

Etablierung von Mausmodellen für die T-Zelltherapie von B-Zell-Lymphomen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Frank Michael Lehmann

12.09.2011

angefertigt am
Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für
Gesundheit und Umwelt

Erstgutachterin: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Zweitgutachter: PD. Dr. Josef Mautner

Tag der mündlichen Prüfung: 8.02.2012

Man merkt nie, was schon getan wurde; man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt (Marie Curie).

Meinen Eltern und Samantha

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	2
3	Einleitung	5
3.1	Das Immunsystem	5
3.1.1	T-Lymphozyten und ihr Rezeptor	6
3.1.2	Aktivierung von T-Zellen	8
3.1.3	Toleranzinduktion	9
3.1.4	Antigenpräsentation	10
3.2	Das Immunsystem und Krebs	10
3.2.1	Immunüberwachung	11
3.2.2	Immunsupprimierung durch Tumoren	12
3.2.3	Tumorantigene	13
3.2.4	c-MYC	14
3.2.5	CD19	15
3.3	Adoptive T-Zelltherapie	16
3.3.1	Paradigmen der T-Zelltherapie	17
3.3.2	T-Zellrezeptor-Therapie	19
3.3.3	T-Helferzellen in der adoptiven Immuntherapie	21
3.4	B-Zell-Lymphome	22
3.5	Modellsysteme	24
3.5.1	CD19-Cre	24
3.5.2	STAT1-Knockout-Mäuse	24
4	Zielsetzung	25
5	Material und Methoden	27
5.1	Plasmide	27
5.2	Sonden für Southern-Blot	27
5.3	Bakterien	27
5.4	Zelllinien	27
5.5	Mausstämme	28
5.6	DNA-modifizierende Enzyme	29

5.7	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	29
5.8	Medien und Puffer	29
5.8.1	Medien zur Bakterienkultur	29
5.8.2	Zellkulturmedien	30
5.9	Oligonukleotide	30
5.10	Peptide	31
5.11	Geräte	32
5.12	Molekularbiologische Methoden	33
5.12.1	Amplifikation von Plasmiden in Bakterienkulturen	33
5.12.1.1	Isolierung von Plasmiden	33
5.12.1.2	Generierung elektrokompenter Bakterien	33
5.12.1.3	Transformation von Bakterien	33
5.12.1.4	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	34
5.12.1.5	Restriktionsspaltung	34
5.12.1.6	Auffüllen überhängender DNA-Enden	34
5.12.1.7	Ligation von DNA-Molekülen	34
5.12.1.8	Sequenzierung	35
5.12.1.9	Agarose-Gelelektrophorese	35
5.12.1.10	Isolierung von DNA aus Mausschwanzspitzen	35
5.12.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
5.12.2	Klonierung	37
5.12.2.1	Targeting-Vektor	37
5.12.2.2	Bakterielle Rekombination	39
5.12.2.3	DNA-Vakzinierungsplasmide	40
5.13	Allgemeine Zellkulturtechniken	40
5.13.1	Bestimmung der Zelldichte und Vitalität	40
5.13.2	Gradientenzentrifugation zur Zellseparation	40
5.14	Arbeit mit ES-Zellen	41
5.14.1	Kultivierung von embryonalen Fibroblasten	41
5.14.2	Kultivierung von ES-Zellen	41
5.14.3	Transfektion von ES-Zellen	42
5.14.4	Selektion und Expansion von ES-Zellklonen	42
5.14.5	Isolierung von DNA aus ES-Zellen	43
5.14.6	Southern-Blot	44
5.14.7	Kultivierung von stabil transfizierten ES-Zellklonen für die Blastozysten-Injektion	45
5.14.8	Test auf Deletion des Neomycin-Resistenzgens	46
5.14.9	Proteinextraktion aus Zellen	47
5.14.10	Proteinquantifizierung	47
5.14.11	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	47
5.15	Arbeit mit Mäusen	49

5.15.1	Verpaarungen	49
5.15.2	Vakzinierung von Mäusen	49
5.15.3	Präparation von Mausorganen	50
5.15.4	Isolierung von T-Zellen und B-Zellen	51
5.15.5	Kultivierung und Transfer von 291-Lymphomzellen	51
5.15.6	Isolierung von primären Lymphomzellen	52
5.15.7	Depletion von T-Zellen	52
5.16	Immunologische Methoden	53
5.16.1	FACS	53
5.16.2	Analyse der in vitro Proliferation von B-Lymphozyten	53
5.16.3	Immunhistochemie	54
5.16.4	IFN- γ -ELISA	55
5.16.5	IFN- γ -ELISPOT	56
5.16.6	Zytokin-Array	57
5.16.7	Calcein-Freisetzungstest	58
5.17	Kultivierung von T-Zellen	59
5.17.1	Injektion von T-Zellen	60
5.17.2	Klonierung von murinen CD4 ⁺ T-Zellen	60
5.17.3	RNA-Isolierung	61
5.17.4	cDNA-Synthese	61
5.17.5	Analyse des T-Zellrezeptor-Repertoires	61
5.17.6	Molekulare Klonierung der T-Zellrezeptor-Gene des T-Zellklons 27.2 und Funktionalitätsanalyse	62
5.17.7	Statistik	62
6	Ergebnisse	63
6.1	Mäuse transgen für humanes <i>c-MYC</i>	63
6.1.1	Targeting Strategie	63
6.1.2	Generierung von hc-Myc transgenen ES-Zellen	65
6.1.3	Generierung des transgenen hc-Myc-Mausstamms	68
6.1.4	Transgene hc-Myc-Mäuse weisen einen normalen Phänotyp auf	70
6.2	CD19 als Tumorabstoßungsantigen	75
6.2.1	CD19-spezifische Abstoßung von hoch malignen B-Zell-Lymphomzellen	75
6.2.1.1	CD19-defiziente Mäuse haben nach Abstoßung von Lymphomzellen eine Gedächtnis-Immunantwort	79
6.2.1.2	T-Zellen sind für die Abstoßung der Lymphomzellen notwendig	81
6.2.1.3	CD4 ⁺ -Zellen, aber nicht CD8 ⁺ -Zellen, infiltrieren schrumpfende Tumoren	82
6.2.2	Induktion einer CD19-spezifischen T-Zell-Immunantwort	85

6.2.2.1	Induktion einer CD4 ⁺ T-Zell-Immunantwort durch Vakzinierung mit CD19-Peptiden	85
6.2.2.2	Identifizierung von drei I-A ^b -Epitopen	91
6.2.3	Analyse der Immunantwort in Mäusen, die den Lymphomtransfer überlebten	94
6.2.4	Etablierung CD19-spezifischer T-Zelllinien	97
6.2.4.1	Die CD19-spezifische T-Zelllinie 27 weist in vitro keine Zytotoxizität gegen Lymphomzellen auf	99
6.2.5	Erhöhtes Überleben durch CD19-spezifische Immunantworten	100
6.2.6	Klonierung der CD19-spezifischen T-Zelllinie 27	102
6.2.6.1	Analyse der Zytokin-Sezernierung des CD19-spezifischen T-Zellklons	104
6.2.6.2	Analyse des T-Zellrezeptor-Repertoires des CD19-spezifischen T-Zellklons 27.2	105
6.2.6.3	Klonierung der Gene eines CD19-spezifischen T-Zellrezeptors	108
7	Diskussion	111
7.1	Generierung des hc-Myc-Mausstamms	113
7.2	CD19 als Zielantigen für eine T-Zelltherapie	114
7.2.1	CD19 fungiert als Tumorabstoßungsantigen	116
7.2.2	Die Bedeutung des Immunsystems für die Abstoßung der Lymphomzellen	117
7.2.3	Induktion einer T-Zell-Immunantwort gegen murines CD19	118
7.2.4	CD19-spezifische T-Zellen in der Lymphomabstoßung	120
7.2.4.1	CD19-spezifische T-Zellen in der Prophylaxe vor Lymphomtransfer	121
7.2.5	CD4 ⁺ T-Zellen als Mediatoren der Tumorabstoßung	122
7.2.6	Klonierung der Gene eines CD19-spezifischen TCR	125
8	Literaturverzeichnis	127
9	Anhang	141
I.	Zusätzliche Abbildungen	141
II.	Abkürzungsverzeichnis	143
III.	Plasmidkarten	145
IV.	Danksagung	151
V.	Lebenslauf	152
VI.	Eidesstattliche Versicherung	153

1 Zusammenfassung

Ein neues und vielversprechendes Therapiegebiet für Krebserkrankungen ist die adoptive T-Zelltherapie. Maßgeblich entscheidend für den Erfolg einer solchen Therapie ist die Wahl des Zielantigens. Ein ideales Zielantigen ist ein Fremdanigen, welches strikt tumorspezifisch exprimiert wird. Allerdings ist es äußerst schwierig ein tumorspezifisches Fremdanigen zu finden, welches in einer breiten Patientenzahl vorkommt und somit therapeutisch relevant wäre. Eine Ausnahme bilden hierbei Virus-assoziierte Krebserkrankungen.

Deshalb ist es sinnvoll auch tumorassoziierte Selbst-Antigene für die T-Zelltherapie in Erwägung zu ziehen. Bei diesen Antigenen handelt es sich um Proteine, die häufig in Tumorzellen abnormal exprimiert werden, beispielsweise überexprimiert, aber dennoch auch von normalem Gewebe exprimiert werden können. Eine T-Zelltherapie, die gegen solche Selbst-Antigene gerichtet ist, birgt aber auch enorme Risiken hinsichtlich einer Autoimmunreaktion. Deshalb ist es sinnvoll, solche Therapiestrategien zunächst in einem Modellorganismus zu analysieren, bevor sie am Patienten zur Anwendung kommen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zwei Mausmodelle für eine T-Zelltherapie von B-Zell-Lymphomen etabliert, mit c-MYC als in Lymphomen hoch exprimiertes Zielantigen sowie mit CD19 als B-Zell-spezifisches Differenzierungsantigen.

Um eine T-Zelltherapie, die gegen humanes c-MYC gerichtet ist, in einem Mausmodell analysieren zu können, wurde in dieser Arbeit ein transgener Mausstamm generiert, der anstelle des murinen c-MYC humanes c-MYC in jeder Zelle exprimieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass die transgenen Mäuse trotz fehlendem murinen *c-Myc* einen normalen Phänotyp besitzen, d.h. ein normales Körpergewicht sowie unveränderte Organgewichte und ein normales Proliferationsverhalten der B-Zellen in vitro aufweisen. Da Mäuse bei einer verminderten c-MYC-Expression Veränderungen in diesen Parametern zeigen und eine Deletion des *c-Myc*-Gens embryonal letal ist, zeigt dies, dass das humane c-MYC-Protein sein murines Ortholog ersetzen kann. Somit ist es möglich, in diesem Mausmodell eine T-Zelltherapie gegen humanes c-MYC als Zielantigen darauf hin zu analysieren, ob es ein therapeutisches Fenster zwischen Tumormunität und Autoimmunität gibt.

Für das zweite Mausmodell ist das Zielantigen der murine B-Zell-Korezeptor CD19. In dieser Arbeit wurde zunächst gezeigt, dass CD19 ein sehr gutes T-Zell-Abstoßungsantigen für ein Burkitt-ähnliches CD19-positives Lymphom (Lymphom-Zelllinie aus dem λ -MYC-Mausstamm) in CD19-defizienten Mäusen ist. In 50 und 60 % dieser Mäuse wurden nämlich 1×10^6 bzw. 1×10^5 Lymphomzellen nach subkutanem Transfer abgestoßen. Im Gegensatz

hierzu überlebten nur 6 und 15 % der Wildtyp-Mäuse den Lymphomtransfer. Die Bedeutung der T-Zellen für die Abstoßung der Lymphomzellen wurde durch eine Depletion von Thymozyten, wodurch alle Mäuse ein subkutanes Lymphom entwickelten, unterstrichen. Besonders $CD4^+$ T-Zellen scheinen bei der Abstoßung von Bedeutung zu sein, da nur $CD4^+$ T-Zellen im Gewebe schrumpfender Tumoren nachweisbar waren und zudem in Mäusen, die den Lymphomtransfer überlebt hatten, nur eine CD19-spezifische $CD4^+$ T-Zell-Immunantwort nachgewiesen werden konnte.

Zusätzlich konnte eine $CD4^+$ T-Zell-Immunantwort gegen murines CD19 in CD19-defizienten Mäusen durch Peptid- und Plasmid-Vakzinierung induziert werden und eine CD19-spezifische $CD4^+$ T-Zelllinie sowie ein T-Zellklon generiert werden, welche beide spezifisch die Lymphomzellen erkennen. Verglichen mit einer Kontrollvakzinierung scheint die Vakzinierung gegen CD19 auch das Überleben der CD19-defizienten Mäuse nach Lymphomtransfer zu erhöhen, was zusätzlich die Bedeutung der $CD4^+$ T-Zellen für die Lymphomabstoßung unterstreicht.

Aus dem T-Zellklon konnten die Gene für einen CD19-spezifischen T-Zellrezeptor mittels molekularer Klonierung isoliert und naiven T-Zellen durch Transduktion mit diesen eine CD19-Spezifität verliehen werden. Mit den CD19-spezifischen T-Zellen sind somit Studien hinsichtlich einer T-Zelltherapie im Mausmodell möglich.

2 Summary

A promising therapeutic approach for cancer treatment is adoptive T cell therapy. One success determining factor is the precise choice of the target antigen. An ideal target antigen should be a foreign antigen, which is strictly tumor-specific. However, most foreign antigens in tumors carry patient-specific mutations and are therefore not present in a large number of patients. Generic therapeutically relevant foreign antigens can only be found in viral-induced cancers. For this reason, tumor-associated self-antigens have to be considered as candidate target-antigens. These antigens are proteins that are not exclusively expressed in tumor cells, but are abnormally expressed, for instance overexpressed. However, a T cell therapy targeting tumor-associated self-antigens bears the risk of inducing severe autoimmunity. Hence, testing such a T cell therapy in experimental model systems before going into the clinic is advisable.

To this end, we generated two mouse models for studying T cell therapy of B cell lymphomas. As target antigens human c-MYC and murine CD19 were chosen. In order to be able to analyze a T cell therapy targeting human c-MYC in the mouse, we generated a

transgenic mouse strain that expresses human c-MYC instead of the murine c-MYC. These animals lacking the endogenous murine *c-Myc* gene had a normal phenotype. Transgenic animals had a body weight and organ weights comparable to that of wild type mice. Moreover, the in vitro proliferation of B cells of these mice was normal. Since animals that express very low amounts of c-MYC have defects in these parameters and a complete c-MYC knockout is embryonically lethal, this indicates that murine c-MYC can be replaced by the human orthologous protein. Thus, in this mouse model the question can be addressed whether for human c-MYC as tumor-associated antigen a therapeutic window exists between anti-tumor immunity and autoimmunity.

In the second mouse model murine CD19 was chosen as target antigen. In CD19-deficient animals murine CD19 served as a T cell-dependent rejection antigen for CD19-positive c-MYC-induced murine B cell lymphomas (lymphoma cells derived from λ -MYC mice): 50 and 60 % of CD19-deficient animals survived the subcutaneous transfer of 1×10^6 or 1×10^5 lymphoma cells, respectively, whereas only 6 and 15 % of wild type animals survived. By depleting thymocytes it could be shown that T cells are essential for rejection of the lymphoma cells. In animals that had survived the transfer of lymphoma cells only CD19-specific CD4⁺ T cells, but no CD19-specific CD8⁺ T cells, could be detected. Furthermore, only CD4⁺ T cells infiltrated shrinking tumors in CD19-deficient animals, indicating that CD4⁺ T cells play an important role in rejection of the lymphoma cells in this model. For this reason, a vaccination protocol was established to induce a CD19-specific CD4⁺ T cell immune response. It could be shown that survival of animals vaccinated with CD19-peptides and a CD19 expression plasmid was prolonged after transfer of lymphoma cells compared to control-vaccinated mice emphasizing the role of CD4⁺ T cells in lymphoma rejection in this model system.

After vaccination, a CD19-specific CD4⁺ T cell line and one T cell clone that recognized lymphoma cells could be established by repeated in vitro stimulation with peptide. Additionally, genes coding for the CD19-specific TCR could be isolated from this T cell clone and naïve T cells could be rendered CD19-specific by transduction with these TCR genes. Thus, it is now possible to study CD19-specific T cell therapies in the mouse by using these CD19-specific T cells.

3 Einleitung

3.1 Das Immunsystem

Als Abwehr gegen verschiedenste Arten von Pathogenen haben sich in Vertebraten eine Reihe hoch spezialisierter Zelltypen entwickelt, die als Immunsystem den Körper schützen. Das Immunsystem lässt sich in einen angeborenen und einen adaptiven Teil gliedern. Der angeborene Teil ist für eine erste und schnelle Immunantwort gegen Pathogene zuständig. Diese Immunantwort basiert im Gegensatz zur adaptiven Antwort auf Rezeptoren, wie den Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR), die eine Reihe von unveränderlichen Merkmalen der Pathogene, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), erkennen. Solche sogenannten Mustererkennungsrezeptoren werden von mehreren Zellen des angeborenen Immunsystems, darunter natürlichen Killerzellen (NK), Makrophagen und dendritischen Zellen (DC), gebildet.

Viele Pathogene haben allerdings Mechanismen entwickelt der angeborenen Immunantwort zu entgehen. Um dieses zu verhindern hat sich das adaptive Immunsystem entwickelt, welches eine antigenspezifische Immunantwort bilden kann. Die adaptive Immunantwort ist auch entscheidend für die Entwicklung der immunologischen Gedächtnisfunktion, so dass auf eine erneute Infektion mit demselben Pathogen sehr schnell eine Immunantwort folgt und der Erreger eliminiert wird. Die adaptive Immunantwort, welche sich weiter in eine humorale und eine zelluläre Immunantwort gliedern lässt, beruht auf der Bildung von antigenspezifischen Rezeptoren auf B- und T-Lymphozyten (auch B- und T-Zellen genannt). Für die humorale Immunantwort sind Antikörper, die von B-Lymphozyten sezerniert werden, von Bedeutung. Diese dienen in der Regel der Beseitigung extrazellulärer Pathogene. Die zelluläre Immunantwort beseitigt hingegen intrazelluläre Pathogene sowie Tumorzellen und unterstützt die humorale Immunantwort. T-Lymphozyten bestreiten diesen wesentlichen Teil der Immunantwort. Um Autoimmunreaktionen zu verhindern, müssen T- und B-Zellen allerdings in der Lage sein, zwischen Fremd und Selbst zu unterscheiden. Hierfür werden Immunzellen, die Selbst-Antigene erkennen, während ihrer Entwicklung eliminiert oder gehen in einen anergen Zustand über.

Die Immunzellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, welche zunächst zu myeloiden oder lymphoiden Vorläuferzellen differenzieren. Erstere entwickeln sich zu Zellen des angeborenen Immunsystems sowie zu Erythrozyten und Thrombozyten. Aus lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich hingegen B-Zellen, welche im Knochenmark reifen, und T-Lymphozyten, welche im Thymus reifen.

3.1.1 T-Lymphozyten und ihr Rezeptor

T-Lymphozyten können anhand ihres Rezeptors in $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten, deren Rezeptor aus einer α - und einer β -Kette besteht und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, bei denen der Rezeptor aus einer γ - und einer δ -Kette zusammengesetzt ist, unterteilt werden. Letztere machen nur ca. 5% der Lymphozyten im Blut aus, kommen allerdings in Epithelgeweben häufiger vor (Murphy et al., 2008).

Aufgrund der Expression des Korezeptors (CD4 oder CD8) lassen sich $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten weiter in $CD8^+$ T-Lymphozyten und $CD4^+$ T-Lymphozyten, auch T-Helferzellen genannt, unterteilen. $CD8^+$ T-Lymphozyten, welche zytotoxisch sind, können infizierte Zellen sowie Tumorzellen beseitigen. $CD4^+$ T-Helferzellen werden hingegen aufgrund der Sezernierung von diversen Zytokinen weiter in T_H1 -, T_H2 -, T_H17 - und regulatorische T-Zellen gegliedert (Murphy et al., 2008). T_H1 -Zellen sind essentiell für die Eliminierung intrazellulärer Pathogene, die Makrophagen befallen, z.B. *Mycobacterium tuberculosis* und unterstützen zudem die $CD8^+$ T-Zellantwort sowie die Antikörperbildung. T-Helferzellen des Typs T_H2 unterstützen ebenfalls die Bildung von Antikörpern durch B-Zellen und scheinen essentiell für die Abwehr gegen Parasiten zu sein. Über T_H17 -Zellen, die sich durch die Sezernierung von Interleukin 17 (IL-17) auszeichnen, ist weniger bekannt. Diese Untergruppe scheint ebenfalls bei der Abwehr von verschiedenen bakteriellen Infektionen eine Rolle zu spielen und wird auch mit Endzündungsprozessen und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Sallusto und Lanzavecchia, 2009). Im Gegensatz zu anderen T-Zellen besitzen regulatorische T-Lymphozyten eine immunsupprimierende Funktion (Sakaguchi, 2004). In der Karzinogenese unterdrücken regulatorische T-Zellen häufig eine antitumorale Immunantwort, welches diese T-Zellpopulation auch interessant für die Krebstherapie macht (Campbell und Koch, 2011).

Die meisten T-Zellen können mit Hilfe ihres Rezeptors nur Antigene erkennen, die von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) auf der Oberfläche anderer Zellen präsentiert werden. Allerdings sind die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten vermutlich auch dazu fähig, Antigene unabhängig von den MHC-Molekülen zu erkennen (Murphy et al., 2008).

Der T-Zellrezeptor besteht aus zwei Ketten, in der Regel aus einer α - und einer β -Kette und ist komplexiert mit dem Korezeptor CD3 (Abbildung 1), welcher für die intrazelluläre Signaltransduktion wesentlich ist. Dieser besteht aus einem $\epsilon\gamma$ -, einem $\epsilon\delta$ -Heterodimer und einem $\zeta\zeta$ -Homodimer. Ein Teil der $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten kann allerdings auch noch eine zusätzliche α -Kette exprimieren (Casanova et al., 1991, Padovan et al., 1993), wobei in diesen T-Zellen die β -Kette mit beiden α -Ketten interagiert. Dies führt möglicherweise dazu, dass

solche T-Zellen zwei verschiedene Spezifitäten besitzen, welches die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen könnte (Padovan et al., 1995, Kekalainen et al., 2010). Die α - und β -Kette bestehen jeweils aus einer konstanten Domäne und einer variablen Domäne (Abbildung 1). Letztere interagiert direkt mit dem auf MHC-Molekülen präsentierten Antigen. Zusätzlich verfügen die Ketten noch über eine Gelenkdomäne sowie eine Transmembrandomäne, die den T-Zellrezeptor in der Membran verankert. Über eine Disulfidbrücke sind die beiden Ketten des T-Zellrezeptors miteinander verbunden (Murphy et al., 2008).

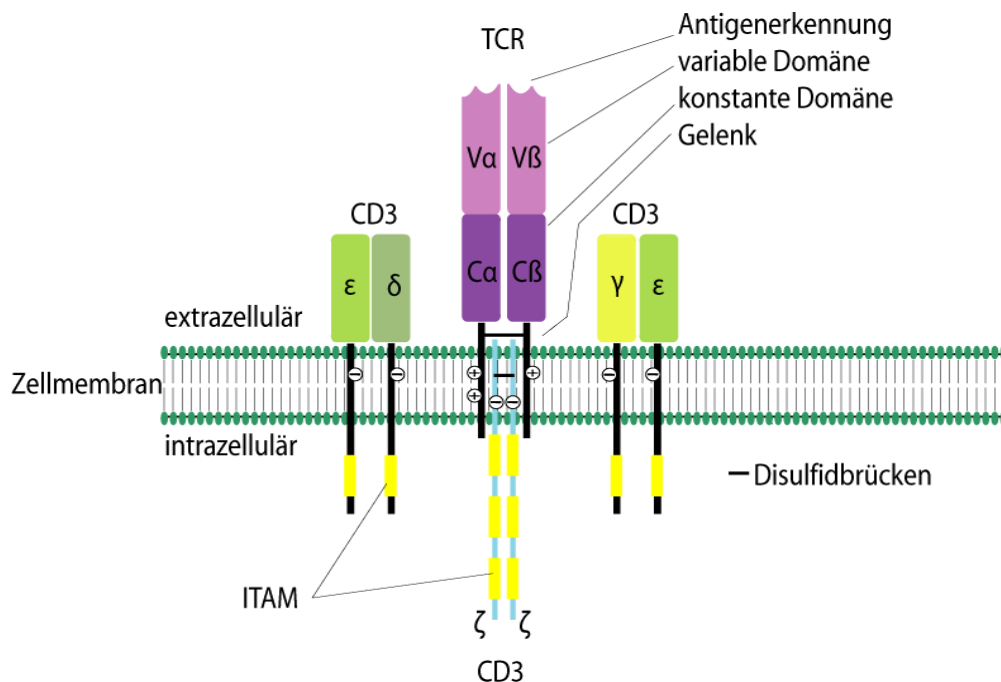


Abbildung 1: T-Zellrezeptorkomplex mit CD3

Der dargestellte T-Zellrezeptor (TCR) besteht aus einer α - und einer β -Kette. Beide Ketten können in eine variable Domäne (V) und eine konstante Domäne (C) unterteilt werden. Die variable Region ist hoch variabel und vermittelt die Antigenerkennung. Zusätzlich hat der TCR noch eine Gelenk-Region, eine transmembrane Domäne sowie ein zytoplasmatisches Ende. Der Korezeptor CD3 besteht aus einem $\epsilon\delta$ - und einem $\gamma\epsilon$ -Heterodimer sowie einem $\zeta\zeta$ -Homodimer. Im intrazellulären Bereich enthalten alle Dimere sogenannte ITAM-Sequenzen (immunoreceptor tyrosine based activation motif), welche für die Signaltransduktion essentiell sind. Die Interaktion zwischen dem TCR und CD3 erfolgt über eine unterschiedliche Ladung der Transmembrandomänen (modifiziert nach Murphy et al., 2008).

Die Genloci der α -Kette und β -Kette bestehen jeweils aus unterschiedlichen Gensegmenten, die für die variable Domäne des T-Zellrezeptors kodieren. In beiden Genloci kommen mehrere sogenannten V (variable)- und J (joining)-Gensegmente vor, wobei der Genloкус für die β -Kette noch das zusätzliche D (diversity)-Gensegment aufweist. Während der Reifung der T-Lymphozyten im Thymus kommt es durch somatische Rekombination zwischen jeweils

einem V- und einem J-Gensegment im α -Lokus sowie jeweils einem V-, einem D- und einem J-Gensegment im β -Lokus zur Bildung der Genabschnitte, welche für die variablen Regionen des T-Zellrezeptors kodieren (Murphy et al., 2008). Im Gegensatz zu den unterschiedlichen V- und J-Gensegmenten enthält der α -Lokus nur ein Gensegment für die konstante Region des Rezeptors, der β -Lokus enthält hingegen zwei. Mit Hilfe der somatischen Rekombination kann eine Vielzahl variabler Regionen im T-Zellrezeptor und somit eine Vielzahl an T-Zellrezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität entstehen. Zusätzlich kann es im Verlauf der somatischen Rekombination zur variablen Addition und Entfernung von Nukleotiden zwischen den V- und J-Gensegmenten im α -Lokus sowie zwischen den V-, D- und J-Gensegmenten im β -Lokus kommen. Dieser Prozess der junktionalen Vielfalt erhöht das potentielle T-Zellrezeptor-Repertoire enorm (beim Menschen auf 2×10^{11}). In der Maus resultiert aus einer ebenfalls hohen Anzahl an Gensegmenten im Lokus für die Ketten des T-Zellrezeptors ein ähnlich hohes T-Zellrezeptor-Repertoire.

3.1.2 Aktivierung von T-Zellen

Im Gegensatz zu B-Lymphozyten können T-Lymphozyten keine löslichen Antigene erkennen oder durch diese stimuliert werden. Antigene, die von T-Zellen erkannt werden können, werden auf MHC-Molekülen in Form kurzer Peptide auf der Zelloberfläche präsentiert. T-Zellen erkennen ihr Antigen immer im Kontext eines spezifischen MHC-Moleküls; weisen die Zielzellen kein passendes MHC-Molekül auf, findet keine Erkennung statt. Bevor eine T-Zelle allerdings Zielzellen eliminieren oder aktivieren kann, muss diese selbst aktiviert werden. Für die Aktivierung von naiven T-Zellen sind antigenpräsentierende Zellen (APZ) essentiell. Zu den APZ gehören dendritische Zellen (DC), B-Lymphozyten und Makrophagen. Diese APZ nehmen Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren sie anschließend auf den MHC-Molekülen. Nach Aktivierung durch Gefahrensignale, beispielsweise durch die Anwesenheit von Lipopolysacchariden (LPS), exprimieren sie zusätzlich kostimulatorische Moleküle (Huang et al., 1994). Zur Aktivierung einer naiven T-Zelle sind zwei Stimuli durch die APZ notwendig: ein Signal der Antigenerkennung durch den T-Zellrezeptor und ein kostimulatorisches Signal, z.B. durch Mitglieder der B7-Familie und/oder der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Familie (Watts, 2005). Bei Abwesenheit des kostimulatorischen Signals gehen T-Zellen in einen anergen Zustand über, welcher sie unempfindlich für äußere Einflüsse macht. Dieser Mechanismus ist essentiell zur Verhinderung einer Autoimmunreaktion.

Nach Aktivierung der T-Zellen sind diese in der Lage, Zielzellen zu erkennen und ihre Effektorfunktion auszuüben, unabhängig von einem zweiten kostimulatorischen Signal. $CD8^+$ T-Zellen und auch einige $CD4^+$ T-Zellen können die Apoptose in ihren Zielzellen nach Erkennung des präsentierten Antigens auslösen. Dies kann über die Ausschüttung von Effektormolekülen oder über den Todesrezeptor-Signalweg erfolgen. Beim Todesrezeptor-Signalweg bindet ein Ligand auf T-Zellen, in der Regel FasL oder TRAIL, an den entsprechenden Rezeptor auf den Zielzellen (FAS oder TRAIL-Rezeptor) (Wang und El-Deiry, 2003, Murphy et al., 2008). Dies löst eine intrazelluläre Kaskade von Caspasen aus, welche in Apoptose der Zelle resultiert. T-Zellen können auch lytische Granula ausschütten, welche Effektormoleküle enthalten. Zu diesen gehören Perforin und die Serinproteasen Granzym A und B, die in Kombination die Apoptose der Zielzellen auslösen (Cullen und Martin, 2008). Perforin ermöglicht den Granzymen, durch Bildung von Membranporen, den Eintritt ins Zytosol. Hier lösen diese die Apoptose durch Aktivierung der Caspase-Kaskade aus (Barry und Bleackley, 2002, Lieberman, 2003). T-Zellen können zudem nach Zielzellerkennung diverse Zytokine und Chemokine sezernieren, welche die Immunantwort zusätzlich verstärken und modulieren können.

3.1.3 Toleranzinduktion

Ein wesentlicher Punkt zur Verhinderung einer Autoimmunerkrankung während der T-Zell-Immunantwort ist die Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst. Dies erfolgt durch die Induktion einer Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen. Die Toleranz kann in eine zentrale und eine periphere gegliedert werden (Murphy et al., 2008). Durch die zentrale Toleranz, welche während der T-Zellreifung im Thymus induziert wird, werden T-Zellen, die Selbst-Antigene erkennen, eliminiert. Hierfür werden den reifenden T-Zellen auf MHC-Molekülen der Stromazellen im Thymus körpereigenen Peptide präsentiert (Derbinski et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor AIRE scheint hierbei von besonderer Bedeutung zu sein. Dieser sorgt dafür, dass auch Proteine in den Stromazellen exprimiert und somit auf MHC-Molekülen präsentiert werden, von denen zunächst angenommen wurde, dass sie strikt gewebsspezifisch gebildet werden. Bindet der TCR während der Reifung einer T-Zelle stark an ein solches Selbst-Antigen, geht die T-Zelle in Apoptose (Murphy et al., 2008). Durch diese sogenannte negative Selektion wird das T-Zellrezeptor-Repertoire auf Erkennung von körperfremden Antigenen reduziert.

T-Zellen, die dem Prozess der zentralen Toleranzselektion entgehen, können zusätzlich durch verschiedene Mechanismen der peripheren Toleranz gehemmt werden. Hierbei spielen unter anderem die regulatorischen T-Zellen eine wesentliche Rolle, welche durch die Sezernierung des transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β) und IL-10 immunsuppressiv wirken können (Murphy et al., 2008). Ebenso ist die Induktion der Anergie einer T-Zelle (Abschnitt 3.1.2) bei fehlendem kostimulatorischem Signal Teil der peripheren Toleranz.

3.1.4 Antigenpräsentation

MHC-Moleküle lassen sich in zwei Hauptgruppen gliedern, MHC-Klasse I und Klasse II. MHC-Klasse II-Moleküle haben die Funktion, Antigene den $CD4^+$ T-Lymphozyten zu präsentieren. Der Korezeptor CD4 interagiert hierbei mit dem MHC-Klasse II-Molekül und beschränkt die Erkennung von Antigenen durch die $CD4^+$ T-Lymphozyten auf diese MHC-Moleküle. Der CD8-Korezeptor interagiert hingegen nur mit MHC-Molekülen der Klasse I. MHC-Klasse I-Moleküle, welche von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, präsentieren vornehmlich zytoplasmatisch prozessierte Peptide (8-10 Aminosäuren). Im Gegensatz hierzu werden Antigene, die extrazellulären Ursprungs sind, in der Regel auf MHC-Klasse II-Molekülen von Zellen präsentiert, die auf Antigenpräsentation spezialisiert sind (professionelle antigenpräsentierende Zellen). Hierzu gehören dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Die Länge der präsentierten Peptide kann dabei variabel sein.

Allerdings können intrazelluläre Antigene auch auf MHC-Klasse II-Molekülen sowie extrazelluläre Antigene auf MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden. Letzteres wird Kreuzpräsentation genannt und dient unter anderem dazu, Antigene von infizierten Zellen oder Tumorzellen auf MHC Klasse I-Molekülen von nicht infizierten APZ zu präsentieren, sodass eine Antigen-spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort auch indirekt induziert werden kann.

Sowohl MHC-Klasse I- als auch Klasse II-Moleküle sind Heterodimere. Moleküle der Klasse I bestehen aus einer $\beta 2$ -Mikroglobulin-Kette und einer polymorphen α -Kette, wohingegen Klasse II-Moleküle aus je einer polymorphen α - und β -Kette bestehen.

3.2 Das Immunsystem und Krebs

Schon früh gab es Hinweise auf Interaktionen zwischen dem Immunsystem und Krebszellen. Heutzutage ist bekannt, dass Komponenten des Immunsystems sowohl das Tumorwachstum unterdrücken, als auch begünstigen können, aber es gibt dennoch viele Unklarheiten, insbesondere auch darüber, wie diese Erkenntnisse therapeutisch umgesetzt werden könnten.

3.2.1 Immunüberwachung

Erste Beobachtungen von Wechselwirkungen zwischen dem Immunsystem und Tumorgewebe gab es bereits vor mehr als 100 Jahren. So konnte Rudolf Virchow bereits 1863 in neoplastischem Gewebe eine Infiltration von Leukozyten zeigen (Mantovani et al., 1992). 1909 stellte Paul Ehrlich einen gewissen Schutzmechanismus gegen das Anwachsen schnell proliferierender Tumoren durch Vakzinierung mit Tumorzellen fest (Ehrlich, 1909). Trotz dieser Erkenntnisse konnte allerdings erst viel später eine Interaktion zwischen dem Immunsystem und Tumorzellen bewiesen werden. Erst mit Hilfe von Maus-Inzuchtstämmen gelang es zu zeigen, dass Tumorzellen sich immunologisch von normalen Zellen unterscheiden können und Mäuse auch erfolgreich gegen syngene Tumorzellen immunisiert werden können.

Auf der Basis dieser entscheidenden Entdeckung formulierte F.M. Burnet die Theorie der Immunüberwachung (Burnet, 1970), die besagt, dass das Immunsystem in der Lage ist, die Entstehung maligner Erkrankungen zu überwachen und zu bekämpfen. Allerdings konnten Studien erst in jüngerer Zeit, unter anderem mit Hilfe immundefizienter Mäuse, zeigen, dass bestimmte Immundefekte mit einer höheren Tumorzinzidenz einhergehen (Dighe et al., 1994, Kaplan et al., 1998, Street et al., 2001, Cretney et al., 2002). Diese Experimente demonstrierten auch die Wichtigkeit von Interferon- γ , STAT1 (Signaltransduktor-und-Aktivator-der-Transkription-1), β 2-Mikroglobulin sowie Perforin für die anti-Tumor-Immunantwort. So verwundert es nicht, dass es auch Berichte über Zusammenhänge zwischen der Immunsuppression bei Patienten sowie immunologischen Fehlfunktionen und der Häufigkeit von Krebserkrankungen gibt (Vajdic und van Leeuwen, 2009). Zum Beispiel konnte eine Korrelation zwischen einer Infektion mit HIV und der Entstehung von bestimmten Lymphomen gezeigt werden (Levine, 1994, Boshoff und Weiss, 2002). Da nach neueren Erkenntnissen die Beziehung zwischen dem Immunsystem und entarteten Zellen allerdings ziemlich komplex ist, haben Robert Schreiber und Mitarbeiter das ursprüngliche Konzept der Immunüberwachung auf drei Phasen erweitert (Dunn et al., 2004).

Die erste Phase, die Eliminierungsphase, bei der das Immunsystem Tumorzellen erkennt und zerstört, entspricht der ursprünglichen Immunüberwachung. Eine zweite Phase, die sog. Gleichgewichtsphase, tritt ein, wenn die Eliminierung der entarteten Zellen nicht vollständig war. Während dieser Phase kommt es zur Ansammlung weiterer Mutationen in den entarteten Zellen, die das Überleben und somit das Entgehen der immunologischen Erkennung begünstigen. In diesem, als „Immun-Editing“ bezeichneten Prozess, übt das Immunsystem einen Selektionsdruck zur Ansammlung solcher Mutation auf die Tumorzellen aus (Bodmer et

al., 1993, Koopman et al., 2000, Dunn et al., 2004). In der dritten, sogenannten Evasionsphase wachsen Tumorzellen, die von der Immunüberwachung nicht beseitigt werden konnten, unkontrolliert weiter.

3.2.2 Immunsupprimierung durch Tumoren

Die Interaktion zwischen dem Immunsystem und Krebserkrankungen ist nicht nur durch Änderungen und Anpassungen des Immunsystems gekennzeichnet. Auch Tumorzellen verändern sich im Verlauf ihrer Entwicklung sowie im Verlauf der Immunüberwachung. Aufgrund der genetischen Instabilität von Tumorzellen kommt es häufig zur Ansammlung diverser Mutationen sowie zum Expressionsverlust von nicht essentiellen Proteinen (Cheng und Loeb, 1993, Loeb, 1994). Durch die Eliminierung von immunogenen Tumorzellen durch das Immunsystem kann es dann zu einer Selektion von Tumorzellen mit einer verminderten Immunogenität kommen.

Häufig beschriebene Mutationen in Tumorzellen beeinflussen die Antigenpräsentation auf der Oberfläche der Tumorzellen negativ (Marincola et al., 2000). So gibt es beispielsweise in Tumoren unterschiedlichster Histologie Mutationen, die eine schwächere Expression oder sogar einen Expressionsverlust der MHC-Moleküle der Klasse I auf der Zelloberfläche zur Folge haben (Bodmer et al., 1993, Koopman et al., 2000, Algarra et al., 2004). Ebenso können Tumorzellen aufgrund ihrer genetischen Instabilität auch die Expression von Antigenen verlieren, was somit wiederum eine Resistenz gegenüber der Immunerkennung verleihen würde. Weitere beschriebene Mutationen haben einen negativen Einfluss auf die intrazelluläre Prozessierung der Tumorantigene (Marincola et al., 2000, Seliger et al., 2000).

Ein weiterer Mechanismus der Tumorzellen dem Immunsystem zu entgehen, ist die Expression von immunsupprimierenden Faktoren durch die Tumorzellen, wie beispielsweise TGF- β (Torre-Amione et al., 1990, Tada et al., 1991). Einige Tumoren sind auch in der Lage, regulatorische T-Zellen zu rekrutieren, welche dann durch ihre immunsupprimierende Wirkung das Überleben der Tumorzellen begünstigen (Curiel et al., 2004, Turk et al., 2004, Wang et al., 2004a, Strauss et al., 2007). Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass manche Tumorzellen Mutationen anhäufen, welche eine Apoptose-Resistenz verleihen (Malmberg und Ljunggren, 2006, Stewart und Abrams, 2008). Mehrere Krebsgeschwüre wachsen auch in Körperregionen, die dem Immunsystem nicht gut zugänglich sind, wie dem Gehirn oder bilden physikalische Barrieren aus Kollagen und Fibrin um der Immunerkennung zu entkommen (Murphy et al., 2008). Den Tumorzellen ist es insgesamt auf eine vielfältige

Art und Weise möglich, der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entkommen.

3.2.3 Tumorantigene

Unter Tumorantigenen (TA) sind immunogene Peptide zu verstehen, die aus Proteinen entarteter Zellen prozessiert und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Bei den meisten Proteinen, die von Tumoren exprimiert werden, handelt es sich allerdings um Selbst-Proteine, gegen die das Immunsystem aufgrund der Toleranzinduktion keine effektive Immunantwort generieren kann.

Im Verlauf der Onkogenese akkumulieren die Tumoren aber auch viele Mutationen und exprimieren mutierte Proteine, die als Fremdanitgen fungieren können. Gegen diese Antigene hat im Laufe der T-Zellentwicklung keine Toleranzinduktion stattgefunden, weshalb sich eine Immunantwort entwickeln kann. Anhand einiger Beispiele konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem tatsächlich gegen manche mutierte Proteine T-Zell-Immunantworten generieren kann (Monach et al., 1995, Wolfel et al., 1995, Mumberg et al., 1996, Dubey et al., 1997). Dennoch bedeutet das Vorhandensein eines mutierten Proteins nicht zwangsläufig, dass dieses auch als T-Zellantigen fungieren kann. Insgesamt ist es äußerst schwierig, Fremdanitgene in Tumoren zu finden, die therapeutisch von Nutzen sein könnten, da viele mutierte Proteine, die als T-Zellantigen fungieren, nur von individuellen Tumoren exprimiert werden (Huber und Wolfel, 2004, Offringa, 2009). Eine Ausnahme bilden hierbei Virus-induzierte Tumoren.

TA können somit in Proteine unterteilt werden, die nur in individuellen Tumoren exprimiert werden oder häufig in Tumoren vorkommen (Abbildung 2). Letztere Gruppe lässt sich noch weiter in tumorspezifische und gewebspezifische TA unterteilen (Huber und Wolfel, 2004). Zu den häufigen tumorspezifischen TA gehören insbesondere virale Proteine, die in Virus-induzierten Tumoren exprimiert werden. Bei den häufigen gewebspezifischen TA handelt es sich um tumorassoziierte Selbst-Antigene. Diese Gruppe kann noch weiter in Differenzierungsantigene und hoch-spezifische Antigene unterteilt werden. Letztere, insbesondere die Keimbahnantigene, haben in besonderer Weise die Aufmerksamkeit der Tumorummunologen auf sich gezogen, da davon ausgegangen wurde, dass diese nicht im Thymus exprimiert werden und somit nicht der zentralen Toleranz unterliegen. Zu dieser Klasse von Antigenen zählen unter anderen MAGE-1 und MAGE-3, welche normalerweise nur in den Hoden exprimiert werden, allerdings auch auf Melanomen vorkommen können (Brasseur et al., 1995, Houghton et al., 2001). Neuere Erkenntnisse zeigten jedoch, dass

einige Proteine, von denen angenommen wurde, dass sie nur in peripheren Organen vorkommen, auch durch den Transkriptionsfaktor AIRE im Thymus exprimiert werden und somit der zentralen Toleranz unterliegen (Derbinski et al., 2001).

Die Differenzierungsantigene werden auf bestimmten Tumorgeweben und den normalen Zelltypen, aus denen sich die entarteten Zellen entwickelt haben, exprimiert (Van den Eynde und Boon, 1997, Houghton et al., 2001). Hierzu zählen die Antigene Tyrosinase und CD19.

