender Stimulationszahl ihre Proliferationsfähigkeit allmählich verlieren (Perillo et al., 1993; Adibzadeh et al., 1995; Effros & Pawelec, 1997; Hamann et al., 1997).

### 4. Die T-Zellen im adoptiven Transfer

Mit den adoptiven T-Zell-Transfers sollte untersucht werden, wie sich die *in vitro* stimulierten T-Zellen bei *In-vivo*-Protektionsversuchen verhalten.

Die Beobachtungen waren anfangs überraschend, da es in den drei Parallelversuchen drei unterschiedliche Ergebnisse gab. Die T-Zellen aus der Triom-immunisierten Maus, die mit BiV-Protein fünfmal stimuliert worden waren, zeigten bei allen Mäusen einen Langzeitschutz. Ebenso waren T-Zellen aus einer Triom-immunisierten Maus vollständig protektiv, die mehrmals mit A20-Zellen stimuliert worden waren. Die mit A20-Zellen stimulierten T-Zellen zeigten selbst nach nur zweimaliger Restimulation schon eine tumorprotektive Wirkung (R. Mocikat, pers. Mitteilung).

Bei den T-Zellen aus der Naivmaus zeigte sich, dass sie *in vivo* keine Tumorprotektion vermitteln konnten, obwohl sie *in vitro* eine Aktivierung gezeigt hatten.

Dies könnte damit erklärt werden, dass die *In-vitro*-Stimulation allein für eine effektive tumorspezifische Aktivierung nicht ausreichend ist. Es ist denkbar, dass die A20-Ag von den APC nicht besonders gut aufgenommen und/ oder prozessiert werden. Eine vorherige *In-vivo*-Stimulation der T-Zellen, welche durch die Triom-Immunsierung stattgefunden hat, könnte ausreichen, um die Zellen *in vitro* auch durch eine nur suboptimale Stimulation in einen optimalen tumorspezifischen Aktivierungszustand zu versetzen.

Die Stimulierbarkeit der T-Zellen aus der tumortragenden Maus, die *in vitro* mit BiV-Protein sechsmal stimuliert worden waren, liegt zwischen den beiden vorher diskutierten Ergebnissen. Die Mäuse zeigen gegenüber der Kontrolle ein verlängertes Überleben, was mit einer Verlangsamung des Tumorwachstums einhergeht. Offensichtlich findet durch das Tumorwachstum *in vivo* eine Stimulation und keine Anergisierung der T-Zellen statt; jene ist jedoch nicht so ausgeprägt wie nach Triom-Vakzinierung.

Für die T-Zellen aus der Naivmaus scheint auch eine verlängerte Stimulationdauer keine Verbesserung zu bringen; auch nach neun Restimulationen *in vitro* wiesen die Zellen keine Tumorprotektivität *in vivo* auf.

Zusammenfassend deuten die Befunde darauf hin, dass *in vivo* Aktivierungsprozesse ablaufen, die *in vitro* nicht nachgestellt werden können.

## 5. Analyse des TZR-Gebrauchs der T-Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse beleuchten anhand der Analyse des TZR-Gebrauchs die molekulare Natur der T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen A20-Tumorzellen.

Es sollte untersucht werden, ob die analysierten T-Zell-Populationen Einschränkungen im TZR-Repertoire aufweisen. Dies kann eventuell auf eine klonale Ag-spezifische T-Zell-Aktivierung zurückgeführt werden.

Experimente in Mausmodellen führten zur Beschreibung von drei Kriterien, die kennzeichnend für die Ag-getriebene Selektion von TZR im Verlauf einer spezifischen, zell-vermittelten Immunantwort sind (McHeyzer-Williams & Davis, 1995; Maryanski et al., 1996). Diese betreffen beide TZR-Ketten und umfassen einen limitierten V- und J-Gensegmentgebrauch, eine Einschränkung der CDR3-Schleifenlänge und die Konser-vierung bestimmter AS in der CDR3-Region.

Andererseits zeigte eine Vielzahl von Studien, dass ein TZR-Repertoire, das eine Ag-spezifische Immunantwort vermittelt, von stark eingeschränkt bis hin zu außerordentlich divers variieren kann (Casanova & Maryanski, 1993; Pantaleo et al., 1994; Moss et al., 1995; Steinle et al., 1995). Das Bild einer Ag-getriebenen, monoklonalen T-Zell-Expansion *in vivo* steht beispielsweise in scharfem Widerspruch zu den Studien von Maryanski et al. (1996), die auf Sequenzniveau belegen, dass mehrere TZR- $\beta$ -Ketten zum Repertoire einer Ag-spezifisch aktivierten T-Zell-Population *in vivo* beitragen.

Zudem kann die biologische Signifikanz selbst von monoklonalen T-Zell-Expansionen ohne begleitende funktionelle Analysen nicht evaluiert werden. Bislang wurden molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen aber erst in wenigen Studien kombiniert (Sensi et al., 1993; Caignard et al., 1996).

Zur besseren Charakterisierung der Immunantwort gegen A20 wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit funktionelle Studien und *In-vivo*-Befunde mit molekularen TZR-Analysen gepaart.

## 5.1 Anmerkungen zu den Voruntersuchungen

Für die TZR-Untersuchungen wurde eine RT-PCR durchgeführt, in der die DNS-Bereiche zwischen den V- und C-Regionen der  $\beta$ -Ketten amplifiziert wurden. Dieser Bereich beinhaltet die CDR3-Region, die für die Bindungsstelle des Ag-Peptids des TZR kodiert. Für die Bestimmung der V-Gensegment-Unterfamilien, des rearrangierten J-Gensegments und der genauen Basenabfolge der CDR3-Region mussten die PCR-Produkte sequenziert werden.

Nach Etablierung einer TZR- $\beta$ -Ketten-spezifischen PCR überraschte das Fehlen einiger  $V\beta$ -Familien im TZR-Repertoire der untersuchten Zellpopulationen, obwohl es sich um naive Mäuse handelte, bei denen eine Einschränkung des TZR-Repertoires nicht zu erwarten war. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die  $V\beta$ -Familien ohne sichtbares PCR-Produkt von nur sehr wenigen Zellen in der Gesamtpopulation exprimiert werden und somit unter der Detektionsgrenze für eine erfolgreiche Amplifizierung lagen.