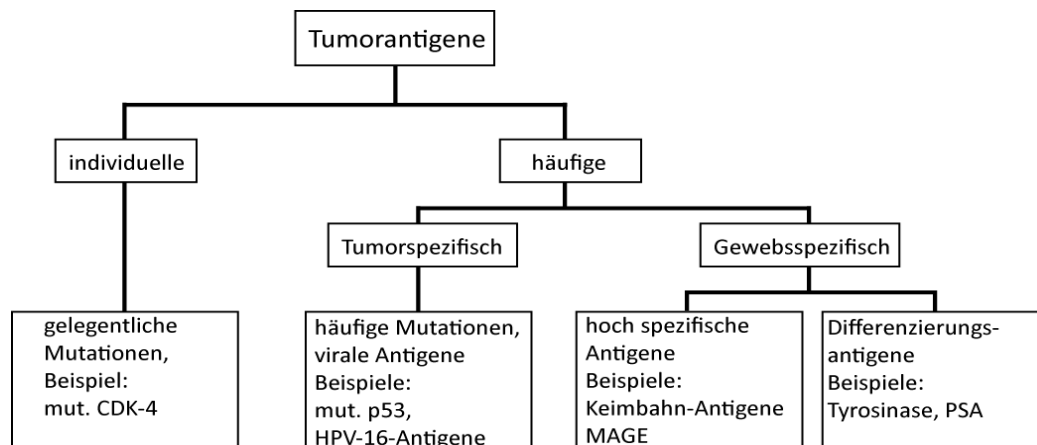


Abbildung 2: Schematische Einteilung der Tumorantigene. (Entnommen aus Huber und Wolfel, 2004). mut. CDK4 (mutierte cycline dependent kinase 4), mut. p53 (mutiertes p53), MAGE (melanoma associated antigen), PSA (prostate specific antigen), HPV-16 (humanes Papillomvirus 16).

Tumorassoziierte Antigene (TAA) können auch noch weiter in Antigene, die in Tumorzellen stark überexprimiert werden, z.B. HER-2/neu und c-Myc (Natali et al., 1990, Boon et al., 2006) und solche, die abnormal posttranslational modifiziert werden (Duffy et al., 2000, Singh und Bandyopadhyay, 2007), untergliedert werden.

Somit steht die Immuntherapie von Krebserkrankungen vor einem Dilemma: in den meisten Tumoren gibt es keine Fremdanigene, die von therapeutischem Nutzen sein könnten. Es gibt lediglich TAA, welche zugleich Selbst-Antigene sind, gegen die das Immunsystem aufgrund der Toleranzinduktion keine effektive hoch-affine Immunantwort generieren kann.

3.2.4 c-MYC

c-MYC ist ein Transkriptionsfaktor der MYC-Familie. Zu dieser Familie gehören auch noch L-MYC und MYCN. MYC-Transkriptionsfaktoren sind wesentlich für die Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Apoptose von Zellen (Henriksson und Luscher, 1996). Ruhende Zellen exprimieren geringe

Mengen an c-MYC, während das Expressionsniveau nach Eintritt in den Zellzyklus ansteigt (Amati et al., 1998, Edgar et al., 2001, Johnston und Gallant, 2002, Cole und Nikiforov, 2006). MYC-Transkriptionsfaktoren werden von Protoonkogenen kodiert und in verschiedenen Krebsarten überexprimiert, insbesondere c-MYC (Nesbit et al., 1999, Bociak, 2005). Das *c-MYC*-Gen, welches aus drei Exons besteht, enthält zwei Startcodons: ein CTG im ersten Exon und ein ATG im zweiten Exon. Somit kodiert das Gen für zwei Proteine: c-MYC1 vom CTG-Startcodon und c-MYC2 vom ATG-Startcodon (Hann et al., 1988). Diese unterscheiden sich in der aminoterminalen Sequenz und werden unterschiedlich während der zellulären Proliferation exprimiert (Hann et al., 1992, Hann et al., 1994). Allerdings ist häufig c-MYC2 und nicht c-MYC1 in verschiedenen Krebsarten überexprimiert (Hann und Eisenman, 1984, Hann et al., 1988).

Onkogene Veränderungen von *c-MYC* werden in der Regel durch Genamplifikationen, Gentranslokationen und Überexpression hervorgerufen. In Burkitt-Lymphomen wird das Gen des Transkriptionsfaktors c-MYC aufgrund einer Translokation in die Nähe eines Immunoglobulin Enhancers überexprimiert (Boxer und Dang, 2001). Translokationen von *c-MYC* sind auch in weiteren malignen Erkrankungen, darunter im multiplen Myelom und im ovarialen Karzinom zu finden (Baker et al., 1990, Nesbit et al., 1999, Avet-Loiseau et al., 2001). In Melanomzellen liegt das *c-MYC*-Gen häufig amplifiziert vor (Treszl et al., 2004). Insgesamt ist der Transkriptionsfaktor c-MYC in sehr vielen Tumorarten überexprimiert und kausal an der Tumorentstehung beteiligt. c-MYC ist deswegen ein interessantes Ziel für eine Immuntherapie (Vita und Henriksson, 2006).

Die Überexpression von MYC ist zudem für die Aufrechterhaltung der Proliferation der Tumorzellen von entscheidender Bedeutung. Interessanterweise zeigt eine Studie in einem Mausmodell, in dem c-MYC konditional exprimiert werden kann, dass die Inaktivierung der c-MYC-Expression in Tumoren zur Regression und zur Apoptose der Tumorzellen führt (Felsher und Bishop, 1999). Eines der Hauptprobleme einer gegen c-MYC gerichteten Immuntherapie ist allerdings, dass eine solche Therapie fatale Nebenwirkungen haben könnte, da c-MYC in nahezu allen Körperzellen exprimiert werden kann. Die entscheidende Frage ist diesbezüglich, ob es ein therapeutisches Fenster zwischen Autoimmunität und Tumorabstoßung gibt.

3.2.5 CD19

Das Membranprotein CD19 wird als Teil des B-Zellkorezeptors auf B-Zellen exprimiert und verstärkt das B-Zellrezeptorsignal. CD19 scheint in der Differenzierung, Entwicklung und

Erhaltung von B-Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen (Rickert et al., 1995, Sato et al., 1995, Sato et al., 1997, Otero et al., 2003). Dieses Protein weist auf malignen B-Zellerkrankungen keine aberrante Expression auf, ist aber dennoch für die Therapie von B-Zellerkrankungen von Interesse, da es in nahezu allen B-Zell-Populationen während der B-Zell-Entwicklung exprimiert wird, außer auf Plasmazellen und hämatopoietischen Stammzellen (Tedder et al., 1997, LeBien, 2000). Aus diesem Grund weisen auch sehr viele maligne B-Zellerkrankungen eine stabile CD19-Expression auf, unter diesen Burkitt-Lymphome, diffuse großzellige B-Zell-Lymphome, Mantelzell-Lymphome und chronische lymphatische Leukämien (Uckun et al., 1988, Echeverri et al., 2002, Hulkkonen et al., 2002, Yang et al., 2005).

CD19 ist ein interessantes Ziel für eine Immuntherapie, da es nur auf B-Zellen und einer Subpopulation von dendritischen Zellen exprimiert wird und somit nur wenig normale unveränderte Zellen durch die Therapie angegriffen werden würden (Tedder et al., 1994, Munn et al., 2004, Baban et al., 2005). Durch die klinische Verwendung des Antikörpers Rituximab, der gegen das B-Zell-spezifische Protein CD20 gerichtet ist und B-Zellen depletiert, ist inzwischen zudem bekannt, dass Patienten unter Immunglobulin-Applikation gut eine Weile ohne B-Zellen auskommen (Leget und Czuczman, 1998).

Diverse Studien verfolgen CD19-spezifische Therapieansätze. So sind beispielsweise mehrere CD19-spezifische Antikörper, darunter welche, die mehrere Spezifitäten aufweisen (sog. bi- und trispezifische Antikörper) in der Erprobung (Daniel et al., 1998, Kipriyanov et al., 2002, Bruenke et al., 2005, Bargou et al., 2008, Horton et al., 2008). Insbesondere ein bispezifischer Antikörper, der gegen CD19 und CD3 gerichtet ist, scheint in ersten klinischen Studien bemerkenswerte Erfolge zu erzielen (Bargou et al., 2008).

3.3 Adoptive T-Zelltherapie

Trotz zahlreicher Fortschritte in der Krebstherapie im letzten Jahrhundert ist Krebs immer noch eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt. Insbesondere wenn die klassischen Behandlungsstrategien (Chirurgie, Chemotherapie und Bestrahlung) versagen, gibt es bei den meisten Krebserkrankungen kaum kurative Therapiemöglichkeiten.

Ein vielversprechender neuer Therapieansatz ist die zelluläre Immuntherapie, insbesondere die adoptive T-Zelltherapie. In frühen Versuchen zur adoptiven Zelltherapie wurden sogenannte Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) verwendet (Rosenberg, 1985). Bei diesen handelt es sich um NK-Zellen, von denen beschrieben wurde, dass sie nach ex vivo

Stimulation mit Interleukin-2 (IL-2) Tumorzellen lysieren könnten (Ettinghausen und Rosenberg, 1986). Diese Strategie hatte in Kombination mit einer Gabe von IL-2 allerdings nur geringe Erfolge in der Melanom-Therapie (Rosenberg et al., 1993). Eine Weiterentwicklung ist die Therapie mit antigenspezifischen T-Zellen, in den meisten Fällen mit zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Es kann zwischen einer Therapie mit T-Zellen, welche Tumorantigene erkennen, die zugleich auch Selbst-Antigene sind und einer Therapie mit T-Zellen, welche körperfremde Peptide (z.B. Virusantigene) erkennen, unterschieden werden. Aufgrund der Toleranzinduktion ist es eine besonders schwierige Herausforderung, T-Zellen in die Hand zu bekommen, die hoch-affin für körpereigene Antigene sind. Allerdings gibt es ebenso kaum Fremdanigene in Tumoren, die für eine T-Zelltherapie genutzt werden könnten.

3.3.1 Paradigmen der T-Zelltherapie

Die größten Erfolge verbucht die T-Zelltherapie in der Behandlung von Virus-assoziierten Tumorerkrankungen und in der Therapie eines Rezidivs der chronischen myeloischen Leukämie (CML) nach Knochenmarkstransplantation.

Letzteres wird mittels einer Infusion von Donor-Lymphozyten (DLI) behandelt (Kolb et al., 1990, Kolb et al., 1995, Kolb et al., 2004). Da hier T-Zellen ausschlaggebend für den Therapieerfolg sind, kann die DLI auch mit einer adoptiven T-Zelltherapie verglichen werden (Apperley et al., 1988). Die DLI hat sich aus dem Wissen um die Spender-gegen-Empfänger-Krankheit (**graft-versus-host disease**, GvHD) nach allogener Knochenmarkstransplantation entwickelt. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass Immunzellen des Spenders gesunde Zellen des Empfängers attackieren. Studien, in denen T-Zell-depletiertes Knochenmark zur Transplantation verwendet wurde, machten deutlich, dass T-Zellen nicht nur für die Entstehung der GvHD von zentraler Bedeutung sind, sondern auch einen Rückfall der Leukämie aufgrund einer Spender-gegen-Leukämie (**graft-versus-leukemia**, GvL)-Reaktion verhindern können (Kolb et al., 1979, Rodt et al., 1979, Apperley et al., 1988, Sullivan et al., 1989, Falkenburg et al., 1999). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der Erfolg der DLI auf der Erkennung von Minor-Histokompatibilitätsantigenen, welche von polymorphen Proteinen abstammen, die sich zwischen Spender und Empfänger unterscheiden, beruht (Marijt et al., 2003, Bleakley und Riddell, 2004). Somit scheint bei dieser Therapie das Vorhandensein eines Fremdanigens ausschlaggebend für den Therapieerfolg zu sein, was auch dadurch bekräftigt wird, dass die DLI bei eineiigen Zwillingen keinen therapeutischen Effekt hat (Kolb et al., 1995, Kolb, 2008).

Eine Immunsuppression nach einer Organtransplantation begünstigt Reaktivierungen von Cytomegalovirus- (CMV) und Epstein-Barr-Virus-Infektionen (EBV). Durch letztere kann es zur sogenannten PTLD (**p**ost **t**ransplant **l**ymphoproliferative **d**isorder) kommen. Hierbei handelt es sich um EBV-induzierte B-Zell-Lymphome. Zur Prophylaxe und zur Therapie der PTLD wurden virusspezifische T-Zellen der Spender sowie in vitro generierte EBV-spezifische T-Zellen mehrfach erfolgreich eingesetzt (Riddell et al., 1992, Papadopoulos et al., 1994, Heslop et al., 1996, Heslop und Rooney, 1997, Rooney et al., 1998, Heslop et al., 2010). Die Erfolge dieser Ansätze basieren ebenfalls auf dem Vorhandensein von Fremddantigenen in den Tumoren.

Die meisten Tumorantigene sind allerdings Selbst-Antigene, gegen die das Immunsystem keine effektive Immunantwort generieren kann, was eine T-Zelltherapie gegen solche Zielantigene äußerst schwierig macht. Eine Besonderheit stellt hier die Erkrankung des malignen Melanoms dar. Für diese Krebsart scheint es einzigartig zu sein, dass das Immunsystem im Verlauf des Tumorwachstums in der Lage ist, eine anti-Tumor-Immunantwort zu entwickeln, an der eine signifikante Anzahl an Lymphozyten beteiligt ist (Muul et al., 1987). Somit können aus Melanom-Patienten im Gegensatz zu anderen Krebspatienten in der Regel genügend tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) oder periphere tumorspezifische Lymphozyten isoliert werden, welche in vitro, außerhalb des immunsuppressiven Milieus des Tumors expandiert und aktiviert werden können. Diese können dann in therapeutisch relevanten Mengen den Patienten zur Therapie injiziert werden. Allerdings konnten erst durch Immunsupprimierung der Patienten vor Gabe der T-Zellen, die durch Chemotherapie und Bestrahlung erreicht wird, entscheidende Erfolge erzielt werden (Dudley et al., 2002, Dudley et al., 2005, Dudley et al., 2008). Durch diese Vorbehandlung wird vermutlich das Volumen des Tumors deutlich reduziert und durch Elimination der regulatorischen T-Zellen das immunsupprimierende Milieu des Tumors zerstört (Antony et al., 2005, Gattinoni et al., 2005), wodurch eine möglicherweise niedrig affine T-Zell-Immunantwort therapeutischen Nutzen erlangen kann. Ebenso müssen transferierte T-Zellen nun nicht mehr mit ansässigen T-Zellen um homöostatische Zytokine, welche essentiell für das Überleben der T-Zellen sind, konkurrieren (Gattinoni et al., 2005). Allerdings sind die Erfolge der Lymphodepletion auch mit einem höheren Risiko einer Autoimmunreaktion verbunden (Muranski et al., 2006). Durch die Kombination der adoptiven T-Zelltherapie mit einer Lymphodepletion konnten lang anhaltende Erfolge in allen Körperregionen der Patienten erzielt werden, weshalb Rosenberg und Kollegen dies inzwischen als die beste Therapieform für Patienten mit metastatischem Melanom bezeichnen (Rosenberg und Dudley,

2009). Insgesamt zeigen diese erfolgreichen T-Zelltherapien, dass die Wahl des Zielantigens von entscheidender Bedeutung ist. Eine Therapie ist dann anscheinend besonders effektiv, wenn ein Fremdanigen als Ziel dient, gegen das sich eine hoch-affine T-Zell-Immunantwort bilden kann.

3.3.2 T-Zellrezeptor-Therapie

Eine neue vielversprechende Strategie, um die Problematik der Toleranz gegenüber tumorassoziierten Selbst-Antigenen zu umgehen, stellt der Transfer von T-Zellrezeptor-Genen in periphere T-Zellen des Patienten dar. Schon 1986 wurde gezeigt, dass durch den Transfer der Gene für die α - und β -Kette eines T-Zellrezeptors T-Zellen eine neue Spezifität verliehen werden kann (Dembic et al., 1986).

Der erste Schritt in der T-Zellrezeptor-Therapie ist zunächst die Identifizierung und Isolierung eines T-Zellklons, welcher eine hohe Affinität für das Tumorantigen aufweist. Dies kann auf verschiedene Weise geschehen. Eine Strategie stellt die Isolierung von tumorspezifischen T-Zellen aus Patienten dar, verbunden mit einer anschließenden in vitro Vermehrung und Klonierung (Ho et al., 2003, Hughes et al., 2005, Disis et al., 2009, Schub et al., 2009). Anschließend müssen die α - und die β -Kette des T-Zellrezeptors identifiziert und die Gene, welche für diese kodieren, durch molekulare Klonierung isoliert werden. Daraufhin werden periphere T-Zellen in der Regel mit einem retroviralen oder lentiviralen Vektor, welcher für beide Ketten kodiert, transduziert (Schmitt et al., 2009).

Da es sich bei vielen Tumorantigenen um Selbst-Antigene handelt, ist es aufgrund der Toleranzmechanismen unmöglich, T-Zellen aus Patienten oder gesunden Spendern zu isolieren, die eine hohe Affinität für ein solches Antigen aufweisen. Dies ist allerdings für eine erfolgreiche Therapie von Tumoren, die mitunter eine niedrige Antigenpräsentation aufweisen, von entscheidender Bedeutung (Schmitt et al., 2009). Durch die Verwendung von transgenen Mäusen, welche humane MHC-Moleküle exprimieren, kann diese Problematik umgangen werden (Johnson et al., 2009). In diesen Mäusen kann aufgrund der Sequenzunterschiede zwischen vielen murinen und humanen Proteinen eine hoch-affine Immunantwort gegen humane Tumorantigene induziert werden. Zusätzlich können auch Mäuse verwendet werden, die einen Knockout für das murine Ortholog des humanen Tumorantigens aufweisen, um eine noch effizientere T-Zell-Immunantwort induzieren zu können. Aus den tumorspezifischen T-Zellen der Maus können schließlich die Gene für die α - und β -Kette des murinen TCR isoliert und zur Transduktion humaner T-Zellen verwendet werden (Abbildung 3).

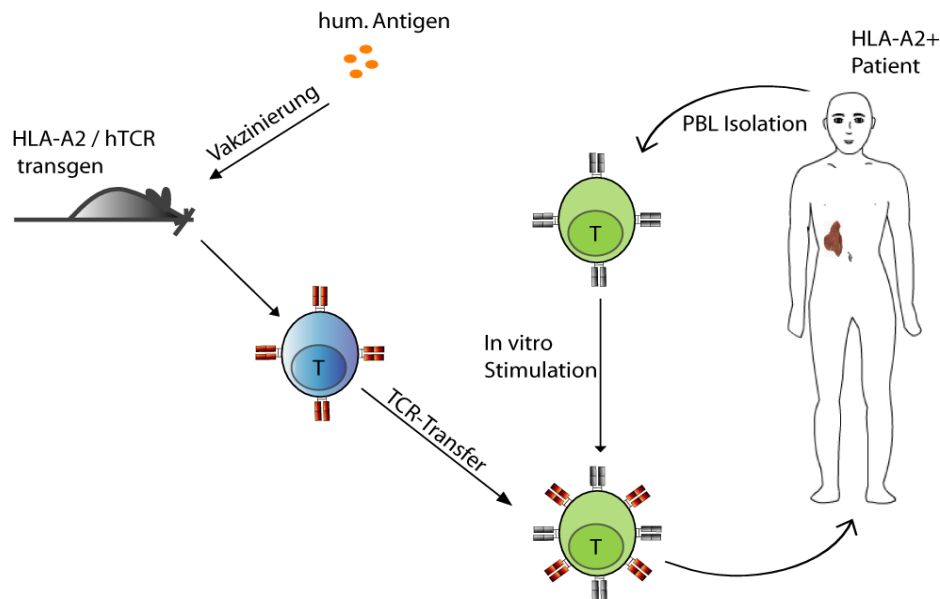


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Strategie zur TCR-Therapie

Zunächst werden Mäuse, welche transgen für humanes HLA-A2 und das humane T-Zellrezeptor-Repertoire sind, mit einem humanen Tumorantigen immunisiert. Aus Tumorantigen-spezifischen murinen T-Zellen werden dann die Gene für den TCR isoliert. Diese werden mittels eines retroviralen oder lentiviralen Vektors in periphere Blut-Lymphozyten (PBL) des Patienten eingebracht. Die T-Zellen der PBL erhalten somit eine Spezifität für das Tumorantigen und werden dem Patienten nach Anreicherung wieder verabreicht.

Zur Reduzierung der Immunogenität des transferierten T-Zellrezeptors können vor dem T-Zelltransfer zusätzlich murine Teile der TCR-Ketten, welche nicht für die Antigenerkennung essentiell sind, durch humane ersetzt werden (Voss et al., 2005). Des Weiteren können Mäuse verwendet werden, welche zusätzlich zu den humanen MHC-Molekülen noch transgen für das humane T-Zellrezeptor-Repertoire sind (Li et al., 2010).

Eine Alternative zu dieser Strategie ist die Verwendung naiver T-Zellen aus einem Spender, der für bestimmte MHC-Moleküle (z.B. HLA-A2), die der Patient aufweist, negativ ist. Diese könnten dann in vitro mit TA-beladenen APZ, die das entsprechende MHC-Molekül exprimieren, stimuliert werden, um TA-spezifische T-Zellen und schließlich Gene TA-spezifischer T-Zellrezeptoren zu erhalten (Schuster et al., 2007, Liang et al., 2010). Mit dieser Methode kann ebenfalls die Toleranzinduktion gegen Selbst-Antigene umgangen werden.

Limitierender Faktor bei allen T-Zelltherapien ist allerdings die Tatsache, dass ein T-Zellrezeptor das entsprechende Antigen immer im Kontext eines definierten MHC-Moleküls erkennt. Dies bedeutet, dass Spender-T-Zellen sowie T-Zellen aus transgenen Mäusen ein Tumorantigen im Kontext eines MHC-Moleküls erkennen müssen, dass der Patient auch exprimiert. Aus diesem Grund konzentriert sich die Forschung auf diesem Gebiet auf T-Zellen, welche Antigene im Kontext von MHC-Molekülen erkennen, die weit verbreitet sind,

wie beispielsweise HLA-A2. Weitere Schwierigkeiten in der T-Zellrezeptor-Therapie sind ein häufig niedriges Expressionsniveau des transduzierten TCR sowie das Risiko einer Fehlpaarung zwischen den transduzierten T-Zellrezeptorketten und endogenen Ketten (Cooper et al., 2000, Labrecque et al., 2001, Dossett et al., 2009). Durch eine Fehlpaarung zwischen den TCR-Ketten kann es zur Entstehung von neuen T-Zellrezeptoren kommen, die eine potentielle Autoreaktivität aufweisen und dementsprechend eine GvHD induzieren können (Fernandez-Miguel et al., 1999, Bendle et al., 2010).

Obwohl diverse Studien die Funktionalität des TCR-Transfers belegen (Kessels et al., 2001, Coccoris et al., 2008, de Witte et al., 2008, Dossett et al., 2009), wurden bisher nur wenige klinische Studien mit TCR-transduzierten T-Zellen durchgeführt. In einer Studie mit Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium konnten durch eine Therapie mit T-Zellrezeptoren mit Spezifität für die Antigene MART1 oder gp100 Erfolge erzielt werden (Morgan et al., 2006, Johnson et al., 2009).

3.3.3 T-Helferzellen in der adoptiven Immuntherapie

Aufgrund der Annahme, dass zytotoxische T-Zellen die einzig wichtige Komponente zur Eliminierung von Krebszellen sind, fokussierte sich die Forschung bisher auf $CD8^+$ T-Zellen zur Verwendung in der adoptiven T-Zelltherapie (Muranski und Restifo, 2009). $CD4^+$ T-Zellen schienen eher nur zusätzliche Stimuli zu liefern und kamen für die Erkennung von Tumorzellen nicht in Betracht, weil die meisten humanen Tumoren für Moleküle der MHC-Klasse II negativ sind (Muranski und Restifo, 2009).

Nach und nach wird allerdings immer offensichtlicher, wie wichtig auch $CD4^+$ T-Helferzellen für die Immuntherapie von Krebs sind. So ist inzwischen bekannt, dass $CD8^+$ T-Zellen ihre Funktion in vivo verlieren und keine Gedächtnis-Immunantwort generieren können, wenn keine $CD4^+$ T-Zell-Hilfe vorhanden ist (Bourgeois et al., 2002, Shedlock und Shen, 2003, Sun und Bevan, 2003). Weitere Studien zeigen zudem, dass neben den $CD8^+$ T-Zellen auch $CD4^+$ T-Zellen Tumorzellen erkennen und eine zytotoxische Aktivität entwickeln können, da viele humane Tumoren die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen nach Stimulation mit $IFN-\gamma$ hoch regulieren (Heller et al., 2006). T-Helferzellen scheinen auch in der Lage zu sein, MHC-Klasse II-negative Tumoren indirekt, über eine Erkennung von Tumorantigenen auf APZ, zu eliminieren. Die APZ aktivieren und stimulieren die T-Helferzellen, welche wiederum verschiedenste Arme der adaptiven und angeborenen Immunantwort zur Krebsbeseitigung aktivieren können (Mumberg et al., 1999). So werden unter anderen tumorizidale

Makrophagen und NK-Zellen durch die $CD4^+$ T-Zellen aktiviert (Lauritzsen und Bogen, 1993, Corthay et al., 2005, Perez-Diez et al., 2007).

Die komplexe genetische Diversität im MHC Klasse II-Lokus stellt jedoch eine große Barriere in der therapeutischen Verwendung tumorspezifischer $CD4^+$ T-Zellen dar, da diese in der Regel nur an einer begrenzten Patientenzahl angewendet werden können (Marsh et al., 2005, Muranski und Restifo, 2009). Zusätzlich gibt es derzeit ein Mangel an kliniknahen Mausmodellen, in denen die Wirkung von tumorspezifischen $CD4^+$ T-Zellen untersucht wird (Muranski und Restifo, 2009). Dessen ungeachtet gibt es Studien, die im Mausmodell belegen, dass $CD4^+$ T-Zellen, unabhängig von $CD8^+$ T-Zellen, in der Lage sind, Tiere vor dem Anwachsen von Tumorzellen zu schützen (Fujiwara et al., 1984, Greenberg et al., 1985). In manchen Publikationen wird sogar postuliert, dass $CD4^+$ T-Zellen in der Lage sind, effektiver Tumoren zu eliminieren als $CD8^+$ T-Zellen (Perez-Diez et al., 2007).

Klinische Studien mit $CD4^+$ T-Zellen waren bisher im Allgemeinen darauf beschränkt, eine T-Helfer-Immunantwort durch Immunisierung mit MHC-Klasse II-Epitopen zu erzeugen oder $CD4^+$ T-Zellen als eine undefinierte Komponente in einer großen Masse an Zellen zu injizieren (Ostrand-Rosenberg, 2005, Bollard et al., 2007). Die Therapieerfolge der Donor-Lymphozyten-Injektion werden so zumindest zum Teil $CD4^+$ T-Zellen zugeschrieben (Jiang et al., 1996). Eine klinische Studie mit Patienten, die an metastatischen Melanomen litten, zeigte jedoch Erfolge nach Injektion von $CD4^+$ T-Zellen, welche spezifisch für das Tumorantigen NY-ESO waren (Hunder et al., 2008). Nach Injektion der Zellen erlangte ein Patient ohne vorherige Lymphodepletion eine lang anhaltende Remission der Krankheit. In diesem Patient waren noch zwei Jahre nach der Therapie die transferierten $CD4^+$ T-Zellen nachweisbar. Zudem konnten neue $CD8^+$ T-Zell-Reaktivitäten gegen Melanomantigene nachgewiesen werden. Obwohl diese Therapie nur bei einem von acht Patienten Erfolg hatte, lässt sie vermuten, dass $CD4^+$ T-Zellen in der Therapie von Krebserkrankungen von großer Bedeutung sein können (Heslop und Brenner, 2008).

3.4 B-Zell-Lymphome

Maligne Lymphome sind bösartige Erkrankungen des lymphatischen Systems. Sie befallen in der Regel Lymphknoten, die Rachenmandel, die Milz oder das Knochenmark, können aber auch extranodal auftreten. Diese Neoplasien lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und Hodgkin-Lymphome. Als Unterscheidungsmerkmal weisen Hodgkin-Lymphome im Gegensatz zu Non-Hodgkin-Lymphomen sogenannte

Sternberg-Reed-Riesenzellen auf. In der Regel beruhen Non-Hodgkin-Lymphome auf der malignen Transformation von B-Lymphozyten (B-NHL). Maligne Transformationen von T-Lymphozyten oder natürlichen Killerzellen kommen nur in ca. 10% der NHL-Patienten vor (Rudiger und Muller-Hermelink, 2002). Von der Weltgesundheitsorganisation werden Non-Hodgkin-Lymphome noch weiter nach der Ursprungszelle (Vorläuferzellen oder reife Zellen) sowie klinischen, morphologischen, genetischen und weiteren biologischen Eigenschaften klassifiziert (Jaffe et al., 2008).

Ein Beispiel für ein B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom ist das nach dem irischen Chirurgen Denis Parsons Burkitt benannte Burkitt-Lymphom (Burkitt, 1958). Im tropischen Afrika und in Neu Guinea zählt diese Erkrankung zu der häufigsten Tumorerkrankung unter Kindern (Burkitt und O'Connor, 1961, Booth et al., 1967). Dieses endemische Burkitt-Lymphom wird von dem sporadischen Burkitt-Lymphom, welches in gemäßigten Klimazonen mit einer geringeren Inzidenz auftritt, unterschieden (Magrath, 1990). Eine weitere Untergruppe bildet das HIV-assoziierte Burkitt-Lymphom, welches häufig im Rahmen einer HIV-Infektion auftritt (Kalter et al., 1985). Das endemische Burkitt-Lymphom ist regelmäßig mit Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert, d.h. die Tumorzellen enthalten das komplette virale Genom von EBV und exprimieren einzelne virale Gene (Bornkamm, 2009). Unabhängig von der Assoziation mit EBV weisen Burkitt-Lymphome generell eine chromosomale Translokation des *c-MYC*-Gens in einen der Immunglobulin-Loci (IgH oder IgL) auf, wodurch das *c-MYC*-Gen konstitutiv aktiviert wird. Durch die konstitutive übermäßige *c-MYC*-Expression wird eine erhöhte zelluläre Proliferation induziert (Klein, 1983). Das Burkitt-Lymphom gehört aufgrund seiner außerordentlich hohen Zellteilungsrate zu den am schnellsten wachsenden Tumoren des Menschen (Banthia et al., 2003).

Verbesserungen in der konventionellen Chemotherapie haben die Mortalität unter B-NHL-Patienten in den letzten Jahrzehnten wesentlich verbessert. Allerdings stellt ein Rezidiv nach konventioneller Therapie ein besonderes Problem dar, da ein Teil der Patienten weder auf Chemotherapie noch auf Bestrahlung anspricht. Darüber hinaus sind Erfolge der allogenen Knochenmarkstransplantation bei hochmalignen B-NHL-Lymphomen vermutlich aufgrund der schnellen Proliferation des Tumors unbefriedigend (Grigg und Ritchie, 2004). Dem neu entstehenden Immunsystem des Patienten wird nach Knochenmarkstransplantation wohl nicht genug Zeit gelassen, eine effektive Immunreaktion gegen Minor-Histokompatibilitätsantigene zu entwickeln. Zudem hat die Inzidenz maligner Lymphome in den letzten Jahrzehnten aus nicht vollständig geklärter Ursache zugenommen (Zeeb und Blettner, 2001). Somit sind neue Therapie-Strategien dringend erforderlich.

3.5 Modellsysteme

In dieser Arbeit wurden verschiedene transgene Mäuse als Modellsystem benutzt, welche im Folgenden erklärt werden.

3.5.1 CD19-Cre

Um eine B-Zell-spezifische Expression der Cre-Rekombinase zu erreichen, hat die Gruppe von Klaus Rajewsky (Rickert et al., 1995, Rickert et al., 1997) ein DNA-Konstrukt, welches für die Cre-Rekombinase kodiert, in das zweite Exon des *Cd19*-Gens integriert. Dies resultiert in einer Zerstörung der Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation des *Cd19*-Gens sowie in einer Leserastermutation. Somit weisen Mäuse, die homozygot für *Cd19-Cre* sind, keine CD19-Expression auf. Diese CD19-Defizienz wirkt sich auf die B-Zellpopulation aus. So haben homozygote Mäuse besonders in bestimmten Subpopulationen eine verminderte Anzahl von B-Zellen (B-1-Zellen) und weisen eine verminderte Antikörperproduktion (besonders IgM) auf (Rickert et al., 1995). Die T-Zell-abhängige Antikörper-Immunantwort ist ebenfalls stark beeinträchtigt (Rickert et al., 1995). Dies ist aber anscheinend ein B-Zell-eigener Defekt und resultiert nicht aus einer defizienten T-Zell-Immunantwort (Gardby et al., 2001). Somit haben Mäuse, die homozygot für *Cd19-Cre* sind, eine defekte B-Zell-Immunantwort, aber eine normale T-Zellantwort. Da diese Mäuse kein CD19 bilden, eignen sie sich somit gut zur Induktion einer T-Zell-Immunantwort gegen murines CD19.

3.5.2 STAT1-Knockout-Mäuse

Das Protein STAT1 (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 1) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher insbesondere für die Weiterleitung von Signalen der Interferon-Typ I- und Typ II-Rezeptoren von Bedeutung ist (Meraz et al., 1996). STAT1-Knockout-Mäuse exprimieren kein funktionelles STAT1-Protein, was zu einem Defekt in der Interferon-induzierten Signaltransduktion führt. Trotz normalem Wachstum und normaler Entwicklung dieser Mäuse führt dies zu einem globalen Defekt in der Immunantwort (Durbin et al., 1996, Meraz et al., 1996, Kaplan et al., 1998, Shankaran et al., 2001, Lesinski et al., 2003). Da es in diesen Mäusen somit nicht zu einer tumorspezifischen Immunantwort kommen kann, eignen sie sich besonders gut als Positivkontrolle für Tumortransferversuche.

4 Zielsetzung

Die T-Zelltherapie von Krebserkrankungen ist eine vielversprechende neue Therapiestrategie. Da es bei vielen Krebsarten allerdings keine therapeutisch nutzbaren Tumorantigene gibt, die zugleich auch Fremdanigene sind, müssen für solche Therapien auch tumorassoziierte Selbst-Antigene in Erwägung gezogen werden. Für diese Antigene ist jedoch die Frage zu stellen, ob es ein therapeutisches Fenster zwischen Tumorabstoßung und Autoimmunität gibt.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zwei Mausmodelle zur Analyse von T-Zelltherapien für B-Zell-Lymphome etabliert. Im ersten Modellsystem sollte das humane c-MYC-Protein als Zielantigen für eine T-Zelltherapie fungieren. Um eine solche T-Zelltherapie in einem Mausmodell analysieren zu können, muss zunächst eine transgene Maus generiert werden, die humanes c-MYC anstelle des murinen Orthologen exprimiert. Hierfür sollte das endogene *c-Myc*-Gen durch das humane Gen ausgetauscht werden, ohne dass dies gravierende phänotypische Auswirkungen hat. In Wildtyp-Mäusen könnten dann T-Zellen generiert werden, die spezifisch für humanes c-MYC sind, welche dann in der transgenen Maus hinsichtlich ihrer Autoimmunität charakterisiert werden könnten.

Da eine c-MYC-spezifische T-Zelltherapie aufgrund der c-MYC-Expression in nahezu allen proliferierenden Zellen mit einem hohen Risiko an Nebenwirkungen verbunden ist, sollte im zweiten Mausmodell zur T-Zelltherapie von B-Zell-Lymphomen ein Selbst-Antigen als Ziel dienen, welches nur in definierten Geweben exprimiert wird. Hierfür wurde das murine CD19 als Zielantigen ausgewählt, da es fast ausschließlich in B-Zellen exprimiert wird und zudem CD19-defiziente Mäuse existieren, in denen einen Immunantwort gegen murines CD19 induziert werden kann. Ziel für dieses Mausmodell war zunächst zu analysieren, ob CD19 ein geeignetes Abstoßungsantigen für Burkitt-Lymphom-ähnliche murine Lymphomzellen ist und somit ein geeignetes Ziel für eine CD19-spezifische T-Zelltherapie sein könnte. Zudem sollte durch Vakzinierung eine CD19-spezifische T-Zell-Immunantwort induziert werden sowie CD19-spezifische T-Zelllinien und Klone etabliert werden. Aus letzteren sollten Gene CD19-spezifischer T-Zellrezeptoren kloniert werden. Mit den CD19-spezifischen T-Zellen und den klonierten T-Zellrezeptor-Genen können dann im Mausmodell die Möglichkeiten der T-Zelltherapie für B-Zell-Lymphome studiert werden.

5 Material und Methoden

5.1 Plasmide

Plasmidkarten siehe Anhang

5.2 Sonden für Southern-Blot

Myc 3'Probe 5

Die 726 bp lange Sonde wurde mit den Primern 3'Probe 5 fwd und 3'Probe 5 rev mittels einer PCR aus dem Vektor pBS-MYC 3' Probe 5 amplifiziert.

Myc 5'Probe 3

Die 791 bp lange Sonde wurde mit den Primern 5'Probe 3 fwd und 5'Probe 3 rev mittels einer PCR aus dem Vektor pBS-MYC 5'Probe 3 amplifiziert.

5.3 Bakterien

I. XL-1 blue MRF': *Escherichia coli*-Stamm

Genotyp: F':Tu10 proA+B+ lacIq D (lacZ) M15/recA1 end A1 gyr A96 (Nalr) thi hsd R17 (rk-mk+) glu V44 rel A1 lac. Der Originalbakterienstamm wurde von der Firma Stratagene bezogen und von J. Mautner zur Verfügung gestellt.

II. EL-250: *Escherichia coli*-Stamm (Liu et al., 2003)

Genotyp: F⁻mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Ø80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7649 ga/U ga/K rspL nupG [λcI857(cro-bioA)<> araC-P_{BAD}flpe].

Dieser Bakterienstamm trägt ein Arabinose-induzierbares Gen für die Flp-Rekombinase und wurde zur Rekombination während der Herstellung des Targeting-Vektors für die embryonalen Stammzellen verwendet.

5.4 Zelllinien

I. Bruce4 embryonale Stammzellen (Klaus Rajewsky, Harvard Medical School, Boston)

Embryonale Stammzellen aus der Blastozyste des Mausstamms C57BL/6 wurden zur Generierung des hc-Myc-Mausstamms verwendet.

II. Embryonale Fibroblastenzellen (EF)

EF-Zellen wurden aus pSV2neo, PEP-IL4 C57BL/6 Embryonen, die 13,5 Tage alt waren, von Franziska Hampel (AGV, Helmholtz Zentrum München) isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. EF-Zellen wurden bis zur dritten Passage verwendet.

III. 291

Bei den 291-Zellen handelt es sich um eine murine Zelllinie, die aus einem Burkitt-ähnlichen Lymphom eines Weibchens des C57BL-6-Mausstamms λ -MYC (Kovalchuk et al., 2000) generiert wurde. Diese Zelllinie wurde von Armin Gerbitz (Hämatologie & Internistische Onkologie, Universitätsklinikum Erlangen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

IV. LCL 1.11

Bei diesen Zellen handelt es sich um humane lymphoblastoide B-Zellen. Zelllysate dieser Zellen dienten als Positivkontrolle für humanes c-MYC im Western-Blot.

5.5 Mausstämme

I. C57BL/6 (Charles River Laboratories)

Dieser Mausstamm wurde zur Kreuzung während der Zucht der Mäuse sowie in einigen Tumortransfer-Experimenten als Wildtyp-Kontrolle verwendet.

II. Balb/c (Charles River Laboratories)

Balb/c Mäuse wurden zur Blastozysten-Injektion verwendet.

III. CD19-Cre (Rickert et al., 1995)

Homozygote CD19-Cre-Mäuse des Mausstamms C57BL/6 wurden in Vakzinierungs- und Tumortransferversuchen, als CD19-negative Mäuse verwendet. Als Kontrolle für diese Versuche dienten heterozygote Mäuse und Wildtyp-Mäuse.

IV. STAT1^{-/-} (Durbin et al., 1996)

STAT1-defiziente Mäuse des Mausstamms C57BL/6 dienten in Tumortransferversuchen als Positivkontrolle für das Tumorwachstum.

V. Deleter-Cre (Schwenk et al., 1995)

Deleter-Cre-Mäuse des Mausstamms C57BL/6 ermöglichen eine Deletion von loxP-flankierten DNA-Sequenzen in allen Geweben der Maus, auch in Keimzellen. Um in hc-Myc-

Mäusen den Selektionsmarker Neomycin in allen Geweben zu deletieren, wurden die Deleter-Cre-Mäuse mit den hc-Myc-Mäusen verpaart.

5.6 DNA-modifizierende Enzyme

Restriktionsenzyme sowie CIP (calf intestine phosphatase), T4-DNA-Polymerase, T4-DNA-Ligase und die Phusion™ DNA-Polymerase wurden, sofern nicht anders vermerkt, von New England Biolabs oder Fermentas bezogen. Die Reverse Transkriptase (Superscript II) und die Taq-DNA-Polymerase stammten von Invitrogen.

5.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Becton-Dickinson, BioRad, Calbiochem, Corning, Eppendorf, GE-Healthcare, Greiner, Fermentas, Invitrogen, Merck, Millipore, Miltenyi Biotec, New England Biolabs, Neolab, Nunc, PAA, Pan Biotech, Packard Instruments, Perkin Elmer, Promega, Qiagen, Roche, Sartorius, Sigma-Aldrich und Stratagene bezogen.

5.8 Medien und Puffer

5.8.1 Medien zur Bakterienkultur

Tabelle 1: Medien zur Bakterienkultur

LB-Medium: 10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt Ad 1 L H ₂ O pH 7.0 autoklaviert	SOB-Medium: 20 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 0,5 g NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ Ad 1 L H ₂ O autoklaviert	LB-Agar: 10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt Ad 1L H ₂ O Autoklaviert	SOC-Medium: SOB-Medium + 0,2 % Glukose sterilfiltriert
---	---	--	--

5.8.2 Zellkulturmedien

Tabelle 2: Zellkulturmedien

ES-Medium: 15 % (v/v) FKS (Pan Biotech) 2 % (v/v) Hepes (Gibco) 3 mM L-Glutamin (Gibco) 1mM Natriumpyruvat (Gibco) 1 × Nicht essentielle Aminosäuren (Gibco) 50 µM β-Mercaptoethanol (Gibco) in DMEM (Gibco)	T-Zellmedium: 10% (v/v) Hitze-inaktiviertes FKS (Biochrom KG) 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (Gibco) 2 mM L-Glutamin (Gibco) 1 mM Natriumpyruvat (Gibco) 1 × Nicht essentielle Aminosäuren (Gibco) 10 mM Hepes 50 µM β-Mercaptoethanol (Gibco) in RPMI 1640 (Gibco)
EF-Medium: 10 % (v/v) Hitze-inaktiviertes FKS (Pan Biotech) 2 mM L-Glutamin (Gibco) 1 × Nicht essentielle Aminosäuren (Gibco) in DMEM (Gibco)	291-Medium: 20% (v/v) Hitze-inaktiviertes FKS (Biochrom KG) 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (Gibco) 2 mM L-Glutamin (Gibco) 1 mM Natriumpyruvat (Gibco) in IMDM (Invitrogen)

5.9 Oligonukleotide

Tabelle 3: Primer für Genotypisierung

Primer	Sequenz 5'-3'
CD19c	AACCAGTCAACACCCCTTCC
CD19d	CCAGACTAGATACAGACCAG
Cre 7	TCAGCTACACCAGAGACGG
hu Myc fwd	CACCAGGCTTAGATGTGGC
hu Myc rev	GGCTGAAGCTTACAGTCCC
mu Myc fwd	GCAGCTATCCCTCACGGGA

Tabelle 4: Primer für Klonierung

Primer	Sequenz 5'-3'
5' flank fwd	ATAGAAGCTTGGACAGTCAGGGAAACCCCTA
5' flank rev	GCAATATGCATGGAAGATGGTGGAAAGATGTC
3' flank fwd	TGGCATGCATGGGTGAGTCACATCTCTATAG
3' flank rev	GACTTCTAGAGTATGGCCTGCCTAATGAGAT
5' junction fwd	ATTCATGTCGACAAGAAGGGAGGGGAGGGATC
5' junction rev	GGTGCTTACCTGGTTTTCCACTACCCGAAAAAATCCAGCCTTCAAACAGCTC GAGGAGC
3' junction fwd	GACAGAACTGATGCGCTGGAATTAA
3' junction rev	ATAGAATTTCGGTACCTTCCCATATTTGTAAACCTACCC
5' Probe 3 fwd	CTATTCTAGAGCCGCCAAAAGGACCATC
5' Probe 3 rev	ATAGCTCGAGAGCAGGAGACCCTAAGGACG
3' Probe 5 fwd	ATTCTAGACTCCAGCTTTTCATGCAGGGC
3' Probe 5 rev	GTCTCGAGCCCCCTCCTTTTCTGTCAGCAG

Tabelle 5: Primer für V β -PCR

Primer	Sequenz 5'-3'	Primer	Sequenz 5'-3'
V β 1	CTGAATGCCAGACAGCTCCAAGC	V β 11	GCACTCAACTCTGAAGATCCAGAGC
V β 2	TCCTGATACGGAGCTGAGGC	V β 12	GATGGTGGGGCTTTCAAGGATC
V β 3.1	CCTTGCAGCCTAGAAATTCAGT	V β 13	AGGCCTAAAGGAATACTCCAC
V β 4	GCCTCAAGTCGCTTCCAACCTC	V β 14	ACGACCAATTCATCCTAAGCAC
V β 5.1	CATTATGATAAAATGGAGAGAGAT	V β 15	CCCATCAGTCATCCCAACTTATCC
V β 5.2	AAGGTGGAGAGAGACAAAGGATTC	V β 16	CACTCTGAAAATCCAACCCAC
V β 5.3	AGAAAGGAAACCTGCCTGGTT	V β 17	AGTGTTCTCTCGAACTCACAG
V β 6	CTCTCACTGTGACATCTGCCC	V β 18	CAGCCGGCCAAACCTAACATTCTC
V β 7	TACAGGGTCTCACGGAAGAAGC	V β 19	CTGCTAAGAAACCATGTACCA
V β 8.1	CATTACTCATATGTCGCTGAC	V β 20	TCTGCAGCCTGGGAATCAGAA
V β 8.2	CATTATTCATATGGTGCTGGC	CB	CTTGGGTGGAGTCACATTTCTC
V β 8.3	TGCTGGCAACCTTCGAATAGGA	5' Aktin	TGGGTCAGAAGGACTCCTATG
V β 9	TCTCTCTACATTGGCTCTGCAGGC	3' Aktin	CAGGCAGCTCATAGCTCTTCT
V β 10	ATCAAGTCTGTAGAGCCGGAGGA		

Tabelle 6: Primer für V α -PCR

Primer	Sequenz 5'-3'	Primer	Sequenz 5'-3'
MVA1-1	AGACTCCCAGCCCAGTGACT	MVA8-1	ACGCCACTCTCCATAAGAGCA
MVA1-2	ACATCAGAGAGCCGCAACC	MVA9-1	AACCTGAAGAAATCCCCAGC
MVA1-3	CACATCAAAGAACCACAACCC	MVA10-1	GCTCTTTGCACATTTCTCTCC
MVA2-1	TGCAGTTATGAGGACAGCACTT	MVA11-1	CTGGAGGACTCAGGCACTTACT
MVA2-2	CTGCAGTTATGAGAACAGTGCTT	MVA12-1	CTGTTTATCTCTGCTGACCGG
MVA3-1	CTGCAGCTGAGATGCAAGTATT	MVA13-1	GACCCAAGGACTCATCGTTTT
MVA3-2	TCCTATGGTGGATCCATTTACC	MVA14-1	CAGGCAAAGGTCTTGTGTCC
MVA4-1	TCCTGAAAGTCATTACGGCTG	MVA15-1	GTGGACAGAAAAACAGAGCCAA
MVA4-2	AGAGCCTCAAGGGACAAAGAG	MVA16-1	ACGCTCCTAATAGACATTTCGCT
MVA4-3	GGTACCCGACTCTTTTCTGGT	MVA17-1	TTCCATCGGACTCATCATCAC
MVA4-4	TTTAAAGTCCCAAAGGCCAA	MVA18-1	CCCTGCCAGCTAATCTTAAT
MVA4-5	ACCCTTTCAGAAAGATGACTTCC	MVA18-2	GCTCTCTGTCCATCACTGCTG
MVA5-1	ACGAAGGACAAGGATTCACTGT	MVA19-1	TGGATGGTTTGAAGGACAGTG
MVA6-1	GTTCCTCTTCAGGGTCCAGA	MVA20-1	GGAAGACGGAAGATTACAGTT
MVA7-1	CCAGACGATTCTGGGAAAGTA	MTA	TCAGTGATGAACGTTCCAGATTCC ATG

5.10 Peptide

Peptide, die in Tabelle 7 angegeben sind, wurden von Thermo Fisher Scientific synthetisiert und zur Vakzinierung sowie zur Analyse der Immunantwort verwendet. Die Reinheit der Peptide betrug mehr als 70 %. Alle Peptide wurden in 60-100% (v/v) DMSO-H₂O gelöst (5-10 mg/mL). Zusätzlich zu diesen Peptiden wurde auch noch zwei Bibliotheken von überlappenden Peptiden, die das gesamte CD19-Protein überspannen (NP_033974.2) verwendet. Eine Bibliothek besteht aus Peptiden einer Länge von 15 Aminosäuren (aa) und einer Überlappung von 11 aa. Die zweite besteht aus Peptiden einer Länge von 12 aa und einer 8 aa langen Überlappung. Die einzelnen Peptide beider Bibliotheken wurden in 100 % DMSO gelöst (10 mg/mL).

Tabelle 7: Synthetische CD19-Peptide

Peptide	Peptidsequenz
Peptid A	VVLPCLPDSSPVSSSEKLAWYRGNQSTPFLELSPGSPGLGL
Peptid B	LELSPGSPGLGLHVGSLGILLVIVNVSDHMGGFYLCQKRP
Peptid C	PPFKDIWQPAWTVNVEDSGEMFRWNASDVRLDCD
Peptid D	SGSHRSTSGSQLYVWAKDHPKVWGTGPVCAPRGSSLNQSL
Peptid E	KVWGTGPVCAPRGSSLNQSLINQDLTVAPGSTLWL
Peptid F	KVIARSAVWLWLLRTGGWIVPVVTLVYVIFCMVSLVAFLY
Peptid G	FFKVTPPSGNGTQNQYGNVLSLPTSTSGQAHAQRWAAGLG
Peptid H	GYENPEDEPMGPEEEDSFSNAESYENADEELAQPVGRMMD
OVA 1	SIINFEKL
OVA 2	ISQAVHAAHAEINEAGR

5.11 Geräte

Bakterieninkubator (Heraeus)

Bestrahlungsanlage (Gammacell 40 der Firma AECL mit Cäsium-137 (γ -Strahler))

Brutschrank (Haereus, ThermoForma, Binder)

Cryostat CM1900 UV (Leica)

Elektrophoresekammer (Biometra, BioRad)

Elektroporationsgerät Gene Pulser (BioRad)

ELISA-Reader (Tecan-Sunrise)

ELISPOT-Reader (AID Diagnostika GmbH)

FACS Calibur (Becton-Dickinson)

Falcon Roller (Coulter Electronics Limited)

Gefrierschrank -80°C (Colora)

Gefrierschrank -20°C (Liebherr)

Konfokalmikroskop (Zeiss)

Kühlschrank (Liebherr)

Lichtmikroskop (Zeiss)

Millipore-Anlage (Millipore)

Nanodrop (Thermo Scientific)

Netzgerät (BioRad)

Neubauer-Zählkammer (GLW)

PCR-Thermozykler (Perkin Elmer, Biometra)

pH-Messgerät (Knick)

Pipetten (Eppendorf)

Pipettierhilfe (Integra)

Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific)

Spektrophotometer (Eppendorf)

Sterilbank (Bio Flow Technik)

UV-Transilluminator (UVP-Inc.)

Vortexer Genie (Bender & Hobein)

Wallac 1420 multilabel counter Victor² (Perkin Elmer)

Zentrifugen (Eppendorf, Sorvall, Beckman, Hettich)

5.12 Molekularbiologische Methoden

5.12.1 Amplifikation von Plasmiden in Bakterienkulturen

In der Regel wurden nur Bakterien des *E. coli*-Stammes XL1 blue MRF^c zur Amplifikation von Plasmiden verwendet. Hierzu wurden die Bakterien in LB-Medium oder auf LB-Agar unter Anwesenheit von Ampicillin (100 µg/mL) oder Kanamycin (50 µg/mL), (je nach Plasmid) kultiviert (Tabelle 1). Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Bakterien in 1 mL LB-Medium mit 10 % Glycerin bei -80°C eingefroren.

5.12.1.1 Isolierung von Plasmiden

Zur Isolierung von Plasmiden für die Klonierung wurde das Jetstar-Kit (Genomed) von Genomed nach Herstellerangaben verwendet. In einigen Fällen, insbesondere zur Präparation des Plasmids für die Transfektion von embryonalen Stammzellen sowie zur Präparation der Plasmide für die Vakzinierung, wurde ein Endotoxin-freies Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

5.12.1.2 Generierung elektrokompeter Bakterien

Hierfür wurden 500 mL SOB-Medium (Tabelle 1) in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit Bakterien angeimpft (*E. coli* XL1 blue MRF^c). Die Kultur wurde bei 37°C und Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 kultiviert. Darauf wurde die Kultur 15 Minuten auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (15 Min., 4800 × g, 4°C) und in 250 mL kalten Glycerin (10 % (v/v) in H₂O) resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Bakterien in 2-4 mL kalten Glycerin (10 % (v/v) in H₂O) resuspendiert, aliquotiert (50 µL) und bei -80°C eingefroren.

5.12.1.3 Transformation von Bakterien

Die Transformation der Bakterien erfolgte mittels Elektroporation. Hierzu wurden 20 µL, auf Eis aufgetaute, elektrokompeter Bakterien verwendet. Diese wurden mit 1 µL eines Ligationsansatzes oder Plasmids vermischt und in gekühlte Elektroporationsküvetten (1 mm Spaltbreite) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1500 Volt, 25 µF und 100 Ω. Anschließend wurden die Bakterien sofort in 1 mL SOC-Medium (Tabelle 1) aufgenommen und für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 30 bis 100 µL der Bakterien auf Antibiotika-haltigen (je nach Plasmid) LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.12.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Diese Methode dient dazu Kontaminationen mit Proteinen (Restriktionsenzyme) in DNA-Lösungen zu beseitigen. Hierzu wurde ein Volumen Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol (Verhältnis der Komponenten 25:24:1, Roth) mit der DNA-Lösung durch Invertierung vermischt. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt ($20000 \times g$, 5 Minuten) wurde die Suspension in verschiedene Phasen getrennt. Die obere Phase, in der sich die DNA sammelt, wurde darauf in eine neues Reaktionsgefäß überführt, ein Volumen Chloroform-Isoamylalkohol zugefügt (24:1, Roth) und alles wieder durch invertieren gemischt. Anschließend erfolgte wieder eine Zentrifugation, wie oben beschrieben und die obere Phase wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc sowie 2,5 Volumen 100 % Ethanol durch invertieren gemischt. Zur Isolierung der DNA wurde das Gemisch zunächst für 30 Minuten auf -20°C gestellt und anschließend die DNA durch Zentrifugation ($20000 \times g$, 5 Minuten) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde nun je nach Verwendungszweck nach Trocknung in $1 \times \text{TE}$ resuspendiert oder über einen längeren Zeitraum in Ethanol bei -20°C gelagert.

5.12.1.5 Restriktionsspaltung

Zur Spaltung von Plasmid- oder genomischer DNA wurden die Restriktionsenzyme nach Herstellerangaben verwendet.

5.12.1.6 Auffüllen überhängender DNA-Enden

Ein wichtiger Schritt im Rahmen einer Klonierung ist das Umwandeln überhängender DNA-Enden, nach Restriktionsverdau, in „glatte“ Enden. Hierzu wurde die T4-DNA-Polymerase verwendet. Dieses Enzym besitzt eine Exonukleaseaktivität in 3'-5'-Richtung und eine Polymeraseaktivität in 5'-3'-Richtung. Zur Generierung „glatter“ Enden wurde zu einem Restriktionsverdau (20 μL) 1 μL dNTP (10 mM) sowie 1 μL T4-DNA-Polymerase (5U/ μL) gegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Durch Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die Reaktion schließlich gestoppt.

5.12.1.7 Ligation von DNA-Molekülen

Eine Ligation dient dazu zwei DNA-Fragmente (z.B. linearisiertes Plasmid + Genfragment), welche kovalente Enden aufweisen, zu verknüpfen. Dieser essentielle Schritt der Plasmid-Klonierung wurde mit der T4-DNA-Ligase, welche ATP-abhängig eine

Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des einen und der 5'-Phosphatgruppe des anderen DNA-Fragments bildet, durchgeführt. Das Insert wurde zum linearisierten Vektor im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich 1 μL T4-DNA-Ligase (400 U/ μL), 1,5 μL zehnfach Puffer und wurde auf 15 μL mit Wasser aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 16°C. Am nächsten Tag wurde der Ligationsansatz zur Transformation von Bakterien verwendet.

5.12.1.8 Sequenzierung

DNA-Moleküle wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) mittels Kettenabbruch-Verfahrens nach Sanger sequenziert (Sanger et al., 1977).

5.12.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Gele mit 1-2 % Agarose verwendet. Unter Aufkochen wurde die entsprechende Agarosemenge in TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid (0,2 $\mu\text{g/mL}$) versetzt, um die DNA im Gel unter UV-Licht sichtbar zu machen. Mit 1/10 Volumen Ladepuffer wurde die DNA-Lösung auf ein Agarosegel geladen und bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt.

TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl pH7.8, 5 mM NaAc, 1 mM EDTA

Ladepuffer: 50 mM Tris/HCl pH7.5, 50 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 40 % Glycerin

5.12.1.10 Isolierung von DNA aus Mausschwanzspitzen

Die Isolierung von DNA aus Mausschwanzspitzen basiert auf der Methode von Laird (Laird et al., 1991). Zunächst wurde den Mäusen ein ca. 0,3 cm langes Schwanzstück abgeschnitten und über Nacht in 500 μL Lysepuffer bei 56°C inkubiert. Knochen und Haare wurden anschließend durch Zentrifugation ($10000 \times g$, 10 Minuten) pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurde 1/3 Volumen gesättigtes NaCl (>5 M) gegeben, mehrmals invertiert und erneut zentrifugiert (s.o.), um Proteine zu fällen. Zur Präzipitation der DNA wurde der Überstand wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 600 μL 100% (v/v) Isopropanol versehen und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach einer Zentrifugation (20 Minuten bei $10000 \times g$) wurde der Überstand verworfen, das

DNA-Pellet einmal mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 100 µL 1 × TE gelöst.

Lysepuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl, 100 µg/ml Proteinase K

5.12.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde sowohl für die Genotypisierung von Mäusen, als auch im Rahmen der Klonierung des Targeting-Vektors zur Transfektion von embryonalen Stammzellen und der Klonierung der DNA-Vakzinierungsvektoren verwendet. Zur Genotypisierung von Mäusen wurde die *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Folgendes PCR-Programm und folgender Reaktionsansatz wurden je nach Primer-Kombination variiert:

<u>Reaktionsansatz <i>Taq</i>-Polymerase:</u>		<u>PCR-Programm <i>Taq</i>-Polymerase:</u>		
DNA:	5-10 ng	Starttemperatur	95°C	2,5 Min.
Primer (100 µM)	0,25 µL	Zykl. Denaturierung	95°C	45 s
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µL	Zykl. Hybridisierung	56°C – 62°C	45 s
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL	Zykl. Verlängerung	72°C	1-2 Min.
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µL)	0,15 µL	Finale Verlängerung	72°C	10 Min.
Puffer (10 X)	2,5 µL	Anzahl der Zyklen		28-30
Wasser	ad 25 µL			

Zur Klonierung wurde hingegen die Phusion™-Polymerase, welche eine höhere Genauigkeit als die *Taq*-Polymerase aufweist, verwendet. Für diese PCR-Reaktionen wurden Variationen von folgendem PCR-Programm durchgeführt:

<u>Reaktionsansatz Phusion™-Polymerase:</u>		<u>PCR-Programm Phusion™-Polymerase:</u>		
DNA:	5-10 ng	Zykl. Denaturierung	98°C	15 s
Primer (100 µM)	2 µL	Zykl. Hybridisierung	55°C – 65°C	15 s
dNTP-Mix (10 mM)	2 µL	Zykl. Verlängerung	72°C	30 s
Phusion™-Polymerase (2 U/µL)	1 µL	Anzahl der Zyklen		35
Puffer (5 X)	20 µl			
DMSO	5 µL			
Wasser	ad 100 µl			

5.12.2 Klonierung

5.12.2.1 Targeting-Vektor

Zur Klonierung des Targeting-Vektors (Schematische Darstellung siehe Abbildung 4) wurde zunächst durch einen bakteriellen Rekombinationsschritt der murine *c-Myc*-Lokus in einen sogenannten Retrieval-Vektor (pL255, siehe Anhang) gebracht. Hierzu wurde jeweils ein DNA-Fragment mittels einer PCR amplifiziert, welches stromaufwärts (5') (5'Flanke, ca. 600 bp) und ein weiteres, welches stromabwärts (3') (3'Flanke, ca. 300 bp), des murinen *c-Myc*-Gens, liegt (Primer siehe Tabelle 4). Beide Fragmente wurden in den Retrieval-Vektor pL255 kloniert (pL255-flanks, siehe Anhang), die 5' Flanke zwischen die Restriktionsschnittstellen *NsiI* sowie *HindIII* und die 3'Flanke zwischen *NsiI* und *XbaI*. Diese beiden sogenannten Flanken dienten als Sequenzen für die homologe Rekombination zwischen dem Vektor pL255-flanks und einem BAC (bacterial artificial chromosome, B06373), welches den murinen *c-Myc*-Lokus enthält. Durch eine bakterielle Rekombination wurde die Sequenz, die zwischen den beiden Flanken liegt und den murinen *c-Myc*-Lokus enthält, in das Plasmid pL255-flanks gebracht (pL255-mMyc, siehe Anhang). Dieses diente als Ausgangsvektor zur Generierung des Targeting-Vektors. Des Weiteren wurden nicht kodierende Bereiche stromaufwärts (5') des CTG-Startcodons und stromabwärts (3') des Stoppcodons, im humanen *c-MYC*-Gen, durch murine Sequenzen ersetzt. Hierzu wurde ein DNA-Fragment des ersten Exons des murinen *c-Myc*-Gens amplifiziert (5'Junction) und in das erste Exon des humanen *c-MYC*-Gens kloniert (zwischen die Restriktionsschnittstellen *SexA1* und *SalI*), sodass der nicht kodierende Bereich vor dem ersten Startcodon (CTG) des humanen *c-MYC*-Gens aus der orthologen murinen Sequenz besteht (Primer siehe Tabelle 4). Ebenso wurde ein DNA-Fragment aus dem dritten Exon des murinen *c-Myc*-Gens amplifiziert (3'Junction), welches hinter das Stoppcodon in das dritte Exon des humanen *c-MYC*-Gens (zwischen die Restriktionsschnittstellen *MunI* und *NsiI*) kloniert wurde (Primer siehe Tabelle 4). Beide Fragmente haben eine Länge von ca. 500 bp und wurden in den Vektor D23-3 cMyc zur Generierung des Vektors D23-3-muhumu-MYC kloniert. Zusätzlich wurde in die *BglII*-Restriktionsschnittstelle (Im 2. Intron des *c-MYC*-Gens) das loxP-Neo-loxP-Fragment des Vektors pL452-B2 (*Bam*HI, *BglII*-Restriktion) kloniert, welches für eine Neomycin-Geneticin-Resistenz, flankiert von zwei loxP-Stellen, kodiert (D23-3-muhumu-MYC-neo, siehe Anhang).

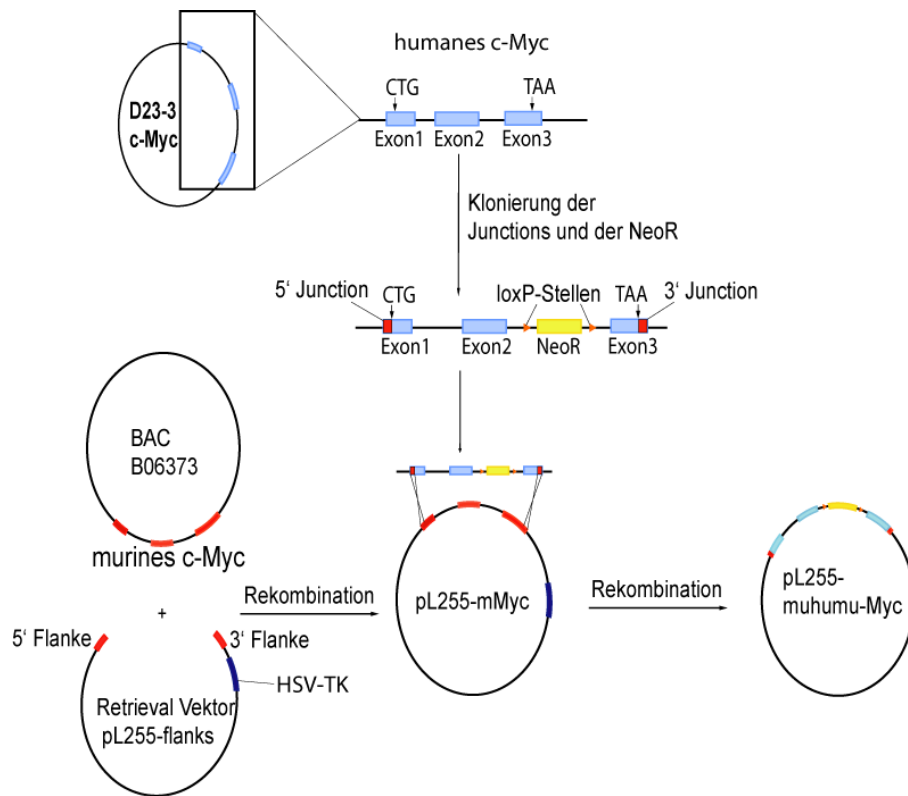


Abbildung 4: Strategie zur Klonierung des Targeting-Vektors. Dargestellt ist die Strategie zur molekularen Klonierung des Targeting-Vektors zur Generierung von Mäusen transgen für humanes *c-MYC*. Rot sind murine Sequenzen markiert und in hellblau humane Sequenzen. Es wurde ein *c-Myc*-Gen generiert, bei dem nicht kodierende DNA-Sequenzen stromaufwärts (5') des CTG-Startcodons (5' Junction) und stromabwärts (3') des TAA-Stoppcodons (3' Junction) murin sind. Als Selektionsmarker wurde in das zweite Intron des *c-Myc*-Gens ein Neomycin-Geneticin-Resistenzgen (NeoR), welches von loxP-Stellen flankiert ist, integriert. Zur Negativ-Selektion für eine homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES) wurde ein HSV-TK-Gen (Thymidinkinase-Gen des Herpes-simplex-Virus), in das pL255-Plasmid außerhalb der murinen Sequenzen integriert, so dass dieses bei einer homologen Rekombination nicht in das ES-Zellgenom integriert. Die murinen Flanken und Junctions dienen in den angegebenen Schritten zur Rekombination zwischen den Plasmiden in Bakterien.

Die murinen Sequenzen in diesem Vektor dienen als homologe Bereiche für eine Rekombination zwischen den Vektoren pL255-mMyc und D23-3-muhumu-MYC-neo. Durch diese Rekombination wird das veränderte *c-Myc*-Gen in den murinen *c-Myc*-Lokus des Vektors pL255-mMyc übertragen. Dies führt zur Generierung eines *c-Myc*-Gens, welches eine humane kodierende Sequenz sowie humane Introns aufweist, allerdings murine regulatorische Sequenzen stromaufwärts (5') des CTG-Startcodons und ebenfalls stromabwärts (3') des Stoppcodons besitzt. Dieser so generierte Targeting-Vektor pL255-muhumu-MYC wurde zur Transfektion von embryonalen Stammzellen verwendet.

5.12.2.2 Bakterielle Rekombination

Zur bakteriellen Rekombination wurden zunächst Bakterien des Stammes EL250 mit dem BAC B06373 transformiert. Hierfür wurde eine 30 mL Kultur der Bakterien bis zu einer OD_{600} von 0,6, bei 32°C und Schütteln, kultiviert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation ($4400 \times g$, 10 Minuten, 4°C) und das Bakterienpellet wurde in 1,8 mL eiskaltem Glycerin (10 % (v/v)) resuspendiert. Nun erfolgten vier Waschschr tte mit 10 % (v/v) Glycerin (Zentrifugation bei $16200 \times g$, 20 Sekunden, 4°C). Nach dem letzten Waschschr tt wurde das Pellet in 100-200 μ L 10% (v/v) Glycerin aufgenommen und direkt für die Elektroporation verwendet. Hierzu wurden 1-5 μ L des BAC dem Reaktionsmix zugefügt, alles für 5 Minuten auf Eis inkubiert und die Bakterien bei 1700 V, 25 μ F und 200 Ω elektroporiert. Anschließend wurden die Bakterien in 1,5 mL LB-Medium resuspendiert und für eine Stunde bei 32°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten ausgebracht und über Nacht bei 32°C inkubiert. Nach Überprüfung der Transformation durch Restriktionsspaltung wurde, von einer Kolonie ausgehend, eine 50 mL Kultur, ebenfalls bei 32°C unter schütteln, bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert. Anschließend wurden 25 mL der Bakterien bei 42°C und Schütteln für 15 Minuten inkubiert. Dieser Schritt diente zur Induktion der Flp-Rekombinase. Zur Kontrolle wurde die andere Hälfte der Bakterienkultur bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend, wie oben beschrieben, elektrokompent gemacht und elektroporiert. Zur Elektroporation wurden 15 ng des, mit dem Restriktionsenzym *NsiI*, linearisierten Vektors pL255-flanks verwendet. Nach Überprüfung der Rekombination durch Restriktionsspaltung mittels 4 mL Kulturen, ausgehend von Bakterienkolonien der Agarplatten, wurden Bakterien, die einen Vektor mit homologer Rekombination trugen zunächst bei -80°C gelagert (siehe Abschn. 5.12.1). Zur Verwendung für den zweiten Rekombinationsschr tt (Abschn. 5.12.2.1) wurden die Bakterien, wie beschrieben induziert, elektrokompent gemacht und schließlich mit 15 ng des linearisierten (mit *KpnI* und *BamHI* gespalten) Vektors D23-3-muhumu-MYC transformiert. Die homologe Rekombination wurde ebenfalls mittels Restriktionsspaltung verifiziert. Nach Plasmid-Präparation (Abschn. 5.12.1.1) wurde zusätzlich die Sequenz des Vektors durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde der Vektor zur Transfektion von embryonalen Stammzellen verwendet.

5.12.2.3 DNA-Vakzinierungsplasmide

Zur Generierung eines Vektors für die DNA-Vakzinierung von Mäusen gegen murines CD19, wurde eine *Cd19*-cDNA verwendet, die aus RNA von Milzzellen aus C57BL/6-Mäusen präpariert wurde (Gabriele Marschall-Schröter – Helmholtz Zentrum München). Zur Kontrolle der Vakzinierung wurde ein weiterer Vektor für die DNA-Vakzinierung gegen Hühner-Ovalbumin hergestellt. Hierzu wurde die cDNA aus einem vorhanden (pCDNA3-OVA, siehe Anhang) Expressionsvektor für Ovalbumin verwendet. Beide cDNAs wurden mittels PCR amplifiziert und in die *HindIII*-Restriktionsschnittstelle des Vektors pVAX1 kloniert.

5.13 Allgemeine Zellkulturtechniken

Arbeiten mit Zellkulturen wurden mit sterilen Pipetten, Kulturflaschen und –schalen sowie sterilen Lösungen unter Umluft-Sterilwerkbänken (Heraeus) durchgeführt. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte, falls nicht anders beschrieben, bei $300 \times g$ für 6 Minuten (4°C).

5.13.1 Bestimmung der Zelldichte und Vitalität

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte unter einem Lichtmikroskop mittels einer Neubauer Zählkammer. Hierzu wurden die Zellen verdünnt, 10 μL der Suspension in der Kammer analysiert und drei bis vier Großquadrate ausgezählt.

Zur Bestimmung der Vitalität einer Zellkultur wurde eine Trypanblau-Ausschlusszählung durchgeführt. Der Farbstoff Trypanblau dringt bei dieser Methode in das Zytoplasma toter Zellen ein und färbt dieses blau. Lebende Zellen weisen im Gegensatz hierzu kein gefärbtes Zytoplasma auf. Zur Färbung wurde die vorverdünnte Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau vermischt und die lebenden Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt.

5.13.2 Gradientenzentrifugation zur Zellseparation

Mittels einer Gradientenzentrifugation wurden lebende von toten Zellen separiert. Hierzu wurden 5 mL einer Zellsuspension mit 3 mL einer Trennlösung (Pancoll, PAN Biotech) in einem Reaktionsgefäß unterschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei $800 \times g$ für 30 Minuten ohne Bremse (4°C). Während dieser Zentrifugation sammeln sich tote Zellen am Boden des Reaktionsgefäßes und lebende Zellen, aufgrund ihrer niedrigeren Dichte, über

der Trennlösung. Diese wurden mit einer Pipette abgenommen und anschließend dreimal mit Medium oder PBS gewaschen. Bei den Waschschritten erfolgte die Zentrifugation bei $300 \times g$ für 6 Minuten (4°C).

5.14 Arbeit mit ES-Zellen

Zur Generierung von transgenen C57BL/6 Mäusen, wurden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) vom Typ Bruce4 genetisch manipuliert. Um die Pluripotenz der ES-Zellen aufrecht zu erhalten, wurden diese auf embryonalen Fibroblastenzellen in ES-Medium (Tabelle 2) mit 0,1 % (v/v) LIF (leukemia inhibitory factor, Chemicon International) kultiviert.

5.14.1 Kultivierung von embryonalen Fibroblasten

5×10^6 embryonale Fibroblasten wurden in EF-Medium (Tabelle 2) auf 10 cm Kulturschalen kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die EF-Zellen bis zur dritten Passage 1:5 auf neue Kulturschalen aufgeteilt. Zur Kultivierung mit ES-Zellen erfolgte eine mitotisch Inaktivierung der EF-Zellen durch Mitomycin C (Sigma). Hierzu wurden adhärente EF-Zellen zunächst mit PBS gewaschen, anschließend für drei Stunden mit $10 \mu\text{g/mL}$ Mitomycin bei 37°C inkubiert und danach erneut dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die EF-Zellen durch Behandlung mit $1 \times \text{Trypsin}$ (Gibco), für 5 Minuten bei 37°C , in Suspension gebracht. Die Zugabe von zwei Volumen FCS-haltigem Medium stoppte die Reaktion. Auf einer mit Gelatine behandelten Kulturschale (15 Minuten Inkubation mit 0,1 % (v/v) Gelatinelösung) wurden schließlich $1,5 \times 10^6$ EF-Zellen ausplattiert, bevor 12 Stunden später ES-Zellen zugefügt wurden.

5.14.2 Kultivierung von ES-Zellen

ES-Zellen wachsen in Kolonien adhärent auf EF-Zellen. Jeden Tag wurden die Zellen mit frischem ES-Medium gefüttert und alle 2-3 Tage auf neue EF-haltige Kulturschalen verteilt. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit $1 \times \text{Trypsin}$, welches mit 1 % (v/v) Hühner-Serum versetzt wurde, für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von zwei Volumen FCS-haltigem Medium stoppte die Reaktion. Darauf folgend wurden die Zellen durch pipettieren vereinzelt und nach Zentrifugation ($250 \times g$, 5 Minuten) auf neue Kulturschalen verteilt ($7,5 \times 10^5$ Zellen / 10 cm Kulturschale).

Zur längerfristigen Lagerung wurden ES-Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen in 500 μL Einfriermedium (90 % (v/v) FCS + 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C , worauf die Zellen in ES-Medium gewaschen und anschließend in einer Dichte von $0,75 - 1 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm Kulturschale ausplattiert wurden.

5.14.3 Transfektion von ES-Zellen

Zur Transfektion von ES-Zellen wurde der Targeting-Vektor, wie in Abschnitt 5.12.1.1 beschrieben, aus Bakterien isoliert, mit dem Restriktionsenzym *PacI* linearisiert und einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen (Abschn. 5.12.1.4). Das DNA-Pellet wurde darauffolgend mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in 70% Ethanol bis zur Transfektion der ES-Zellen gelagert. Vor Transfektion wurde das Reaktionsgefäß zunächst zentrifugiert ($20000 \times g$, 4°C , 5 Minuten), der Überstand verworfen und das DNA-Pellet unter der Sterilwerkbank getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100 μL Transfektionsmedium (RPMI ohne Phenolrot, PAA) durch Inkubation für eine Stunde gelöst.

Zur Transfektion wurden die ES-Zellen bis zu einer Dichte von $0,5 - 1 \times 10^7$ Zellen pro 10 cm Kulturschale kultiviert, anschließend in Suspension gebracht (s.o.), einmal mit PBS gewaschen und in Transfektionsmedium resuspendiert. Drei Stunden vor Transfektion erfolgte noch ein Wechsel des Mediums, um stark proliferierende Zellen zu erhalten. 7×10^6 ES-Zellen wurden zur Transfektion in 800 μL Transfektionsmedium, mit 20 μg des linearisierten Vektors, in eine Transfektionsküvette überführt (0,4 cm Spaltbreite, Gene Pulser, Bio-Rad), zunächst für 10 bis 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 230 V und 500 μF elektroporiert. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen in 40 mL ES-Medium aufgenommen und auf vier 10 cm Kulturschalen (zuvor mit EF-Zellen beschichtet) verteilt.

5.14.4 Selektion und Expansion von ES-Zellklonen

Nach Transfektion wuchsen die Zellen zunächst für 36 Stunden auf normalem ES-Zellmedium. Danach wurde das Medium durch ES-Medium mit G418 (150 μg aktives G418/mL), welches für eukaryotische Zellen normalerweise toxisch ist, ersetzt. Da der Targeting-Vektor allerdings für eine Neomycin-Geneticin-Resistenz kodiert, überlebten diese Selektion nur Zellen, die eine stabile Integration des Targeting-Vektors aufwiesen. Zu den ES-Zellen wurde jeden Tag frisches Selektionsmedium gegeben und die G418-Konzentration

schrittweise um 10 µg/mL auf insgesamt 170 µg/mL erhöht. Als Negativ-Selektionsmarker enthielt der Targeting-Vektor auch noch ein Gen, welches für die Thymidinkinase (TK) des Herpes-simplex-Virus (HSV) kodiert und bei homologer Rekombination nicht in das Genom der ES-Zellen integriert. Zur Negativ-Selektion wurde dem ES-Medium an Tag 4 und 5 nach Transfektion zusätzlich 2 µM Ganciclovir zugesetzt. Ganciclovir wird durch die HSV-TK in ein Nukleosid-Analogon umgewandelt, welches für eukaryotische Zellen toxisch ist. Nach ca. 6 - 8 Tagen überleben diese Selektion fast nur Zellen, die das Targeting-Konstrukt über homologe Rekombination in ihr Genom integriert haben. Im Anschluss an die Selektion wurden, nach zweimaligem Waschen der Kulturschale und Überschichtung mit 10 mL PBS, Kolonien der ES-Zellen, mit einer Pipette in 25 µL aufgesaugt und in eine 96-Loch-Platte überführt. Dies erfolgte unter einer Gegenstrom-Sterilbank. Zu jedem überführten Klon wurden anschließend 50 µL Trypsin gefügt und die Platte für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Zellen in Suspension zu bringen. Die Zugabe von FCS-haltigem ES-Medium stoppte die Reaktion. Durch Pipettieren wurden die Zellen vereinzelt und auf eine neue 96-Loch-Platte, die mit EF-Zellen in 100 µL ES-Medium (mit 170 µg/mL G418 und 2 µM Ganciclovir) versehen war, überführt. Nach einer Kultivierung von zwei bis drei Tagen wurden von dieser Platte Triplikate angefertigt. Die ES-Zellen von zwei Platten wurden auf EF-Zellen weiterkultiviert und ein sowie zwei Tage nach dem Splitten eingefroren. Hierzu wurde zu den Zellen nach Trypsinierung jeweils 50 µL Einfriermedium (80 % (v/v) FCS + 20 % (v/v) DMSO) pro Loch gegeben und die Suspension mit 50 µL Mineralöl (Sigma) überschichtet. Die Platten wurden in mehrere Lagen Zellulose gewickelt und bei -80°C eingefroren. Die letzte Triplikat-Platte war hingegen nur mit Gelatine beschichtet. Diese Platte diente nach weiterer Expansion der ES-Zellklone zur DNA-Gewinnung für den Southern-Blot und der Identifizierung von stabil transfizierten ES-Zellklonen.

5.14.5 Isolierung von DNA aus ES-Zellen

Zur Isolierung von DNA aus embryonalen Stammzellen (ES) im 96-Loch-Format, wurden die ES-Zellen bis zu einer Dichte von ca. 90 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 × PBS gewaschen, in 50 µL ES-Lysepuffer resuspendiert und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 56°C inkubiert. Nachdem am nächsten Tag die 96-Loch-Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur abgekühlt war, erfolgte eine Zentrifugation bei 400 × g für acht Minuten. Anschließend wurden 100 µL 100 % (v/v) Ethanol zugefügt, die Platte erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Platte dreimal mit je 150 µL 70% (v/v)

Ethanol je Loch gewaschen. Hierfür wurde die Platte, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Nach Trocknung der Platte, wurde die DNA in 35 μ L des Restriktions-Gemisches (Abschn. 5.14.6) gelöst.

Zur Isolierung von DNA aus einer größeren Anzahl an ES-Zellen, wurden die Zellen auf 10 cm Kulturschalen, bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % kultiviert. Darauffolgend wurden die Zellen in Suspension gebracht und in drei 2 mL Reaktionsgefäße portioniert. Nach Zentrifugation bei $300 \times g$ wurde das Zellpellet bis zur DNA-Extraktion bei -20°C eingefroren. Zur DNA-Isolierung wurde ein Zellpellet in 750 μ L ES-Lysepuffer resuspendiert und über Nacht bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden 305 μ L einer gesättigten NaCl-Lösung ($>5\text{ M}$) zugefügt und alles bei $9000 \times g$ zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde dann, wie in Abschnitt 5.12.1.4 beschrieben, die DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Das DNA-Pellet wurde nach Trocknung in TE-Puffer (10 mM Tris pH 7,9, 1 mM EDTA) durch Schütteln für vier Stunden bei 37°C gelöst.

ES-Lysepuffer: 10 mM Tris pH 7,4, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % (w/v) SDS, 10 mg/mL Proteinase K

5.14.6 Southern-Blot

Die Southern-Blot-Technik (Southern, 1975) wurde zur Kontrolle der homologen Rekombination in ES-Zellen verwendet. Bei dieser Technik wird zunächst DNA aus einem Gel auf eine Membran übertragen. Anschließend wird auf dieser, mittels einer markierten (meistens radioaktiv) DNA-Sonde, ein definiertes DNA-Fragment nachgewiesen. Die DNA-Moleküle, sowohl die zu transferierende DNA, als auch die Sonde, müssen hierzu denaturiert werden, damit diese einzelsträngig vorliegen und aneinander binden können.

Für den Southern-Blot wurde zunächst genomische DNA aus embryonalen Stammzellen mit *EcoRI* in folgendem Restriktionspuffer verdaut: 1 mM Spermidin, 1 mM DTT, 100 μ g/mL BSA, 50 μ g/mL RNase, $1 \times$ Puffer und 100-150 U *EcoRI*. Die Spaltung der DNA erfolgte für 16 Stunden bei 37°C , entweder mit der ES-Zell-DNA direkt im 96-Loch-Format oder es wurde DNA von ES-Zellen, welche in $1 \times$ TE gelöst war, zugefügt. Die Reaktionsmische wurden anschließend über Nacht in einem Agarosgel (0,8 %) aufgetrennt (Abschn. 5.12.1.9). Danach wurde das Gel für 25 Minuten in einer 0,25 N HCl-Lösung inkubiert, um die DNA zu denaturieren und zu fragmentieren. Um die Denaturierung zu stoppen sowie zur Äquilibration, wurde das Gel zunächst mit Wasser abgespült und dann in Transferpuffer für 30 bis 40 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die DNA aus dem Gel von oben nach unten durch einen Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran (Imobilion™ Ny+ membrane, Millipore)

übertragen. Der Blot erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Taschen des Gels auf der Membran markiert und die Membran, zur Neutralisierung des pH-Wertes, zweimal mit $2 \times \text{SSC}$ gewaschen. Anschließend wurde die DNA durch backen für eine Stunde bei 80°C mit der Membran vernetzt. Die Membran wurde nun entweder direkt weiterverwendet oder bei Raumtemperatur gelagert.

Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die Membran zunächst im vorgewärmten Hybridisierungspuffer für sechs Stunden bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde erfolgte eine erneute Inkubation für 16 Stunde bei 65°C . Hierzu wurden allerdings zuvor $50 \mu\text{g}$ DNA-Sonde nach Herstellerangaben mittels des Random Prime Labeling Kits (GE Healthcare) mit $50 \mu\text{Ci}$ $\alpha^{32}\text{-dCTP}$ (Hartmann Analytic) markiert. Danach wurde die Sonde in einer G50 Sephadex Säule (GE-Healthcare) nach Herstellerangaben gereinigt. Anschließend wurde die Sonde 5 Minuten bei 100°C denaturiert, darauffolgend 2 Minuten auf Eis inkubiert und direkt für den Southern-Blot eingesetzt. Nach Inkubation mit der Sonde wurde die Membran drei bis viermal mit dem Waschpuffer für 10 Minuten bei 58°C gewaschen, um unspezifisch gebundene DNA-Sonden zu entfernen. Zur Detektion der Radioaktivität wurden radiosensitive Filme (Biomax MS PE Applied Biosystems $35 \times 43 \text{ cm}$, Kodak) verwendet. Diese wurden bis zu einem Tag in einer Biomax-Kassette der Membran exponiert. Als Sonden, wurden DNA-Moleküle verwendet, die mittels einer PCR aus den Vektoren pBS-MYC 3' Probe 5 und pBS-MYC 5'Probe 3 amplifiziert wurden (siehe Anhang). Eine davon bindet stromaufwärts ($5'$) des genetisch manipulierten *c-Myc*-Gens und die andere stromabwärts ($3'$). Beide Sonden sind 700 bis 800 bp lang (Abschn. 5.2). Im Southern-Blot liefern beide Sonden für das Wildtyp-Allel eine Bande bei ca. 20 kb und eine Bande bei ca. 11 kb für das rekombinierte Allel.

Transferpuffer: 0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl

$2 \times \text{SSC}$: 0,3 M NaCl, 0,03 NaCitrat, pH 6,5

Hybridisierungspuffer: 1 M NaCl, 50 mM Tris, 10 % (w/v) Dextransulfat, 1 % (w/v) SDS, 250 $\mu\text{g/mL}$ Lachsperma-DNA, pH 7,5

Waschpuffer: $0,2 \times \text{SSC}$, 0,5 % (w/v) SDS

5.14.7 Kultivierung von stabil transfizierten ES-Zellklonen für die Blastozysten-Injektion

Mittels Southern-Blot-Analyse wurden ES-Zellklone identifiziert, die eine homologe Rekombination aufwiesen. Diese Klone wurden von den 96-Loch-Platten in einem semi-sterilen Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend expandiert. Hierzu wurden die

entsprechenden Klone auf 24-Loch-Platten, die zuvor mit EF-Zellen beschichtet wurden, überführt. Nach acht Stunden wurde das Medium erneuert, um das DMSO auszuwaschen. Nun wurden die Zellen für ca. 3 drei Tage kultiviert und anschließend, nach Trypsinierung, auf 6-Loch-Platten, die ebenfalls zuvor mit EF-Zellen beschichtet wurden, überführt. Nach weiteren zwei Tagen Kultivierung wurden die Zellen, nach Trypsinierung, auf 10 cm Kulturschalen (mit EF-Zellen beschichtet) überführt. Nachdem die Zellen gut gewachsen waren, wurden sie wie beschrieben (Abschnitt 5.14.2) eingefroren. Die Selektion mit G418 wurde bis zur letzten Passage vor Blastozysteninjektion aufrechtgehalten. Aus einigen Klonen wurden zur Analyse der Expression des Transgens Proteinextrakte hergestellt.

Nachdem im Western-Blot verifiziert wurde, ob einige ES-Klone das Transgen exprimieren, wurden vier entsprechende Klone bis zur Blastozysten-Injektion expandiert. Hierzu wurden diese aufgetaut und auf 10 cm Kulturschalen, die mit EF-Zellen beschichtet waren, expandiert. Nach zwei bis drei Tagen wurden diese auf mehrere Kulturschalen verteilt. Da die ES-Zellen nach 36 Stunden eine hohe Proliferation aufweisen, wurden die Zellen nach dieser Kultivierungsdauer trypsiniert, resuspendiert und in Balb/c-Blastozysten injiziert (In Kooperation mit dem Institut für Entwicklungsgenetik, Helmholtz Zentrum München).

5.14.8 Test auf Deletion des Neomycin-Resistenzgens

Zur Analyse, ob die Deletion des, mit loxP-Stellen flankierten, Neomycin-Resistenzgens funktionieren kann, wurden transgene ES-Zellen mit dem Vektor 141-MerCreMer (siehe Anhang), wie in Abschnitt 5.14.3 beschrieben, transfiziert. Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein, das aus der Cre-Rekombinase und der Hormon-binde-Domäne des mutierten Östrogenrezeptors (mer) besteht. Die Cre-Rekombinase ist hierdurch nur unter Anwesenheit von Tamoxifen aktiv. Zusätzlich kodiert der Vektor für eine Puromycinresistenz.

Nach Transfektion erfolgte die Kultivierung der ES-Zellen ausschließlich auf Kulturschalen, die mit Gelatine beschichtet waren, in ES-Medium. Ca. 48 Stunden nach Transfektion wurden stabil transfizierte ES-Zellen unter Anwesenheit von 0,5 µg/mL Puromycin selektiert. Nach sieben bis acht Tagen Selektion konnten einzelne Klone, wie in Abschnitt 5.14.4 beschrieben, mit einer Pipette aufgesaugt und in 96-Loch-Platten überführt werden. Einzelne Klone wurden nun für die Isolierung von genomischer DNA weiter expandiert. Ca. zwei Tage vor Zellernte wurde die Cre-Rekombination durch Zusatz von 1µM Tamoxifen induziert. Nach Isolierung der DNA wurde diese mittels des Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten und ein Southern-Blot, wie im Abschnitt 5.14.6 beschrieben durchgeführt.