Die stark unterschiedliche Bandenstärke der einzelnen  $V\beta$ -Produkte deutet auf unterschiedliche Transkriptmengen hin, wobei eine quantitative Auswertung nicht möglich ist. Es kann sein, dass die PCR-Reaktion bei manchen Ansätzen noch nicht im logarithmisch-linearen Bereich der Amplifikatmengen zunahme ist, während sie sich bei anderen schon darüber hinaus bewegt hat und sich bereits im Plateau-Bereich befindet. Die Primerdimere, die in manchen Ansätzen zu sehen waren, sprechen dafür, dass nur wenig Transkript für das jeweilige  $V\beta$ -Amplifikat vorhanden war. Ein quantitativer Vergleich der  $V\beta$ -Transkripte im logarithmisch-linearen Bereich der PCR-Reaktion wäre z.B. mit dem „Light-Cycler“-System der Firma Roche möglich.

## 5.2 TZR-Repertoire der untersuchten T-Zellen

### 5.2.1 Die Ergebnisse vor *In-vitro*-Stimulation

Als Vergleichsgrundlage für die Untersuchungen der restimulierten T-Zellen wurden die TZR aus Triom-immunisierten und naiven Mäusen vor Stimulation untersucht und miteinander verglichen. Neben einer hohen Übereinstimmung in der Bandenexpression war auffällig, dass  $V\beta 6$  in der Naivmaus nicht, in der Immunmaus jedoch sehr stark

sichtbar war. Eine Erklärung könnte darin liegen, dass die V $\beta$ 6-Expression in der Naivmaus unter dem Detektionsniveau lag. Andererseits könnten durch die Stimulation mit Triom-Zellen gerade die T-Zellen mit dem V $\beta$ 6-TZR zu einer Proliferation angeregt worden sein. Das Fehlen der Amplifikate für V $\beta$ 5.2 und V $\beta$ 8.1 in der Triom-immunisierten Maus könnte dagegen für eine Verschiebung des Repertoires durch Abnahme von Zellen mit diesen Rezeptoren sprechen.

Eine Sequenzierung der PCR-Produkte zu diesem Zeitpunkt wurde für wenig sinnvoll erachtet, da üblicherweise in T-Zellen mit einem kaum eingeschränkten, breiten Repertoire die V $\beta$ - mit vielen J $\beta$ -Gensegmenten rearrangieren. Dies würde zu nicht auswertbaren Mischsequenzen führen.

### 5.2.2 Ergebnisse nach *In-vitro*-Stimulation

Die polyklonale TZR-Zusammensetzung, die auch nach wiederholten Restimulationen *in vitro* kaum eingeschränkt wurde, war anfangs überraschend, vor allem bei den T-Zellen, die mit Protein stimuliert waren. Es war erwartet worden, dass durch die verringerte Anzahl an antigenen Determinanten im Vergleich zu den Stimulationen mit ganzen Zellen ein eingeschränktes TZR-Repertoire generiert würde. In der Literatur sind jedoch Untersuchungen beschrieben, in denen auf Stimulationen mit einzelnen Ag polyklonale (Casanova & Maryanski, 1993; Sourdive et al., 1998), aber auch monoklonale (McHeyzer-Williams & Davis, 1995; McHeyzer-Williams et al., 1999) TZR-Antworten generiert wurden. Es scheint also nicht zwingend erforderlich, dass sich durch ein eingeschränktes Ag-Angebot auch das TZR-Repertoire einschränkt.

Vergleicht man die TZR-Repertoires nach fünf bzw. sechs Restimulationen, so ist erkennbar, dass sich keine oligo- oder gar monoklonale Population entwickelt hat. Die Unterschiede zwischen den T-Zellen mit unterschiedlicher Herkunft liegen nur in der Expressionsstärke einzelner Rezeptoren. Was die Zellen aus der Triom-immunisierten Maus von denen aus der Naivmaus unterscheidet, ist die Expression von Rezeptoren mit den V $\beta$ -Ketten 7, 8.2 und 18. Es könnte also sein, dass die *In-vivo*-Tumorprotektion durch die Verwendung dieser TZR vermittelt wird.

Bemerkenswert ist der Vergleich zum TZR-Repertoire von Zellen aus den Triom-immunisierten Mäusen, die mit A20-Zellen fünf- bzw. neunmal stimuliert wurden. Diese Zellen konnten im adoptiven Transfer zu beiden Restimulationszeitpunkten Tumorprotektivität vermitteln, obwohl sie völlig unterschiedliche TZR-Repertoires besaßen. Nach fünf Restimulationsrunden exprimierten diese Zellen V $\beta$ 8.2, aber nicht V $\beta$ 18. Nach neun Restimulationen war auch eine Expression von V $\beta$ 8.2 nicht mehr zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt bestand das Repertoire nur noch aus TZR mit den beiden dominant exprimierten V $\beta$ -Ketten 4 und 6 und der nur schwach zu erkennenden V $\beta$ 1-Kette. Also müsste bei diesen Zellen die Protektivität über TZR mit den oben genannten V $\beta$ -Ketten vermittelt werden.

Die schwächere *In-vivo*-Tumorprotektivität der T-Zellen aus der tumortragenden Maus könnte damit erklärt werden, dass im Vergleich zu den Zellen aus der Triom-immunisierten Maus nur TZR mit der V $\beta$ -Kette 7, nicht aber 8.2 und 18 exprimiert werden. Nach den Sequenzierungen der J $\beta$ -Regionen der TZR kann man feststellen, dass die Polyklonalität der Repertoires durch die J-Bereiche noch zusätzlich erhöht wird.

Es könnte also zutreffen, dass die unterschiedlichen tumorprotektiven Potentiale der T-Zellen *in vivo* durch den Gebrauch von unterschiedlichen TZR hervorgerufen werden. Allerdings müssten zur Erhärtung dieser Vermutung Versuche mit TZR-transgenen T-Zellen durchgeführt werden.

Möglich wäre aber auch, dass die Zellen schon durch ihre Herkunft Unterschiede zueinander aufweisen. Diese Vermutung liegt nahe, da allein die T-Zellen aus der Triom-immunisierten Maus einen effektiven Tumorschutz *in vivo* vermitteln konnten, egal ob sie zuvor *in vitro* mit Tumorzellen oder nur mit Protein stimuliert worden waren.

### 5.3 Die untersuchten Th1-Zellen

Die *in vitro* generierten Th1-Zellen entsprechen T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen, die zweimal restimuliert wurden (Egeter et al., 2000). Der Unterschied liegt nur in der Zugabe von CpG-Oligonukleotiden als Stimulator. Diese Zellen unterscheiden sich auch in ihrem TZR-Repertoire kaum von normal restimulierten Zellen.

Somit kann man die Verwendung der TZR für die Erklärung des Verhaltens *in vivo* nicht heranziehen.

## 6. Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse werfen einige weiterführende Fragen auf:

- Werden durch eine Triom-Vakzinierung Id-spezifische T-Zellen induziert?

Diese Frage könnte beantwortet werden, indem T-Zellen aus einer Triom-immunisierten Maus *in vitro* mit DC stimuliert werden, die vorher mit Id-DNS oder –Protein beladen wurden.

- Gibt es zwischen einer Triom-immunisierten und einer Tumormaus Unterschiede in der Frequenz der tumorspezifischen T-Zellen?

Um die aktivierten T-Zellen, die aber offensichtlich nur in sehr niedriger Frequenz vorhanden sind, *in vitro* zu detektieren, könnte eine IFN- $\gamma$ -spezifische Detektion der T-Zellen durchgeführt werden. Diese T-Zellen könnten nach einem IFN- $\gamma$ -Einfang *in vitro* expandiert und charakterisiert werden.

- Wird die *In-vivo*-Protektion durch einzelne TZR oder über ein breites Spektrum vermittelt?

Zur Beantwortung dieser Frage müssten adoptive Transferversuche mit TZR-transgenen T-Zellen für die in Frage kommenden TZR durchgeführt werden.

## VII ZUSAMMENFASSUNG

Der Triom-Ansatz hat sich als überaus potente Möglichkeit erwiesen, um gegen das murine A20-B-Zell-Lymphom zu vakzinieren. Das Prinzip beruht auf der Redirektion von Tumorantigenen an Antigen-präsentierende Zellen des Immunsystems durch sogenannte Triom-Zellen. Diese entstehen durch die Fusion der Lymphomzellen mit Hybridomen, die Antikörper gegen internalisierende Fc-Rezeptoren auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimieren. Der Tumorschutz wird dabei weniger über eine humorale Immunabwehr vermittelt als vielmehr über CD4- und CD8-T-Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Aspekte der zellulären Immunantwort in Triom-immunisierten Mäusen untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob tumorspezifische T-Zellen vorhanden sind und ob diese möglicherweise gegen den Immunglobulin-Idiotyp des Tumors gerichtet sind. Dazu wurden T-Zellen aus präimmunisierten Mäusen im Vergleich zu solchen aus unbehandelten und tumortragenden Mäusen *in vitro* mit verschiedenen Tumorantigenen stimuliert und expandiert.

Eine tumorspezifische Aktivierung erfolgte bei den Zellen aus den Triom-immunisierten Mäusen am schnellsten und effektivsten. Nach häufigeren Stimulationen stellten sich jedoch bei allen T-Zellen ähnliche Aktivierungswerte ein. In Versuchen mit Idiotyp-negativen A20-Tumorzellen stellte sich heraus, dass der Idiotyp als tumorspezifisches Antigen bei der Aktivierung der T-Zellen zwar eine gewisse Rolle spielt, aber nicht essentiell ist. Auch konnte gezeigt werden, dass alle Zellpopulationen einen CD4<sup>+</sup>-Phänotyp besaßen. Um über das tumorprotektive Verhalten dieser *in vitro* reaktiven CD4-T-Zellen auch *in vivo* einen Überblick zu bekommen, wurden die Zellen nach mehreren Stimulationsrunden zusammen mit Tumorzellen in eine unbehandelte Maus transferiert: Nur die Zellen aus der Triom-immunisierten Maus konnten einen vollkommenen Langzeit-Tumorschutz vermitteln. Dagegen konnten die Zellen aus der tumortragenden Maus das Tumorstadium nur verlangsamen, und die Zellen aus der unbehandelten Maus zeigten keinerlei Schutzwirkung.

Um zu prüfen, ob die unterschiedlichen *In-vitro*- und *In-vivo*-Daten zur Tumorspezifität auf der Benutzung von unterschiedlichen T-Zell-Rezeptoren (TZR) beruhten, wurden Studien zum TZR-Repertoire der untersuchten Zellen durchgeführt. In TZR-V $\beta$ -

spezifischen RT-PCR-Versuchen konnte gezeigt werden, dass das ursprünglich polyklonale TZR-Repertoire der Zellen erst nach vielen Stimulationsrunden starke Einschränkungen zeigt. Nach kurzer Stimulationszeit fallen hingegen im Vergleich zum Zustand ohne Stimulation keine nennenswerten Unterschiede auf.

Die Befunde deuten darauf hin, dass für die Induktion tumorprotektiver T-Zellen eine *In-vivo*-Aktivierung ablaufen muss, die *in vitro* nicht simuliert werden kann. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass eine Einschränkung des TZR-Repertoires mit einem Tumorschutz nach adoptivem Transfer der T-Zellen korreliert.

## VIII ANHANG

Tabelle VIII-1: Aktivierungsquotienten<sup>1</sup> aus den GM-CSF-ELISA-Ansätzen nach *In-vitro*-Stimulation von T-Zellen unterschiedlicher Herkunft

Maus, aus der die T-Zellen stammen	Stimulator <i>in vitro</i>	Zeitpunkt des GM-CSF-ELISA	Zielzelle im GM-CSF-ELISA-Ansatz	AQ bei 62.500 T-Zellen	AQ bei 125.000 T-Zellen
Naiv	A20-Zellen	vor <i>In-vitro</i> -Stimulation	A20-Zellen	1,2	1,1
Naiv	A20-Zellen	vor <i>In-vitro</i> -Stimulation	A20-Zellen	1,1	1,2
Naiv	A20-Zellen	vor <i>In-vitro</i> -Stimulation	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	1,1	1,1
Naiv	A20-Zellen	Vor 2. Rest.	A20-Zellen	1,2	1,3
Naiv	A20-Zellen	Vor 2. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	1,0	0,9
Naiv	A20-Zellen	Vor 3. Rest.	A20-Zellen	1,2	1,3
Naiv	A20-Zellen	Vor 3. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	1,0	1,1
Naiv	A20-Zellen	Vor 5. Rest.	A20-Zellen	7,3	5,3
Naiv	A20-Zellen	Vor 7. Rest.	A20-Zellen	3,9	3,5
Naiv	A20-Zellen	nach 9. Rest.	A20-Zellen	5,5	5,2
BiV-immunisiert	A20-Zellen	vor <i>In-vitro</i> -Stimulation	A20-Zellen	1,5	1,5
BiV-immunisiert	A20-Zellen	vor <i>In-vitro</i> -Stimulation	A20-Zellen	1,3	1,2
BiV-immunisiert	A20-Zellen	vor <i>In-vitro</i> -Stimulation	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	1,1	1,2
BiV-immunisiert	A20-Zellen	vor 2. Rest.	A20-Zellen	1,5	1,4
BiV-immunisiert	A20-Zellen	vor 2. Rest.	A20-Zellen	1,9	1,7
BiV-immunisiert	A20-Zellen	vor 2. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	1,0	0,9
BiV-immunisiert	BiV-Protein	vor 2. Rest.	A20-Zellen	2,0	1,9
BiV-immunisiert	Ag20-Protein	vor 2. Rest.	A20-Zellen	1,5	1,5
BiV-immunisiert	A20-Zellen	vor 3. Rest.	A20-Zellen	2,9	3,3
BiV-immunisiert	A20-Zellen	vor 4. Rest.	A20-Zellen	3,4	3,8
BiV-immunisiert	A20-Zellen	vor 4. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	2,1	2,4