5.14.9 Proteinextraktion aus Zellen

Zur Analyse der Expression des Transgens wurden Zellextrakte aus ES-Zellen und Milzzellen der transgenen Mäuse generiert. Die ES-Zellen wurden hierzu bis zu einer Dichte von 80 % auf Kulturschalen, die mit Gelatine beschichtet waren, kultiviert. Zur Präparation von Zellextrakten wurden diese durch Trypsin-Behandlung (Abschn. 5.14.2) in Suspension gebracht und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden 3×10^6 Zellen in 20 μL NP40-Puffer für 20 Minuten auf Eis inkubiert und ca. alle 4 Minuten auf höchster Stufe gevortext. Danach wurden DNA und Zelltrümmer vom Lysat durch Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl (15 Minuten, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (Abschn. 5.14.10). Zur Generierung von Proteinextrakten aus Milzzellen wurden 20 μL NP40-Extrakt mit Protease-Inhibitor für 1×10^7 Zellen verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte so wie oben beschrieben. Ca. 30 μg Proteine wurden für den Western-Blot verwendet.

NP40-Puffer: 100 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl, 4 mM EDTA, 2 % (v/v) NP40, frisch zugefügter $1 \times$ Proteaseinhibitor (Mini Complete Tabletten, Roche Diagnostics)

5.14.10 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Herstellerangaben mit dem DC Protein Assay (Bio-Rad).

5.14.11 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Mittels eines Western-Blots (Towbin et al., 1979) werden Proteine, die in einem SDS Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wurden, auf eine Membran übertragen. Hier können Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden.

Zur SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, (Laemmli, 1970)) wurde ein Gel verwendet, das aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestand sowie mit Laemmli-Laufpuffer überschichtet war. 30 μg des ES-Zellextrakts wurden mit $5 \times$ Laemmli-Puffer zu einer $1 \times$ Konzentration vermischt, bei 70°C für 10 Minuten erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 250 V und 20 mA (konstant) für das Sammelgel und 40 mA (konstant) für das Trenngel. Für den Größenvergleich wurde ein Proteinstandard (Prestained Protein Ladder, Fermentas) verwendet.

Als Membran für den Western-Blot diente eine Polyvinyliden Fluorid (PVDF) Membran (ImmobilonTM P Membran, Millipore). Diese wurde zunächst mit Methanol aktiviert, mit Reinstwasser abgespült und im Blotpuffer für 5 Minuten inkubiert. Das SDS-PAGE Gel wurde ebenfalls 5 Minuten im Blot-Puffer inkubiert. Zum Übertragen der Proteine auf die Membran erfolgte ein sogenannter elektrophoretischer „Nass-Blot“ in einer Bio-Rad-Apparatur, bei dem ein elektrisches Feld die Proteine auf die Membran überträgt. Der Western-Blot wurde so aufgebaut, dass die negativ geladenen Proteine zur Membran wandern und erfolgte bei 40 mA (konstant) und 300 V über Nacht im Kühlraum. Nach Transfer wurde eine gleichmäßige Ladung des Polyacrylamidgels durch Färbung der Membran für fünf Minuten mit Ponceau S (Ponceau S Lösung, Sigma) überprüft.

Anschließend wurde mit der Antikörper-Detektion von Proteinen auf der Membran begonnen. Hierzu wurde die Membran zunächst in TBST mit 5 % Rinderserumalbumin (BSA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörper (Tabelle 8) über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach einem dreifachen Waschschrift für 10 Minuten mit TBST erfolgte eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 9) für 1 bis 3 Stunden, in einer TBST-Lösung mit 5 % (w/v) Milchpulver bei Raumtemperatur und Schütteln. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und die Proteine mit der ECL-Detektionsreagenz (Enhanced Chemiluminescence ECLTM von GE Healthcare) sichtbar gemacht.

Sammelgel: 5 % (v/v) Acrylamid, 0,625 mM Tris pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,006 % (w/v) TEMED

Trenngel: 10 to 12 % (v/v) Acrylamid, 3,75 mM Tris pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,004 % (w/v) TEMED

Laemmli-Laufpuffer: 25 mM Tris Base, 0,2 M Glycin, 0,1 % (v/v) SDS

5 × Laemmli-Puffer: 300 mM Tris pH 6,8, 7,5 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (v/v) Bromphenolblau, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Blot-Puffer: 25 mM Tris Base, 0,2 M Glycin, 20 % (v/v) Methanol

TBST: 0,1 M Tris/HCl pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,02 % (v/v) Tween

Tabelle 8: Primärantikörper für Western-Blot

Antikörper	Antigen	Hersteller	Quelle	Verdünnung
Y69	c-MYC	Abcam	Kaninchen	1:10000
Aktin (C-2)	Aktin	Santa Cruz	Maus	1:500

Tabelle 9: Sekundärantikörper für Western-Blot

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP	Cell Signaling	1:2000
Esel-anti-Maus IgG-HRP	GE Healthcare	1:2000

5.15 Arbeit mit Mäusen

5.15.1 Verpaarungen

Während der Generierung der transgenen *hc-Myc*-Mäuse wurden zunächst die chimären Mäuse mit Wildtyp-C57BL/6-Mäusen verpaart. Transgene Nachkommen wurden mit C57BL/6 *Deleter-Cre*-Mäusen verpaart, um das Gen für die Neomycinresistenz, welches sich noch im Transgen befindet zu deletieren. Nachkommen dieser Verpaarung weisen möglicherweise noch nicht in allen Zellen eine Deletion der Neomycinresistenz auf, weshalb diese nochmal mit Wildtyp-C57BL/6-Mäusen verpaart wurden. Die Nachkommen wurden mittels PCR auf das *Deleter-Cre*-Allel und auf das Neomycin-Resistenzgen getestet. Durch weitere Verpaarungen mit Wildtyp-Mäusen wurde schließlich das *Deleter-Cre*-Allel herausgekreuzt. Für die Analysen wurden diese Mäuse dann homozygot für das *hc-Myc*-Allel verpaart.

5.15.2 Vakzinierung von Mäusen

Homozygote CD19-Cre-Mäuse wurden gegen murines CD19 vakziniert, um eine T-Zell-Immunantwort zu induzieren. Es wurden drei verschiedene Strategien zur Vakzinierung durchgeführt. In einer Strategie wurden Wildtyp-Milzzellen aus C57BL/6-Mäusen oder CD19-positive murine Lymphomzellen zur Vakzinierung verwendet. Hierfür wurden, in der Regel 1×10^7 Zellen gelöst in PBS, in Kombination mit einem CpG-Oligonukleotid (s.u.) und inkomplettem Freundschens Adjuvans (IFA) verwendet. Die Milzzellen wurden mit 50 µg CpG in 50 µL PBS gelöst und mit 50 µL IFA überschichtet. Kurz vor Injektion wurde das Gemisch gründlich gevortext, bis eine milchige Emulsion vorlag. Diese wurde dann subkutan den Mäusen gespritzt. In einer weiteren Strategie wurden zunächst H-2K^b- und H2-D^b- (MHC-Klasse I in C57BL/6-Mäusen) sowie I-A^b-Epitope (MHC-Klasse II in C57BL/6-Mäusen) im murinen CD19-Protein (NP_033974.2) mit den Algorithmen SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999; <http://www.syfpeithi.de>) und mhc2pred (Lata et al., 2007; <http://www.imtech.res.in/raghava/mhc2pred/index.html>) vorhergesagt. Zur Peptidsynthese wurden jeweils ca. 40 Aminosäuren der Sequenz des CD19-Proteins im Bereich von acht Epitopen, die eine hohe Punktzahl (Wahrscheinlichkeit, dass dieses Epitop tatsächlich an das

MHC-Molekül bindet) aufwiesen, verwendet (Tabelle 7). Diese Peptide wurden in Mixturen von bis zu 6 Peptiden zur Vakzinierung verwendet. 20 µg von jedem Peptid wurden mit 50 µg des CpG-Oligonukleotids in 50 µL PBS gelöst und mit 50 µL IFA überschichtet. Die Vakzinierung erfolgte wieder, nach vortexen des Gemisches, subkutan. In der dritten Strategie wurde der Vektor pVAX1-CD19 in Kombination mit dem Vektor pRJB-GM (Altmann et al., 1991) als Adjuvans, verwendet (siehe Anhang). Von beiden Plasmiden wurden 100 µg in 100 µL PBS den Mäusen intramuskulär injiziert (Lindencrona et al., 2004). Es wurden diverse Kombinationen der verschiedenen Vakzinierungsstrategien ausprobiert. Am häufigsten wurde eine dreifache Vakzinierung, mit primärer Injektion der Plasmide, gefolgt von einer Injektion der CD19-Peptide ca. 10-14 Tage später und einer weiteren Peptid-Injektion drei bis vier Wochen später, durchgeführt. Eine Woche nach der letzten Injektion wurde die Immunantwort der Mäuse mittels ELISA und ELISPOT analysiert. Ein weiteres Immunisierungsprotokoll mit Wildtyp-Milzzellen basierte auf dieser Strategie. Hierbei wurde anstelle der Peptid-Injektion mit Milzzellen vakziniert und wieder eine Woche nach der letzten Injektion die Immunantwort analysiert. Vakzinierungen mit Lymphomzellen wurden nur zur Boosterung von Mäusen, die einen Tumor abgestoßen hatten, durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Mäuse mit den Peptiden OVA1 (H2-K^b) und OVA2 (I-A^b) sowie dem Plasmid pVAX1-OVA (Peptide siehe Tabelle 7, Plasmid: siehe Anhang), nach dem gleichen Protokoll, gegen Hühner-Ovalbumin vakziniert. Als Negativkontrolle dienten naive Mäuse und Mäuse, die nur mit den Adjuvanzien behandelt wurden.

CpG-Oligonukleotid: Sequenz (5' nach 3'): tccatgacgttcctgacgtt, Phosphothioat-ODN, Metabion.

5.15.3 Präparation von Mausorganen

Zur Präparation von Organen wurden die Mäuse zunächst durch eine CO₂-Begasung in einem geschlossenen Behälter euthanasiert und anschließend mit 70% (v/v) Ethanol abgesprüht. Die Organe Milz, Leber, Nieren sowie die Lymphknoten wurden in T-Zellmedium (Tabelle 2) aufgenommen. Zur Generierung einer Zellsuspension aus der Milz und den Lymphknoten wurden diese durch ein feines Sieb (70 µm Cell strainer, Becton Dickinson) gedrückt. Nach einer Zentrifugation (300 × g, 4°C, 7 Minuten) wurden die Erythrozyten blutreicher Organe (z.B. Milz) in 0,5 bis 1 mL (je nach Größe des Zellpellets) eines hypotonischen Lysepuffer (Erythrocytic Lysis Buffer, eBioscience) gelöst und für 3 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die Zugabe von 10 mL T-Zellmedium stoppte die Lyse. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt, wie oben beschrieben und die Zellen wurden in 0,5 bis 1 mL T-

Zellmedium resuspendiert. Mit Ausnahme der Inkubation bei Raumtemperatur während der Erythrozytenlyse wurden die Zellen die gesamte Zeit auf Eis gehalten.

Zur Isolierung von Knochenmark wurde der Schienbeinknochen (Tibia) der Mäuse präpariert. Dieser wurde mit einer feinen Kanüle mit T-Zell-Medium durchspült, um das Knochenmark zu isolieren. Anschließend erfolgte wieder eine Lyse der Erythrozyten, wie oben beschrieben.

5.15.4 Isolierung von T-Zellen und B-Zellen

Durch magnetische Zellseparation (MACS) wurden sowohl $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie B-Zellen aus einer Milz- und Lymphknoten-Zellsuspension nach Erythrozytenlyse isoliert (Abschn. 5.15.3). Bei diesem Verfahren werden Antikörper verwendet, die spezifisch für Oberflächenmoleküle sind und entweder direkt an magnetische Kügelchen gebunden sind, oder über einen sekundären Antikörper mit diesen verbunden werden. Diese binden an die entsprechenden Zellen, welche anschließend in einer Säule durch ein starkes Magnetfeld zurückgehalten werden, während ungebundene Zellen herausgewaschen werden können.

Zur Gewinnung von T-Zellen wurden Kits zur Isolierung von unberührten Zellen von Miltenyi Biotec nach Angaben des Herstellers verwendet ($CD4^+$ T Cell Isolation Kit II, mouse, $CD8^+$ T Cell Isolation Kit II, mouse). Diese bieten den Vorteil, dass die T-Zellen nicht durch gebundene Antikörper voraktiviert werden können. Die isolierten Zellen haben in der Regel eine Reinheit von über 95 % $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen. Für die Isolierung von unberührten B-Zellen wurden α -CD43 Kügelchen, (Miltenyi Biotec) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Reinheit der isolierten B-Zellen ist bei dieser Methode höher als 85%. Während der Waschschrte wurde ein kommerzieller Puffer (autoMACS™ Running Buffer, Miltenyi Biotec) eingesetzt.

5.15.5 Kultivierung und Transfer von 291-Lymphomzellen

Die Kultivierung dieser Lymphomlinie erfolgte in 291-Medium (Tabelle 2). Die 291-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro mL in Gewebekulturflaschen ausgesät. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen 1:4 bis 1:5 auf neue Gewebekulturflaschen verteilt und mit frischem, vorgewärmtem Medium gefüttert.

Zwei Tage vor Injektion der Zellen in Mäuse wurden diese nochmal auf neue Flaschen 1:4 verteilt und mit frischem Medium gefüttert, damit diese sich bei Injektion in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden. Zur Injektion wurden die Zellen dreimal mit gekühltem PBS gewaschen, um das fötale Kälberserum (FKS) herauszuwaschen.

Anschließend wurden lebende Zellen mittels Trypanblau-Ausschlusszählung gezählt sowie die Zelldichte eingestellt und die Zellen unverzüglich den Mäusen injiziert. Zur Injektion wurden in der Regel 1×10^5 oder 1×10^6 Zellen in 100 μL PBS den Mäusen subkutan in die rechte oder linke Flanke gespritzt. Das Tumorstadium wurde regelmäßig durch Palpation kontrolliert, der Tumordurchmesser in drei Dimensionen (Länge, Breite und Tiefe) mittels einer Schublehre bestimmt und die Mäuse bei einem durchschnittlichen Tumordurchmesser größer als 10 mm euthanasiert.

5.15.6 Isolierung von primären Lymphomzellen

Nach Injektion von 291-Lymphomzellen in mehrere STAT1-defiziente Mäuse, wurde das Gewebe der Tumoren, die sich entwickelt hatten, isoliert und eine Zellsuspension, wie in Abschnitt 5.15.3 für Mausorgane beschrieben, hergestellt. Die Lymphomzellen der STAT1-defizienten Mäuse wurden gemischt, in Aliquots von 2×10^7 Zellen in Einfriermedium (90% TCS, 10% DMSO) eingefroren und in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung gelagert. In der gesamten Arbeit wurden nur diese Lymphomzellen für die Experimente verwendet.

5.15.7 Depletion von T-Zellen

Zur *in vivo* Depletion von T-Zellen in Mäusen wurde der Antikörper MMTC (freundlicherweise von Elisabeth Kremmer zur Verfügung gestellt (Kremmer et al., 1997)), welcher spezifisch für murines Thy1.2 ist, verwendet. Als Isotypkontrolle diente der Antikörper KSB5D10, der spezifisch für ein Virusprotein des humanen Herpesvirus 8 ist.

Zur Depletion wurde den Mäusen, drei Tage vor Injektion der Tumorzellen, 0,4 mg Antikörper in PBS intraperitoneal injiziert. Am Tag der Injektion sowie drei Tage später wurde die Injektion wiederholt. Von nun an erfolgten nur noch alle drei bis vier Tage Injektionen mit 0,2 mg des Antikörpers, bis die Mäuse euthanasiert werden mussten oder maximal bis Tag 30 nach Tumortransfer. Die Depletion der T-Zellen im peripheren Blut wurde mittels Durchflusszytometrie kontrolliert. Hierzu wurden den Mäusen aus der Schwanzvene, mit einer Glaskapillare, ca. 20 μL Blut entnommen. Dieses wurde in 300 μL PBS mit 5 μM EDTA aufgenommen und anschließend Erythrozyten, wie in Abschnitt 5.15.3 beschrieben, lysiert. Nach einer Zentrifugation ($300 \times g$, 4°C , 6 Minuten) wurde das Zellpellet in 500 μL FACS-Puffer (PBS, 1% BSA) resuspendiert. Um die unspezifische Färbung von Zellen, die Fc-Rezeptoren aufweisen (u.A. B-Zellen und NK-Zellen), zu verhindern, wurden diese mit 2 μL (0,5 mg/mL) Fc-Block (Mouse Fc-block, Becton-Dickinson), für 20 Minuten auf Eis,

blockiert. Nach einer Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen direkt zur Färbung mit den Antikörper-Gemischen für die Durchflusszytometrie verwendet (Abschn. 5.16.1).

5.16 Immunologische Methoden

5.16.1 FACS

Mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurden Zellen auf die Anwesenheit von bestimmten Oberflächenmarkern sowie auf ihre Vitalität untersucht. Bei dieser Technik werden Antikörper verwendet, die direkt an ein Fluorochrom (z.B. FITC, PE, PerCP, APC) oder an Biotin gekoppelt sind. Letztere werden mittels eines an Streptavidin-gekoppelten Fluorochroms detektiert. Zur FACS-Analyse wurden Einzelzellsuspensionen zunächst mit FACS-Puffer (PBS, 1% BSA) gewaschen, anschließend in einer Dichte von $0,1 \times 10^6$ bis 1×10^6 Zellen mit den Antikörpern für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln gefärbt und darauf erneut mit FACS-Puffer gewaschen. Die Zentrifugationsschritte während des Waschens erfolgten jeweils bei $300 \times g$ für 6 Minuten (4°C). Zur Messung wurden die Zellen anschließend entweder in 50 μL FACS-Puffer oder in 50 μL 1:40000 (v/v), in FACS-Puffer, verdünntem TO-PRO-3 (TO-PRO-3 Iodid, Molecular Probes) aufgenommen. TO-PRO-3 diente zur Überprüfung der Vitalität der Zellen.

Die Analyse erfolgte mit einem FACSCaliburTM (Becton Dickinson) und die Auswertung mittels der CELLQuestTM Software.

Antikörper für die Durchflusszytometrie:

Es wurden Biotin-gekoppelte oder an ein Fluorochrom gekoppelte Antikörper spezifisch für murines B220, IgM, CD3, CD4, CD8, CD19, CD43, I-A^b, H-2K^b, H-2D^b und V β 8.3 sowie Streptavidin gekoppelt an Fluorochrome verwendet (Becton Dickinson und eBioscience).

5.16.2 Analyse der in vitro Proliferation von B-Lymphozyten

Zur Analyse der Proliferation von B-Zellen wurden zunächst, wie unter Abschnitt 5.15.4 beschrieben, B-Zellen aus einer Milzzellsuspension isoliert. Die Proliferation der Zellen wurde nach Markierung mit 5-(und 6)-Carboxy-Fluoreszin-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE, Molecular Probes) über mehrere Tage verfolgt. CFSE wird durch Bindung an Proteine der inneren Zellmembran in ein fluoreszierendes Produkt umgewandelt, welches bei Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird. Durch die Abnahme der Fluoreszenz bei Zellteilungen kann die Proliferation der Zellen in vitro verfolgt werden.

Zur Markierung wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro mL zunächst zweimal mit T-Zellmedium ohne FCS gewaschen und anschließend in $5 \mu\text{M}$ CFSE, verdünnt in T-Zellmedium ohne FCS, für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zusatz des fünffachen Volumens an kaltem T-Zellmedium mit 10% (v/v) FCS wurde die Markierung gestoppt. Nach Zentrifugation ($300 \times g$, 7 Minuten, 4°C) wurden die Zellen in einer Dichte von 6×10^6 Zellen pro mL in T-Zellmedium gelöst und je $50 \mu\text{L}$ auf 96-Loch-Platten (konischer Boden) verteilt. Zu diesen wurden weitere $50 \mu\text{L}$ T-Zellmedium mit verschiedenen Stimuli zugefügt. Die Stimulation von B-Zellen erfolgte mittels Interleukin 4 (IL-4, rekombinant aus der Maus, Sigma; 1 ng/mL) in Kombination mit einem anti-CD40-Antikörper (eBioscience, Klon HM40-3; $2,5 \mu\text{g/mL}$) und separat mit Lipopolysacchariden (LPS, *E.coli* 055:B5, Sigma; $0,1 \text{ mg/mL}$).

5.16.3 Immunhistochemie

Zur Analyse der T-Zellinfiltration in Tumorgewebe wurde eine immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten durchgeführt. Hierzu wurde direkt nach Präparation ein Teil des Tumorgewebes in O.C.T. Tissue Tek (Sakura) eingelegt und bei -80°C eingefroren. Mittels eines Kryotoms (Leica Microsystems) wurden 4 bis $8 \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Nach Lufttrocknung für 5 Minuten wurden die Schnitte bei -20°C in 100 % (v/v) Aceton für 10 Minuten fixiert, anschließend erneut an der Luft getrocknet (20 Minuten) und bei -20°C bis zur Färbung gelagert. Zur Färbung wurden die Schnitte zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut, kurz in PBS gewaschen und dann 20 Minuten mit der IHC-Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Zur Blockierung unspezifischer Avidin- und Biotin-Bindestellen erfolgte nach einem PBS-Waschschritt (5 Minuten) eine Inkubation für 15 Minuten mit zwei verschiedenen Blocklösungen (Avidin/Biotin Blocking Kit von Vector Laboratories). Zwischen beiden Blockschritten wurde für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für jeweils eine Stunde mit den verschiedenen Antikörpern oder mit Streptavidin-gekoppelter Phosphatase inkubiert (Tabelle 10). Vor der ersten und zwischen den einzelnen Inkubationen wurde jeweils dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Zur Farbentwicklung wurden die Schnitte zunächst für ca. 3 Minuten mit 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories) rot angefärbt, einmal für 5 Minuten anschließend gewaschen und danach für ca. 4 Minuten mit dem BCIP/NBT Substrat Kit (Vector Laboratories) lila gefärbt. Nach einem dreifachen Waschschritt (5 Minuten in PBS) und anschließendem Trocknen an der Luft, wurden die Schnitte in Gelatine

(Kaisers Gelatine, Merck) eingebettet und mit Deckgläschen versehen. Die Analyse und Aufnahme der Schnitte erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena), mit einer Digitalkamera (RS Photometrics) und den Programmen Openlab von Improvision sowie der Adobe Photoshop Software.

IHC-Blocklösung: 10 % (v/v) Ziegen Serum, 0,1 % (v/v) H₂O₂, 1 % (w/v) BSA in PBS

Tabelle 10: Antikörper / SA-alkalische Phosphatase für Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Ratte α -Maus-CD3	Von Elisabeth Kremmer zur Verfügung gestellt	1:2
Ratte α -Maus-CD8	Von Elisabeth Kremmer zur Verfügung gestellt	1:2000
biotinylierter α -Ratte-IgG1	Jackson Laboratories	1:250
biotinylierter α -Maus-CD4	Becton-Dickinson	1:1000
Peroxidase konjugierter α -Maus IgM	Sigma	1:100
SA-gekoppelte alkalische Phosphatase	Sigma	1:400

5.16.4 IFN- γ -ELISA

Mit Hilfe eines Interferon- γ (IFN- γ) ELISA wurde die spezifische Erkennung von Antigenen durch T-Zellen gemessen. Zur Antigenpräsentation wurden in diesen Versuchen Milzzellen aus CD19-defizienten Mäusen verwendet. Diese wurden mit T-Zellen in der Regel in 96-Loch-Platten (Rundboden) für 18-24 Stunden kokultiviert (37°C, 7 % CO₂, 99 % hum.).

Hierzu wurden die Milzzellen in einer Dichte von 1 bis 2×10^5 Zellen pro Loch ausgebracht und 2,5 μ g des zu untersuchenden Peptids zugefügt. Zur Isolierung der T-Zellen wurden aus Mäusen zunächst die Milz und Lymphknoten (In der Regel inguinale und axiale Lymphknoten) präpariert. Aus beiden Organen wurde eine Zellsuspension hergestellt und T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (Abschn. 5.15.4) isoliert. Diese wurden dann in der Regel in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Loch zu den Peptid-beladenen Milzzellen gegeben. Als Negativkontrollen wurden T-Zellen ohne Milzzellen, mit Milzzellen, die mit einem irrelevanten Peptid beladen worden waren oder mit nicht beladenen Milzzellen, zu denen nur 0,25 bis 1,5 μ L 100 % (v/v) DMSO gegeben wurde, in T-Zellmedium inkubiert. In einigen Versuchen wurden die T-Zellen auch mit CD19-exprimierenden primären Lymphomzellen sowie mit CD19-exprimierenden B-Zellen kokultiviert. Hierzu wurden zunächst 1×10^5 B-Zellen oder Lymphomzellen pro Loch vorgelegt und anschließend die T-Zellen zugefügt. Zur Analyse der Immunantwort wurde auch in einigen Versuchen nur ein Zellgemisch aus Milz- und Lymphknotenzellen (2×10^5 Zellen pro Loch), aus vakzinieren Mäusen, mit 2,5 μ g Peptid für 18 bis 24 Stunden stimuliert. In diesen Versuchen wurden mit

den Milz- & Lymphknotenzellen T-Zellen isoliert, welche IFN- γ durch die Peptid-Stimulation sezernieren können. Dieser Ansatz diene zur schnellen und einfachen Abfrage der Immunantwort, ohne vorher T-Zellen isolieren zu müssen. Als Positivkontrolle diene in allen Ansätzen eine Stimulation der T-Zellen mit 5ng/mL Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, Sigma) und 0,669 μ M Ionomycin (Sigma).

Für den ELISA wurde der Überstand der Kokultivierungen verwendet. Hierzu wurde die 96-Loch-Platte bei $300 \times g$ für 6 Minuten (4°C) zentrifugiert und der Überstand in eine neue Platte überführt. Diese wurde entweder direkt für den ELISA verwendet oder bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Durchführung des IFN- γ -ELISA wurde ein Kit der Firma MABTECH nach Herstellerangaben verwendet (Mouse Interferon- γ -ELISA Kit). Die Messung der IFN- γ -Sekretion basierte auf einer Färbereaktion, katalysiert durch die Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase), nach Zusatz von 100 μ L HRP-Färbelösung. Nach 5 bis 10 Minuten wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 50 μ L 2N H_2SO_4 gestoppt und die Färbung bei 450 nm, im ELISA-Reader (Tecan), gemessen.

5.16.5 IFN- γ -ELISPOT

Mit Hilfe eines ELISPOT kann die Zytokin-Sekretion (Beispielsweise von Interferon- γ) einzelner Zellen nachgewiesen werden. Dies ermöglicht eine quantitative Analyse der Häufigkeit solcher Zellen in einer Population. Hierzu wird in der Regel eine 96-Loch-Platte verwendet, die eine Membran am Boden besitzt. Diese wird mit einem Primärantikörper beschichtet und anschließend blockiert. Danach werden die Zellen auf die Membran gegeben, welche sich nach einer Weile auf der Membran absetzen. Wenn diese nun bestimmte Zytokine sezernieren, kann mit Hilfe des Primärantikörpers und eines Sekundärantikörpers die zellspezifische Sekretion dieser Zytokine nachgewiesen werden.

Zur Detektion der Antigen-spezifischen Sekretion von Interferon- γ durch murine T-Zellen wurde ein ELISPOT-Set von Becton-Dickinson (Mouse IFN- γ -ELISPOT Set) verwendet. Zunächst wurde die Membran der ELISPOT-Platte durch Inkubation mit 15 μ L 35 % (v/v) Ethanol für eine Minute aktiviert und anschließend dreimal mit $1 \times \text{PBS}$ gewaschen. Die Beschichtung mit dem Primärantikörper und die weitere Durchführung des ELISPOT erfolgten nach Herstellerangaben. Zur Analyse der Immunantwort wurden Milzzellen und T-Zellen, wie in Abschnitt 5.16.4 für den ELISA beschrieben, auf dieser Platte kokultiviert. Im Unterschied zum IFN- γ -ELISA ist der ELISPOT sensitiver und ermöglicht eine Quantifizierung der Antigen-spezifischen T-Zellen. Die Detektion der IFN- γ -Sekretion

basierte ebenfalls auf der HRP und erfolgte mittels des AEC Substrat Reagent Sets von Becton-Dickinson nach Herstellerangaben. Zur Quantifizierung der IFN- γ -sezernierenden Zellen wurde ein ELISPOT-Reader verwendet (AID Diagnostika GmbH).

5.16.6 Zytokin-Array

Zur Differenzierung zwischen den verschiedenen CD4⁺ T-Zell-Populationen wurde ein Zytokin-Array durchgeführt. Mittels dieser Technik ist es möglich die Sezernierung von diversen Zytokinen und Chemokinen nach Stimulation der T-Zellen abzufragen. Hierzu wurde ein Maus-Zytokin-Array der Firma R&D Biosciences (Proteome Profiler™, Mouse Cytokine Array Panel A) nach Herstellerangaben verwendet.

1×10^6 T-Zellen wurden hierfür in 24-Loch-Platten für 18-24 Stunden mit 1×10^6 Peptid-beladenen Milzzellen (10 μ g Peptid) in T-Zellmedium kokultiviert (37°C, 7 % CO₂, 99 % hum.). Nach Zentrifugation (300 \times g, 6 Minuten, 4°C) wurden 750 μ L Überstand entweder direkt für den Zytokin-Array verwendet oder bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Abbildung 5 zeigt den Aufbau des Zytokin-Array sowie die Koordinaten der getesteten Zytokine.

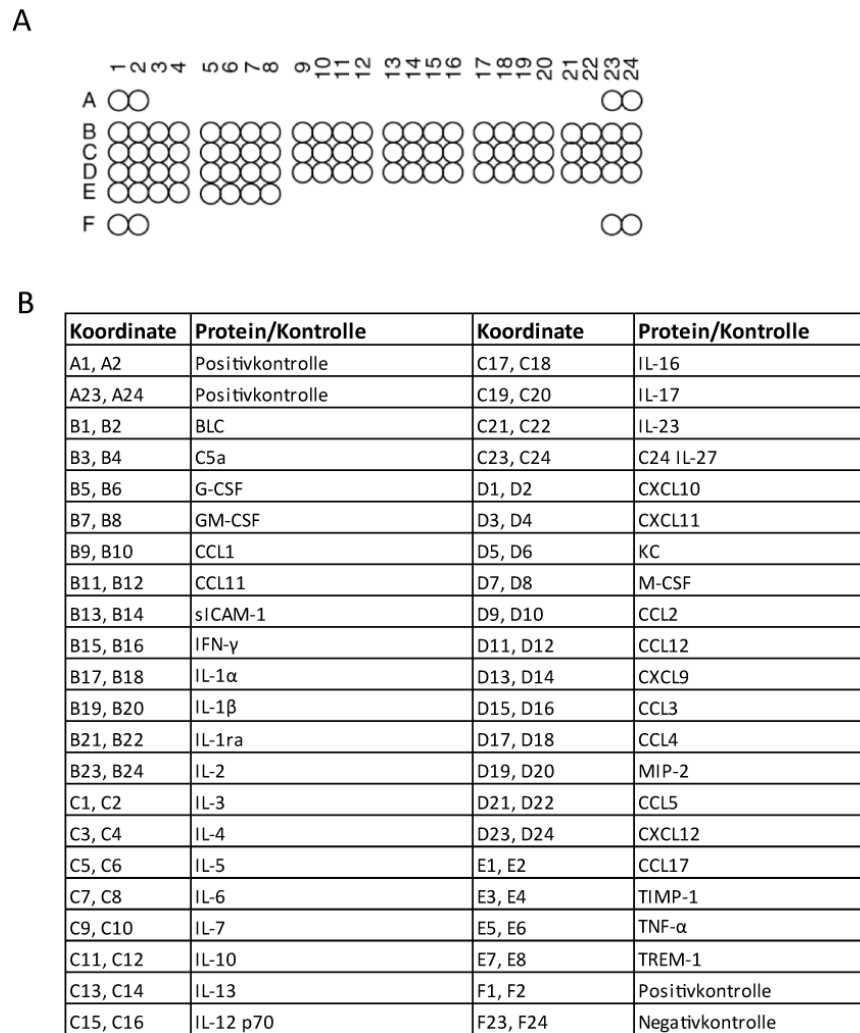


Abbildung 5: Aufbau des Zytokin-Array (A) und Koordinaten (B) der für definierte Proteine spezifischen Antikörper.

Bei Sezernierung dieser Zytokine/Proteine wird ein Signal an der entsprechenden Koordinate erwartet.

5.16.7 Calcein-Freisetzungstest

Zur Detektion einer potentiellen Zytotoxizität von T-Zellen gegen Lymphomzellen wurde ein Calcein-Freisetzungstest durchgeführt. Hierfür wurde das Fluorescein-Derivat Calcein-Acetoxymethylester (Invitrogen) verwendet, welches durch die Zellmembran ins Zytosol der Zellen transportiert werden kann. Im Zellinneren wird die Acetoxymethylgruppe durch Esterasen abgespalten, was eine Komplexierung von Calcein mit Calciumionen und hierdurch eine grüne Fluoreszenz ermöglicht. Durch eine Lyse der Zellen wird der Komplex in den Kulturüberstand freigesetzt und kann hier durch ein Fluoreszenzsignal bei 535 nm (Anregungsmaximum 495 nm) detektiert werden.

Für diesen Test erfolgte zunächst eine Gradientenzentrifugation der T-Zellen und 291-Zellen um tote Zellen von lebenden zu trennen (Abschn. 5.13.2). Anschließend wurden die Zellen

dreimal mit Medium gewaschen. Danach wurden 1×10^6 Lymphomzellen ein bis zwei Stunden mit 10 µg Peptid in 1 mL T-Zellmedium im Brutschrank inkubiert (37°C, 7% CO₂, 4°C). Anschließend wurden 10 µL (10 µg/ml) Calcein-Acetoxymethylester zugefügt und die Zellen erneut für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach einem dreifachen Waschschrift (Zentrifugation bei $300 \times g$, 6 Minuten, 4°C) wurden die Lymphomzellen mit den T-Zellen in unterschiedlichen Effektor (T-Zellen) zu Zielzellen (Lymphomzellen) Verhältnissen (E:T-Verhältnis) in 96-Loch-Rundbodenplatten kokultiviert. Von den Lymphomzellen wurden immer $7,5 \times 10^4$ Zellen eingesetzt. In den verschiedenen Experimenten wurden zu diesen $7,5 \times 10^5$ (E:T = 10:1), $2,25 \times 10^5$ (E:T = 3:1) und $7,5 \times 10^4$ (E:T = 1:1) T-Zellen zugefügt und die Platte für drei Stunden im Brutschrank (37°C, 7 % CO₂) inkubiert. Als Kontrollen dienten Inkubationen der Lymphomzellen ohne T-Zellen (Spontanlyse), Inkubationen der Lymphomzellen mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 (Maximallyse) und Mediumkontrollen. Von jedem Ansatz und den Kontrollen wurden Triplikate angefertigt. Nach Inkubation wurden 150 µL Überstand abgenommen und die Fluoreszenz (Anr. 485nm, Emis.: 535nm, 1 s) gemessen (Wallac 1420 multilabel counter victor, Perkin Elmer).

5.17 Kultivierung von T-Zellen

Für die in vitro Kultivierung von T-Zellen wurden zunächst CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Mäusen, die gegen CD19 immunisiert worden waren, isoliert (Abschn. 5.15.4). Als Stimulator-Zellen während der T-Zellkultivierung wurden naive Milzzellen verwendet, die für ca. 2 Stunden mit einzelnen CD19-Peptiden im Brutschrank (37°C, 7 % CO₂, 99 % hum.) beladen worden waren. Hierzu wurden 10 µg Peptid auf 2×10^6 Milzzellen in 1 mL Medium eingesetzt. Nach Inkubation wurden die Milzzellen mit 33 Gy bestrahlt, um eine Proliferation der Milzzellen während der Kultivierung zu verhindern und danach dreimal mit Medium gewaschen, um überschüssiges MHC-ungebundenes Peptid wegzuwaschen. Anschließend wurden 1×10^6 T-Zellen mit $1 - 1,5 \times 10^6$ Milzzellen in 2 mL T-Zellmedium in einer 24-Loch-Platte kokultiviert. Nach ca. 24 Stunden wurden zu den Zellen 10 U/mL humanes Interleukin 2 (IL-2, Chiron-Novartis) gegeben. Die Zellen wurden nun 10 bis 11 Tage im Brutschrank kultiviert. Während dieser Zeit wurde an Tag 3 und 6 nach Kultivierungsbeginn frisches IL-2 zugefügt. Wenn die Zellen ausreichend dicht gewachsen waren, wurden sie 1:2 auf neue Löcher in der 24-Loch-Platte verteilt. Frisches Medium wurde zugefügt, sobald das alte Medium ein wenig gelb wurde. Hierzu wurde 1 mL des alten Mediums abgenommen und 1 mL frisches Medium mit 10 U/mL IL-2 zugefügt. Nach 10 bis 11 Tagen wurde mit einem

neuen Stimulationszyklus, wie oben beschrieben, begonnen. Die Überprüfung der Funktionalität der T-Zellen erfolgte mittels IFN- γ -ELISA- oder IFN- γ -ELISPOT-Analysen. Während der gesamten Kultivierung wurde ausschließlich T-Zellmedium verwendet und die Zellen im Brutschrank bei 37°C, 7 % CO₂ und 99 % Luftfeuchtigkeit kultiviert (Tabelle 2). Die auf diese Art generierte T-Zelllinie wurde nach ausreichender Proliferation mehrfach in Einfriermedium (90 % FCS, 10% DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

5.17.1 Injektion von T-Zellen

Zur Injektion von T-Zellen wurden CD4⁺ T-Zellen aus einer in vitro Kultur (Abschn. 5.17) und als Kontrolle naive CD4⁺ T-Zellen aus CD19-defizienten C57BL/6-Mäusen verwendet. Die naiven T-Zellen wurden mittels magnetischer Zellseparation isoliert (Abschn. 5.15.4). Vor Injektion erfolgte eine Gradientenzentrifugation, um lebende T-Zellen von toten zu separieren (Abschn. 5.13.2). Nach Trypanblau-Ausschlusszählung wurden schließlich 1×10^6 lebende Zellen in 100 μ L PBS den Mäusen intravenös injiziert.

5.17.2 Klonierung von murinen CD4⁺ T-Zellen

Um eine Kultur von T-Zellen zu erhalten, die nur eine Spezifität aufweisen und auch nur einen T-Zellrezeptor exprimieren, wurden die T-Zellen kloniert. Hierzu wurden T-Zellen, nachdem die T-Zelllinie ausreichend gut gewachsen war, in 96-Loch-Rundbodenplatten mit je 1×10^5 Peptid-beladenen Milzzellen, in 200 μ L T-Zellmedium, stimuliert. Hierzu wurden, wie unter Abschnitt 5.17 beschrieben, naive Milzzellen für 2 Stunden mit einem CD19-Peptid beladen, bei 33 Gy bestrahlt und anschließend dreimal gewaschen. Pro Loch wurden dann die Milzzellen vorgelegt und 3 bis 10 T-Zellen zugegeben. Im Gegensatz zur normalen Kultivierung wurde während der Klonierung direkt bei Stimulationsbeginn 10 U/mL IL-2 zugefügt. Zusätzlich wurde bei Stimulationsbeginn noch 5 ng/mL PMA (Sigma) und 0,669 μ M Ionomycin-Calcium-Salz (Iono, Sigma) eingesetzt. Nach 24 Stunden wurden 170 μ L Medium abgenommen und neues T-Zellmedium mit 10 U/mL IL-2 zugegeben. Nach 10 bis 11 Tagen Kultivierung wurde ein neuer Stimulationzyklus begonnen. Sobald die Zellen sich vermehrt hatten, wurden sie auf 96-Loch-Flachbodenplatten überführt. Nachdem diese dicht gewachsen waren, wurden die Zellen auf 48-Loch-Platten und schließlich nach ausreichender Proliferation auf 24-Lochplatten überführt.

5.17.3 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von RNA wurde das RNeasy Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

5.17.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte durch reverse Transkription mit der Superscript II Polymerase (Invitrogen) und Oligo-dT-Primern (Roche Diagnostics). Hierzu wurden 10 µg RNA zunächst mit 2 µL Oligo-dT-Primern (0,8 µg/µL) in 34 µL RNase-freiem DEPC-H₂O für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde der Mix sofort auf Eiswasser für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden 16 µL des RT-Mixes (Tabelle 11) zugefügt und alles bei 42°C für 60 Minuten inkubiert. Die so generierte cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 11: RT-Mix zur reversen Transkription

Komponente	Hersteller	Eingesetztes Volumen
dNTP-Mix (10 mM)	Invitrogen	2 µL
5 × Puffer	Invitrogen	10 µL
SuperScript (200U/µL)	Invitrogen	2 µL
DTT (0,1 M)	Invitrogen	2 µL

5.17.5 Analyse des T-Zellrezeptor-Repertoires

Die Analyse des T-Zellrezeptor-Repertoires erfolgte mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (Pannetier et al., 1993, Yoshida et al., 2000). In Tabelle 5 und Tabelle 6 sind die verwendeten Primer dargestellt. Als Positivkontrolle wurde die Aktin-cDNA amplifiziert. Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

Reaktionsansatz Vβ- und Vα-Kette:

cDNA	1 µL
Primer (100 µM)	1 µL
dNTP-Mix (10 mM)	1 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µL
Taq-Poly. (5 U/µL)	0,8 µL
Puffer (10 X)	5 µL
DMSO (100 %)	2,5 µL
Wasser	ad 50 µl

PCR-Programm für V β -Kette:

Denaturierung	94°C	1 Min.
Zyklische Denat.	94°C	70 s
Zyklische Hybrid.	60°C	60 s
Zyklische Verläng.	72°C	4 Min.
Verlängerung	72°C	10 Min.
Anzahl der Zyklen	40	

PCR-Programm für V α -Kette:

Denaturierung	94°C	1 Min.
Zyklische Denat.	94°C	70 s
Zyklische Hybrid.	55°C	60 s
Zyklische Verläng.	72°C	4 Min.
Verlängerung	72°C	10 Min.
Anzahl der Zyklen	40	

5.17.6 Molekulare Klonierung der T-Zellrezeptor-Gene des T-Zellklons 27.2 und Funktionalitätsanalyse

Die molekulare Klonierung der Gene des T-Zellrezeptors (TCR) aus dem T-Zellklon 27.2 wurde in Kooperation von Elisa Kieback (AG Wolfgang Uckert, Max-Delbrück-Centrum Berlin) durchgeführt. Zur Analyse der Funktionalität (Ebenfalls von Elisa Kieback durchgeführt) des TCR wurden naive T-Zellen retroviral mit den alpha- und beta-Ketten des TCR transduziert. 5×10^4 transduzierte T-Zellen wurden anschließend mit 5×10^4 Milzzellen unter Anwesenheit des CD19-Peptids 27 in verschiedenen Konzentrationen kokultiviert (ca. 20 h). Ebenso wurden die T-Zellen mit primären CD19-positiven Lymphomzellen stimuliert. Als Negativkontrolle dienten Kokultivierung ohne Peptid, mit einem irrelevanten Peptid (OVA2) und eine Kultivierung der T-Zellen ohne Milzzellen. Für die Positivkontrolle wurden die T-Zellen mit 5 ng/mL Phorbol-12-myristat-13-acetat und 0,669 μ M Ionomycin-Calcium-Salz stimuliert. Die Sezernierung von Interferon- γ wurde in 50 μ L Überstand mittels eines ELISA gemessen.

5.17.7 Statistik

Alle Überlebenskurven wurden nach der Kaplan-Meier-Methode mit dem Programm GraphPad Prism 5 ausgewertet. Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte nach dem Log-Rank-Test.

6 Ergebnisse

6.1 Mäuse transgen für humanes *c-MYC*

Ziel dieser Arbeit ist es, Mausmodelle zu etablieren, in denen eine T-Zelltherapie sowie eine Therapie mit T-Zellrezeptor-Genen für maligne B-Zell-Erkrankungen analysiert werden kann. Ein interessantes Zielantigen für eine solche Therapie ist das humane *c-MYC*-Protein.

Zur Analyse einer Therapie mit T-Zellen, die hoch-affin das humane *c-MYC*-Protein erkennen, ist es jedoch notwendig, einen Mausstamm zu verwenden, der in jeder Zelle das humane *c-MYC*, anstelle des murinen *c-MYC*-Proteins, unter der Kontrolle muriner regulatorischer Elemente exprimieren kann. Dieser Mausstamm wird folgend als *hc-Myc* (humanisiertes *c-Myc*) bezeichnet.