Maus, aus der die T-Zellen stammen	Stimulator <i>in vitro</i>	Zeitpunkt des GM-CSF-ELISA	Zielzelle im GM-CSF-ELISA-Ansatz	AQ bei 62.500 T-Zellen	AQ bei 125.000 T-Zellen
BiV-immunisiert	A20-Zellen	vor 5. Rest.	A20-Zellen	5,0	5,3
BiV-immunisiert	A20-Zellen	vor 5. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	3,6	5,0
BiV-immunisiert	BiV-Protein	vor 5. Rest.	A20-Zellen	6,9	6,8
BiV-immunisiert	BiV-Protein	vor 5. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	4,7	5,1
BiV-immunisiert	Ag20-Protein	vor 5. Rest.	A20-Zellen	7,0	5,9
BiV-immunisiert	Ag20-Protein	vor 5. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	4,6	4,5
Tumortragend	A20-Zellen	vor <i>In-vitro</i> -Stimulation	A20-Zellen	1,0	1,2
Tumortragend	A20-Zellen	vor 2. Rest.	A20-Zellen	1,3	1,3
Tumortragend	A20-Zellen	vor 2. Rest.	A20-Zellen	1,2	1,3
Tumortragend	A20-Zellen	vor 2. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	1,0	1,0
Tumortragend	BiV-Protein	vor 2. Rest.	A20-Zellen	1,2	1,3
Tumortragend	BiV-Protein	vor 2. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	1,0	1,0
Tumortragend	Ag20-Protein	vor 2. Rest.	A20-Zellen	1,3	1,3
Tumortragend	Ag20-Protein	vor 2. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	1,0	1,0
Tumortragend	A20-Zellen	vor 3. Rest.	A20-Zellen	1,8	2,0
Tumortragend	BiV-Protein	vor 6. Rest.	A20-Zellen	3,0	3,4
Tumortragend	BiV-Protein	vor 6. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	2,1	2,6
Tumortragend	Ag20-Protein	vor 6. Rest.	A20-Zellen	4,7	5,8
Tumortragend	Ag20-Protein	vor 6. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	4,2	5,7
Tumortragend	BiV-Protein	vor 7. Rest.	A20-Zellen	2,8	3,1
Tumortragend	BiV-Protein	vor 7. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	2,0	2,5
Tumortragend	Ag20-Protein	vor 7. Rest.	A20-Zellen	7,4	8,5
Tumortragend	Ag20-Protein	vor 7. Rest.	A20Id <sup>-</sup> -Zellen	5,4	6,5

Maus, aus der die T-Zellen stammen	Stimulator <i>in vitro</i>	Zeitpunkt des GM-CSF-ELISA	Zielzelle im GM-CSF-ELISA-Ansatz	AQ bei 62.500 T-Zellen	AQ bei 125.000 T-Zellen
Maus, die eine letale Tumordosis mit der simultanen Gabe von CD4-T-Zellen überlebte (Prävention)	A20-Zellen	vor <i>In-vitro</i> -Stimulation	A20-Zellen	1,5	1,6
Maus, die von einer sieben Tage alten Tumorlast durch adoptiven Transfer von CD4-T-Zellen geheilt wurde (Therapie)	A20-Zellen	vor <i>In-vitro</i> -Stimulation	A20-Zellen	1,4	1,8
Maus, die eine letale Tumordosis mit der simultanen Gabe von CD8-T-Zellen überlebte	A20-Zellen	vor <i>In-vitro</i> -Stimulation	A20-Zellen	1,2	1,1
„CD4-T-Zell-Klon“	A20-Zellen	nach 9. Rest.	A20-Zellen	1,0	1,0

<sup>1</sup> Der Aktivierungsquotient (AQ) ist das Verhältnis der Extinktionen, die im GM-CSF-ELISA bei einer Effektorzellzahl zu Zielzellzahl von 1,25:1 und 2,5:1 erhalten wurden.  
Rest.: Restimulation *in vitro*;

## Die Basenabfolge der sequenzierten PCR-Produkte für V $\beta$ 4 und V $\beta$ 6

### Triom-immunisierte Maus nach neun Restimulationen mit A20-Zellen

#### V $\beta$ 4-J $\beta$ 1.3:

**V-Segment:** 5' - AGTTCAAAGAAAAACCATTTAGACCTTCAGATCACAGCTCTAAAGCCTGATGACTCGGCCACATACTTCTGTGCCAGCAGCCA -

**NDN-J-Segment:** - AGATGGGGGACAAAAATACGCTCTATTTTGGAGAAGGAAGCCGGCTCATTGTTGTAG -

**C-Segment:** -AGGATCTGAGAAATGTGACTCCACCCAAG-GC-Klammer-3'

#### V $\beta$ 6-J $\beta$ 2.3:

**V-Segment:** 5' - AGAAGAACGAGATGGCCGTTTTTCTCTGTGCCAGCAGTAT -

**NDN-J-Segment:** - TTCTGGGGGGGCA GAAACGCTGTATTTTGGCTCAGGAACCAGACTGACTGTTCTCG -

**C-Segment:** -AGGATCTGAGAAATGTGACTCCACCCAAG-GC-Klammer-3'

### Triom-immunisierte Maus nach neun Restimulationen mit BiV-Protein

#### V $\beta$ 4-J $\beta$ 2.3:

**V-Segment:** 5' - AAGTTCAAAGAAAAACCATTTAGACCTTCAGATCACAGCTCTAAAGCCTGATGACTCGGCCACATACTTCTGTGCCAGCAGCCA -

**NDN-J-Segment:** - AGGGACTGGGGGC GAAACGCTGTATTTTGGCTCAGGAACCAGACTGACTGTTCTCG -

**C-Segment:** -AGGATCTGAGAAATGTGACTCCACCCAAG-GC-Klammer-3'

Bezüglich Lage und Definition der CDR3-Region, die in den obenstehenden Sequenzen unterstrichen ist, siehe Abbildung II-3, Seite 15.