6.1.1 Targeting Strategie

Zur Generierung des *hc-Myc*-Mausstamms wurde die kodierende Sequenz des murinen *c-Myc*-Gens, vom CTG-Startcodon in Exon 1 bis einschließlich zum Stoppcodon (TAA) in Exon 3 durch die entsprechende humane Sequenz ersetzt, so dass wichtige regulatorische Elemente stromaufwärts (5') von CTG und stromabwärts (3') des Stoppcodons, darunter die Promotoren P1 und P2, eine murine Sequenz aufweisen und somit eine normale Regulation des *hc-Myc*-Gens in Mäusen ermöglichen. Dies gewährleistet ebenfalls, dass beide humanen *c-MYC*-Proteine, *c-MYC1* vom alternativen CTG-Startcodon in Exon1 und *c-MYC2* vom ATG-Startcodon in Exon2, exprimiert werden können.

Abbildung 6 illustriert die Targeting Strategie. Aus technischen Gründen geht die humane Sequenz allerdings in 3'-Richtung noch 69 bp über das Stoppcodon hinaus. Ebenfalls aus technischen Gründen wurden humane Intronsequenzen verwendet.

Die humane Sequenz des Targeting-Konstrukts ist mit homologen Armen flankiert, die die exakte Integration in den murinen *c-Myc*-Lokus ermöglichen. Als Selektionsmarker diente ein mit loxP-Stellen flankiertes Neomycin-Geneticin-Resistenzgen in Intron 1 sowie ein Gen für die Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-TK), außerhalb der Arme für die homologe Rekombination. Im Gegensatz zum Neomycin-Geneticin-Resistenzgen (Neo), integriert das HSV-TK-Gen bei homologer Rekombination nicht in den murinen *c-Myc*-Lokus. Da das Neo-Gen durch loxP-Stellen flankiert ist, kann es, nach homologer Rekombination, in Mäusen mittels der Cre-Rekombinase deletiert werden.

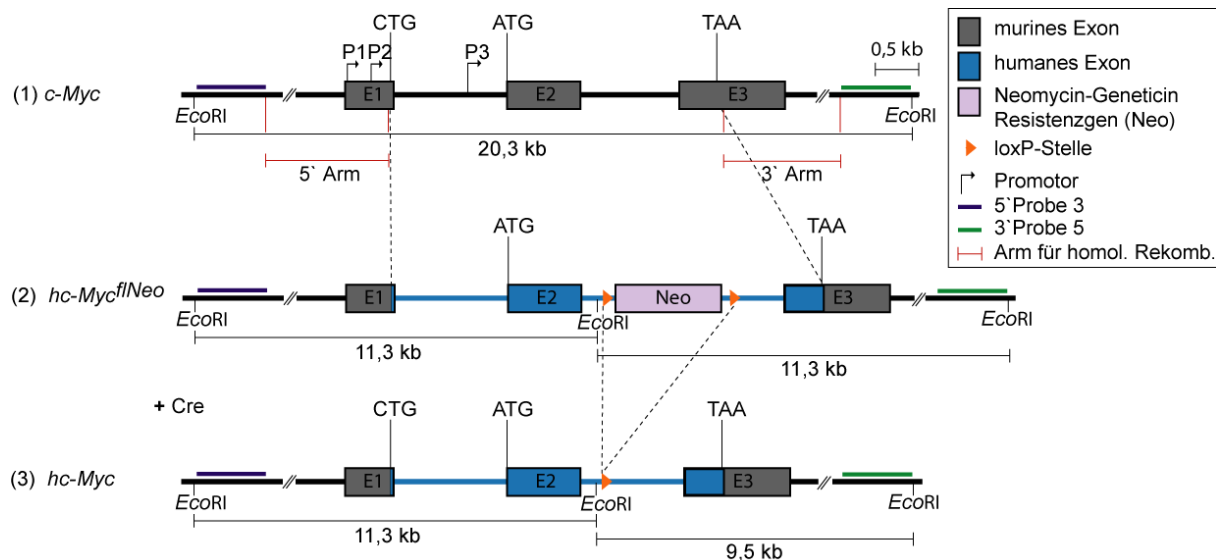


Abbildung 6: Targeting Strategie zur Generierung der hc-Myc-Mäuse.

Das endogene murine *c-Myc*-Gen wurde durch ein *c-Myc*-Gen ersetzt, bei welchem die kodierenden Regionen sowie die Introns humane Sequenzen aufweisen und die regulatorischen Regionen stromaufwärts (5') des CTG-Startcodons und stromabwärts (3') des Stoppcodons (TAA) aus murinen Sequenzen bestehen. (1) Der endogene murine *c-Myc*-Lokus mit den drei Exons des *c-Myc*-Gens sowie den 3 Promotoren (P1, P2 und P3), den beiden Startcodons (CTG und ATG) und dem Stoppcodon (TAA) sowie den beiden flankierenden *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen. (2) Der *c-Myc*-Lokus nach homologer Rekombination mit dem Targeting-Konstrukt. (3) Der *c-Myc*-Lokus nach homologer Rekombination und Deletion des Neomycin-Geneticin-Resistenzgens durch die Cre-Rekombinase. Die gestrichelten Linien stellen die homologe Rekombination dar. Die schematische Darstellung zeigt die *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen, die für die Southern-Blot-Strategie verwendet wurden sowie die Lokalisation der verwendeten Southern-Blot Sonden (3' Probe 5 und 5' Probe 3) und die erwartete Größe der DNA-Fragmente nach *EcoRI*-Restriktion. Cre (Cre-Rekombinase), Neo (Neomycin-Geneticin-Resistenzgen).

Für die Generierung der transgenen Mäuse waren fünf Schritte notwendig. Zunächst musste das Targeting-Konstrukt kloniert werden, mit welchem dann (2) embryonale Stammzellen (ES) des Typs Bruce4 transfiziert wurden. Nach Identifizierung von ES-Zellklonen, die eine homologe Rekombination aufwiesen, wurden diese als nächstes (3) in Blastozysten von Balb/c-Mäusen injiziert, um chimäre Mäuse zu generieren. Nachdem dies erfolgreich war, mussten (4) die chimären Mäuse mit C57BL/6 Wildtyp-Mäusen gekreuzt werden, um den transgenen C57BL/6 hc-Myc-Mausstamm zu etablieren. Schließlich wurde dann (5) das Neomycin-Geneticin-Resistenzgen durch Verpaarung der hc-Myc-Mäuse mit einem C57BL/6 Deleter-Cre-Mausstamm, der die Cre-Rekombinase schon in einem frühen embryonalen Stadium exprimiert, deletiert. Anschließend wurde aus den hc-Myc-Mäusen für die Experimente das *Cre*-Allel herausgekreuzt und die Mäuse homozygot für das *hc-Myc*-Allel verpaart.

6.1.2 Generierung von hc-Myc transgenen ES-Zellen

Nach Klonierung und Transfektion von ES-Zellen (In Abschnitten 5.12.2.1 und 5.14.3 beschrieben), wurden stabil transfizierte ES-Zellklone mittels G418 und Ganciclovir selektiert (Abschnitt 5.14.4). Einzelne ES-Zellklone wurden weiter expandiert und für zusätzliche Analysen verwendet. Zur Identifizierung von Klonen, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hatte, wurde eine Southern-Blot-Strategie durchgeführt (Abschnitt 5.14.6). Diese Strategie basiert auf einem Restriktionsverdau genomischer DNA der ES-Zellen mit dem Enzym *EcoRI*. Der endogene murine *c-Myc*-Lokus ist von zwei *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen flankiert (Abbildung 6). Für diesen Lokus liefert ein *EcoRI*-Restriktionsverdau ein DNA-Fragment von ca. 20,3 kb. Durch die homologe Rekombination wurde in den *c-Myc*-Lokus allerdings eine zusätzlich interne *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle integriert (Abbildung 6). Ein Restriktionsverdau des rekombinierten Lokus liefert somit zwei Fragmente: ein Fragment 5' (5' Fragment) von der internen *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle sowie ein weiteres 3'gelegenes Fragment (3'Fragment). Beide Fragmente weisen eine Größe von ca. 11,3 kb auf und können mit spezifischen Sonden im Southern-Blot von dem großen Fragment (20,3 kb) für das Wildtyp-Allel unterschieden werden. Im Southern-Blot wurde je eine Sonde für das 5'Fragment (Sonde: 5'Probe 3) und eine weitere für das 3'Fragment (Sonde: 3'Probe 5) verwendet. Abbildung 7 A (5'Probe 3) und B (3' Probe 5) zeigen, dass die ES-Klone 1, 14, 18 und 19 in einem Allel eine homologe Rekombination aufweisen. Mit beiden Sonden konnte jeweils eine Bande für das Wildtyp-Allel (wt; 20,3 kb) und je eine für ein Fragment des rekombinierten Allels (rek.; 11,3 kb) detektiert werden. Insgesamt konnten mit dem Southern-Blot 27 ES-Zellklone identifiziert werden, in denen in einem Allel das endogene murine *c-Myc*-Gen durch das *hc-Myc*-Gen mittels homologer Rekombination ersetzt wurde.

Um die Pluripotenz der ES-Zellen durch zu lange Kultivierung und erneute Transfektion nicht negativ zu beeinflussen, sollte das Neomycin-Geneticin-Resistenzgen erst in vivo in der transgenen Maus durch Verpaarung mit einem Mausstamm, der die Cre-Rekombinase schon in einem frühen embryonalen Stadium exprimiert, deletiert werden. Allerdings wurde die Funktionalität der Cre-vermittelten Deletion des Resistenzgens in den ES-Zellklone 1, 14, 18 und 19 durch Transfektion mit einem Plasmid, welches für die Cre-Rekombinase kodiert (Abschnitt 5.14.8), getestet. Durch die Deletion dieses Resistenzgens verkleinert sich das 3'Fragment im Southern-Blot auf ca. 9,5 kb (Abbildung 6). In Abbildung 7 C ist zu sehen, dass alle vier ES-Zellklone nach Transfektion ein 3'Fragment von ca. 9,5 kb aufwiesen, im

Gegensatz zu der nicht transfizierten Kontrolle (Klon18 ohne Cre). Somit ist die Deletion des Resistenzgens möglich.

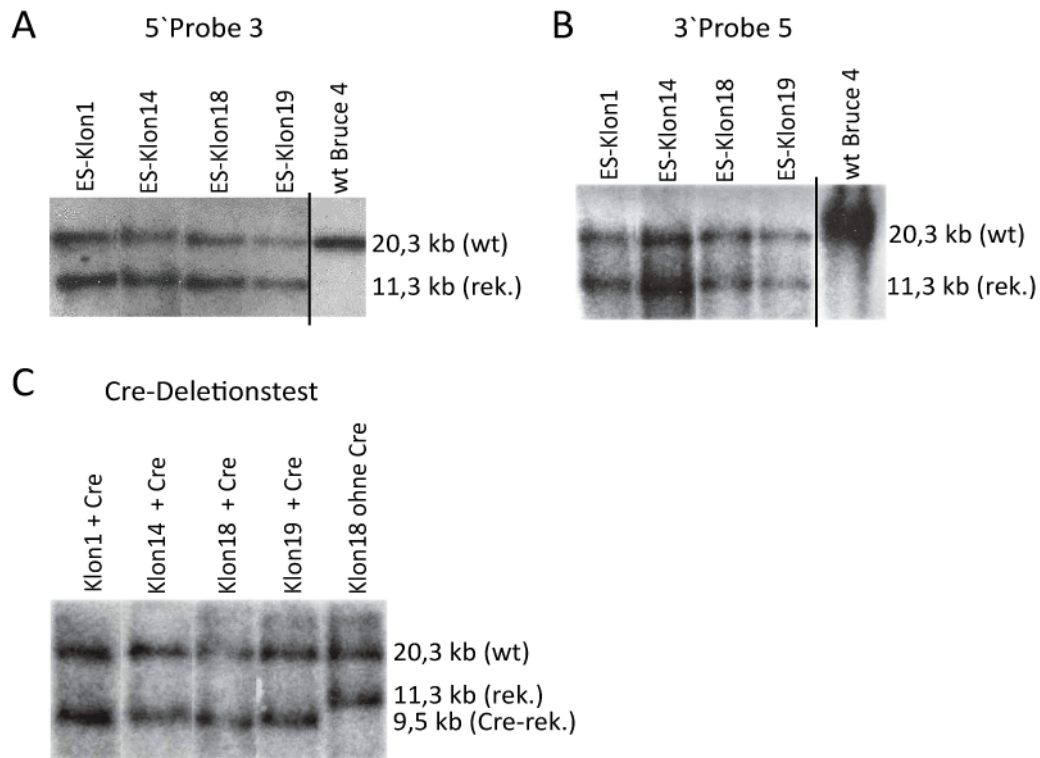


Abbildung 7: Southern-Blot-Analyse von Wildtyp-ES-Zellen und stabil transfizierten ES-Zellklonen.

Abbildungen A und B zeigen die Integration des Targeting-Konstrukts über homologe Rekombination in den murinen *c-Myc*-Lokus. Genomische DNA wurde aus den ES-Zellklonen 1, 14, 18 und 19 sowie aus Wildtyp-ES-Zellen (wt Bruce4) mittels des Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und mit den radioaktiv markierten Sonden 5' Probe 3 (A) und 3' Probe 5 (B) im Southern-Blot analysiert. (wt) Fragment für den endogenen murinen *c-Myc*-Lokus; (rek.) Fragment für den rekombinierten *c-Myc*-Lokus. (C) Southern-Blot Nachweis der Funktionalität der Deletion des Neomycin-Geneticin-Resistenzgens durch die Cre-Rekombinase in den ES-Zellklonen 1, 14, 18 und 19. Hierzu wurden die ES-Zellklone mit einem Plasmid, das für die Cre-Rekombinase kodiert, transfiziert (Klon1 bis 14 + Cre). Anschließend wurde, nach Restriktionsverdau mit *EcoRI*, die genomische DNA der Zellen im Southern-Blot mit der radioaktiv markierten Sonde 3' Probe 5 analysiert. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte ES-Zellen verwendet (Klon18 ohne Cre). (Cre-rek.) Rekombinierter *c-Myc*-Lokus nach Deletion des Neomycin-Geneticin Resistenzgens durch die Cre-Rekombinase.

Bevor die ES-Zellklone für die Generierung transgener Mäuse verwendet wurden, wurde zusätzlich überprüft, ob diese tatsächlich das humane c-MYC-Protein exprimieren. Hierfür wurden Zellextrakte aus den ES-Zellklonen 1, 14, 18 und 19 generiert (Abschnitt 5.14.9) und für eine Western-Blot-Analyse verwendet (Abschnitt 5.14.11). Als Positivkontrolle für humanes c-MYC wurden auch Proteinextrakte aus der humanen lymphoblastoiden Zelllinie LCL 1.11 generiert. Mittels eines Antikörpers, der spezifisch für humanes c-MYC ist, konnte

in allen vier Klonen die Expression des humanen Proteins nachgewiesen werden (Abbildung 8, Bande bei ca. 64 kDa).

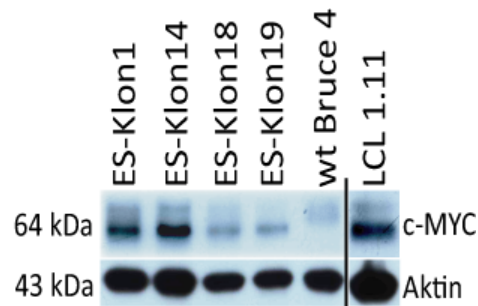


Abbildung 8: Western-Blot-Analyse der Expression des humanen c-MYC-Proteins in ES-Zellen.

Hierfür wurden Proteinextrakte aus ES-Zellklonen (1, 14, 18 und 19), Wildtyp-ES-Zellen (wt Bruce4) und aus der humanen LCL 1.11 (Positivkontrolle) generiert. Die Detektion des humanen c-MYC-Proteins (ca. 64 kDa) erfolgte mittels des spezifischen Antikörpers Y69. Als Ladekontrolle wurde murines Aktin (ca. 43 kDa) detektiert. Dieser Western-Blot wurde mehrfach durchgeführt.

In Wildtyp-ES-Zellen konnte erwartungsgemäß keine Expression des humanen c-MYC-Proteins detektiert werden. Allerdings scheint der Antikörper auch unspezifisch ein anderes Protein gebunden zu haben, vermutlich das murine c-MYC, was an einer schwachen Bande in der Wildtyp-Kontrolle ersichtlich ist (siehe Abbildung 8, wt Bruce4). Diese lief aber etwas höher als die Bande für das humane Protein. Zudem zeigten die ES-Zellklone 1 und 14 eine stärkere Expression des humanen Proteins als die Klone 18 und 19. Zur Kontrolle einer gleichen Ladung wurde im Western-Blot zusätzlich ein für Aktin spezifischer Antikörper verwendet (Bande bei ca. 43 kDa). Die Aktin-Banden zeigen eine etwas schwächere Ladung der Geltaschen für die ES-Klone 18 und 19, was zum Teil die schwächere Bande für das humane c-MYC-Protein erklären könnte.

Nachdem nachgewiesen worden war, dass die ES-Zellklone 1, 14, 18 und 19 das *hc-Myc*-Allel über homologe Rekombination integriert haben sowie das humane c-MYC-Protein exprimieren und nachdem die Funktionalität der Cre-Deletion überprüft worden war, wurden zusätzlich noch die Exons des *hc-Myc*-Gens in den Klonen 1 und 14 sequenziert, um Punktmutationen in der kodierenden Sequenz auszuschließen. Hierfür wurden alle drei Exons amplifiziert und anschließend sequenziert. Da die Sequenzen keine Abweichungen von den Sollsequenzen aufwiesen, wurden die ES-Klone 1 und 14 für die Injektion in Balb/c-Blastozysten verwendet.

6.1.3 Generierung des transgenen hc-Myc-Mausstamms

Die Generierung der hc-Myc-Mäuse erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Entwicklungsgenetik des Helmholtz Zentrums München.

Hierfür wurden die ES-Zellklone 1 und 14 expandiert und in Blastozysten der Balb/c-Mäuse injiziert, welche darauffolgend in scheinschwangere Balb/c-Mäuse implantiert wurden. Aus beiden Klonen konnten chimäre Mäuse generiert werden (Abbildung 9 A), wobei der Chimärismus der Mäuse, die von Klon 14 abstammten, höher war und auch nur diese Chimären transgene Nachkommen lieferten.

Zur Etablierung des hc-Myc-Mausstamms wurden die chimären Tiere mit Wildtyp-C57BL/6-Mäusen verpaart. Eine Bestimmung des genetischen Hintergrunds der Nachkommen war anhand der Fellfarbe möglich, da Mäuse, die von Balb/c-Keimzellen, abstammen, eine braune Fellfarbe aufweisen müssen. Haben sich allerdings die transgenen ES-Zellen auch zu Keimzellen entwickelt, treten auch Nachkommen auf, die eine schwarze Fellfarbe aufweisen. Zusätzlich zur Fellfarbe wurden die Genotypen der Nachkommen auch mittels einer PCR kontrolliert. Abbildung 9 B zeigt ein Beispiel für eine solche PCR. Die Bande für das *hc-Myc*-Allel läuft bei ca. 800 bp, während die PCR für das murine *c-Myc*-Allel (mu. *c-Myc*) ein Fragment mit einer Größe von ca. 1000 bp liefert. So kann in der PCR leicht zwischen heterozygoten Mäusen (*hc-Myc*^{+/-}) und Mäusen, die homozygot für das Wildtyp-Allel (murines *c-Myc*; C57BL/6 wt) oder das *hc-Myc*-Allel (*hc-Myc*^{+/+}) sind, unterschieden werden. Abbildung 9 B zeigt auch, dass es möglich ist, Mäuse zu erhalten (*hc-Myc*^{+/+}), die homozygot für das *hc-Myc*-Allel sind und somit kein endogenes murines *c-Myc*-Gen mehr aufweisen.

Zusätzlich wurde in Mäusen, die homozygot für das *hc-Myc*-Allel sind, untersucht, ob diese das humane c-MYC-Protein exprimieren. Hierfür wurden Proteinextrakte aus Milzzellen der Mäuse und als Positivkontrolle Proteinextrakte aus dem ES-Zellklon 14 im Western-Blot analysiert. Abbildung 9 C zeigt, dass in den Milzzellen der hc-Myc-Mäuse (*hc-Myc*^{+/+}) das humane Protein auch tatsächlich exprimiert wurde, welches in Zellen der Wildtyp-C57BL/6-Mäusen nicht zu finden war.

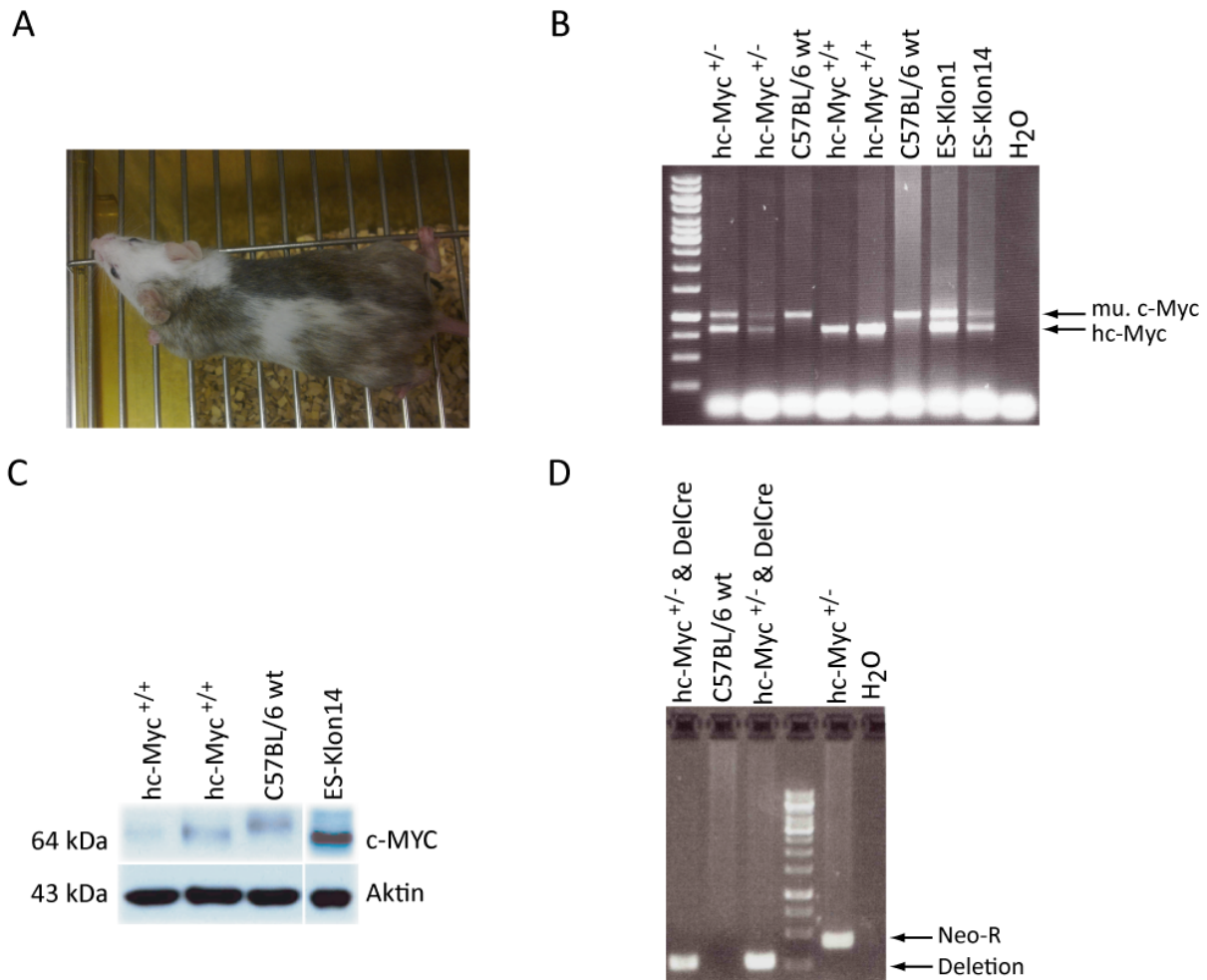


Abbildung 9: Etablierung des hc-Myc-Mausstamms.

(A) Chimäre Maus (60-70 % Chimarismus), die durch Injektion von Zellen des ES-Klons 14 in Balb/c-Blastozysten generiert wurde. (B) Chimäre Mäuse wurden mit Wildtyp-C57BL/6-Mäusen verpaart. Nach Genotypisierung mittels PCR-Analyse wurden Nachkommen untereinander verpaart, um Mäuse zu erhalten, die homozygot für das *hc-Myc*-Allel sind. Dargestellt ist eine PCR-Analyse der Genotypen dieser Nachkommen. Zur Kontrolle wurde auch eine PCR-Analyse mit genomischer DNA aus den ES-Zellklonen 1 und 14 durchgeführt. (mu.c-Myc) Bande für das murine *c-Myc*-Allel (ca. 1000 bp); (*hc-Myc*) Bande für das humanisierte *c-Myc*-Allel (ca. 800 bp). (C) Western-Blot-Analyse der Expression des humanen c-MYC-Proteins (ca. 64 kDa) in Wildtyp-C57BL/6 Mäusen und Mäusen, die homozygot für das *hc-Myc*-Allel sind. Hierfür wurden Proteinextrakte aus Milzzellen im Western-Blot analysiert. Proteinextrakte aus dem ES-Klon 14 wurden als Positivkontrolle verwendet. Zur Ladekontrolle wurde Aktin im Western-Blot detektiert (ca. 43 kDa). Der Western-Blot wurde zweimal durchgeführt. (D) PCR-Analyse der in vivo Deletion des Neomycin-Geneticin-Resistenzgens. Hierfür wurden *hc-Myc*-Mäuse mit Deleter-Cre-Mäusen verpaart, die ab einem frühen embryonalen Stadium die Cre-Rekombinase exprimieren. (Neo-R) Bande für die Neomycin-Geneticin-Resistenz (ca. 430 bp); (Deletion) Bande für die Deletion der Neomycin-Geneticin-Resistenz (ca. 300 bp).

Zur Deletion des Neomycin-Geneticin-Resistenzgens wurden *hc-Myc*-Mäuse mit Deleter-Cre-Mäusen gekreuzt. Diese Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase schon ab einem sehr frühen embryonalen Stadium. Nachkommen dieser Verpaarung, die ein Allel für die Cre-Rekombinase aufweisen, sollten das Resistenzgen im Genom deletiert haben. Mittels einer PCR-Analyse von genomischer DNA aus dem Mausschwanz wurde dies kontrolliert

(Abbildung 9 D). Bei Deletion des Resistenzgens liefert die PCR eine Bande bei ca. 300 bp, wobei die PCR bei Anwesenheit des Resistenzgens ein DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 430 bp amplifiziert. Wenn kein *hc-Myc*-Gen vorhanden ist, amplifiziert die PCR kein DNA-Fragment. In Abbildung 9 D ist zu erkennen, dass die Deletion bei den Mäusen, die das *hc-Myc*-Allel und das Allel für die Cre-Rekombinase aufwiesen (*hc-Myc*^{+/-} & DelCre), erfolgreich war.

6.1.4 Transgene *hc-Myc*-Mäuse weisen einen normalen Phänotyp auf

Bevor die *hc-Myc*-Mäuse als Modell für eine T-Zelltherapie verwendet werden können, muss die Frage beantwortet werden, ob das *hc-Myc*-Gen das endogene murine *c-Myc*-Gen vollständig ersetzen kann. Die Deletion des murinen *c-Myc*-Gens ist normalerweise embryonal letal (Davis et al., 1993). Da aus Verpaarungen der *hc-Myc*-Mäuse allerdings auch Mäuse hervorgegangen sind, die homozygot für das *hc-Myc*-Allel sind, somit kein murines c-MYC mehr exprimieren, folgt daraus, dass das humane c-MYC-Protein das murine mindestens teilweise ersetzen kann (Abbildung 9).

Experimente, in denen die Expression des murinen *c-Myc*-Gens reduziert wurde, haben allerdings auch einen Zusammenhang zwischen der Körpergröße, der Größe aller Organe und der Proliferation von Lymphozyten mit der Höhe der c-MYC-Expression gezeigt (Trump et al., 2001). Aus diesem Grund wurden Mäuse, die homozygot für das *hc-Myc*-Allel sind (BL6 *hc-Myc*^{+/+}) sowie heterozygote *hc-Myc*-Mäuse (BL6 *hc-Myc*^{+/-}) und gleich alte Wildtyp-Mäuse (BL6 wt) auf diese Parameter hin untersucht. Abbildung 10 A zeigt den geöffneten Bauchraum von Beispieltieren. Zwischen den einzelnen Mäusen war optisch kein Unterschied zu erkennen. Ebenso zeigten Vergleiche des Körpergewichts (Abbildung 10 B) keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mäusen. Die arithmetischen Mittelwerte waren bei Mäusen, die homozygot für das *hc-Myc*-Allel sind, fast identisch zu den Wildtyp-Mäusen.

Zusätzlich wurden die Milz, beide Nieren und die Leber der Mäuse gewogen. In Abbildung 11 A und B ist zu sehen, dass es auch nur minimale Abweichungen im Milzgewicht zwischen homozygoten und heterozygoten *hc-Myc*-Mäusen sowie Wildtyp-Tieren gab. Abbildungen C und D zeigen, dass es ebenfalls keine signifikanten Abweichungen im Gewicht beider Nieren sowie im Gewicht der Leber gab.

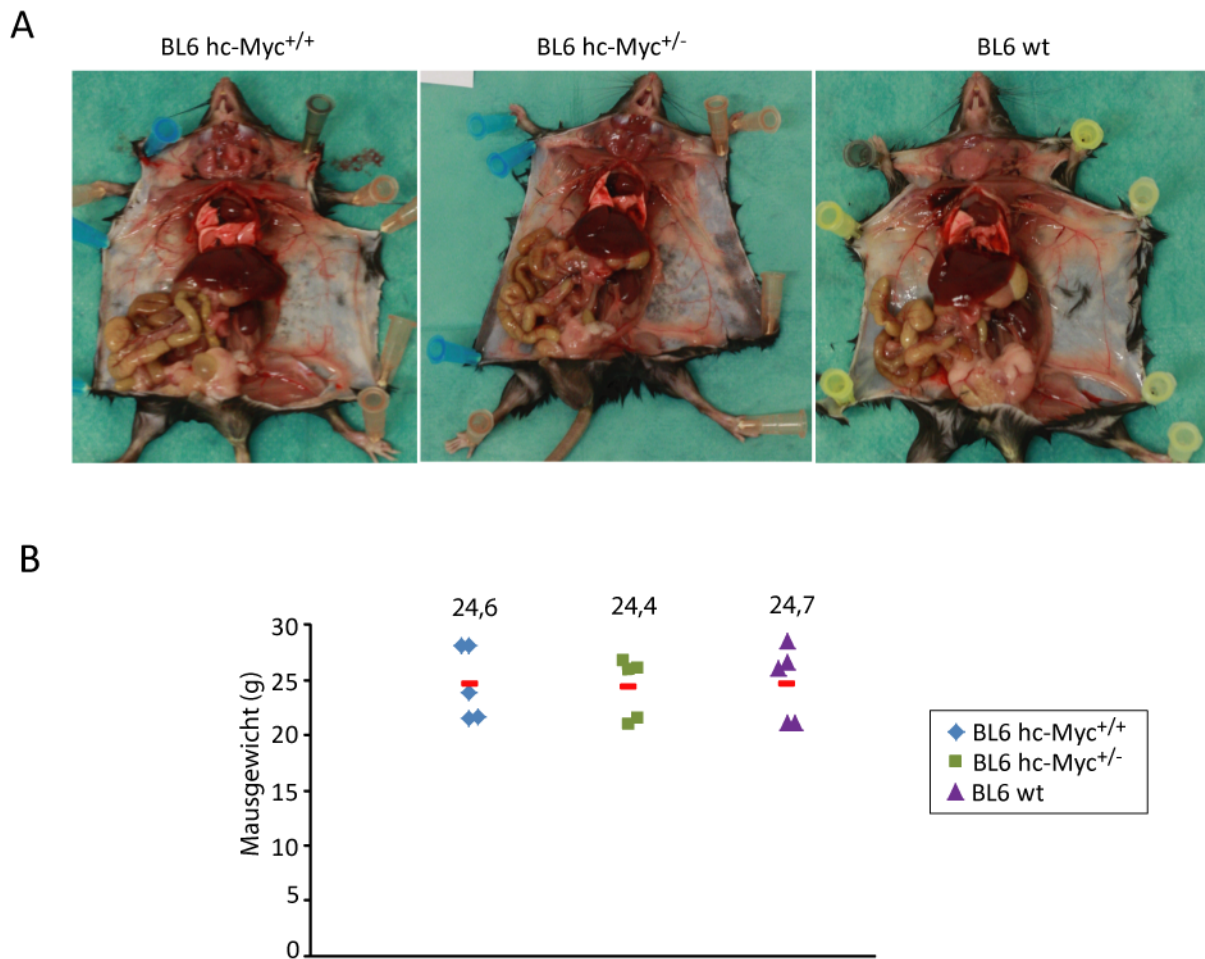


Abbildung 10: hc-Myc-Mäuse haben kein vermindertes Gewicht.

Mäuse, die homozygot (BL6 hc-Myc^{+/+}, n=5) sowie heterozygot (BL6 hc-Myc^{+/-}, n=5) für das *hc-Myc*-Allel sind und Wildtyp-C57BL/6 Mäuse (BL6 wt, n=5) wurden im Alter von 10-11 Wochen analysiert. (A) Innere Organe in BL6 wt-, BL6 hc-Myc^{+/+}- und BL6 hc-Myc^{+/-}-Mäusen. (B) Analyse des Körpergewichts von BL6 wt-, BL6 hc-Myc^{+/+}- und BL6 hc-Myc^{+/-}-Mäusen. Jedes Symbol repräsentiert das Gewicht einer Maus. Es wurden pro Genotyp je drei Männchen und zwei Weibchen verwendet. Das durchschnittliche Gewicht ist mit einem roten Balken dargestellt und über den Symbolen angegeben.

Zur Analyse der Zellzahlen in lymphatischen Organen wurden zunächst die Milz, inguinale Lymphknoten und das Knochenmark aus dem Schienbeinknochen präpariert. Nach Generierung von Zellsuspensionen wurden die Gesamt-Zellzahlen durch Zählung mit einer Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil an lebenden B220-positiven und CD3-positiven Zellen bestimmt, womit schließlich deren Zellzahl berechnet wurde. B220 ist ein Marker der von B-Lymphozyten exprimiert wird, während CD3 ein Marker für T-Lymphozyten ist.

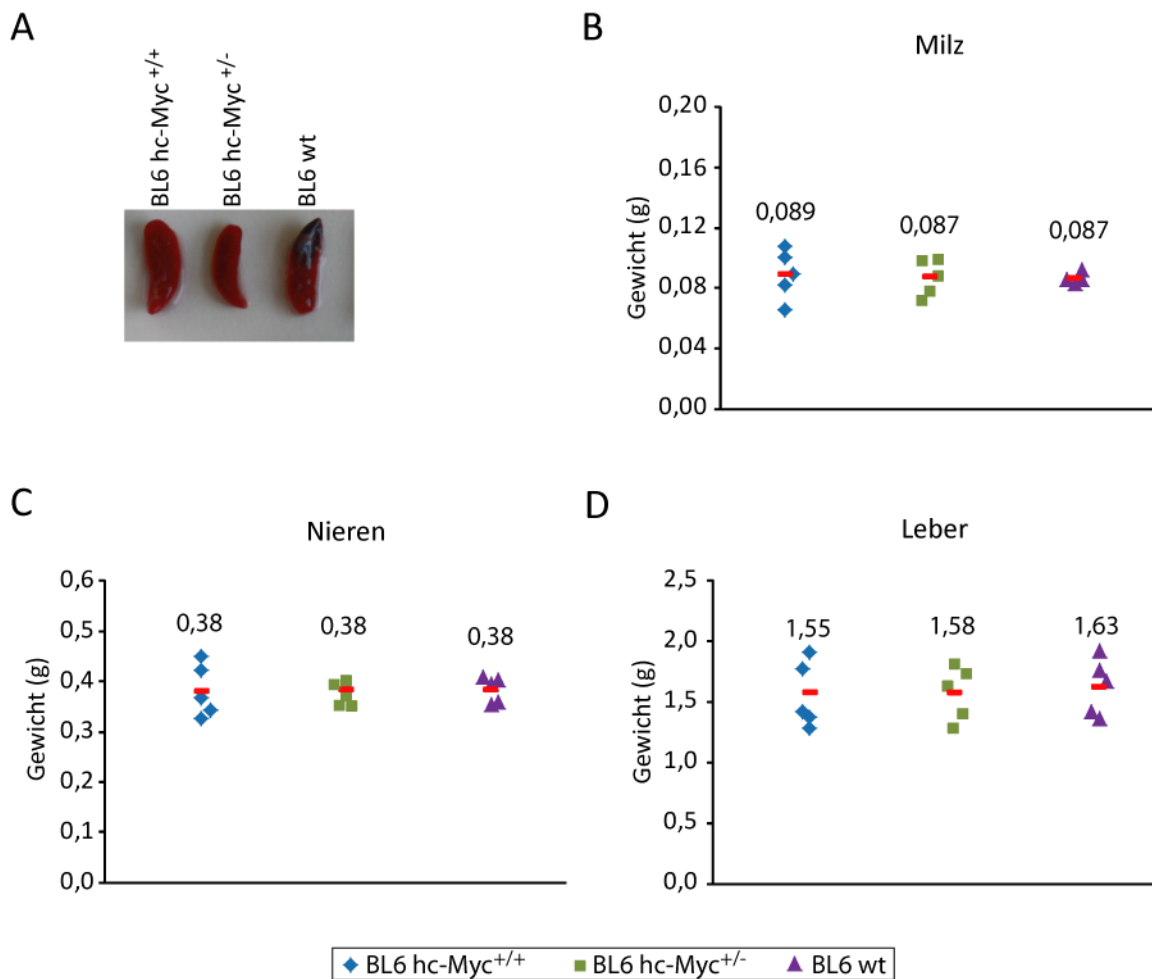
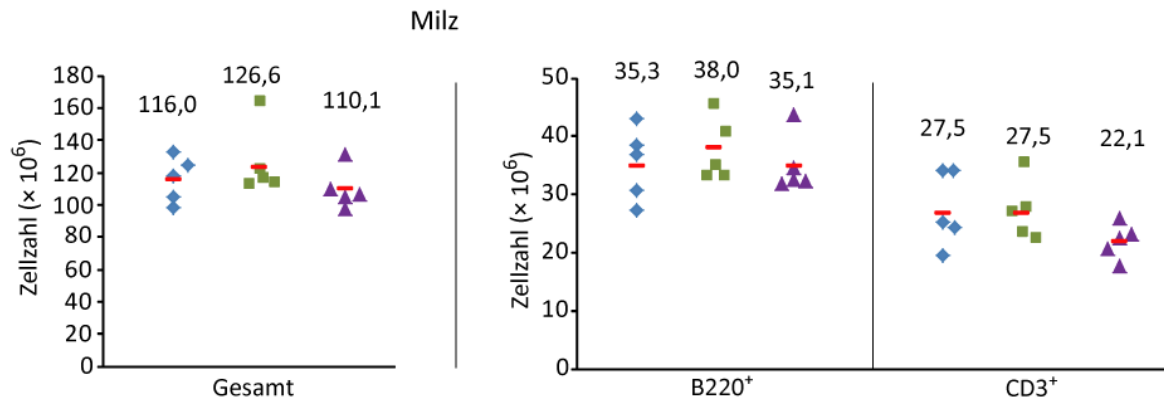


Abbildung 11: Transgene hc-Myc-Mäuse haben kein verändertes Organgewicht.

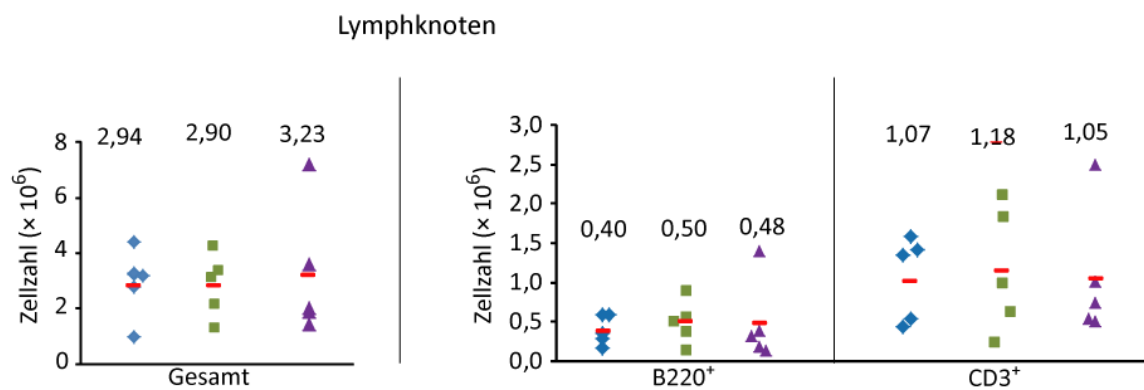
Untersucht wurden zehn bis elf Wochen alte Wildtyp-Mäuse (BL/6 wt, n=5) und Mäuse, die homozygot (BL6 hc-Myc^{+/+}, n=5) und heterozygot für hc-Myc (BL6 hc-Myc^{+/-}, n=5) sind. Für die Analysen wurden je drei Männchen und zwei Weibchen verwendet. (A) Milzfotos von BL6 wt-, BL6 hc-Myc^{+/+}- und BL6 hc-Myc^{+/-}-Mäusen. (B) Milzgewichte der Mäuse. (c) Gewicht beider Nieren der einzelnen Mäuse. (D) Lebergewicht der Mäuse. Jedes Symbol repräsentiert das Organgewicht einer Maus. Durchschnittswerte sind durch rote Balken dargestellt und über den Symbolen angegeben.

In Abbildung 12 A ist zu sehen, dass es minimal erhöhte Gesamt-Zellzahlen und T-Zellzahlen (CD3⁺) in der Milz von Mäusen homozygot oder heterozygot für das *hc-Myc*-Allel gab. Allerdings ist diese Abweichung nicht signifikant und liegt noch innerhalb der gewöhnlichen Variation. Die Anzahl an B-Zellen (B220⁺) war in der Milz homozygoter hc-Myc-Mäuse fast identisch zu Wildtyp-Mäusen. Nur in heterozygoten Mäusen war die B-Zellzahl ein wenig erhöht, jedoch ebenfalls nicht in signifikantem Maße. Ebenso gab es nur kleine, nicht signifikante Abweichungen in der Gesamtzellzahl, in der Zahl der B- oder T-Zellen in den inguinalen Lymphknoten (Abbildung 12 B) sowie in den Zellzahlen des Knochenmarks (Abbildung 12 C).

A



B



C

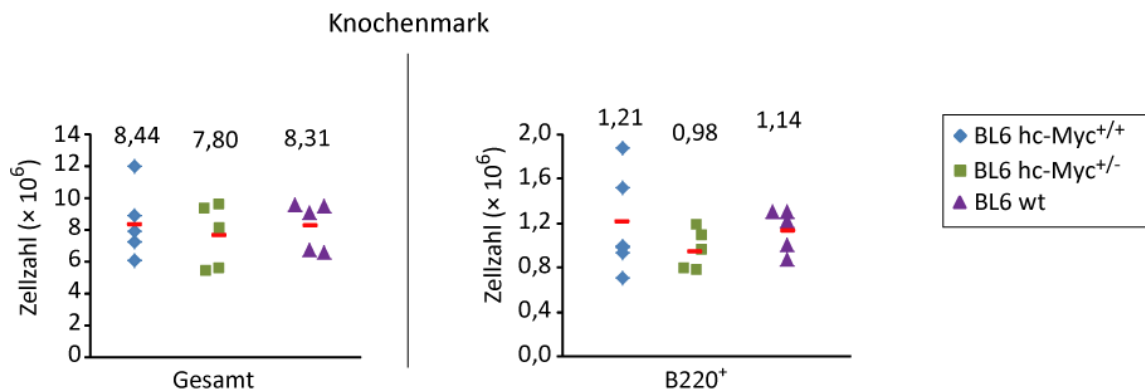


Abbildung 12: B- und T-Zellzahlen transgener hc-Myc-Mäuse.

Mäuse, die homozygot (BL6 hc-Myc^{+/+}) sowie heterozygot (BL6 hc-Myc^{+/-}) für das *hc-Myc*-Allel sind, wurden im Alter von 10-11 Wochen analysiert. Als Kontrollgruppe wurden C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (BL6 wt) analysiert. (A) Dargestellt sind die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl an B220-positiven B-Zellen (B220⁺) und CD3-positiven T-Zellen (CD3⁺) in der Milz einzelner Mäuse. (B) Darstellung der Gesamt-, B- und T-Zellzahlen für beide inguinale Lymphknoten. (C) Gesamtzellzahl und Zellzahl B220-positiver B-Zellen im Knochenmark des Schienbeinknochens. Die Zellzahlen der Organe einer Maus sind jeweils durch ein Symbol dargestellt. Durchschnittswerte sind mit roten Balken markiert und über den Symbolen angegeben. Anzahl der Versuchstiere: jeweils drei Männchen und zwei Weibchen.

Als zusätzlicher Punkt wurde analysiert, ob B-Zellen aus Mäusen, die homozygot für *hc-Myc* sind, *in vitro* nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) oder einem anti-CD40-Antikörper (α -CD40) und IL-4 proliferieren. Hierzu wurden zunächst B-Zellen mittels magnetischer Zellseparation aus der Milz isoliert, anschließend mit 5-(und 6)-Carboxy-Fluoreszin-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) angefärbt und dann *in vitro* über 5 Tage mit den erwähnten Stimulanzen inkubiert. Eine Abnahme des CFSE-Signals zeigt eine Proliferation der Zellen. Als Kontrolle dienten Wildtyp-C57BL/6 Mäuse sowie Kulturen der B-Zellen ohne Stimulus. In Abbildung 13 ist das Ergebnis dieser Analyse dargestellt. Diese Abbildung zeigt für Tag 3 nach Stimulationsbeginn, dass die B-Zellen der homozygoten *hc-Myc*-Mäuse nach *in vitro* Stimulation mit LPS oder α -CD40/IL-4 genauso stark proliferierten wie Wildtyp-B-Zellen.

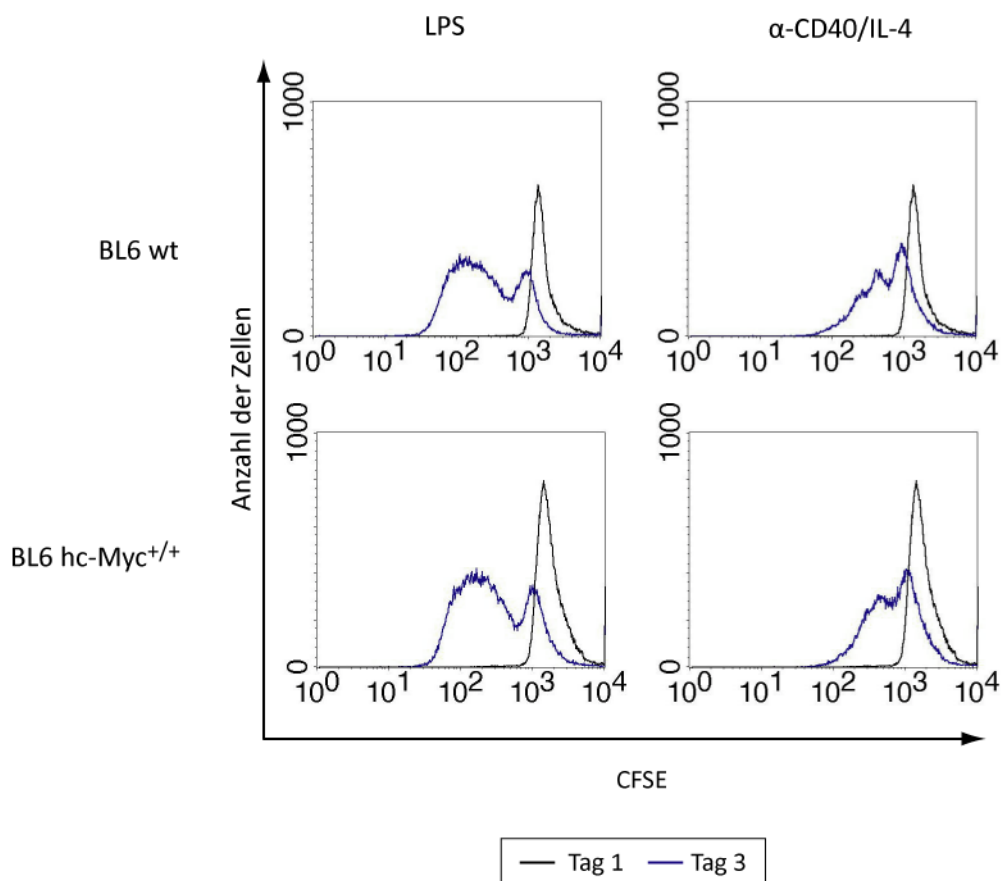


Abbildung 13: In vitro Proliferation der *hc-Myc* B-Zellen.

Zur Analyse der B-Zell-Proliferation nach Stimulation mit LPS oder IL-4 und einem α -CD40-Antikörper (α -CD40) wurden B-Zellen aus Wildtyp-C57BL/6-Mäusen und Mäusen, die homozygot für *hc-Myc* sind, mittels magnetischer Zellseparation isoliert. Vor Stimulation wurden diese mittels CFSE angefärbt. Bis Tag 5 nach Stimulation wurde die Abnahme des CFSE-Signals verfolgt. Als Kontrolle wurden B-Zellen ohne Stimulus kultiviert. Gezeigt sind hier Messungen an Tag 1 und Tag 3, wobei die Messung an Tag 1 unstimulierten Zellen entspricht. In den Abbildungen sind nur Zellen dargestellt, die TO-PRO-3 negativ sind (lebende Zellen). Es wurden jeweils zwei Mäuse pro Genotyp analysiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass hc-Myc-Mäuse in den untersuchten Parametern einen normalen Phänotyp aufweisen. Das humane c-MYC-Protein kann deshalb seinen murinen Orthologen höchstwahrscheinlich sehr gut ersetzen.

6.2 CD19 als Tumorabstoßungsantigen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Mausmodell für eine T-Zelltherapie gegen murines CD19 etabliert und untersucht, ob das murine CD19 ein geeignetes Ziel für eine adoptive T-Zelltherapie von malignen B-Zell-Lymphomen sein könnte. Hierfür wurde in den Analysen die Zelllinie 291 verwendet. Bei den 291-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem spontan aufgetretenen Lymphom der λ -MYC-Maus (Kovalchuk et al., 2000) etabliert worden war.

6.2.1 CD19-spezifische Abstoßung von hoch malignen B-Zell-Lymphomzellen

Zunächst wurde untersucht, ob murines CD19 in CD19-defizienten Mäusen ein geeignetes Abstoßungsantigen für B-Zell-Lymphome ist. Als CD19-defiziente Mäuse wurden homozygote CD19-Cre-Mäuse verwendet. Im ersten Versuch wurden 1×10^5 291-Lymphomzellen subkutan in die Flanke dieser Mäuse (CD19^{-/-}) injiziert. Das Tumorstadium wurde durch Palpation über 100 Tage verfolgt. Alle zwei bis drei Tage wurde der Tumordurchmesser in drei Dimensionen (Länge, Breite und Tiefe) mit Hilfe einer Schublehre gemessen und protokolliert. Ab einem durchschnittlichen Durchmesser von mehr als zehn Millimeter wurden die Mäuse aus Tierschutzgründen euthanasiert. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse verwendet, die mindestens ein Wildtyp-*Cd19*-Allel aufwiesen (CD19⁺) sowie als Positivkontrolle STAT1-defiziente Tiere, die keine Immunantwort gegen die Tumorzellen generieren können. Das Fehlen des zweiten Wildtyp-*Cd19*-Allels scheint außer im Kompartiment der B-Zellen keinen Einfluss auf den Phänotyp der Mäuse zu haben (Rickert et al., 1997).

In Abbildung 14 A ist das prozentuale Überleben der Mäuse in den einzelnen Versuchsgruppen über 100 Tage dargestellt. Es ist zu erkennen, dass alle Mäuse der Positivkontrolle bis Tag 21 aufgrund eines zu großen Tumors euthanasiert werden mussten. In der CD19⁺-Kontrollgruppe lebten an Tag 100 noch ca. 15 % (5/33) der Tiere. Im Gegensatz hierzu überlebten signifikant mehr Mäuse in der CD19^{-/-}-Gruppe. In dieser Versuchsgruppe hatten an Tag 100 60% (15/25) der Tiere keinen Tumor. Die Abbildung repräsentiert eine

Zusammenfassung mehrerer Einzelversuche, in denen auch Geschwister-Kontroll-Tiere verwendet wurden.

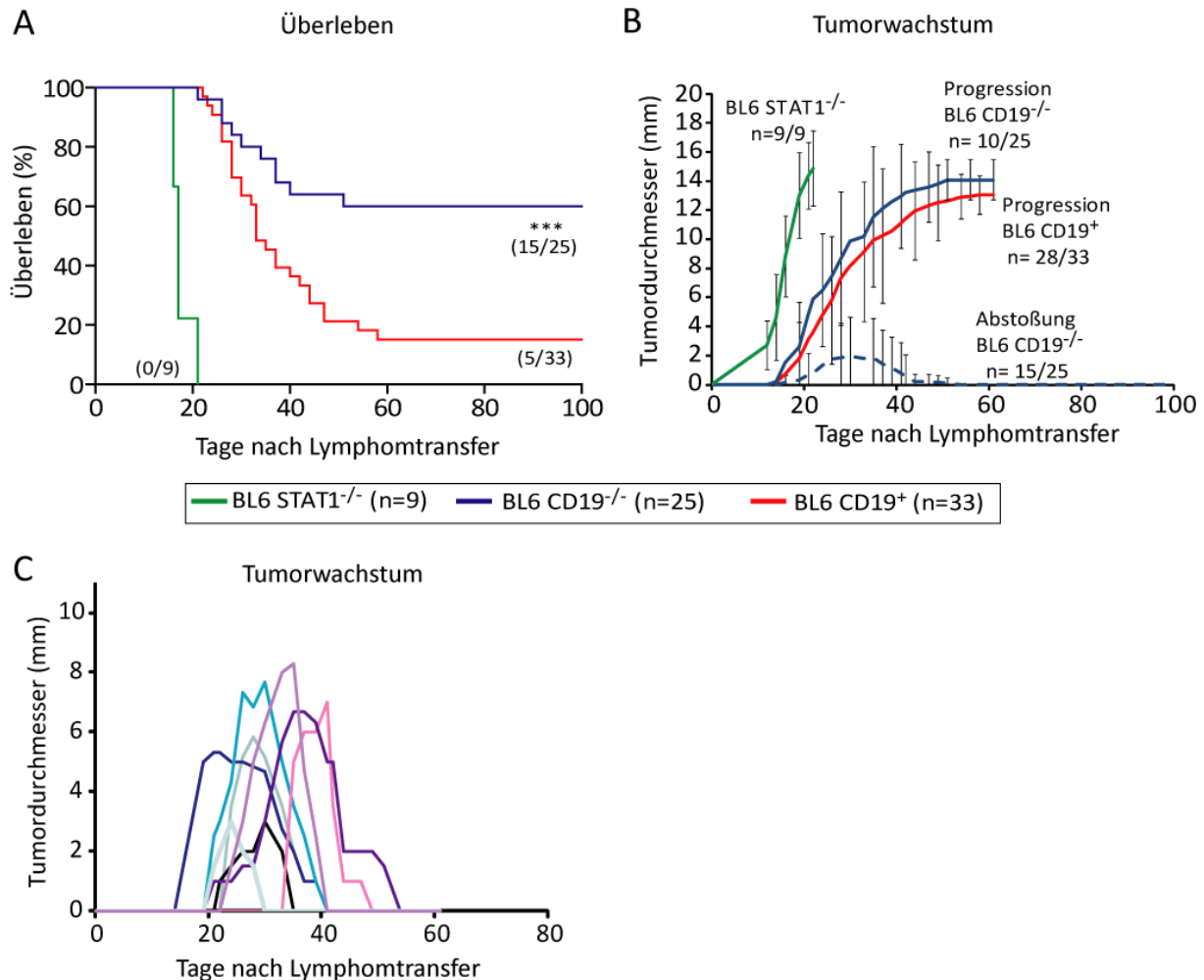


Abbildung 14: Überleben und Tumorwachstum in Mäusen nach Transfer von 10^5 291-Lymphomzellen.

10^5 291-Lymphomzellen wurden Mäusen, die homozygot für *Cd19-Cre* (BL6 CD19^{-/-}) sind und Mäusen, die mindestens ein Wildtyp-*Cd19*-Allel (BL6 CD19⁺) aufwiesen, subkutan in die Flanke injiziert. Als Positivkontrolle dienten STAT1-defiziente (BL6 STAT1^{-/-}) Mäuse. Das Tumorwachstum sowie das Überleben der Mäuse wurden über 100 Tage verfolgt. (A) Prozentuales Überleben der Mäuse in den einzelnen Versuchsgruppen. Die Anzahl der Versuchstiere sowie die Anzahl der Mäuse, die mehr als 100 Tage überlebt haben, sind angegeben. (B) Tumorwachstum in BL6 STAT1^{-/-}-Mäusen, BL6 CD19^{-/-} und BL6 CD19⁺-Mäusen, die die Lymphomzellen nicht abgestoßen haben (Progression) und BL6 CD19^{-/-}-Mäusen, die die Lymphomzellen abgestoßen haben (Abstoßung). Die einzelnen Graphen entsprechen dem akkumulierten, durchschnittlichen Tumordurchmesser \pm Standardabweichung. Die Anzahl der Tiere in den Gruppen ist angegeben. (C) Entwicklung des durchschnittlichen Tumordurchmessers in einzelnen BL6 CD19^{-/-}-Mäusen, die die Lymphomzellen abgestoßen haben. Jeder Graph entspricht einer Maus. *** $p < 0,001$ im Vergleich zu BL6 CD19⁺.

Abbildung 14 B zeigt das durchschnittliche, akkumulierte Tumorwachstum der Mäuse, in denen ein progressives Tumorwachstum vorlag (Progression BL6 STAT1^{-/-}, Progression BL6 CD19⁺ und Progression BL6 CD19^{-/-}) und in CD19-defizienten Tieren, die den Lymphomtransfer für mehr als 100 Tage überlebt haben. Bei letzterer Gruppe ist auffällig, dass einige Tiere zunächst einen Tumor entwickelten, welcher dann aber bis Tag 100 wieder abgestoßen wurde. Deswegen wird diese Gruppe als Abstoßung bezeichnet. In Abbildung 14 C ist das durchschnittliche Tumorwachstum einzelner Mäuse der Abstoßungsgruppe dargestellt. Diese Abbildung verdeutlicht, dass einige Tiere einen sehr großen Tumor entwickelten (bis zu 8 mm im Durchmesser), welcher allerdings in der Regel innerhalb von 20 bis 30 Tagen nach Detektion wieder abgestoßen wurde. Interessanterweise entwickelte keine der fünf CD19⁺-Mäuse, die den Lymphomtransfer mehr als 100 Tage überlebten, einen tastbaren Tumor.

In Abbildung 14 B ist zudem zu erkennen, dass der Tumor in STAT1-defizienten Tieren am schnellsten wuchs, was auch nicht verwundert, da diese Mäuse keine Immunantwort gegen die Tumorzellen generieren können. Ebenso zeigt die Grafik, dass Tumoren in der Progressionsgruppe der CD19-defizienten Mäuse ebenso schnell wuchsen wie in der Progressionsgruppe der CD19⁺-Mäuse.

Der Versuch wurde mit 1×10^6 Lymphomzellen wiederholt. Abbildung 15 A zeigt, dass bei dieser Zellzahl ebenfalls signifikant mehr Mäuse in der CD19^{-/-}-Population den Lymphomtransfer mehr als 100 Tage überlebten als in der CD19⁺-Population. In letzterer hat nur eine von 16 Mäusen überlebt, was ca. 6 % entspricht. In der CD19^{-/-}-Population überlebten hingegen 47 % (7/15). Alle vier STAT1-defizienten Tiere mussten bis Tag 20 aufgrund des Tumorwachstums euthanasiert werden. In Abbildung 15 B ist der durchschnittliche, akkumulierte Tumordurchmesser in verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Diese Abbildung zeigt, dass wieder einige CD19-defiziente Tiere zunächst einen Tumor entwickelten, der dann im Verlauf der 100 Tage abgestoßen wurde (Abstoßungsgruppe). Im Vergleich der Progressionsgruppen untereinander ist zu sehen, dass erwartungsgemäß die Tumoren in STAT1-defizienten Tieren am schnellsten wuchsen. Allerdings wuchsen die Tumoren in der Progressionsgruppe der CD19-defizienten Tiere etwas schneller als in der Vergleichsgruppe der CD19⁺-Tiere.

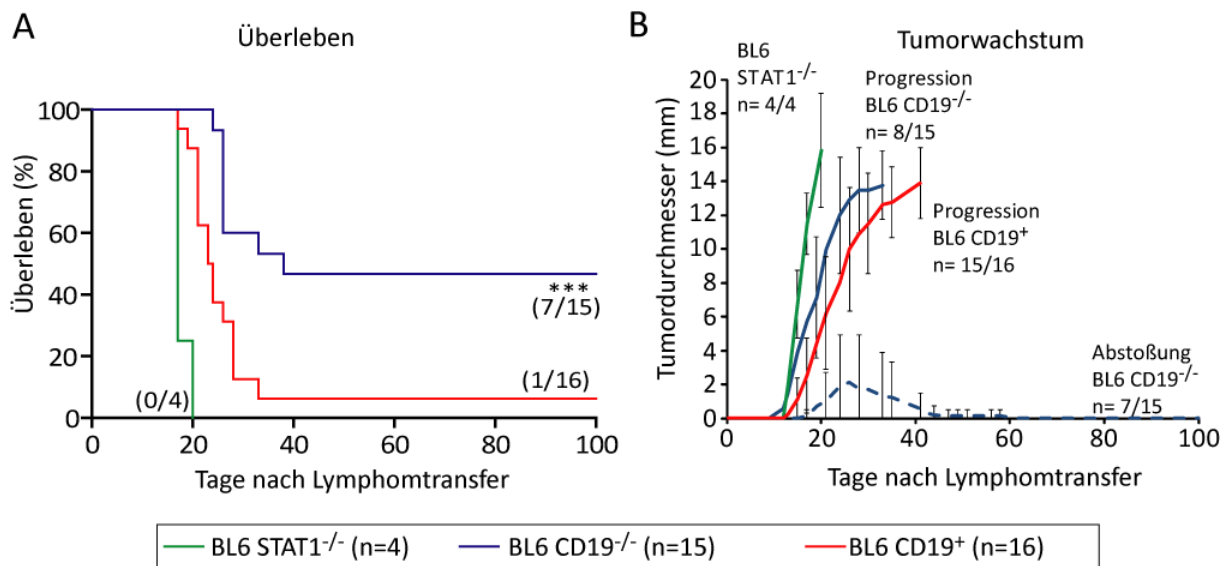


Abbildung 15: Überleben und Tumorwachstum in Mäusen nach Transfer von 10^6 291-Lymphomzellen.

Eine Million 291-Lymphomzellen wurden den Mäusen subkutan in die Flanke injiziert. Das Tumorwachstum sowie das Überleben der Mäuse in den Versuchsgruppen BL6 STAT1^{-/-} (STAT1-defiziente Tiere), BL6 CD19^{-/-} (Mäuse homozygot für *Cd19-Cre*) und BL6 CD19⁺ (C57BL/6 Wildtyp-Mäuse) wurde über 100 Tage lang verfolgt. (A) Überleben der Versuchstiere in Prozent. Die Anzahl der Mäuse, die mindestens 100 Tage überlebten sowie die Anzahl der Versuchstiere sind angegeben. (B) Tumorwachstum in BL6-STAT1^{-/-}, BL6 CD19^{-/-} und BL6 CD19⁺-Mäusen, in denen der Tumor progressiv wuchs (Progression) und in BL6 CD19^{-/-}-Mäusen, die die Lymphomzellen abgestoßen haben. Angegeben ist der durchschnittliche, akkumulierte Tumordurchmesser \pm Standardabweichung. Die Anzahl der Tiere der einzelnen Gruppen ist angegeben. *** $p < 0,001$ im Vergleich zu BL6 CD19⁺.

Nach Euthanasierung der Mäuse aufgrund eines zu großen Tumors (≥ 10 mm), wurde aus einem Teil des Tumorgewebes eine Zellsuspension hergestellt und die Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers auf die Oberflächenexpression von CD19, IgM, MHC-Klasse I (H-2K^b und H-2D^b) und MHC-Klasse II (I-A^b) Molekülen untersucht. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst. Jedes einzelne Symbol repräsentiert hier einen Tumor. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei allen getesteten Oberflächenmolekülen nur minimale Abweichungen zwischen Tumoren aus CD19-defizienten Mäusen (CD19^{-/-}) oder CD19-exprimierenden Mäusen vorlagen. In Tumoren der CD19^{-/-}-Mäuse war der Anteil an CD19-positiven Zellen etwas geringer, was allerdings nicht bedeuten muss, dass einige Tumorzellen die Expression von CD19 verloren haben. Dieser geringere Anteil kann ebenso aus einer Infiltration von CD19-negativen Zellen in das Tumorgewebe resultieren, beispielsweise T-Zellen. Interessanterweise hatte kein Tumor aus CD19-defizienten Mäusen die CD19-Expression vollständig verloren.

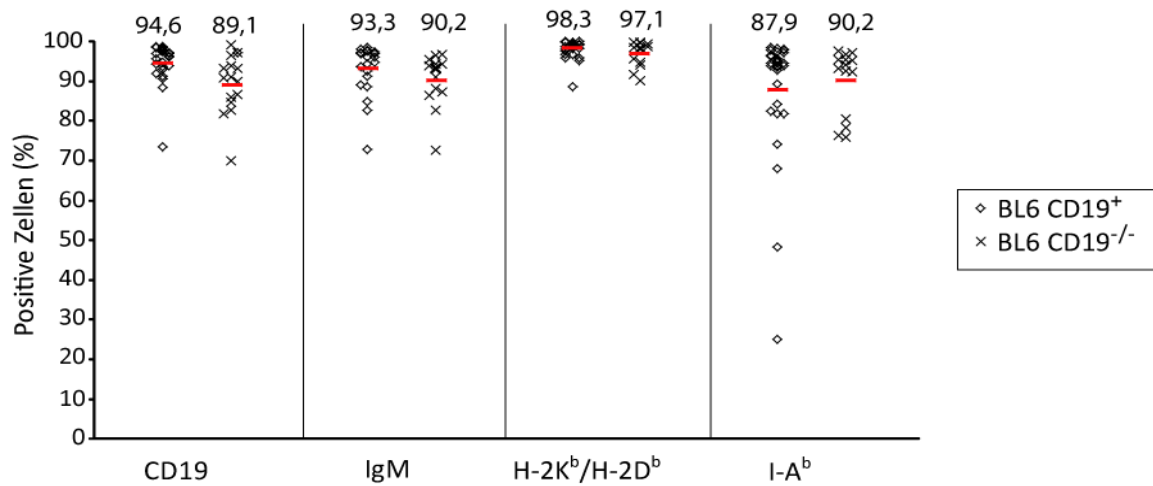


Abbildung 16: Expression von CD19, IgM, MHC-Klasse I- und Klasse II-Molekülen auf der Zelloberfläche von ausgewachsenen Tumoren.

10^5 bis 10^6 CD19-positive Lymphomzellen wurden subkutan in CD19-defiziente Mäuse (BL6 CD19^{-/-}) sowie in Mäuse, die mindestens ein Wildtyp-*Cd19*-Allel (BL6 CD19⁺) aufwiesen, injiziert. Lymphomzellen ausgewachsener Tumoren (Tumordurchmesser ≥ 10 mm) wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Oberflächenexpression von CD19, IgM, H-2K^b/H-2D^b und I-A^b analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil positiver Zellen. Jedes Symbol entspricht einem Tumor aus einer Maus. Symbole von BL6 CD19^{-/-} sind jeweils links und von BL6 CD19⁺ jeweils rechts gezeigt. Die prozentualen Durchschnittswerte sind mit roten Balken gekennzeichnet.

Zusammenfassend zeigen diese Versuche, dass einige CD19-defiziente Tiere im Gegensatz zu CD19-profizienten Tieren in der Lage sind, CD19-positive B-Zell-Lymphome abzustößen. Zudem scheinen Tumoren, die auswachsen (Durchmesser ≥ 10 mm), weder die Expression von CD19, noch die Expression der MHC-Moleküle zu verlieren. Dies bekräftigt die Vermutung, dass CD19 ein gutes Abstoßungsantigen und ein geeignetes Zielantigen für eine T-Zelltherapie ist.

6.2.1.1 CD19-defiziente Mäuse haben nach Abstoßung von Lymphomzellen eine Gedächtnis-Immunantwort

Im Hinblick auf die Entwicklung einer Zelltherapie gegen hochmaligne B-Zell-Lymphome ist die Frage von zentraler Bedeutung, ob an der beobachteten Abstoßung der Lymphomzellen in CD19^{-/-}-Mäusen T-Zellen beteiligt sind. Um einen ersten Hinweis hierfür zu bekommen, wurde zunächst untersucht, ob das adaptive Immunsystem für die Abstoßung der Lymphomzellen von Bedeutung ist. Hierfür wurde CD19-defizienten Mäusen, die einen ersten Transfer von 1×10^5 291-Lymphomzellen mehr als 100 Tage überlebt hatten, erneut Lymphomzellen subkutan in die Flanke injiziert. Diesmal jedoch in einer höheren Dosis (1×10^6). Als Positivkontrolle für das Tumorwachstum während des sekundären Transfers wurden

STAT1-defiziente Mäuse verwendet. In Abbildung 17 ist das prozentuale Überleben (A) sowie der durchschnittliche, akkumulierte Tumordurchmesser (B) über 200 Tage nach primärem Lymphomtransfer dargestellt. Der sekundäre Transfer erfolgte ca. 130 Tage nach dem ersten Transfer.

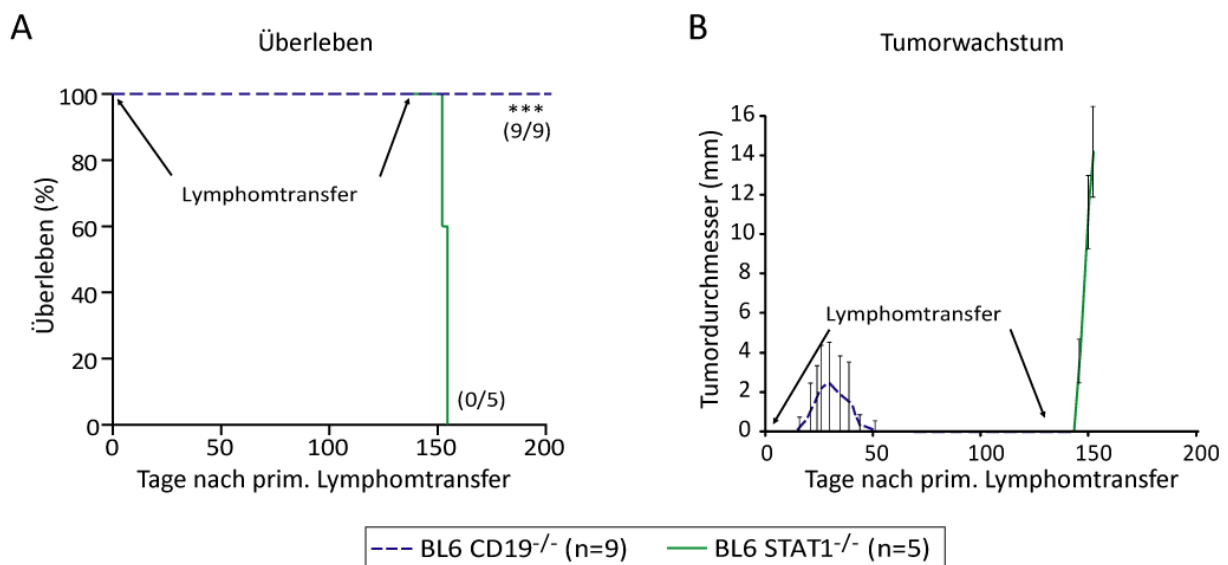


Abbildung 17: CD19-defiziente Mäuse haben nach Injektion von Lymphomzellen eine Gedächtnis-Immunantwort.

Ungefähr 130 Tage nach einer primären Injektion von 1×10^5 CD19-positiven Lymphomzellen in CD19-defiziente Mäuse (BL6 CD19^{-/-}), wurden erneut Lymphomzellen (1×10^6) subkutan in die Flanke injiziert. Parallel zur sekundären Injektion wurden STAT1-defizienten Mäusen (BL6 STAT1^{-/-}) ebenfalls 1×10^6 Lymphomzellen injiziert. Sowohl das Überleben (A), als auch der Tumordurchmesser (B) wurden bis Tag 200 nach primärer Injektion der Lymphomzellen verfolgt. Dargestellt ist der durchschnittliche, akkumulierte Durchmesser \pm Standardabweichung. Die Anzahl der eingesetzten Tiere sowie die Anzahl der Tiere, die den Lymphomtransfer überlebten, sind angegeben. *** p < 0,001 im Vergleich zu BL6 STAT1^{-/-}. p-Wert im Vergleich zu naiven CD19-defizienten Tieren bei primärer Injektion von 1×10^6 Lymphomzellen (Abbildung 15; BL6 CD19^{-/-}): < 0,05(*).

Abbildung 17 zeigt, dass einige Mäuse nach dem ersten Lymphomtransfer einen Tumor entwickelten, der allerdings bis ca. Tag 50 wieder verschwand. Nach dem zweiten Lymphomtransfer hat interessanterweise keine der neun Mäuse einen tastbaren Tumor entwickelt, alle Versuchstiere überlebten bis Tag 200. Im Gegensatz hierzu haben alle Tiere der STAT1^{-/-}-Kontrollgruppe einen Tumor entwickelt und mussten ca. 20 Tage nach dem Lymphomtransfer euthanasiert werden. Im Vergleich zum Überleben naiver CD19-defizienter Tiere nach primärem Transfer von 1×10^6 Lymphomzellen (Abbildung 15) ist das Überleben der Mäuse nach einem sekundären Transfer in diesem Versuch signifikant erhöht (p < 0,05). Nur ca. 50 % der Tiere überlebten die primäre Injektion der Lymphomzellen. Dieses Ergebnis

zeigt, dass Mäuse, die den Lymphomtransfer überlebten, durch eine Gedächtnis-Immunantwort des adaptiven Immunsystems vor einem Anwachsen der Tumorzellen beim sekundären Transfer geschützt waren.

Zur Kontrolle wurden durch Kreuzung des λ -MYC-Transgens auf CD19^{-/-}-Hintergrund auch Mäuse generiert, die spontan CD19^{-/-}-Lymphome entwickeln. In einem nicht gezeigten Versuch wurden solche CD19-negative Lymphomzellen in Mäuse injiziert, die einen Transfer von CD19-positiven Lymphomzellen überlebt hatten. Alle Mäuse entwickelten innerhalb der ersten 15 Tage nach Transfer CD19-negative Tumoren, die größer waren als 10 mm und mussten euthanasiert werden. Allerdings wuchsen diese Lymphomzellen in vivo schneller, als die Zelllinie 291, was einen Vergleich mit den anderen Experimenten schwierig macht. Dennoch liefert dieses Experiment einen Hinweis darauf, dass die Gedächtnis-Immunantwort CD19-spezifisch ist.

6.2.1.2 T-Zellen sind für die Abstoßung der Lymphomzellen notwendig

Zur Analyse der Rolle der T-Zellen für die Abstoßung der Lymphomzellen in CD19-defizienten Mäusen wurden im folgenden Versuch vor Lymphomtransfer Thymozyten mittels eines α -Thy1.2-Antikörpers depletiert. Eine Kontrollgruppe wurde nach demselben Protokoll mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper behandelt. Dieser Antikörper weist keine Reaktivität gegen murine Proteine auf.

Zur T-Zell-Depletion wurde den Mäusen mehrfach (siehe Abschnitt 5.15.7) der α -Thy1.2-Antikörper intraperitoneal injiziert. Die Depletion wurde durch Analysen im Durchflusszytometer bei allen Mäusen wenige Tage nach Antikörper-Injektion kontrolliert und bei einigen Tieren sogar bis Tag 25 nach Tumortransfer verfolgt. Für diese Analyse wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen, die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten gegen CD3, CD4 und CD8 gefärbt. In Abbildung 37 im Anhang ist die Funktionalität der Depletion anhand eines Beispiels gezeigt.

Der Effekt der T-Zelldepletion auf die Abstoßung von 1×10^5 291-Lymphomzellen in CD19-defizienten Mäusen ist in Abbildung 18 gezeigt. Alle 17 Mäuse mussten nach T-Zelldepletion bis ca. Tag 35 aufgrund eines zu großen Tumors euthanasiert werden. In der Kontrollgruppe überlebten hingegen sechs von 15 Tieren (ca. 40%) den Lymphomtransfer bis Tag 100. Dieser signifikante Unterschied ($p < 0,001$) zeigt, dass T-Zellen für die Lymphomabstoßung essentiell sind.

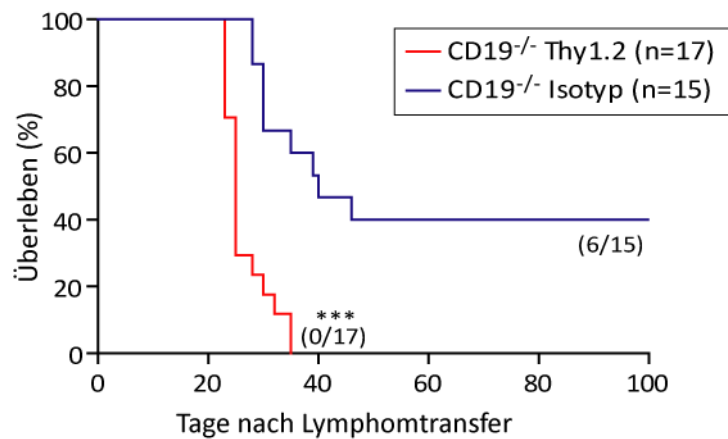


Abbildung 18: T-Zellen sind für die Lymphomabstoßung notwendig.

Vor Transfer von 1×10^5 CD19-positiven Lymphomzellen in CD19-defiziente Mäuse wurden Thymozyten depletiert (CD19^{-/-} Thy1.2). Eine Kontrollgruppe wurde mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper behandelt, der in den Mäusen keine Reaktivität aufwies (CD19^{-/-} Isotyp). Gezeigt ist das Überleben nach Tumortransfer über 100 Tage. Die Anzahl der Mäuse, die den Lymphomtransfer überlebten sowie die Anzahl der Versuchstiere sind angegeben. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle.

6.2.1.3 CD4⁺-Zellen, aber nicht CD8⁺-Zellen, infiltrieren schrumpfende Tumoren

Um die Bedeutung der T-Zellen, insbesondere der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für die anti-Tumor-Immunantwort in CD19-defizienten Mäusen weiter zu untersuchen, wurde ein Teil des Tumorgewebes entnommen, Kryoschnitte davon angefertigt und diese immunhistochemisch auf CD3- (alle T-Zellen), CD4- (T-Helferzellen) und CD8-positive (zytotoxische T-Zellen) Zellen gefärbt. Als Kontrollfärbung wurden die Schnitte auch auf IgM-positive Zellen gefärbt, was ein Marker der Lymphomzellen ist. Tumoren wurden analysiert, die in den Mäusen ausgewachsen waren (≥ 10 mm im Durchmesser) sowie solche, die schrumpften (siehe Abbildung 14 C). Das Kriterium für einen schrumpfenden Tumor war eine Verringerung des durchschnittlichen Durchmessers um mindestens zwei Millimeter oder ein Schrumpfen des Tumors in einer Dimension um mindestens drei Millimeter. Allerdings war es nicht einfach, solche Proben zu erhalten, da einige Tumoren (Abbildung 14 C), die wieder verschwanden, nur vier bis fünf Millimeter groß wurden. Bei Registrierung des Schrumpfens waren diese somit schon fast vollständig verschwunden, weshalb in diesen Fällen nicht genügend Tumormaterial für eine Analyse gewonnen werden konnte. Ebenso kam es vor, dass auch recht große Tumoren innerhalb von ein bis zwei Tagen fast vollständig verschwanden. Aus diesem Grund konnten bisher nur drei Gewebeproben aus schrumpfenden Tumoren analysiert werden.

In Abbildung 19 A sind Beispielfärbungen auf CD3-, CD4- und CD8-positive Zellen (blau-gefärbt; IgM: rot-gefärbt) in ausgewachsenen Tumoren aus Wildtyp-Mäusen und CD19-defizienten Mäusen sowie in schrumpfenden Tumoren aus CD19-defizienten Mäusen gezeigt. Schon anhand dieser immunhistochemischen Färbungen ist zu erkennen, dass sowohl CD3, als auch CD4-positive Zellen das Gewebe schrumpfender Tumoren infiltrierten. Diese Zellen waren in einer viel geringeren Anzahl in ausgewachsenen Tumoren zu finden. Allerdings ließen sich im Gewebe schrumpfender Tumoren kaum CD8-positive Zellen finden. Umgekehrt wurden jedoch in einem ausgewachsenen Tumor in CD19-defizienten Mäusen CD8-positive Zellen detektiert. Diese scheinen aber keinen Effekt auf das Tumorstadium gehabt zu haben, da der Tumor bis zu einer Größe von über 10 mm im Durchschnitt gewachsen war und die Maus deswegen euthanasiert werden musste. In Tumoren der Wildtyp-Mäuse konnte keine Infiltration von CD8-positiven Zellen festgestellt werden.

In Abbildung 19 B ist dieses Ergebnis in Zellzahlen je Sichtfeld unter dem Mikroskop ($20\times$ Vergrößerung) wiedergegeben. Diese Grafik bestätigt die visuelle Einschätzung einer deutlich signifikanten Infiltration von CD3- und CD4-positiven Zellen in schrumpfenden Tumoren im Vergleich zu ausgewachsenen Tumoren der Wildtyp-Mäuse.

Ebenso wird in dieser Abbildung ersichtlich, dass in ausgewachsenen Tumoren der CD19-defizienten Mäuse die Anzahl an CD3- und auch an CD4-positiven Zellen erhöht war. Allerdings ist diese in schrumpfenden Tumoren noch einmal deutlich höher als in ausgewachsenen Tumoren. In den meisten Tumorproben, mit der Ausnahme der erwähnten Probe, konnte keine Infiltration mit CD8-positiven Zellen festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des Abschnitts 6.2.1, dass CD19 ein gutes Antigen für eine T-Zell-vermittelte Abstoßung muriner Lymphomzellen ist. Zudem lassen die immunhistochemischen Färbungen vermuten, dass CD4-positive T-Helferzellen für die Abstoßung wichtig sein könnten, da nur diese das Gewebe schrumpfender Tumoren infiltrierten. Entgegen der Erwartung konnten kaum infiltrierende CD8-positive zytotoxische T-Zellen im Tumorgewebe gefunden werden.

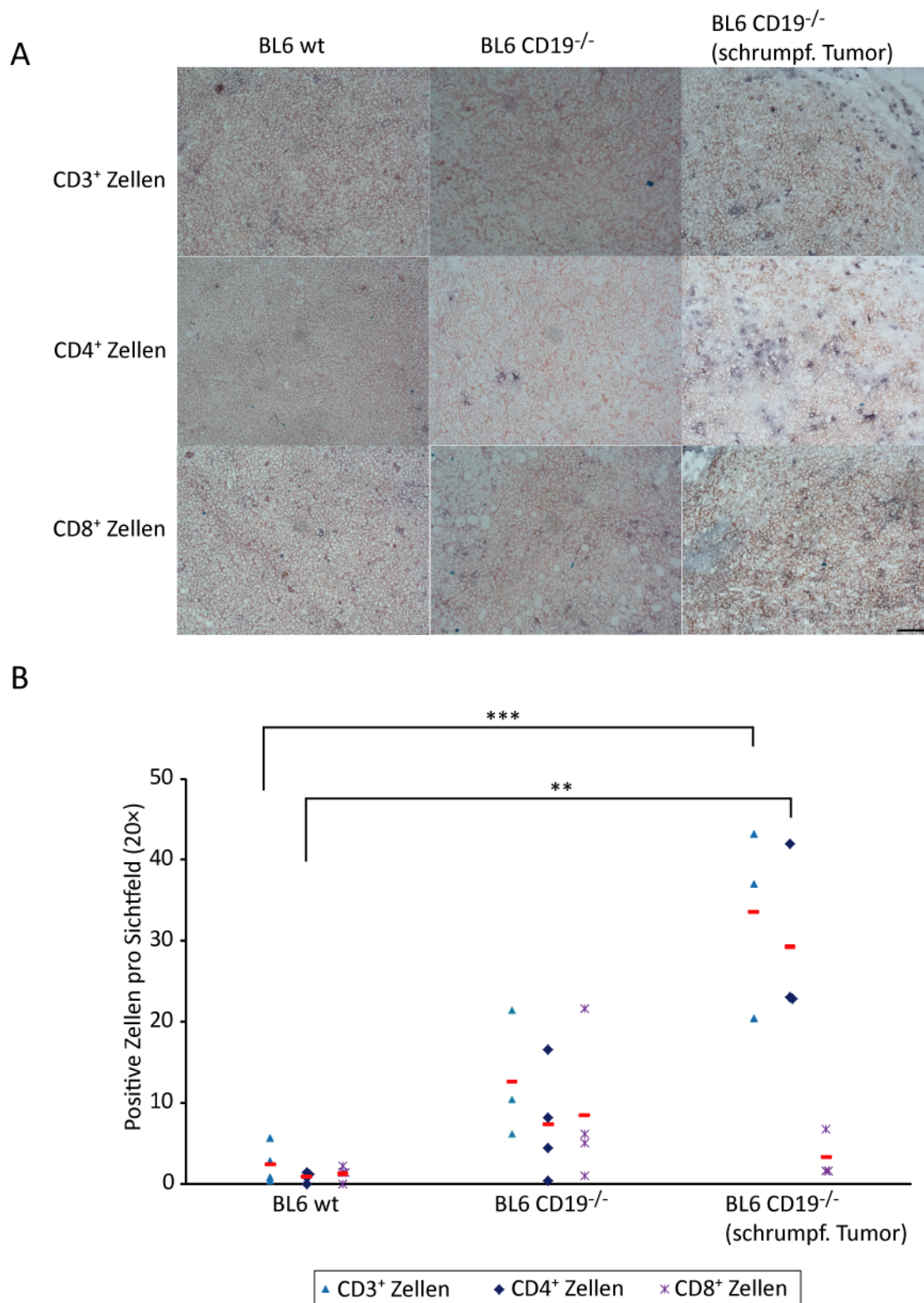


Abbildung 19: T-Zellinfiltration in CD19-positive Tumoren.

Nach Transfer von 10^5 Lymphomzellen in CD19-defiziente Mäuse (BL6 CD19^{-/-}) sowie in Wildtyp-Mäuse (BL6 wt) wurde ein Teil des Gewebes von ausgewachsenen Tumoren (Durchmesser ≥ 10 mm) und schrumpfenden Tumoren immunhistochemisch auf Infiltration von CD3⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen analysiert. (A) Immunhistochemische Färbungen der Tumorgewebe mit α -IgM (Lymphomzellen, rot) und α -CD3, α -CD4 oder α -CD8 (T-Zellen, blau). Vergrößerung 20 \times ; der Balken entspricht 100 μ m. (B) Anzahlen positiver Zellen pro Sichtfeld (20 \times Vergrößerung). Jedes Symbol repräsentiert eine Tumorseite. *** p < 0,001; ** p < 0,01 im Vergleich zu BL6 wt.

6.2.2 Induktion einer CD19-spezifischen T-Zell-Immunantwort

Aufgrund der Hinweise, dass CD19 ein geeignetes Ziel-Antigen für eine T-Zelltherapie gegen B-Zell-Lymphome sein könnte, wurde in diesem Abschnitt versucht, eine T-Zell-Immunantwort gegen murines CD19 durch Vakzinierung zu induzieren. Darauf aufbauend war es das weiterführende Ziel, aus solchermaßen generierten CD19-spezifischen T-Zellen die TCR-Gene, die für einen CD19-spezifischen T-Zellrezeptor kodieren, zu klonieren, um damit naiven T-Zellen eine CD19-Spezifität verleihen zu können.

6.2.2.1 Induktion einer CD4⁺ T-Zell-Immunantwort durch Vakzinierung mit CD19-Peptiden

Zur Induktion einer T-Zell-Immunantwort, die spezifisch für murines CD19 ist, wurden diverse Vakzinierungsstrategien vergleichend getestet. Es wurden Vakzinierungen mit CD19-positiven Milzzellen, 291-Lymphomzellen, synthetisierten CD19-Peptiden (ca. 40 Aminosäuren lang) und einem Plasmid (pVAX1-CD19), welches für murines CD19-kodiert, erprobt. In der Regel wurde mehrfach mit unterschiedlichen Zeitabständen immunisiert. Teilweise wurden auch Kombinationen verschiedener Strategien ausprobiert. Leider verliefen die meisten Ansätze erfolglos, welche hier nicht gezeigt werden.