## IX LITERATUR

- ABBAS A.K., Lichtman A.H., Pober J.S., 1997.  
Cellular and molecular immunology, 3<sup>rd</sup> ed.  
Saunders, Philadelphia
- ADIBZADEH M., Pohla H., Rehbein A., Pawelec G., 1995.  
Long-term culture of monoclonal human T lymphocytes: models for immunosenescence?  
*Mech.Ageing Dev.* 83: 171-183
- ARDEN B., Clark S.P., Kabelitz D., Mak T.W., 1995.  
Mouse T-cell receptor variable gene segment families.  
*Immunogenetics* 42: 501-530
- ASHLEY D.M., Faiola B., Nair S., Hale L.P., Bigner D.D., Gilboa E., 1997.  
Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors.  
*J.Exp.Med.* 186: 1177-1182
- BANAT G.A., Christ O., Cochlovius B., Pralle H.B., Zoller M., 2001.  
Tumour-induced suppression of immune response and its correction.  
*Cancer Immunol.Immunother.* 49: 573-586
- BASKAR S., Clements V.K., Glimcher L.H., Nabavi N., Ostrand-Rosenberg S., 1996.  
Rejection of MHC class II-transfected tumor cells requires induction of tumor-encoded B7-1 and/or B7-2 costimulatory molecules.  
*J.Immunol.* 156: 3821-3827
- BOGEN B., Schenck K., Munthe L.A., Dembic Z., 2000.  
Deletion of idiotype (Id)-specific T cells in multiple myeloma.  
*Acta Oncol.* 39: 783-788
- BOGEN B., Munthe L., Sollien A., Hofgaard P., Omholt H., Dagnaes F., Dembic Z., Lauritzsen G.F., 1995.  
Naive CD4+ T cells confer idiotype-specific tumor resistance in the absence of antibodies.  
*Eur.J.Immunol.* 25: 3079-3086
- CAIGNARD A., Guillard M., Cai Z., Asselin-Paturel C., Carayol G., Chouaib S., 1996.  
The renal cell carcinoma lysis by a specific cytotoxic T cell clone is independent of the Fas/Fas-L cytotoxic pathway.  
*Tissue Antigens* 48: 295-300
- CAMPBELL M.J., Esserman L., Byars N.E., Allison A.C., Levy R., 1990.  
Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Humoral and cellular requirements for the full expression of antitumor immunity.  
*J.Immunol.* 145: 1029-1036
- CAMPBELL M.J., Esserman L., Levy R., 1988.  
Immunotherapy of established murine B cell lymphoma. Combination of idiotype immunization and cyclophosphamide.  
*J.Immunol.* 141: 3227-3233
- CASANOVA J.L. und Maryanski J.L., 1993.  
Antigen-selected T-cell receptor diversity and self-nonself homology.  
*Immunol.Today* 14: 391-394
- CASPAR C.B., Levy S., Levy R., 1997.  
Idiotype vaccines for non-Hodgkin's lymphoma induce polyclonal immune responses that cover mutated tumor idiotypes: comparison of different vaccine formulations.  
*Blood* 90: 3699-3706

- CHAKRABARTI D. und Ghosh S.K., 1992.  
Induction of syngeneic cytotoxic T lymphocytes against a B cell tumor. II. Characterization of anti-idiotypic CTL lines and clones.  
*Cell Immunol.* 144: 443-454
- CHEN L., Linsley P.S., Hellström K.E., 1993.  
Costimulation of T cells for tumor immunity.  
*Immunol.Today* 14: 483-486
- CHEN L., Ashe S., Brady W.A., Hellström I., Hellström K.E., Ledbetter J.A., McGowan P., Linsley P.S., 1992.  
Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4.  
*Cell* 71: 1093-1102
- CHRISTOFORI G. und Semb H., 1999.  
The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour- suppressor gene.  
*Trends Biochem.Sci.* 24: 73-76
- COULIE P.G., 1997.  
Human tumour antigens recognized by T cells: new perspectives for anti- cancer vaccines?  
*Mol.Med.Today* 3: 261-268
- DAVIS M.M. und Bjorkman P.J., 1988.  
T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.  
*Nature* 334: 395-402
- DRANOFF G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V., Hamada H., Pardoll D., Mulligan R.C., 1993.  
Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90: 3539-3543
- DU P.L., 2001.  
The immune system of invertebrates and vertebrates.  
*Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 129: 1-15
- EFFROS R.B. und Pawelec G., 1997.  
Replicative senescence of T cells: does the Hayflick Limit lead to immune exhaustion?  
*Immunol.Today* 18: 450-454
- EGETER O., Mocikat R., Ghoreschi K., Dieckmann A., Rocken M., 2000.  
Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice.  
*Cancer Res.* 60: 1515-1520
- FOULDS L., 1954.  
The experimental study of tumor progression, Vol. I-III.  
*Academic Press, London.*
- GASCOIGNE N.R., Chien Y., Becker D.M., Kavalier J., Davis M.M., 1984.  
Genomic organization and sequence of T-cell receptor beta-chain constant- and joining-region genes.  
*Nature* 310: 387-391
- GEORGE A.J., Folkard S.G., Hamblin T.J., Stevenson F.K., 1988.  
Idiotypic vaccination as a treatment for a B cell lymphoma.  
*J.Immunol.* 141: 2168-2174
- GILBOA E., 1999.  
How tumors escape immune destruction and what we can do about it.  
*Cancer Immunol.Immunother.* 48: 382-385

- GREENBERG P.D., 1991.  
Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells.  
*Adv.Immunol.* 49: 281-355
- GROUX H., Bigler M., de Vries J.E., Roncarolo M.G., 1998.  
Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells.  
*J.Immunol.* 160: 3188-3193
- HAHNE M., Rimoldi D., Schroter M., Romero P., Schreier M., French L.E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J., Tschopp J., 1996.  
Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape.  
*Science* 274: 1363-1366
- HAMANN D., Baars P.A., Rep M.H., Hooibrink B., Kerkhof-Garde S.R., Klein M.R., van Lier R.A., 1997.  
Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells.  
*J.Exp.Med.* 186: 1407-1418
- HAMMOND K.J., Pelikan S.B., Crowe N.Y., Randle-Barrett E., Nakayama T., Taniguchi M., Smyth M.J., van Driel I.R., Scollay R., Baxter A.G., Godfrey D.I., 1999.  
NKT cells are phenotypically and functionally diverse.  
*Eur.J.Immunol.* 29: 3768-3781
- HANAHAHAN D. und Weinberg R.A., 2000.  
The hallmarks of cancer.  
*Cell* 100: 57-70
- HARRIS C.C., 1996.  
Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies.  
*J.Natl.Cancer Inst.* 88: 1442-1455
- HAWKINS R.E., Zhu D., Ovecka M., Winter G., Hamblin T.J., Long A., Stevenson F.K., 1994.  
Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma. Rescue of variable region gene sequences from biopsy material for assembly as single-chain Fv personal vaccines.  
*Blood* 83: 3279-3288
- HEISER A., Maurice M.A., Yancey D.R., Wu N.Z., Dahm P., Pruitt S.K., Boczkowski D., Nair S.K., Ballo M.S., Gilboa E., Vieweg J., 2001a.  
Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA.  
*J.Immunol.* 166: 2953-2960
- HEISER A., Maurice M.A., Yancey D.R., Coleman D.M., Dahm P., Vieweg J., 2001b.  
Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors.  
*Cancer Res.* 61: 3388-3393
- HELLERSTEIN M.K., 1999.  
Measurement of T-cell kinetics: recent methodologic advances.  
*Immunol.Today* 20: 438-441
- HSU F.J., Caspar C.B., Czerwinski D., Kwak L.W., Liles T.M., Syrengelas A., Taidi-Laskowski B., Levy R., 1997.  
Tumor-specific idioypic vaccines in the treatment of patients with B- cell lymphoma--long-term results of a clinical trial.  
*Blood* 89: 3129-3135
- HSU F.J., Kwak L., Campbell M., Liles T., Czerwinski D., Hart S., Syrengelas A., Miller R., Levy R., 1993.  
Clinical trials of idioypic-specific vaccine in B-cell lymphomas.  
*Ann.N.Y.Acad.Sci.* 690: 385-387