Am erfolgreichsten waren Vakzinierungen mit synthetisierten CD19-Peptiden, insbesondere in Kombination mit einer primären Injektion des Plasmids pVAX1-CD19. In der Regel wurden 20 µg pro Peptid in Gemischen von bis zu sechs Peptiden den Mäusen subkutan injiziert. Zur Verstärkung der Immunantwort wurden ein CpG-Oligonukleotid (CpG) und inkomplettes Freundesches Adjuvans (IFA) in Kombination mit den Peptiden verwendet. Für die Vakzinierungen wurden insgesamt acht verschiedene Peptide (Tabelle 7) des murinen CD19 ausprobiert. Durch alleinige Peptid-Vakzinierung konnte jedoch nur gegen das Peptid C eine Immunantwort induziert werden (Abbildung 20). In Teil A dieser Abbildung ist die Immunisierungsstrategie dargestellt. CD19-defizienten Mäusen wurden 60 µg eines Gemisches der Peptide B, C und F (je 20 µg) zweimal in einem Abstand von vier Wochen mit den Adjuvantien IFA und CpG injiziert. Als Kontrolle wurden CD19-defiziente Mäuse nach dem gleichem Protokoll nur mit den Adjuvantien behandelt. Eine Woche nach der letzten Injektion wurden die Milz sowie die Lymphknoten der Mäuse isoliert, eine Zellsuspension (Milz+LN-Zellsuspension) hergestellt und diese in vitro für ca. 20 Stunden mit Peptiden stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit 2×10^5 Milzzellen und 2,5 µg Peptid. Getestet wurden separat die drei Peptide der Vakzinierung (Peptid B, C und F) sowie als Negativkontrolle ein

Gemisch aus zwei Hühner-Ovalbumin-Peptiden (OVA; OVA1 und OVA2 siehe Tabelle 7), welche auf MHC-Klasse I- und Klasse II-Moleküle binden. Als zusätzliche Negativkontrolle wurden Milz+LN-Zellen ohne Peptid kultiviert sowie als Positivkontrolle Milz+LN-Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin (IONO) stimuliert. Die Immunreaktion der T-Zellen in dem Zellgemisch wurde mit Hilfe eines ELISPOT gemessen, wobei eine Sezernierung von Interferon- γ (IFN- γ) die Peptid-Erkennung anzeigt. Allerdings ist hier anzumerken, dass nicht alle T-Zellen IFN- γ bei Peptid-Erkennung sezernieren. Dies tun in der Regel nur zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und T-Helferzellen vom Typ T_H1, welche jedoch auch für eine T-Zelltherapie von Krebserkrankungen von besonderem Interesse sind.

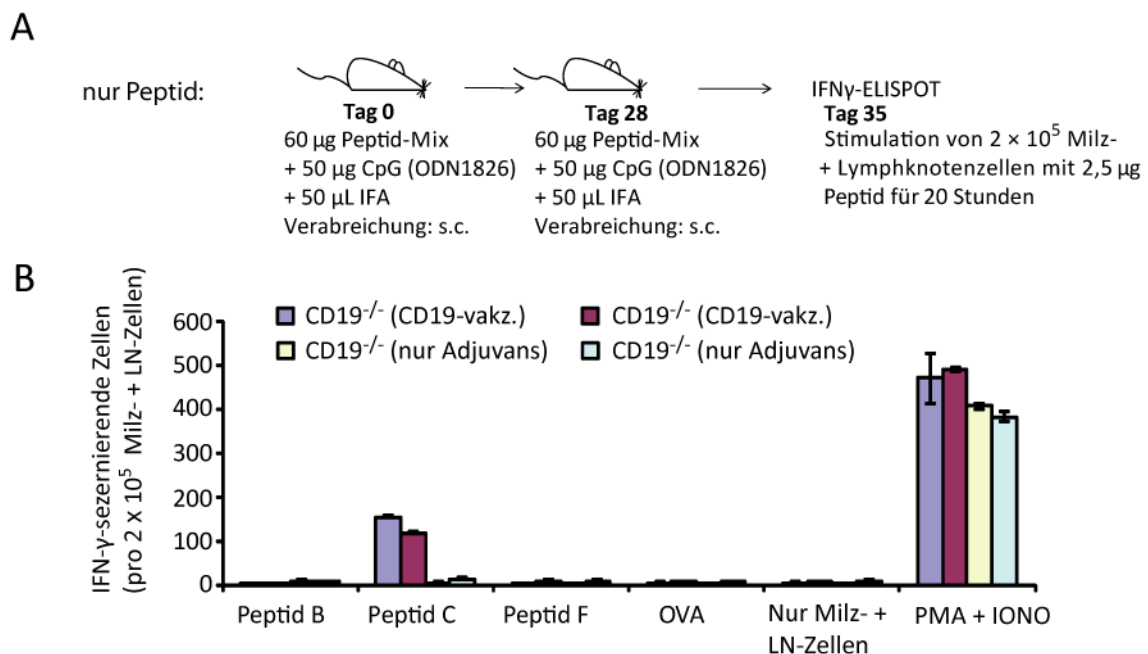


Abbildung 20: Immunantwort gegen CD19-Peptid C.

(A) Schematische Darstellung des Vakzinierungsprotokolls. CD19-defiziente Tiere (CD19^{-/-}) wurden mit einem Peptid-Gemisch aus je 20 µg der CD19-Peptide B, C und F vakziniert. Als Adjuvantien wurden CpG und IFA (inkomplettes Freundesches Adjuvans) verwendet. Die Injektionen der Peptid-Adjuvans-Gemische erfolgten jeweils subkutan (s.c.) in einem Abstand von 28 Tagen. Als Negativkontrolle wurden Mäusen nur mit den Adjuvantien behandelt. (B) Interferon- γ -ELISPOT-Analyse der immunisierten Mäuse. Je 2×10^5 Milz- + Lymphknotenzellen wurden mit 2,5 µg der angegebenen Peptide (B, C und F) für ca. 20 Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit zwei Hühner-Ovalbumin (OVA)-Peptiden stimuliert, von denen eins auf MHC-Klasse I-Moleküle und das zweite auf MHC-Klasse II-Moleküle bindet. Als Positivkontrolle wurde die Zellsuspension auch mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin (IONO) inkubiert. Gezeigt sind arithmetische Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm Standardabweichung. Die Immunreaktion gegen das CD19-Peptid C konnte mehrfach gezeigt werden. Säulen einer Farbe repräsentieren die Werte jeweils einer Maus.

In Abbildung B ist zu erkennen, dass die Milz+LN-Zellen nur nach in vitro Stimulation mit dem Peptid C IFN- γ sezernierten. Je Maus wurden 100 bis 200 Interferon- γ -sezernierende Zellen im ELISPOT detektiert. Mit keinem der anderen Peptide und ebenso wenig mit Milz+LN-Zellen der Kontrollmäuse konnte eine Sezernierung von IFN- γ festgestellt werden. Somit konnte nur gegen das CD19-Peptid C durch Vakzinierung eine spezifische Immunantwort induziert werden.

Da allerdings nach Vakzinierung mit dieser Strategie gegen kein anderes CD19-Peptid eine Immunantwort detektiert werden konnte, wurde damit begonnen vor Injektion der Peptide die Mäuse mit dem Plasmid pVAX1-CD19 zu immunisieren. Mittels dieser Strategie konnten zusätzlich Immunantworten gegen die Peptide D und E induziert werden (Abbildung 21).

Abbildung 21 stellt einen Vergleich der beiden Vakzinierungsstrategien dar. Teil A zeigt die Abfolge der Injektionen beider Strategien. Die Peptid-Vakzinierung wurde nach dem gleichen Protokoll, wie in Abbildung 20 durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die Mäuse mit einem Gemisch der fünf Peptide A, D, E, G und H (je 20 μ g) immunisiert wurden. In der zweiten Vakzinierungsstrategie wurden die Mäuse zehn Tage vor der ersten Injektion des Peptidgemisches durch intramuskuläre Injektion von 100 μ g des Plasmids pVAX1-CD19 in Kombination mit einem Adjuvans-Plasmid (pRJB-GM), welches für murines GM-CSF kodiert, immunisiert. Anschließend erfolgten die Peptid-Injektionen nach dem erwähnten Protokoll. Eine Woche nach der letzten Injektion der Peptide wurde wieder eine Zellsuspension aus der Milz und den Lymphknoten hergestellt. 2×10^5 Milz+LN-Zellen wurden mit je 2,5 μ g der Einzelpeptide (CD19-Peptid A, D, E, G und H) sowie einem Gemisch der beiden Ovalbumin Peptide (je 2,5 μ g pro Peptid) für ca. 20 Stunden in vitro stimuliert. Anschließend wurde die Sezernierung von IFN- γ mittels eines ELISA gemessen (gezeigt ist die optische Dichte bei 450 nm). Als weitere Negativkontrolle wurden die Milz+LN-Zellen ohne Peptide kultiviert.

Teil B von Abbildung 21, zeigt dass nur Mäuse, die mit den Plasmiden und den Peptiden vakziniert worden waren, eine Immunreaktion gegen die CD19-Peptide D und E aufwiesen. Die Mäuse, die nur Peptid-Injektionen erhielten, zeigten gegen keines der getesteten Peptide eine Immunreaktion.

Gegen die CD19-Peptide A, G und H konnte auch trotz Plasmid- und Peptid-Vakzinierung keine Immunreaktion festgestellt werden. Somit scheint die Vakzinierung mit dem CD19-Plasmid und den CD19-Peptiden wirksamer zu sein als die Vakzinierung mit Peptiden allein. Aus diesem Grund wurde die Kombinationsstrategie aus Plasmid- und Peptid-Vakzinierung

für alle folgenden Experimente verwendet. Insgesamt konnte allerdings nur gegen die drei CD19-Peptide C, D und E eine Immunantwort induziert werden.

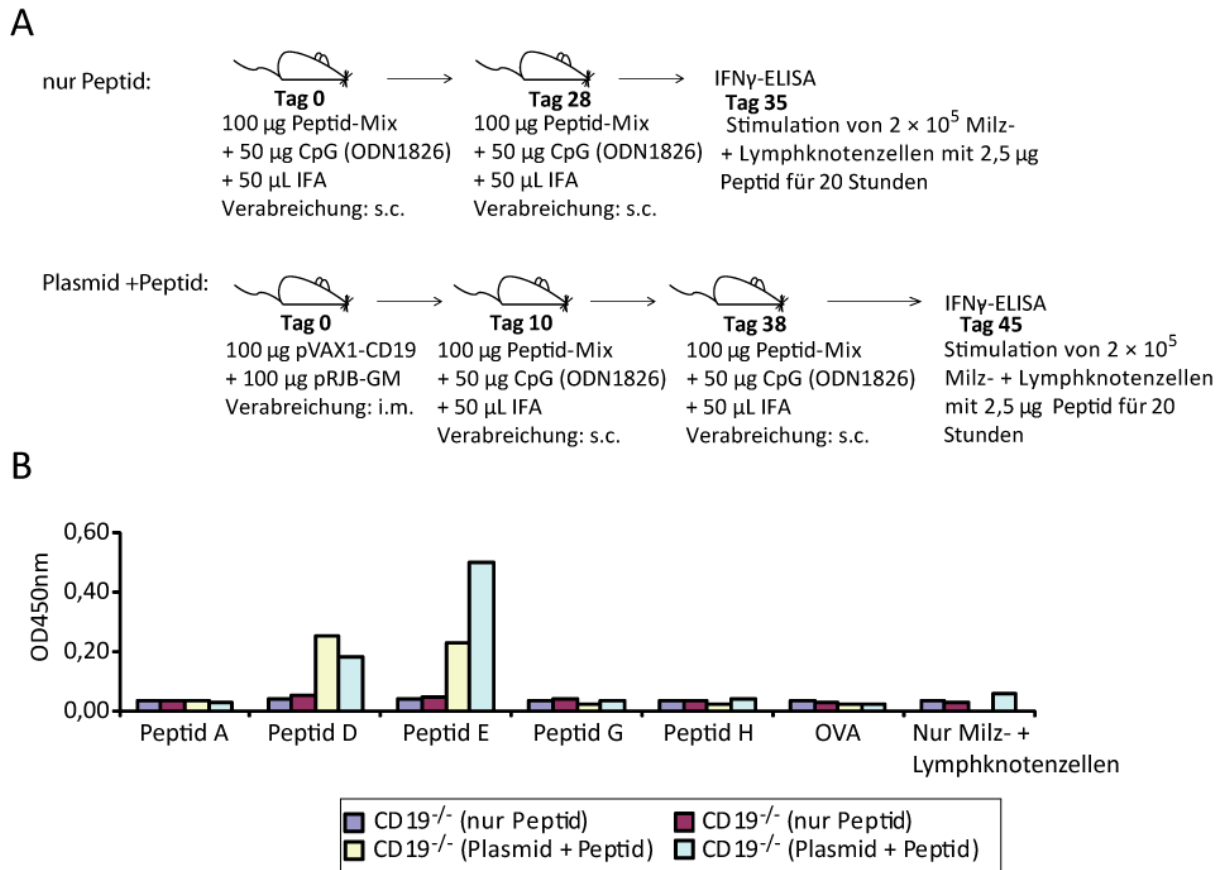


Abbildung 21: Generierung einer Immunantwort gegen CD19-Peptid D und E.

(A) Vakzinierungsstrategien. CD19-defiziente Mäuse wurden entweder nur mit einem Gemisch der murinen CD19-Peptide A, D, E, G und H (je 20 µg) oder mit einem Plasmid (pVAX1-CD19), welches für murines CD19 kodiert, gefolgt von zwei Vakzinierungen mit dem Peptidgemisch immunisiert. Die zeitlichen Abstände zwischen den Einzelinjektionen sind angegeben. Die Injektionen der Peptide erfolgten subkutan (s.c.) mit inkomplettem Freundschens Adjuvans (IFA) und einem CpG-Oligonukleotid. pVAX1-CD19 wurde mit dem Adjuvansplasmid (pRJB-GM) intramuskulär injiziert (i.m.). Die Analyse der Immunantwort erfolgte mittels eines Interferon- γ -ELISA. (B) Immunantworten gegen einzelnen CD19-Peptide. Zur Analyse der Immunantworten wurde aus der Milz und den Lymphknoten der vakzinieren Mäuse eine Zellsuspension hergestellt und diese für ca. 20 Stunden mit einzelnen Peptiden inkubiert. Der Überstand wurde anschließend für einen ELISA verwendet. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit einem Gemisch der Hühner Ovalbumin Peptide OVA1 und OVA2 (OVA) inkubiert. Angegeben ist die optische Dichte bei 450 nm (OD450nm). Dieser Versuch wurde mehrfach durchgeführt. Säulen einer Farbe repräsentieren die Werte jeweils einer Maus.

Um zu analysieren, welche T-Zellpopulation eine Immunreaktion gegen die CD19-Peptide aufweist, wurden CD19-defiziente Mäuse erneut gegen murines CD19 vakziniert. In diesem Versuch wurde ein Peptid-Gemisch der sechs Peptide B, C, D, E, G und H verwendet

(Abbildung 22). Sieben Tage nach der letzten Injektion wurden die Milz und die Lymphknoten isoliert, eine Zellsuspension hergestellt und $CD4^+$ sowie $CD8^+$ T-Zellen aus der Zellsuspension mittels magnetischer Zellseparation isoliert. In vitro wurden 1×10^5 T-Zellen mit 2×10^5 Milzzellen einer naiven CD19-defizienten Maus stimuliert. Zuvor wurden die Milzzellen mit einzelnen CD19 Peptiden (B, C, D, E, G und H) oder den beiden Ovalbumin-Peptiden beladen. Ebenso wurden 1×10^5 T-Zellen mit 1×10^5 B-Zellen aus einer Wildtyp-Maus (CD19-positiv) stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von IFN- γ im Kulturüberstand mittels eines ELISA bestimmt. Als Positivkontrolle wurden die T-Zellen auch mit PMA und Ionomycin (IONO) stimuliert.

Als Kontrolle für den ELISA dienten T-Zellen von Wildtyp-Mäusen, die nach dem gleichen Protokoll mit einem für Hühner-Ovalbumin (pVAX1-OVA) kodierenden Plasmid und den beiden Ovalbumin-Peptiden (OVA1 und OVA2) immunisiert worden waren sowie T-Zellen aus naiven Mäusen. In einer weiteren Versuchsgruppe wurden CD19-defiziente Mäuse gegen Wildtyp-Milzzellen immunisiert (Milz-vakz.). Dies erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die Plasmid-Peptid-Vakzinierungen, nur mit 1×10^7 Milzzellen anstelle der Peptide.

In Abbildung 22 A und B ist zu erkennen, dass sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen aus Ovalbumin vakzinierten Wildtyp-Mäusen Milzzellen erkannten, die mit den Ovalbumin-Peptiden beladen waren. Diese T-Zellen wiesen weder gegen die CD19-Peptide noch gegen Wildtyp-B-Zellen eine Reaktivität auf. Ebenso wiesen T-Zellen aus naiven Mäusen keine Reaktivität gegen eines der getesteten Peptide auf. Im Gegensatz hierzu sezernierten $CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 22 A) aus Mäusen, die gegen murines CD19 mit dem Plasmid und den Peptiden (CD19-vakz.) vakziniert worden waren, große Mengen an IFN- γ nach Stimulation mit Milzzellen, die mit dem CD19-Peptid C beladen waren. Interessanterweise sezernierten die $CD4^+$ T-Zellen sogar mehr IFN- γ nach Stimulation mit Peptid C als nach Stimulation mit PMA und Ionomycin. Weniger IFN- γ sezernierten die $CD4^+$ T-Zellen dieser Mäuse nach Stimulation mit den CD19-Peptiden D und E. Kein IFN- γ wurde nach Stimulation mit Ovalbumin-Peptiden oder den anderen CD19-Peptiden sowie bei Kultivierung der T-Zellen allein sezerniert. Dies zeigt, dass $CD4^+$ T-Zellen spezifisch die CD19-Peptide C, D und E erkannten. Interessanterweise sezernierten die $CD4^+$ T-Zellen auch IFN- γ nach Stimulation mit den Wildtyp-B-Zellen, was zeigt, dass die T-Zellen in der Lage sind, natürlich prozessierte CD19-Peptide auf B-Zellen zu erkennen. Im Gegensatz hierzu wiesen $CD4^+$ T-Zellen aus Mäusen, die gegen Wildtyp-Milzzellen immunisiert worden waren, nur eine Sezernierung von IFN- γ nach Stimulation mit Peptid C beladenen Milzzellen sowie nach Stimulation mit Wildtyp-B-Zellen auf. Verglichen mit der Immunreaktion der $CD4^+$ T-Zellen

aus den Plasmid-Peptid-vakzinierten Mäusen war diese Reaktion allerdings wesentlich schwächer. Dies zeigt deutlich, dass die Plasmid-Peptid-Vakzinierung wesentlich effektiver war als die Vakzinierung mit dem Plasmid und den Milzzellen. Interessanterweise sezernierten $CD8^+$ T-Zellen kein IFN- γ nach Stimulation mit einem CD19-Peptid oder CD19-positiven B-Zellen. Es konnte somit durch die Vakzinierung nur eine $CD4^+$ T-Zell-Immunantwort induziert werden.

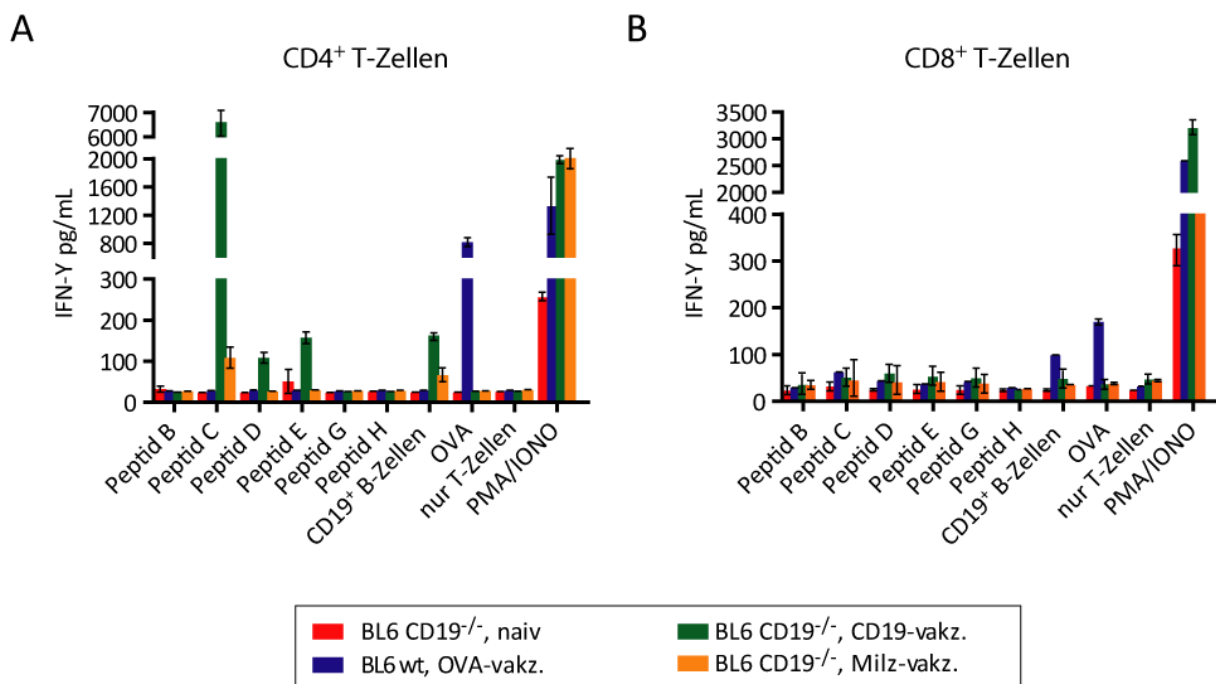


Abbildung 22: Induktion einer $CD19$ -spezifischen $CD4^+$ T-Zell-Immunantwort durch Vakzinierung.

$CD19$ -defiziente Mäuse ($CD19^{-/-}$) wurden mittels einer Kombination einer Plasmidinjektion und Peptidinjektionen (Peptide B, C, D, E, G, H) immunisiert (Vakzinierungsstrategie siehe Abbildung 21). Eine Gruppe von Mäusen wurde nach dem gleichen Protokoll mit 1×10^7 Milzzellen anstelle der Peptide immunisiert (Milz-vakz.). Als Positivkontrolle wurde eine Wildtyp-C57BL/6 Maus (BL6 wt) gegen Hühner-Ovalbumin (OVA) ebenfalls nach dem gleichen Protokoll immunisiert. Sowohl $CD4^+$ (A), als auch $CD8^+$ T-Zellen (B) wurden aus den vakzinierten Mäusen isoliert. In vitro wurden je 1×10^5 T-Zellen mit 2×10^5 Peptid-beladenen $CD19$ -defizienten Milzzellen (Peptid B bis H und OVA) oder 1×10^5 Wildtyp-B-Zellen ($CD19^+$ B-Zellen) stimuliert. Nach ca. 20 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Sekretion von Interferon- γ im ELISA gemessen. Als Positivkontrolle wurden die T-Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin (IONO) stimuliert. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm Standardabweichung. Die Immunreaktion gegen die Peptide C, D und E nach $CD19$ -Vakzinierung konnte mehrfach gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte durch eine Kombination einer Plasmid-Vakzinierung mit Peptid-Vakzinierungen eine $CD4^+$ T-Zell-Immunantwort vermutlich vom T_H1 Typ gegen die $CD19$ -

Peptide C, D und E induziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese T-Zellen auch natürlich prozessiertes CD19 auf Wildtyp-B-Zellen erkennen können.

6.2.2.2 Identifizierung von drei I-A^b-Epitopen

Bisher konnten CD4⁺ T-Zellantworten nach Vakzinierung gegen die CD19-Peptide C, D und E nachgewiesen werden. Da diese Peptide allerdings ca. 40 Aminosäuren lang sind, ist es möglich, dass diese mehrere CD19-Epitope enthalten. Des Weiteren überlappen die Peptide D und E und es wäre möglich, dass beide das gleiche Epitop aufweisen, welches durch die CD4⁺ T-Zellen erkannt wurde. Um die Epitope, die von den T-Zellen erkannt wurden, weiter einzugrenzen und zu charakterisieren, wurden Mäuse erneut nach dem gleichen Protokoll wie in Abbildung 21 mit dem pVAX1-CD19-Plasmid und den CD19-Peptide C, D, E, G und H vakziniert. Für die Abfrage der Immunantwort wurden allerdings kurze, überlappende Peptide (12 Aminosäuren lang) eingesetzt, die die Peptide C, D und E überspannen. Hierfür wurden 1×10^5 CD4⁺ T-Zellen der vakzinierten Mäuse *in vitro* für 20 Stunden mit Milzzellen, die mit einzelnen kurzen Peptiden beladen waren, stimuliert und die Anzahl IFN- γ -sezernierender Zellen im ELISPOT bestimmt. Als Positivkontrolle wurden Milzzellen verwendet, die mit den Peptiden C, D und E beladen waren. Als Negativkontrolle erhielten Mäuse nur Injektionen mit den Adjuvantien CpG und IFA.

In Abbildung 23 ist die Epitop-Analyse für Peptid C dargestellt. In Teil B sind die einzelnen überlappenden Peptide dargestellt, die getestet wurden. Abbildung A zeigt deutlich, dass CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem Peptid C wie erwartet IFN- γ sezernierten (ca. 400 Interferon- γ -sezernierende Zellen). Ein fast ebenso starkes Signal wurde nach Stimulation mit dem kurzen Peptid 27 erreicht, was vermuten lässt, dass dieses kurze Peptid das dominante Epitop enthält. Gegen die nächsten beiden überlappenden Peptide wiesen die T-Zellen eine schwächere Reaktion auf. Da Peptid 29 mit dem Peptid 27 nur in vier Aminosäuren überlappt, könnte dieses Peptid ein weiteres schwächeres CD4⁺ T-Zell-Epitop enthalten. Interessanterweise zeigten die CD4⁺ T-Zellen auch eine schwache Reaktion gegen das Peptid 31. Da das Peptid 31 keine Überlappung mit dem Peptid 27 aufweist, muss dieses Peptid noch ein weiteres immunoreaktives CD4⁺ T-Zell-Epitop enthalten.

Somit konnten innerhalb des CD19-Peptid C mindestens zwei kurze Peptide (27 und 31) identifiziert werden, gegen die CD4⁺ T-Zellen nach Immunisierung eine Reaktion aufwiesen.

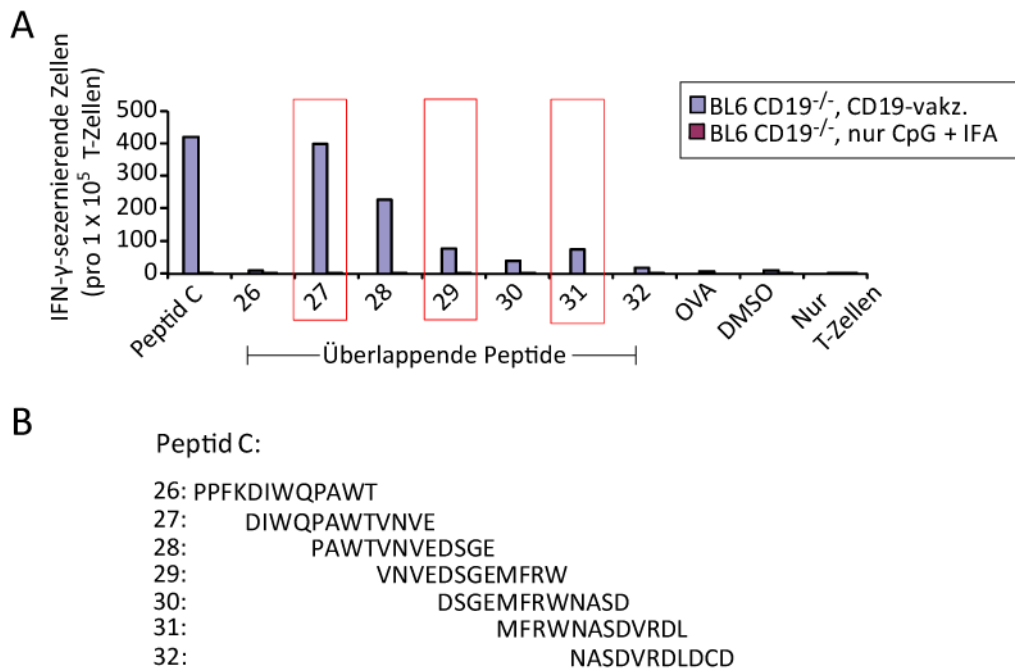


Abbildung 23: Identifizierung von zwei kurzen immunoreaktiven Peptiden in Peptid C.

CD19-defiziente Mäuse wurden mit einem CD19-kodierenden Plasmid sowie einem CD19-Peptid-Gemisch (Peptide C, D, E, G und H) immunisiert (Vakzinierungsstrategie siehe Abbildung 21). Je 1×10^5 isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden anschließend in vitro mit CD19-defizienten Milzzellen (2×10^5), die zuvor mit Einzelpeptiden (CD19-Peptid 26 bis 32) beladen worden waren, stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Milzzellen mit Hühner Ovalbumin (OVA) beladen, unbeladene Milzzellen verwendet oder T-Zellen allein kultiviert. (A) Interferon- γ -ELISPOT-Analyse der Kokultivierungen. (B) Getestete überlappende Peptide. Dieser ELISPOT wurde zweimal durchgeführt.

Abbildung 24 zeigt eine ähnliche Analyse für die Peptide D (Abbildung 24 A) und E (Abbildung 24 B). In Abbildung 24 C sind die verwendeten überlappenden Peptide dargestellt. Nach Immunisierung konnte bei beiden Peptiden erwartungsgemäß nur eine schwache Immunantwort gegen die langen Peptide D und E nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten die CD4⁺ T-Zellen eine Reaktivität gegen das kurze Peptid 42, die ähnlich stark war wie die Reaktivität gegen die Peptide D und E. Peptide D und E überlappen im Bereich der kurzen Peptide 41, 42 und 43. Das kurze Peptid 42 enthält somit vermutlich das immunoreaktive CD4⁺ T-Zell-Epitop.

Die CD4⁺ T-Zellen zeigten gegen keines der anderen Peptide eine Immunreaktion. Ebenso zeigten CD4⁺ T-Zellen der Mäuse, die nur Adjuvans-Injektionen erhielten (CpG + IFA), in keinem der Versuche eine Reaktivität gegen eines der kurzen CD19-Peptide (Abbildung 23 und Abbildung 24). Somit konnten insgesamt durch die CD19-Immunisierungen, CD4⁺ T-Zell-Immunantworten gegen drei bis vier kurze CD19-Peptide induziert werden und somit ebenso viele Epitope identifiziert werden.

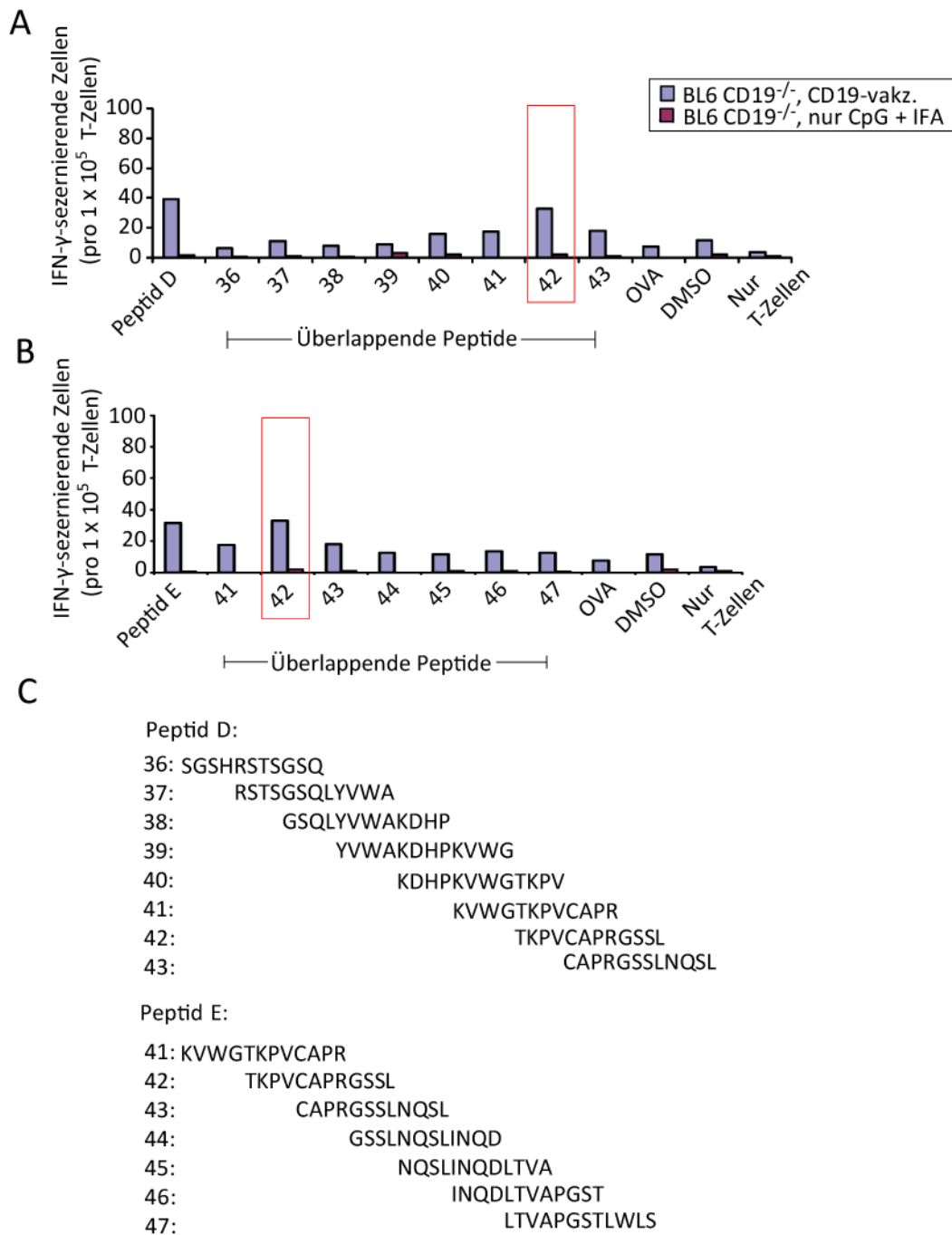


Abbildung 24: Identifizierung eines kurzen immunoreaktiven Peptids in den Peptiden D und E.

CD19-defiziente Mäuse wurden, wie in Abbildung 21 beschrieben, mit einem Plasmid und CD19-Peptiden (C, D, E, G und H) immunisiert. Nach einer Kokultivierung von 1×10^5 CD4⁺ T-Zellen der vakzinierten Mäuse mit 2×10^5 Milzzellen, die mit Einzelpeptiden beladen waren (CD19-Peptide 36 bis 43 in A, CD19-Peptide 41-47 in B), wurde die Sezernierung von Interferon- γ im ELISPOT gemessen. Als Negativkontrolle wurden die Milzzellen mit Hühner-Ovalbumin beladen oder nicht-beladene Milzzellen verwendet sowie die T-Zellen ohne Milzzellen kultiviert. (C) Getestete überlappende Peptide. Diese ELISPOT-Analyse wurde zweimal durchgeführt.

6.2.3 Analyse der Immunantwort in Mäusen, die den Lymphomtransfer überlebten

Nachdem mehrere immunoreaktive CD19-Peptide identifiziert werden konnten, wurde im folgenden Abschnitt die Immunantwort von Mäusen, die einen mehrfachen Lymphomtransfer überlebten, untersucht. Es wurde die Reaktivität der CD4⁺ T-Zellen und auch CD8⁺ T-Zellen gegen die identifizierten CD19-Peptide und Gemische von zahlreichen überlappenden CD19-Peptiden getestet.

Hierfür wurden CD19-defiziente Mäuse verwendet, die einen primären Transfer von 1×10^5 Lymphomzellen sowie einen sekundären Transfer von 1×10^6 Zellen (120 bis 135 Tage nach dem ersten Transfer) überlebt hatten. Circa 60 Tage nach dem zweiten Transfer wurden den Mäusen 1×10^7 Lymphomzellen in Kombination mit CpG und IFA subkutan injiziert, um potentielle Immunantworten zu verstärken (Abbildung 25 A und Abbildung 26 A). Eine Woche nach dieser Injektion erfolgte die Analyse der CD4⁺ und auch CD8⁺ T-Zell-Immunantwort auf Reaktivität gegen CD19-Peptide mittels eines IFN- γ -ELISPOT. Hierfür wurden aus einer Zellsuspension der Milz und der Lymphknoten die CD4⁺ und auch die CD8⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation isoliert. Die T-Zellen wurden mit den CD19-Peptiden in vitro, wie in Abschnitt 6.2.2.1 beschrieben, stimuliert. Zudem wurden jeweils 1×10^5 CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen in vitro mit 1×10^5 Lymphomzellen, die aus Tumoren von Wildtyp- oder STAT1-defizienten Mäusen isoliert wurden (primäre Lymphomzellen), kokultiviert und die Anzahl Interferon- γ -sezernierender Zellen im ELISPOT analysiert.

Abbildung 25 B zeigt das Ergebnis für die Analyse der CD4⁺ T-Zellen. Getestet wurde in diesem Teil die Reaktivität gegen die CD19-Peptide 27 und 42 sowie gegen Gemische (Mix 1 bis Mix 9) von neun bis zehn überlappenden Peptiden (Länge 15 aa, Überlappung: 11 aa), die fast das gesamte CD19-Protein überspannen, ausgenommen der Bereiche des CD19-Proteins, gegen die in Vakzinierungsversuchen keine CD4⁺ T-Zell-Immunantwort induziert werden konnte. In einigen Versuchen wurden CD4⁺ T-Zellen überlebender Mäuse zusätzlich auf eine Reaktivität gegen das Peptid 31 untersucht, welche allerdings immer negativ war (Daten nicht gezeigt).

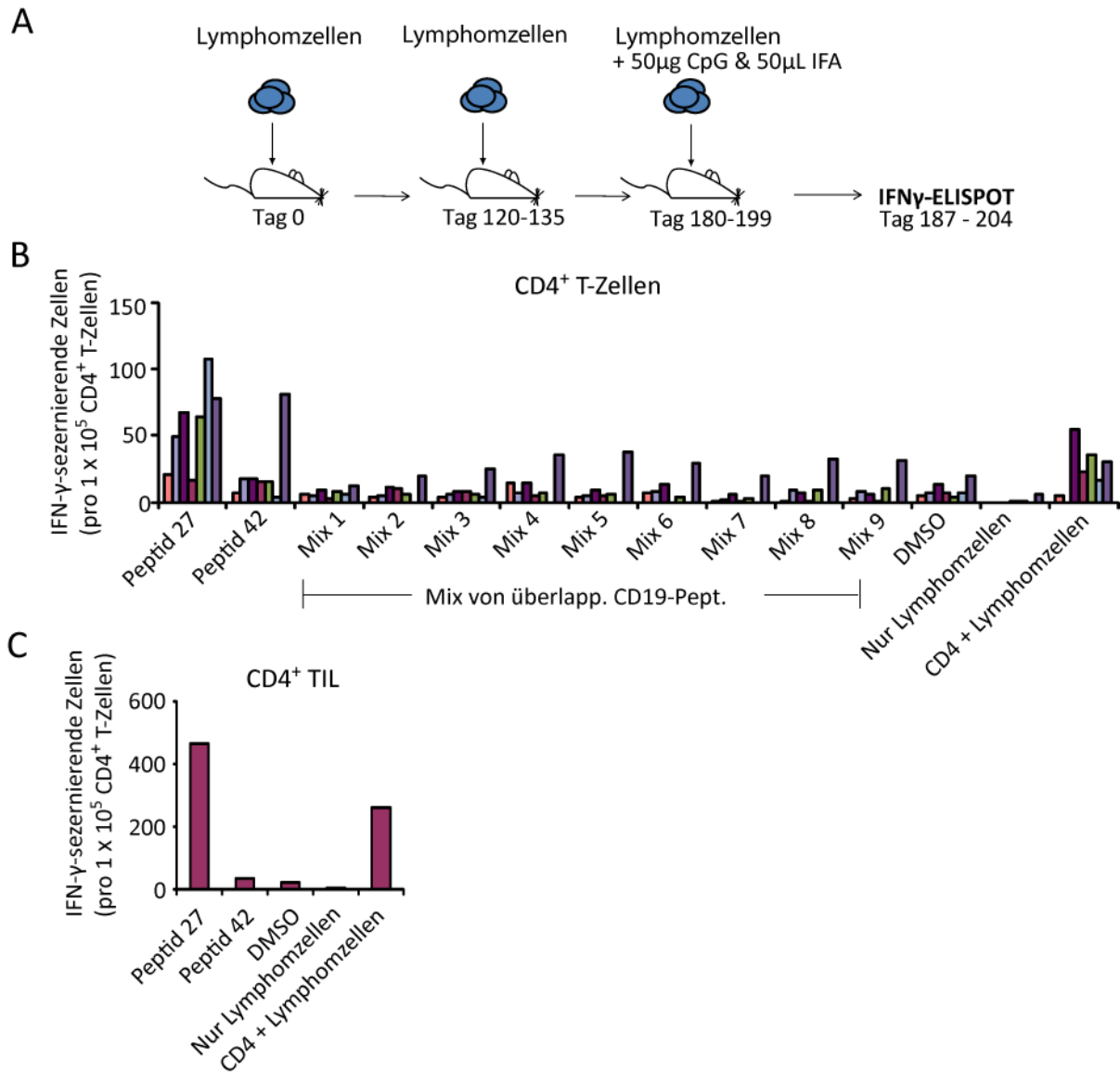


Abbildung 25: Analyse der CD4 $^+$ T-Zell-Immunantwort in Mäusen, die den Lymphomtransfer überlebten.

120 bis 135 Tage nach primärem Transfer von 1×10^5 CD19-positiven Lymphomzellen wurden den überlebenden Mäusen 1×10^6 Lymphomzellen injiziert. Nach weiteren 60 Tagen erfolgte eine weitere Injektion von 1×10^7 Lymphomzellen in Kombination mit CpG und IFA (inkomplettes Freundesches Adjuvans). 7 Tage nach der letzten Injektion wurden zur Analyse der Immunantwort der Mäuse T-Zellen aus einer Milz- und Lymphknotensuspension mittels magnetischer Zellseparation isoliert. (B) IFN- γ -ELISPOT-Analyse nach Kokultivierung von 1×10^5 CD4 $^+$ T-Zellen mit 2×10^5 Peptid-beladenen Milzzellen sowie 1×10^5 CD19-positiven Lymphomzellen. Die Milzzellen wurden mit 2,5 µg der CD19-Peptide 27 oder 42 sowie Gemischen (Mix 1 bis 9) von neun bis zehn kurzen CD19-Peptiden (je 2,5 µg; Länge: 15 aa; Überlappung: 11 aa), die fast das gesamte CD19-Proteins überspannen, beladen. Als Negativkontrolle wurden nicht beladene Milzzellen verwendet oder CD19-positive Lymphomzellen ohne T-Zellen kultiviert. Säulen einer Farbe repräsentieren die Werte jeweils einer Maus. (C) Aus dem schrumpfenden Tumor einer Maus wurden mittels magnetischer Zellseparation CD4 $^+$ T-Zellen isoliert. Nach Kokultivierung von 5×10^4 T-Zellen mit 2×10^5 Peptid-beladenen Milzzellen (Peptid 27 oder 42) oder mit 1×10^5 Lymphomzellen wurde die Sezernierung von Interferon- γ im ELISPOT gemessen. Die Anzahl der Interferon- γ -sezernierenden Zellen wurde für 1×10^5 CD4 $^+$ T-Zellen berechnet. Als Negativkontrolle wurden Milzzellen für die Kokultur verwendet, die unbeladen waren sowie Lymphomzellen ohne T-Zellen kultiviert.

Abbildung 25 B zeigt, dass fast alle Mäuse $CD4^+$ T-Zellen aufwiesen, die für das CD19-Peptid 27 spezifisch waren, obwohl diese Mäuse nie mit einem CD19-Peptid oder Plasmid vakziniert worden waren. Nach Stimulation mit anderen Peptiden war die Anzahl IFN- γ -sezernierender $CD4^+$ T-Zellen im ELISPOT in der Regel sehr gering. Nur die $CD4^+$ T-Zellen einer Maus zeigten Reaktivitäten gegen das Peptid 42 und einige CD19-Peptid-Gemische. Interessanterweise erkannten $CD4^+$ T-Zellen auch die primären Lymphomzellen in vitro. Allerdings war die Anzahl Interferon- γ -sezernierender $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation mit Lymphomzellen sehr gering.