- IRVINE K.R., Rao J.B., Rosenberg S.A., Restifo N.P., 1996.  
Cytokine enhancement of DNA immunization leads to effective treatment of established pulmonary metastases.  
*J.Immunol.* 156: 238-245
- JANEWAY Ch.A. und Travers P., 1997  
Immunologie, 2. Aufl.  
Spektrum Verlag, Heidelberg
- KAKLAMANIS L., Leek R., Koukourakis M., Gatter K.C., Harris A.L., 1995.  
Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer.  
*Cancer Res.* 55: 5191-5194
- KAMINSKI M.S., Kitamura K., Maloney D.G., Levy R., 1987.  
Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Inhibition of tumor immunity by free idiotype protein.  
*J.Immunol.* 138: 1289-1296
- KARASUYAMA H., Kudo A., Melchers F., 1990.  
The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain.  
*J.Exp.Med.* 172: 969-972
- KIM K.J., Kanellopoulos-Langevin C., Merwin R.M., Sachs D.H., Asofsky R., 1979.  
Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties.  
*J.Immunol.* 122: 549-554
- KORSMEYER S.J., 1992.  
Bcl-2: a repressor of lymphocyte death.  
*Immunol.Today* 13: 285-288
- KRONENBERGER K., Dieckmann A., Selmayr M., Strehl J., Wahl U., Lindhofer H., Kraal G., Mocikat R., 2002.  
Impact of the lymphoma idiotype on in vivo tumor protection in a vaccination model based on targeting antigens to antigen-presenting cells.  
*Blood* 99: 1327-1331
- KWAK L.W., Campbell M.J., Czerwinski D.K., Hart S., Miller R.A., Levy R., 1992.  
Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors.  
*N.Engl.J.Med.* 327: 1209-1215
- LASKOV R. und Scharff M.D., 1970.  
Synthesis, assembly, and secretion of gamma globulin by mouse myeloma cells. I. Adaptation of the Merwin plasma cell tumor-11 to culture, cloning, and characterization of gamma globulin subunits.  
*J.Exp.Med.* 131: 515-541
- LENGAUER C., Kinzler K.W., Vogelstein B., 1998.  
Genetic instabilities in human cancers.  
*Nature* 396: 643-649
- LEVINE A.J., 1997.  
p53, the cellular gatekeeper for growth and division.  
*Cell* 88: 323-331
- LEVITSKY H.I., Montgomery J., Ahmadzadeh M., Staveley-O'Carroll K., Guarnieri F., Longo D.L., Kwak L.W., 1996.  
Immunization with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- transduced, but not B7-1-transduced, lymphoma cells primes idiotype- specific T cells and generates potent systemic antitumor immunity.  
*J.Immunol.* 156: 3858-3865

- LINDHOFER H., Mocikat R., Steipe B., Thierfelder S., 1995.  
Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies.  
*J.Immunol.* 155: 219-225
- McHEYZER-WILLIAMS L.J., Panus J.F., Mikszta J.A., McHeyzer-Williams M.G., 1999.  
Evolution of antigen-specific T cell receptors in vivo: preimmune and antigen-driven selection of preferred complementarity-determining region 3 (CDR3) motifs.  
*J.Exp.Med.* 189: 1823-1838
- McHEYZER-WILLIAMS M.G. und Davis M.M., 1995.  
Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo.  
*Science* 268: 106-111
- MAEURER M.J., Necker A., Salter R.D., Castelli C., Hohn H., Karbach J., Freitag K., Neukirch C., Knuth A., Jager E., 2002.  
Improved detection of melanoma antigen-specific T cells expressing low or high levels of CD8 by HLA-A2 tetramers presenting a Melan-A/Mart-1 peptide analogue.  
*Int.J.Cancer* 97: 64-71
- MALISSEN M., Minard K., Mjolsness S., Kronenberg M., Goverman J., Hunkapiller T., Prystowsky M.B., Yoshikai Y., Fitch F., Mak T.W., , 1984.  
Mouse T cell antigen receptor: structure and organization of constant and joining gene segments encoding the beta polypeptide.  
*Cell* 37: 1101-1110
- MALONEY D.G., Brown S., Czerwinski D.K., Liles T.M., Hart S.M., Miller R.A., Levy R., 1992.  
Monoclonal anti-idiotypic antibody therapy of B-cell lymphoma: the addition of a short course of chemotherapy does not interfere with the antitumor effect nor prevent the emergence of idiotype-negative variant cells.  
*Blood* 80: 1502-1510
- MARKOWITZ S., Wang J., Myeroff L., Parsons R., Sun L., Lutterbaugh J., Fan R.S., Zborowska E., Kinzler K.W., Vogelstein B., , 1995.  
Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability.  
*Science* 268: 1336-1338
- MARYANSKI J.L., Jongeneel C.V., Bucher P., Casanova J.L., Walker P.R., 1996.  
Single-cell PCR analysis of TCR repertoires selected by antigen in vivo: a high magnitude CD8 response is comprised of very few clones.  
*Immunity.* 4: 47-55
- MEEKER T., Lowder J., Cleary M.L., Stewart S., Warnke R., Sklar J., Levy R., 1985.  
Emergence of idiotype variants during treatment of B-cell lymphoma with anti-idiotypic antibodies.  
*N.Engl.J.Med.* 312: 1658-1665
- MILLER R.A., Maloney D.G., Warnke R., Levy R., 1982.  
Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody.  
*N.Engl.J.Med.* 306: 517-522
- MOCIKAT R., Selmayr M., Thierfelder S., Lindhofer H., 1997.  
Trioma-based vaccination against B-cell lymphoma confers long-lasting tumor immunity.  
*Cancer Res.* 57: 2346-2349
- MOSS P.A., Rowland-Jones S.L., Frodsham P.M., McAdam S., Giangrande P., McMichael A.J., Bell J.I., 1995.  
Persistent high frequency of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T cells in peripheral blood of infected donors.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 5773-5777

- MÜLHARDT C., 1999.  
Der Experimentator: Molekularbiologie.  
G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- MURATA T., Takizawa T., Funaba M., Fujimura H., Murata E., Torii K., 1997.  
Quantitation of mouse and rat beta-actin mRNA by competitive polymerase chain reaction using capillary electrophoresis.  
*Anal.Biochem.* 244: 172-174
- NELSON E.L., Li X., Hsu F.J., Kwak L.W., Levy R., Clayberger C., Krensky A.M., 1996.  
Tumor-specific, cytotoxic T-lymphocyte response after idiotype vaccination for B-cell, non-Hodgkin's lymphoma.  
*Blood* 88: 580-589
- NOPPEN C., Levy F., Burri L., Zajac P., Remmel E., Schaefer C., Luscher U., Heberer M., Spagnoli G.C., 2000.  
Naturally processed and concealed HLA-A2.1-restricted epitopes from tumor-associated antigen tyrosinase-related protein-2.  
*Int.J.Cancer* 87: 241-246
- NOWELL P.C., 1976.  
The clonal evolution of tumor cell populations.  
*Science* 194: 23-28
- O'CONNELL J., Bennett M.W., O'Sullivan G.C., O'Callaghan J., Collins J.K., Shanahan F., 1999.  
Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege.  
*Clin.Diagn.Lab Immunol.* 6: 457-463
- OFFERMANS M.T., Sonneveld R.D., Bakker E., Deutz-Terlouw P.P., de Geus B., Rozing J., 1995.  
Denaturing and non-denaturing gel electrophoresis as methods for the detection of junctional diversity in rearranged T cell receptor sequences.  
*J.Immunol.Methods* 181: 101-114
- PANNETIER C., Cochet M., Darce S., Casrouge A., Zoller M., Kourilsky P., 1993.  
The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90: 4319-4323
- PANTALEO G., Demarest J.F., Soudeyans H., Graziosi C., Denis F., Adelsberger J.W., Borrow P., Saag M.S., Shaw G.M., Sekaly R.P., , 1994.  
Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV.  
*Nature* 370: 463-467
- PARDOLL D.M., 1993.  
New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors.  
*Curr.Opin.Immunol.* 5: 719-725
- PERILLO N.L., Naeim F., Walford R.L., Effros R.B., 1993.  
The in vitro senescence of human T lymphocytes: failure to divide is not associated with a loss of cytolytic activity or memory T cell phenotype.  
*Mech.Ageing Dev.* 67: 173-185
- PLAUTZ G.E., Yang Z.Y., Wu B.Y., Gao X., Huang L., Nabel G.J., 1993.  
Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90: 4645-4649
- RAK J., Mitsuhashi Y., Bayko L., Filmus J., Shirasawa S., Sasazuki T., Kerbel R.S., 1995.  
Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis.  
*Cancer Res.* 55: 4575-4580

- RIBAS A., Butterfield L.H., McBride W.H., Dissette V.B., Koh A., Vollmer C.M., Hu B., Chen A.Y., Glaspy J.A., Economou J.S., 1999.  
Characterization of antitumor immunization to a defined melanoma antigen using genetically engineered murine dendritic cells.  
*Cancer Gene Ther.* 6: 523-536
- ROMAGNANI S., 1995.  
Biology of human TH1 and TH2 cells.  
*J.Clin.Immunol.* 15: 121-129
- ROMERO P., Cerottini J.C., Waanders G.A., 1998.  
Novel methods to monitor antigen-specific cytotoxic T-cell responses in cancer immunotherapy.  
*Mol.Med.Today* 4: 305-312
- ROSENBERG S.A., Yannelli J.R., Yang J.C., Topalian S.L., Schwartzentruber D.J., Weber J.S., Parkinson D.R., Seipp C.A., Einhorn J.H., White D.E., 1994.  
Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2.  
*J.Natl.Cancer Inst.* 86: 1159-1166
- ROSENBERG S.A., Packard B.S., Aebersold P.M., Solomon D., Topalian S.L., Toy S.T., Simon P., Lotze M.T., Yang J.C., Seipp C.A., 1988.  
Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report.  
*N.Engl.J.Med.* 319: 1676-1680
- ROSENBERG S.A., Spiess P., Lafreniere R., 1986.  
A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes.  
*Science* 233: 1318-1321
- RUF P. und Lindhofer H., 2001.  
Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody.  
*Blood* 98: 2526-2534
- RUSCH V., Klimstra D., Venkatraman E., Pisters P.W., Langenfeld J., Dmitrovsky E., 1997.  
Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression.  
*Cancer Res.* 3: 515-522
- SANGER F., 1981.  
Determination of nucleotide sequences in DNA.  
*Science* 214: 1205-1210
- SCHWARTZ R.H., 1990.  
A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy.  
*Science* 248: 1349-1356
- SENSI M., Salvi S., Castelli C., Maccalli C., Mazzocchi A., Mortarini R., Nicolini G., Herlyn M., Parmiani G., Anichini A., 1993.  
T cell receptor (TCR) structure of autologous melanoma-reactive cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones: tumor-infiltrating lymphocytes overexpress in vivo the TCR beta chain sequence used by an HLA-A2-restricted and melanocyte-lineage-specific CTL clone.  
*J.Exp.Med.* 178: 1231-1246
- SERRE K., Machy P., Grivel J.C., Jolly G., Brun N., Barbet J., Leserman L., 1998.  
Efficient presentation of multivalent antigens targeted to various cell surface molecules of dendritic cells and surface Ig of antigen-specific B cells.  
*J.Immunol.* 161: 6059-6067
- SHAY J.W. und Bacchetti S., 1997.  
A survey of telomerase activity in human cancer.  
*Eur.J.Cancer* 33: 787-791

- SHEVACH E.M., Stobo J.D., Green I., 1972.  
Immunoglobulin and theta-bearing murine leukemias and lymphomas.  
*J.Immunol.* 108: 1146-1151
- SLAMON D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L., 1987.  
Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.  
*Science* 235: 177-182
- SNIDER D.P. und Segal D.M., 1989.  
Efficiency of antigen presentation after antigen targeting to surface IgD, IgM, MHC, Fc gamma RII, and B220 molecules on murine splenic B cells.  
*J.Immunol.* 143: 59-65
- SOTOMAYOR E.M., Borrello I., Tubb E., Rattis F.M., Bien H., Lu Z., Fein S., Schoenberger S., Levitsky H.I., 1999.  
Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through in vivo ligation of CD40.  
*Nat.Med.* 5: 780-787
- SOURDIVE D.J., Murali-Krishna K., Altman J.D., Zajac A.J., Whitmire J.K., Pannetier C., Kourilsky P., Evavold B., Sette A., Ahmed R., 1998.  
Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell responses to an acute viral infection.  
*J.Exp.Med.* 188: 71-82
- STEINLE A., Reinhardt C., Jantzer P., Schendel D.J., 1995.  
In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex.  
*J.Exp.Med.* 181: 503-513
- STEVENSON F.K., George A.J., Glennie M.J., 1990.  
Anti-idiotypic therapy of leukemias and lymphomas.  
*Chem.Immunol.* 48: 126-166
- STREHL J., Selmayr M., Kremer J.P., Hultner L., Lindhofer H., Mocikat R., 1999.  
Gene therapy of B-cell lymphoma with cytokine gene-modified trioma cells.  
*Int.J.Cancer* 83: 113-120
- SYRENGELAS A.D. und Levy R., 1999.  
DNA vaccination against the idiotype of a murine B cell lymphoma: mechanism of tumor protection.  
*J.Immunol.* 162: 4790-4795
- TAO M.H. und Levy R., 1993.  
Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma.  
*Nature* 362: 755-758
- TEPPER R.I. und Mule J.J., 1994.  
Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells.  
*Hum.Gene Ther.* 5: 153-164
- TSIOULIAS G.J., Triadafilopoulos G., Goldin E., Papavassiliou E.D., Rizos S., Bassioukas P., Rigas B., 1993.  
Expression of HLA class I antigens in sporadic adenomas and histologically normal mucosa of the colon.  
*Cancer Res.* 53: 2374-2378

- UNKELESS J.C., 1979.  
Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors.  
*J.Exp.Med.* 150: 580-596
- Van den EYNDE B.J. und van der Bruggen P., 1997.  
T cell defined tumor antigens.  
*Curr.Opin.Immunol.* 9: 684-693
- VIEIRA J. und Messing J., 1982.  
The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.  
*Gene* 19: 259-268
- WEN Y.J., Barlogie B., Yi Q., 2001.  
Idiotype-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: evidence for their capacity to lyse autologous primary tumor cells.  
*Blood* 97: 1750-1755
- ZENG G., Touloukian C.E., Wang X., Restifo N.P., Rosenberg S.A., Wang R.F., 2000.  
Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA- DR molecules.  
*J.Immunol.* 165: 1153-1159

## Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht als:

### Originalarbeit:

- KRONENBERGER K., Dieckmann A., Selmayr M., Strehl J., Wahl u., Lindhofer H., Kraal G., Mocikat R., 2002.  
Impact of the lymphoma idiotype on in vivo tumor protection in a vaccination model based on targeting antigens to antigen-presenting cells.  
*Blood* 99: 1327-1331

### Vortrag und Poster:

- KRONENBERGER K., Frankenberger B., Ellwart J., Mocikat R., 2001.  
Specificity and clonality studies of tumor-specific T-cells from trioma-vaccinated mice.  
11th International Congress of Immunology. Stockholm, 22-27.7.2001.  
Abstrakt in: *Scandinavian Journal of Immunology* 54, Suppl.1, Abstracts for 26.7.01: 78

## X DANK

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die das Zustandekommen dieser Arbeit unterstützt und ermöglicht haben. Mein ganz besonderer Dank gilt:

- PD Dr. R. Mocikat, in dessen Arbeitsgruppe ich diese Arbeit durchgeführt habe. Seine Unterstützung in den molekularbiologischen und immunologischen Methoden sowie seine optimale wissenschaftliche Betreuung ermöglichte jederzeit produktives Arbeiten.
- Prof. Dr. W. Schartau, der die Betreuung meiner Doktorarbeit in der Biologischen Fakultät übernommen hat. Seine Unterstützung war beispielhaft und Voraussetzung für diese Arbeit.
- Prof. Dr. D.J. Schendel, die die Durchführung dieser Arbeit am Institut für Molekulare Immunologie der GSF ermöglicht hat.
- Meinen Arbeitsgruppenkollegen Dr. B. Frankenberger und Dr. U. Wahl. Neben der wissenschaftlichen Hilfe und Unterstützung kam auch das Zwischenmenschliche nie zu kurz.
- Den Diplomanden, Doktoranden, und TA C. Adam, S. Garhammer, N. Graf, H. Jennen, B. Konkol und G. Schmid, für die sehr gute Zusammenarbeit in einer netten Arbeitsatmosphäre.
- J. Jasny, U. Bamberg und dem Tierstallpersonal des Instituts, vor allem M. Hagemann für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen Tierexperimenten.
- S. Donhauser für alle organisatorischen Arbeiten, Hilfen und Tipps.
- Allen Mitarbeitern des IMI, die durch die nette und lockere Atmosphäre sowie durch ihre nicht alltägliche Hilfsbereitschaft und Kooperation ein entspanntes Arbeiten ermöglicht haben.
- Der Fußballtruppe im MPI für Sport und Spaß.
- Meiner Mutter und meinem Vater.

## LEBENS LAUF

### **Persönliche Daten**

Name: Konrad Kronenberger  
Geburtstag/ -ort: 27.10.1969, Temeschburg/ Rumänien  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulausbildung**

9/ 1976-8/ 1983 Gesamtschule in Rumänien  
9/ 1983-6/ 1990 Heinrich-Heine-Gymnasium in München, Abitur

### **Ersatzdienst**

9/ 1990-11/ 1991 Zivildienst in Großhesselohe bei München

### **Studium**

11/ 1991-4/ 1998 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
11/ 1996-6/ 1997 Diplomarbeit bei Prof. Dr. G. Haszprunar  
Thema: Ultrastruktureller Vergleich der Epidermisstrukturen von *Pulvinomyzostomum pulvinar* (Graff) und *Myzostoma alatum* Graff (Myzostomida, Annelida).

### **Promotion**

2/ 1999-2/ 2002 Promotion an der Biologischen Fakultät der LMU-München  
Durchführung der Arbeit am Institut für Molekulare Immunologie der GSF in München Großhadern

## **ERKLÄRUNG**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12(3) der Promotionsordnung  
von Prof. Dr. Walter Schartau betreut.

### **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 26.2.2002

.....  
Konrad Kronenberger