In Abbildung 25 C ist eine ELISPOT-Analyse von $CD4^+$ T-Zellen gezeigt, die aus einem schrumpfenden Tumor mit Hilfe von Antikörper beladenen magnetischen Kügelchen isoliert worden waren. Bisher konnten aber nur aus einem einzigen dieser Tumoren genügend Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) für eine Analyse isoliert werden. Für den ELISPOT wurden jeweils 5×10^4 $CD4^+$ T-Zellen mit 2×10^5 Milzzellen kokultiviert, die zuvor mit den CD19-Peptiden 27 oder 42 beladen worden waren. Für eine Negativkontrolle wurden unbeladen Milzzellen verwendet. Zudem wurden auch 5×10^4 T-Zellen in einem Ansatz mit 1×10^5 primären Lymphomzellen kokultiviert. Nach ca. 20 Stunden Kokultivierung wurde die Anzahl IFN- γ -sezernierender Zellen im ELISPOT bestimmt und schließlich für 1×10^5 $CD4^+$ T-Zellen berechnet. Als weitere Negativkontrolle wurden primäre Lymphomzellen ohne T-Zellen kultiviert. Abbildung 25 C zeigt, dass einige Tumor-infiltrierende $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation mit Milzzellen, die mit dem CD19-Peptid 27 beladen waren, IFN- γ -sezernierten (kalkuliert: ca. 460 IFN- γ -sezernierende Zellen je 1×10^5 T-Zellen). Die $CD4^+$ T-Zellen erkannten auch primäre Lymphomzellen in vitro (kalkuliert: ca. 260 IFN- γ -sezernierende Zellen je 1×10^5 T-Zellen). Gegen das CD19-Peptid 42 wiesen die Tumor-infiltrierenden T-Zellen keine Reaktivität auf. Insgesamt unterstreicht Abbildung 25 die Bedeutung von $CD4^+$ T-Zellen mit Spezifität für das CD19-Peptid 27 für die Abstoßung der Lymphomzellen in den Mäusen.

Eine Analyse auf CD19-Spezifität von $CD8^+$ T-Zellen aus Mäusen, die den Lymphomtransfer überlebten, ist in Abbildung 26 B gezeigt. In diesem Experiment wurden allerdings neben den Gemischen (Mix 1 bis Mix 9) der kurzen, überlappenden CD19-Peptide, auch noch zwei Gemische der größeren Peptide A, B, C, D, E, G und H getestet. Somit wurden Peptide untersucht, die zusammen das gesamte CD19-Protein überspannen.

Die ELISPOT-Analyse zeigt, dass keine der analysierten Mäuse eine CD19-spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort aufwies. Die Anzahl IFN- γ -sezernierender $CD8^+$ T-Zellen nach Stimulation mit den einzelnen Peptiden war jeweils kleiner als zehn Zellen pro 1×10^5 T-Zellen. Allerdings

sezernierten CD8^+ T-Zellen einiger Mäuse nach Stimulation mit primären Lymphomzellen $\text{IFN-}\gamma$ (20 bis 75 Interferon- γ -sezernierende Zellen je 1×10^5 T-Zellen). Dies lässt vermuten, dass Mäuse nach Transfer der Lymphomzellen eine CD8^+ T-Zell-Immunantwort gegen ein weiteres Antigen auf den Lymphomzellen entwickelten.

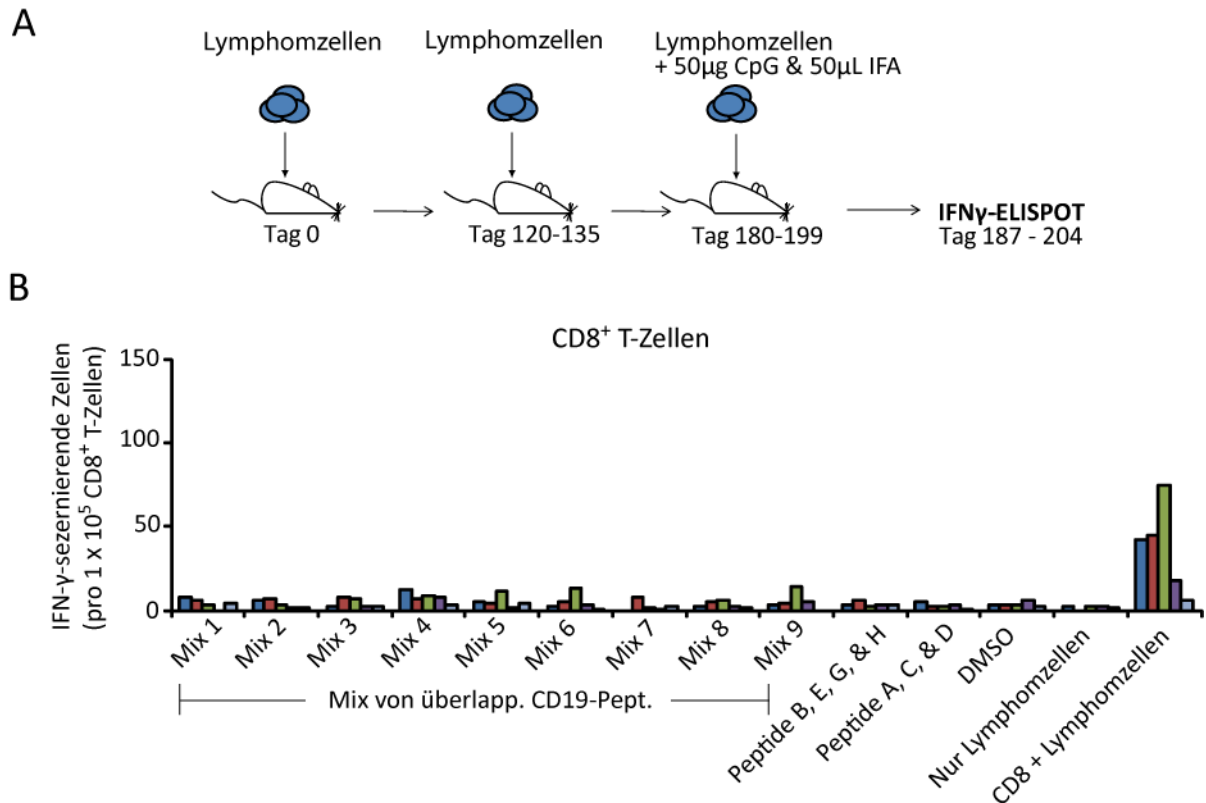


Abbildung 26: Mäuse, die den Transfer von Lymphomzellen überlebten, wiesen keine CD19 -spezifische CD8^+ T-Zell-Immunantwort auf.

(A) Mehrfache Injektion von CD19 -positiven Lymphomzellen in CD19 -defiziente Mäuse (in Abbildung 25 genauer beschrieben). (B) 1×10^5 CD8^+ T-Zellen der Mäuse wurden mit 2×10^5 Milzzellen kokultiviert, die mit Gemischen aus neun bis zehn überlappenden CD19 -Peptiden (je $2,5 \mu\text{g}$; Länge: 15 aa; Überlappung: 11 aa) oder einem Gemisch der Peptide B, E, G & H oder A, C & D (je $2,5 \mu\text{g}$) beladen waren. Zusammen überspannen diese CD19 -Peptide das gesamte CD19 -Protein. Ebenso wurden 1×10^5 CD8^+ T-Zellen mit 1×10^5 CD19 -positiven Lymphomzellen kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden 1×10^5 CD8^+ T-Zellen mit 2×10^5 unbeladenen Milzzellen kokultiviert sowie 1×10^5 Lymphomzellen ohne T-Zellen kultiviert. Mittels eines ELISPOT wurde die Sezernierung von Interferon- γ gemessen. Säulen einer Farbe repräsentieren die Werte jeweils einer Maus.

6.2.4 Etablierung CD19 -spezifischer T-Zelllinien

Aufgrund der Hinweise, dass CD19 -spezifische CD4^+ T-Zellen für die Abstoßung der Lymphomzellen wichtig sein könnten, wurde damit begonnen, CD19 -spezifische CD4^+ T-Zelllinien zu etablieren. Hierfür wurden Mäuse gegen die CD19 -Peptide C, D, E, G und H immunisiert, CD4^+ T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation isoliert und in vitro

mehrfach mit Milzzellen, die mit den Peptiden 27, 31 und 42 beladen waren, stimuliert. Allerdings konnten nur $CD4^+$ T-Zelllinien, nach Stimulation mit den CD19-Peptiden 27 (T-Zelllinie 27) und 42 (T-Zelllinie 42) etabliert werden, nicht jedoch nach Stimulation mit dem CD19-Peptid 31. Nach mehreren Stimulationen wurde die Spezifität der beiden T-Zelllinien *in vitro* getestet. Hierfür wurden 100 Zellen der T-Zelllinie 27 mit 1×10^5 Milzzellen kokultiviert, die zuvor mit dem CD19-Peptid 27 oder dem Peptid OVA2 (Peptid des Hühner Ovalbumins; bindet auf MHC-Klasse II-Moleküle) beladen worden waren. Mittels eines ELISPOT wurde anschließend die Anzahl IFN- γ -sezernierender Zellen bestimmt (Abbildung 27 A). In weiteren Ansätzen wurden 100 T-Zellen mit 1×10^5 primären Lymphomzellen stimuliert und die T-Zellen sowie die Lymphomzellen allein kultiviert. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die $CD4^+$ T-Zelllinie 27 nur Milzzellen, die mit dem Peptid 27 beladen waren sowie CD19-positive Lymphomzellen erkannte. Gegen OVA-beladene Milzzellen wiesen die T-Zellen keine Reaktivität auf. Ungefähr 80% der T-Zellen (ca. 80 Interferon- γ -sezernierende Zellen in 100 $CD4^+$ T-Zellen) zeigten eine Spezifität für das Peptid 27.

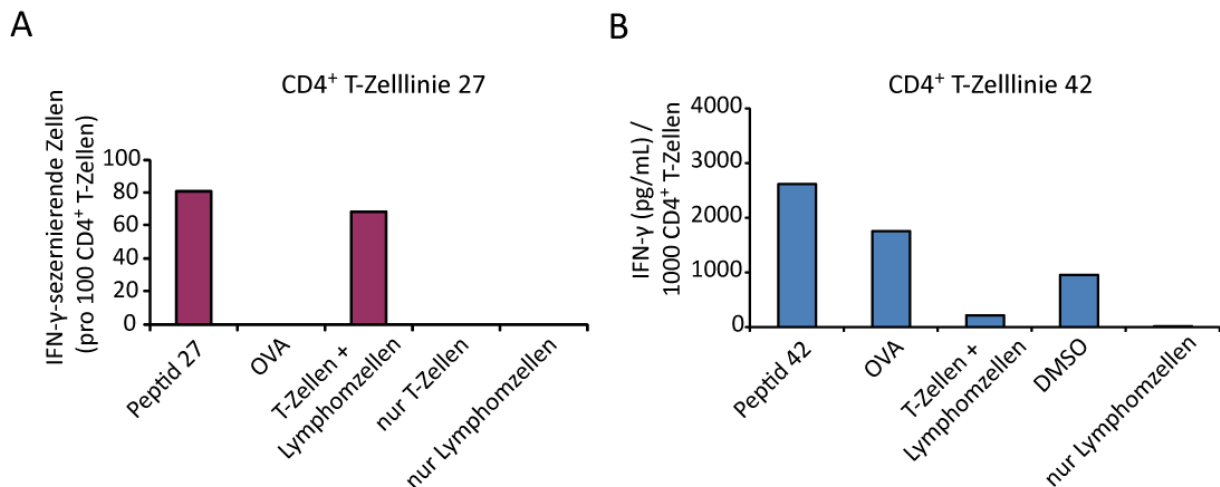


Abbildung 27: Generierung von CD19-spezifischen $CD4^+$ T-Zelllinien.

Aus CD19-defizienten Mäusen, die gegen CD19 immunisiert worden waren, wurden $CD4^+$ T-Zellen isoliert und *in vitro* mehrfach mit den CD19-Peptiden 27 und 42 zur Generierung stabiler Zelllinien stimuliert. (A) Analyse der Peptidspezifität einer $CD4^+$ T-Zelllinie, die *in vitro* mehrfach mit dem CD19-Peptid 27 stimuliert wurde. 100 T-Zellen wurden mit 1×10^5 Peptid 27-beladenen Milzzellen oder 1×10^5 Lymphomzellen für ca. 20 Stunden stimuliert. Als Kontrollen wurden die T-Zellen sowie die Lymphomzellen allein kultiviert und 1×10^5 T-Zellen mit Milzzellen kokultiviert, die mit einem Ovalbumin-Peptid (OVA) beladen waren. Die Sekretion von Interferon- γ wurde im ELISPOT gemessen. (B) IFN- γ -ELISA-Analyse der Spezifität einer $CD4^+$ T-Zelllinie, die mit dem CD19-Peptid 42 mehrfach stimuliert wurde. 1000 $CD4^+$ T-Zellen wurden mit 1×10^5 Milzzellen, welche mit dem CD19-Peptid 42 beladen waren sowie 1×10^5 Lymphomzellen für ca. 20 Stunden kokultiviert und der Überstand für den ELISA verwendet. Zur Kontrolle wurden die T-Zellen mit Ovalbumin-beladenen Milzzellen stimuliert sowie Lymphomzellen und T-Zellen allein kultiviert. Die Peptid-Spezifität beider Zelllinien wurde mehrfach kontrolliert.

Abbildung 27 B zeigt, dass die CD4⁺ T-Zelllinie 42 zwar Milzzellen erkannte, die mit dem Peptid 42 beladen waren, jedoch auch eine Hintergrundreaktivität gegen Ovalbumin (OVA2) beladene Milzzellen aufwies und zudem auch IFN- γ ohne Stimulation mit Milzzellen sezernierte. Für diesen Versuch wurden 1000 CD4⁺ T-Zellen der Linie 42 mit 1×10^5 Peptid-beladenen Milzzellen, oder 1×10^5 primären Lymphomzellen stimuliert und die Sezernierung von IFN- γ mittels eines ELISA gemessen.

Somit konnte insgesamt nur eine CD4⁺ T-Zelllinie generiert werden, die spezifisch für murines CD19 ist.

6.2.4.1 Die CD19-spezifische T-Zelllinie 27 weist in vitro keine Zytotoxizität gegen Lymphomzellen auf

Da gezeigt werden konnte, dass die CD4⁺ T-Zelllinie 27 in vitro primäre Lymphomzellen erkennt, stellte sich als nächstes die Frage, ob diese Zellen auch die Lymphomzellen lysieren können. Um dies zu analysieren, wurde ein Calcein-Freisetzungs-Experiment durchgeführt. Hierfür wurden Lymphomzellen mit Calcein-Acetoxy-methylester markiert und anschließend mit der CD4⁺ T-Zelllinie 27 in verschiedenen Verhältnissen für drei Stunden kokultiviert. Calcein ist ein Fluorescein-Derivat, das ins Zytosol transportiert wird, wo es aktiviert wird. Bei einer Zelllyse wird das fluoreszierende Protein in den Kulturüberstand freigesetzt. Aus diesem Grund wurde nach der Kokultivierung die Fluoreszenz im Kulturüberstand gemessen. Abbildung 28 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Als Positivkontrolle wurden die Lymphomzellen mit Triton X-100 inkubiert. Nach dieser maximalen Lyse (Max) war die Fluoreszenz verglichen mit der spontanen Lyse, für die die Lymphomzellen nur im Medium kultiviert wurden, deutlich erhöht. Allerdings konnte weder nach Kokultivierung der Lymphomzellen mit naiven T-Zellen, noch mit Zellen der T-Zelllinie 27 eine erhöhte Fluoreszenz im Kulturüberstand, verglichen mit der spontanen Lyse, festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die T-Zellen in vitro in diesem experimentellen Ansatz keine Lymphomzellen lysierten.

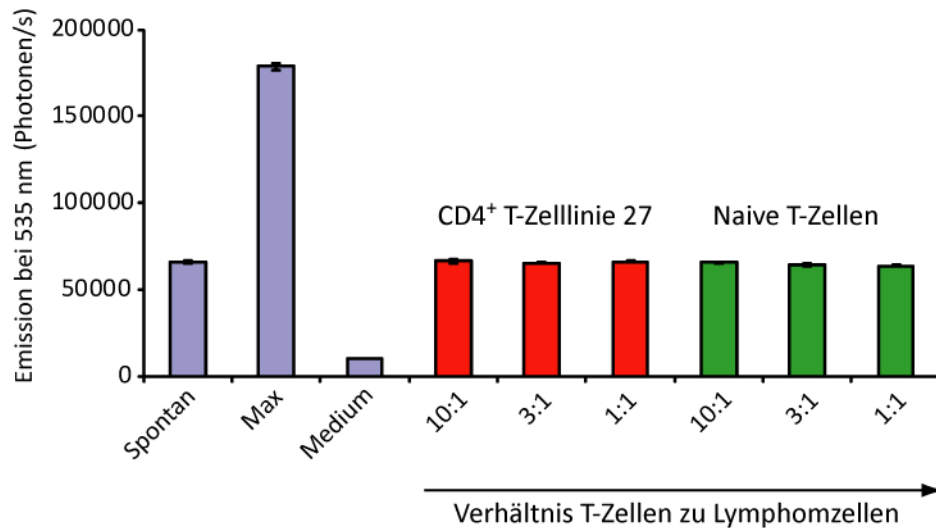


Abbildung 28: Die CD4⁺ T-Zelllinie 27 weist keine Zytotoxizität gegen Lymphomzellen in vitro auf.

CD19-positive primäre Lymphomzellen wurden nach Färbung mit Calcein-Acetoxy-methylester für 3 Stunden mit der T-Zelllinie 27 oder naiven T-Zellen in verschiedenen Verhältnissen kokultiviert. Die Fluoreszenz wurde im Kulturüberstand gemessen. Als Kontrollen wurden Lymphomzellen allein (spontane Lyse) oder mit Triton X-100 inkubiert (Max; maximale Lyse). Zusätzlich wurde die Fluoreszenz des Mediums gemessen. Gezeigt sind arithmetische Mittelwerte von Dreifachbestimmungen \pm Standardabweichung. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

6.2.5 Erhöhtes Überleben durch CD19-spezifische Immunantworten

Im folgenden Abschnitt wurde analysiert, ob eine CD19-spezifische T-Zell-Immunantwort einen positiven Einfluss auf das Überleben nach Transfer von 291-Lymphomzellen hat. Hierfür wurden CD19-defiziente Mäuse, nach dem gleichen Protokoll wie in Abbildung 21, mit dem CD19-kodierenden Plasmid pVAX1-CD19 und den CD19-Peptiden C, D, E, G und H immunisiert. Sieben Tage nach der letzten Injektion wurden den Mäusen 1×10^6 Lymphomzellen subkutan in die rechte oder linke Flanke injiziert. Über 90 Tage nach Transfer der Lymphomzellen wurden das Tumorwachstum sowie das Überleben der Mäuse verfolgt. Als Kontrollgruppe wurden ebenfalls CD19-defiziente Tiere gegen ein irrelevantes Antigen, in diesem Fall mit dem für Hühner Ovalbumin kodierenden Plasmid pVAX1-OVA sowie den Ovalbumin-Peptiden OVA1 und OVA2, immunisiert.

Abbildung 29, welche das Ergebnis dieses Versuchs darstellt, zeigt, dass elf von 19 CD19-immunisierten Mäusen (ca. 60 %) den Lymphomtransfer bis Tag 90 überlebten (d.h. keinen Tumor entwickelten, der größer war als 10 mm). In der Kontrollgruppe war dies nur bei drei von 19 Tieren der Fall (ca. 16 %). Somit wirkt sich eine CD19-spezifische T-Zell-Immunantwort positiv auf das Überleben der Mäuse nach Lymphomtransfer aus.

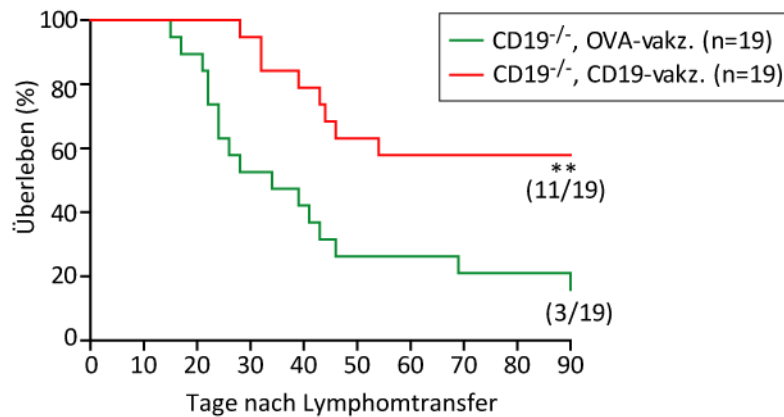


Abbildung 29: Überleben und Tumorwachstum nach Immunisierung gegen murines CD19.

CD19-defiziente Mäuse wurden nach dem Vakzinierungsprotokoll aus Abbildung 21 mit den CD19-Peptiden C, D, E, G und H immunisiert. 7 Tage nach der letzten Injektion wurden 1×10^6 CD19-positive Lymphomzellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. In der Kontrollgruppe wurden Mäuse vor Lymphomtransfer nach dem gleichem Protokoll gegen Hühner Ovalbumin (OVA) immunisiert. Gezeigt ist das Überleben in Prozent für 90 Tage nach Tumortransfer. Die Anzahl der Tiere, die den Lymphomtransfer überlebten sowie die Anzahl der Versuchstiere sind angegeben.

Um herauszufinden ob $CD4^+$ T-Zellen, die spezifisch für das CD19-Peptid 27 sind, das Überleben sowie das Wachstum der Tumoren positiv beeinflussen können, wurden T-Zellen der Linie 27 (1×10^6) intravenös in CD19-defiziente Mäuse kurz vor Transfer von 1×10^6 Lymphomzellen injiziert. Eine Kontrollgruppe erhielt ebenso viele naive T-Zellen. Analysiert wurden jeweils zehn Tiere pro Gruppe. Abbildung 30 zeigt das Überleben sowie das Tumorwachstum nach Transfer der Lymphomzellen für 100 Tage. In Teil A ist zu erkennen, dass durch den Transfer der T-Zelllinie 27 doppelt so viele Mäuse (8/10), verglichen mit der Kontrollgruppe (4/10), den Lymphomtransfer bis Tag 100 überlebten. Teil B der Abbildung zeigt das Tumorwachstum in beiden Versuchsgruppen, jeweils aufgeteilt in Mäuse, die die Lymphomzellen abgestoßen haben (Abstoßungsgruppe) und in eine Gruppe an Tieren, in denen die Lymphomzellen progressiv wuchsen (Progressions-Gruppe). In letzterer Gruppe scheint das Tumorwachstum nach Transfer der CD19-spezifischen T-Zellen schneller verlaufen zu sein, als nach Transfer der naiven T-Zellen. Allerdings war in dieser Gruppe die Anzahl der Versuchstiere sehr gering.

Das erhöhte Überleben nach Transfer der T-Zelllinie 27 ist zwar statistisch aufgrund der kleinen Versuchsgruppe noch nicht signifikant, bekräftigt dennoch die Vermutung, dass $CD4^+$ T-Zellen, die für das CD19-Peptid 27 spezifisch sind, das Überleben der Mäuse verbessern können. Insgesamt zeigen Abbildung 29 und Abbildung 30, dass CD19-spezifische Immunantworten einen positiven Einfluss auf das Überleben der Mäuse haben können.

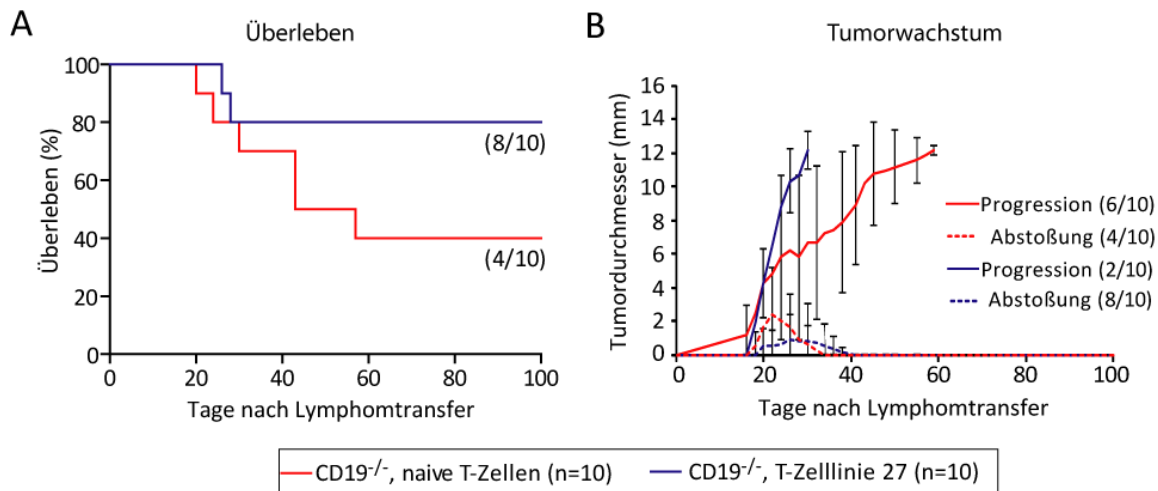


Abbildung 30: Der Transfer von CD19-spezifischen CD4⁺ T-Zellen erhöht das Überleben.

Kurz vor Injektion (subkutan) von 1×10^6 Lymphomzellen wurden 1×10^6 Zellen der CD4⁺ T-Zelllinie 27 CD19-defizienten Mäusen intravenös injiziert. Eine Kontrollgruppe erhielt ebenso viele naive T-Zellen. (A) Überleben (Tumor ≤ 10 mm) der Mäuse in Prozent für 100 Tage. Die Anzahl der überlebenden Mäuse sowie die Anzahl der Versuchstiere sind angegeben. (B) Entwicklung des durchschnittlichen, akkumulierte Tumordurchmessers \pm Standardabweichung in Mäusen, die die Lymphomzellen abgestoßen haben (Abstoßung) sowie in Mäusen, in denen der Tumor progressiv wuchs (Progression). Auf Grund der geringen Tierzahlen ist das Ergebnis noch nicht signifikant ($p=0,1$).

6.2.6 Klonierung der CD19-spezifischen T-Zelllinie 27

Ein essentieller Schritt zur molekularen Klonierung der Gene eines T-Zellrezeptors ist die zelluläre Klonierung einer Antigen-spezifischen T-Zelle. Um die Gene eines T-Zellrezeptors zu erhalten, der für CD19 spezifisch ist, wurde die polyklonale T-Zelllinie 27 kloniert. Dies erfolgte durch Verdünnungen, bei denen nur drei bis zehn T-Zellen pro 96-Loch eingesetzt wurden. Diese wurden dann über mehrere Tage mit dem CD19-Peptid 27 stimuliert, bis einzelne Klone stabil wuchsen. Mittels eines IFN- γ -ELISA wurde schließlich die CD19-Spezifität der einzelnen Klone analysiert. Hierfür wurden 1000 Zellen der Klone in vitro mit 1×10^6 Milzzellen, die mit dem CD19-Peptid 27 oder dem irrelevanten Hühner-Ovalbumin Peptid OVA2 beladen waren, stimuliert und die Sezernierung von IFN- γ in den Kulturüberstand gemessen.

Abbildung 31 A zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Insgesamt wurden vier Klone (27.1 bis 27.4) getestet. Als Positivkontrolle dienten Zellen der T-Zelllinie 27. Die Abbildung zeigt, dass alle vier Klone nur nach Stimulation mit dem CD19-Peptid 27 IFN- γ -sezernierten, was bedeutet, dass alle für dieses Peptid spezifisch sind. Allerdings sezernierte der T-Zellklon 27.2 am meisten IFN- γ , weshalb dieser für weitere Versuche verwendet wurde.

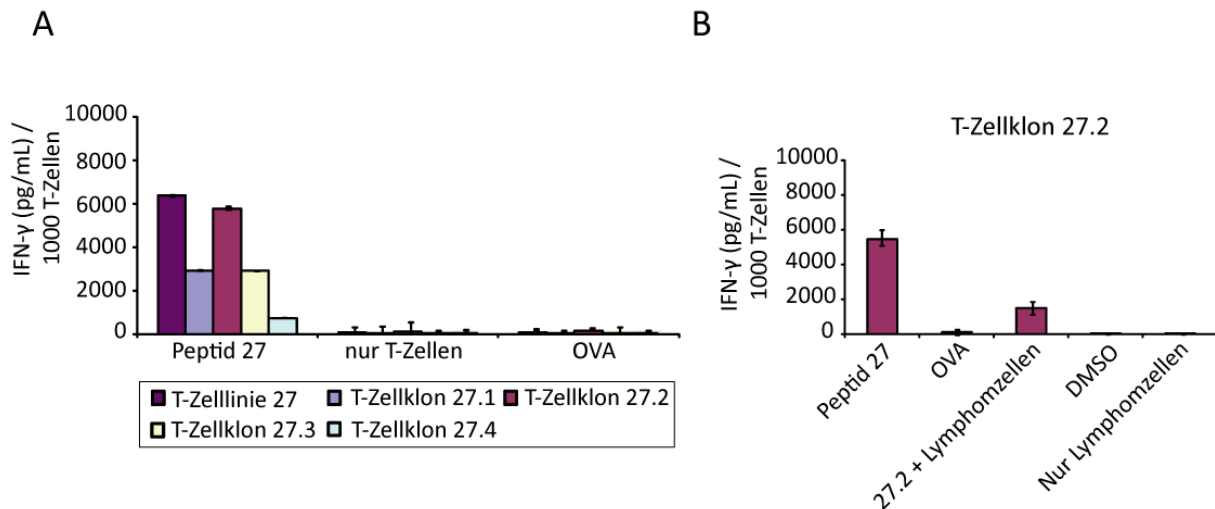


Abbildung 31: Klonierung der CD19-spezifischen T-Zelllinie 27.

Nach Klonierung der CD4⁺ T-Zelllinie 27 wurden einzelne Klone auf ihre Funktionalität mittels eines Interferon- γ -ELISA getestet (A). 1000 T-Zellen wurden jeweils mit 1×10^5 Milzzellen, die mit Peptid 27 oder Ovalbumin (OVA) beladen waren, stimuliert oder ohne Stimulus für ca. 20 Stunden kultiviert. Der Überstand wurde für den ELISA verwendet. (B) Test des T-Zellklons 27.2 auf Reaktivität gegen murine Lymphomzellen, mittels eines Interferon- γ -ELISA. Hierfür wurden 1000 T-Zellen mit 1×10^5 Lymphomzellen kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden die Lymphomzellen allein kultiviert und T-Zellen mit 1×10^5 Hühner Ovalbumin beladenen Milzzellen oder 1×10^5 unbeladenen Milzzellen stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die T-Zellen mit 1×10^5 Milzzellen, die mit dem CD19-Peptid 27 beladen waren, inkubiert. Der Überstand wurde für den ELISA verwendet. Gezeigt sind jeweils arithmetische Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm Standardabweichung. Dieses Ergebnis wurde mehrfach reproduziert.

In Teil B von Abbildung 31 wurde untersucht, ob der T-Zellklon 27.2 auch spezifisch primäre Lymphomzellen erkennt. Hierfür wurden 1000 Zellen des Klons 27.2 mit 1×10^5 Lymphomzellen kokultiviert. Als Negativkontrollen wurden die Lymphomzellen ohne T-Zellen kultiviert sowie mit 1×10^5 Milzzellen stimuliert, die mit dem Hühner Ovalbumin Peptid OVA2 beladen waren. Als Positivkontrolle diente eine Kokultur der T-Zellen mit 1×10^5 Milzzellen, die mit dem CD19-Peptid 27 beladen waren. Nach ca. 20 Stunden Kokultur wurde jeweils die Sezernierung von IFN- γ in den Kulturüberstand mittels eines ELISA gemessen. Abbildung 31 B zeigt, dass die T-Zellen sehr viel IFN- γ (mehr als 5000 pg/mL) nach Stimulation mit dem Peptid 27 sezernierten. Auch nach Stimulation mit den Lymphomzellen wurde eine IFN- γ -Sezernierung (ca. 1500 pg/mL) festgestellt. Somit scheint dieser T-Zellklon die Lymphomzellen in vitro erkennen zu können.

6.2.6.1 Analyse der Zytokin-Sezernierung des CD19-spezifischen T-Zellklons

Als nächstes wurde versucht zu bestimmen, ob der $CD4^+$ T-Zellklon 27.2 nur T_H1 -Zytokine sezerniert. Hierfür wurde die Sezernierung von Zytokinen nach Stimulation mit dem CD19-Peptid 27 analysiert. Mittels eines sogenannten Zytokin-Array wurde die Sezernierung von diversen Zytokinen (siehe Abbildung 5) in den Kulturüberstand nach Stimulation von 1×10^6 T-Zellen mit 1×10^6 Milzzellen, die mit dem Peptid 27 beladen waren, untersucht. Als Kontrolle diente Kulturüberstand einer Kokultivierung von 1×10^6 T-Zellen mit 1×10^6 Milzzellen, die mit dem Hühner-Ovalbumin Peptid OVA2 beladen waren.

In Abbildung 32 ist das Ergebnis dieser Analyse gezeigt. Nach Ovalbumin-Stimulation (OVA) wurden nur Signale für die Positivkontrollen des Zytokin-Array detektiert. Allerdings konnte nach Stimulation mit dem CD19-Peptid 27 eine deutliche Sezernierung verschiedener Zytokine festgestellt werden. So zeigt diese Abbildung, dass die T-Zellen GM-CSF, IFN- γ , IL-3 und TNF- α , welche von $CD4^+$ T-Zellen des Typs T_H1 gebildet werden, sezernierten. Es konnte jedoch keine Sezernierung der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 oder IL-17 festgestellt werden, welche von T_H2 , T_H17 oder regulatorischen $CD4^+$ T-Zellen gebildet werden. Somit scheinen die T-Zellen des Klon 27.2 vom T_H1 -Typ zu sein. Neben diesen Zytokinen konnte zusätzlich eine Sezernierung von CCL1, IL-2, CXCL10, CCL3, CCL4 und CCL5 festgestellt werden. Dagegen muss hier auch angemerkt werden, dass nicht alle Zytokine zwangsläufig von den T-Zellen sezerniert werden. Es ist auch denkbar, dass die T-Zellen durch die Sezernierung von Zytokinen, beispielsweise von IFN- γ , Zellen in der Milzzellsuspension stimulieren, weitere Zytokine, beispielsweise CXCL10, zu sezernieren (Luster et al., 1985, Farber, 1990).

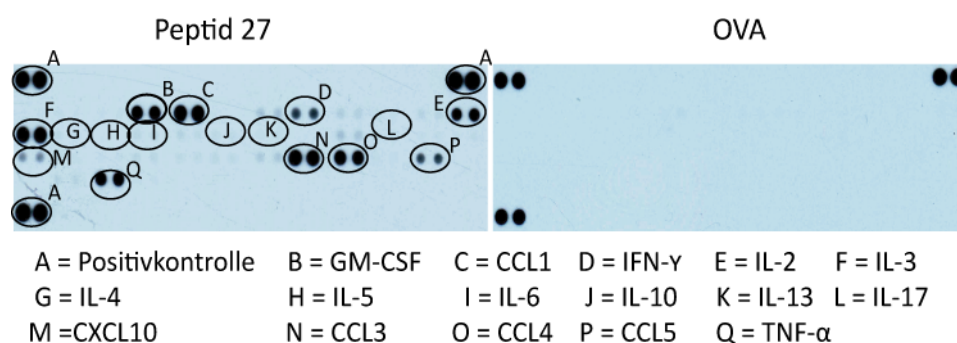


Abbildung 32: Der $CD4^+$ T-Zellklon 27.2 sezerniert T_H1 -Zytokine.

1×10^6 Zellen des T-Zellklons 27.2 wurden mit 1×10^6 Milzzellen, die zuvor mit Peptid 27 beladen worden waren, für ca. 20 Stunden stimuliert. Der Kulturüberstand wurde für einen Zytokin-Array verwendet. Als Negativkontrolle wurden die T-Zellen mit OVA-beladenen Milzzellen stimuliert. Das Ergebnis wurde reproduziert.

In Abbildung 33 wurde die Zytokin-Sezernierung nach Stimulation von 1×10^6 T-Zellen mit 1×10^6 Lymphomzellen analysiert. Als Negativkontrolle wurden die Lymphomzellen separat kultiviert. Abbildung 33 zeigt, dass nach Stimulation mit Lymphomzellen die gleichen Zytokine sezerniert wurden wie nach Stimulation mit Peptid-beladenen Milzzellen. Die einzige Ausnahme ist CXCL10, das nach Stimulation mit Lymphomzellen nicht sezerniert wurde. Allerdings war die Sezernierung von CXCL10 nach Stimulation mit Milzzellen ohnehin sehr schwach, weshalb es in diesem Versuch nach Stimulation mit Lymphomzellen möglicherweise nur nicht detektiert werden konnte. Abbildung 33 verdeutlicht, dass die Lymphomzellen in der Lage sind, CD19-spezifische T-Zellen in einer ähnlichen Art und Weise zu stimulieren und vermutlich auch zu aktivieren, wie die antigenpräsentierenden Zellen in der Milzzellsuspension.

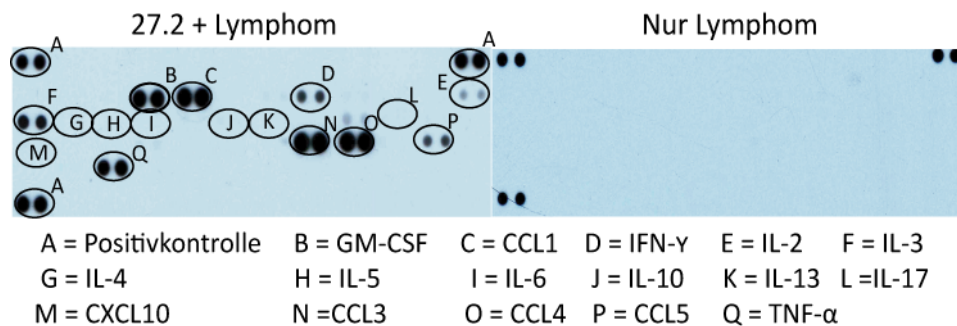


Abbildung 33: Zytokin-Sezernierung des T-Zellklons 27.2 nach Stimulation mit Lymphomzellen.

Nach Kokultivierung (ca. 20 Stunden) von 1×10^6 T-Zellen mit 1×10^6 CD19-positiven primären Lymphomzellen wurde der Kulturüberstand für den Zytokin-Array verwendet. Als Kontrolle wurden die Lymphomzellen ohne T-Zellen kultiviert. Der Zytokin-Array wurde zweimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

6.2.6.2 Analyse des T-Zellrezeptor-Repertoires des CD19-spezifischen T-Zellklons 27.2

Zur Vorbereitung der molekularen Klonierung der Gene für die alpha- und die beta-Kette des T-Zellrezeptors (TCR) des T-Zellklons 27.2, wurde zunächst das Repertoire an exprimierten variablen Regionen der alpha- und der beta-TCR-Kette analysiert. Hierfür wurde RNA aus dem T-Zellklon isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und mittels spezifischer Primer für die variablen Regionen der alpha ($V\alpha$)- und beta ($V\beta$)-Kette in einer PCR analysiert (Primer siehe Tabelle 5 und Tabelle 6). DNA-Amplifikate, die mit diesen Primer amplifiziert werden, enthalten Sequenzen der variablen Regionen (V) sowie der D- und J-Gensegmente. Die erwartete Größe dieser Fragmente liegt, je nach Primer, für die $V\beta$ -PCR zwischen 150 und

300 bp und für die V α -PCR zwischen 150 und 400 bp. Als Positivkontrolle wurden jeweils Primer verwendet, die einen Teil der mRNA für murines Aktin amplifizieren.

Abbildung 34 zeigt das Ergebnis für die Analyse des Repertoires der variablen Regionen der beta-Kette und Abbildung 35 die entsprechende Analyse für die variablen Regionen der alpha-Kette. In Abbildung 34 ist eine deutlich Bande in der Aktin-Positivkontrolle zu sehen, was die Funktionalität des Prozesses beweist. In der Analyse mit den V β -spezifischen Primern wurden teilweise unspezifische DNA-Fragmente amplifiziert (mit den Primern V β 4 und V β 9; Banden zu groß), welche nicht weiter analysiert wurden. Ebenso wurden auch Amplifikate nicht weiter analysiert, die nur sehr schwache Banden lieferten (V β 1, V β 2 und V β 20). Allerdings konnten jeweils mit den Primern V β 8.3 und V β 11 zwei deutlich sichtbare DNA-Fragmente amplifiziert werden. Beide wurden für Sequenzierungen weiter amplifiziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich bei beiden um Sequenzen der beta-Kette eines TCR handelt. Allerdings wies das Amplifikat des Primers V β 11 im J-Gensegment ein internes Stoppcodon auf, welches durch eine Leserasterverschiebung in Folge der variablen Addition und Entfernung von Nukleotiden zwischen den V-, D- und J-Gensegmenten, während der somatischen Rekombination, entstanden sein muss. Somit kodiert dieses Amplifikat anscheinend nicht für den TCR des Klons 27.2 und wurde deswegen nicht weiter analysiert. Mit dem Primer V β 8.3 wurde hingegen eine durchgehend kodierende Sequenz (wird als V β -Kette 8.3 bezeichnet) amplifiziert, die aus Teilen des V β -Gensegments TRBV13-1*02, dem D-Gensegment TRBD2*01 und dem J-Gensegment TRBJ2-5*01 bestand. Da die V β -Kette das D-Gensegment TRBD2*01 enthält, muss diese auch das konstante Gensegment TRBC2 enthalten, was durch eine Sequenzierung bestätigt werden konnte.

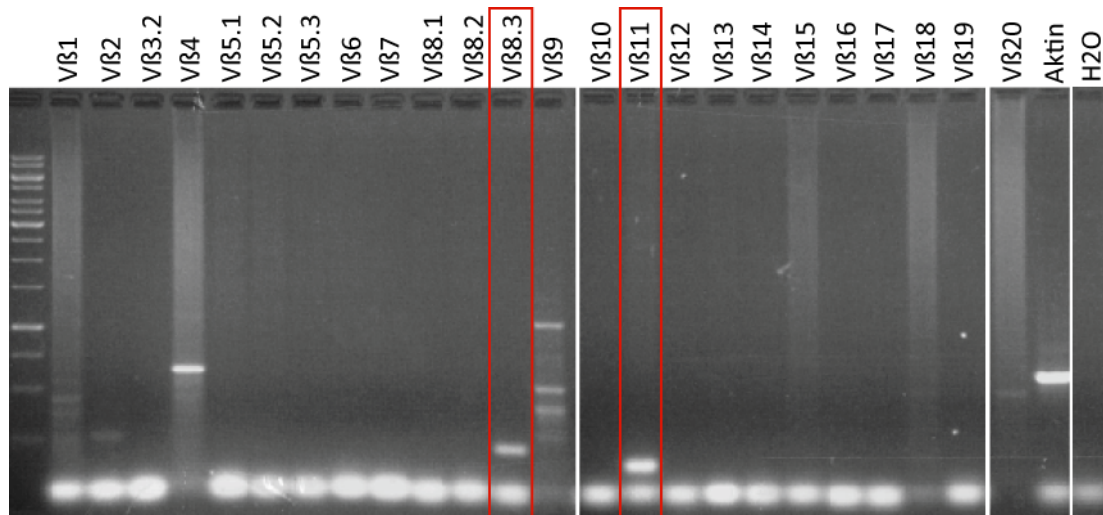


Abbildung 34: Analyse des Repertoires an exprimierten V β -Ketten im T-Zellklon 27.2.

Die Analyse erfolgte mittels einer PCR mit Primern (V β 1 bis V β 20), die teilweise für mehrere V β -Ketten spezifisch sind. Die erwartete Größe der V β -Ketten liegt zwischen ca. 150 und 300 bp. Die PCR wurde reproduziert.

Die Abbildung 35 zeigt neben dem Amplifikat für murines Aktin und einem unspezifischen Amplifikat mit dem Primer MVA1-1 (ca. 500 bp) drei TCR-V α -Amplifikate (MVA4-2, MVA4-3 und MVA11-1). Eine Sequenzanalyse ergab aber, dass mit den Primern MVA4-2 und MVA4-3 dasselbe DNA-Fragment amplifiziert wurde. Die Sequenzanalysen zeigten auch, dass dieses Amplifikat sowie das Amplifikat des Primers MVA11-1 durchgehend kodierende Sequenzen für variable Regionen der alpha-Kette eines TCR aufwiesen. Das MVA11-1-Amplifikat bestand aus Teilen des J-Gensegments TRAJ13*01 und einem V α -Gensegment, welches zunächst nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Eine zweite Analyse, die in Kooperation von Elisa Kieback durchgeführt (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) wurde, zeigte jedoch, dass das Amplifikat Teile des V α -Gensegments TRAV4N-3*01 enthielt. Mit den Primern MVA4-2 und MVA4-3 wurden hingegen Teile des V α -Gensegments TRAV6D-7*04 und des J-Segments TRAJ13*01 amplifiziert.

Somit konnte in dem T-Zellklon 27.2 eine exprimierte V β -Kette (wird als V β 8.3 bezeichnet; Amplifikat mit Primer V β 8.3) und zwei exprimierte V α -Ketten (Bezeichnung der Ketten: V α 4.9, mit Primer MVA4-2/MVA4-3 amplifiziert und V α 11, mit Primer MVA11-1 amplifiziert) identifiziert werden. Es ist nicht ungewöhnlich, dass ein T-Zellklon neben einer V β -Kette zwei V α -Ketten aufweist. Dieses wurde schon mehrfach beschrieben (Casanova et al., 1991, Padovan et al., 1993, Kekalainen et al., 2010).

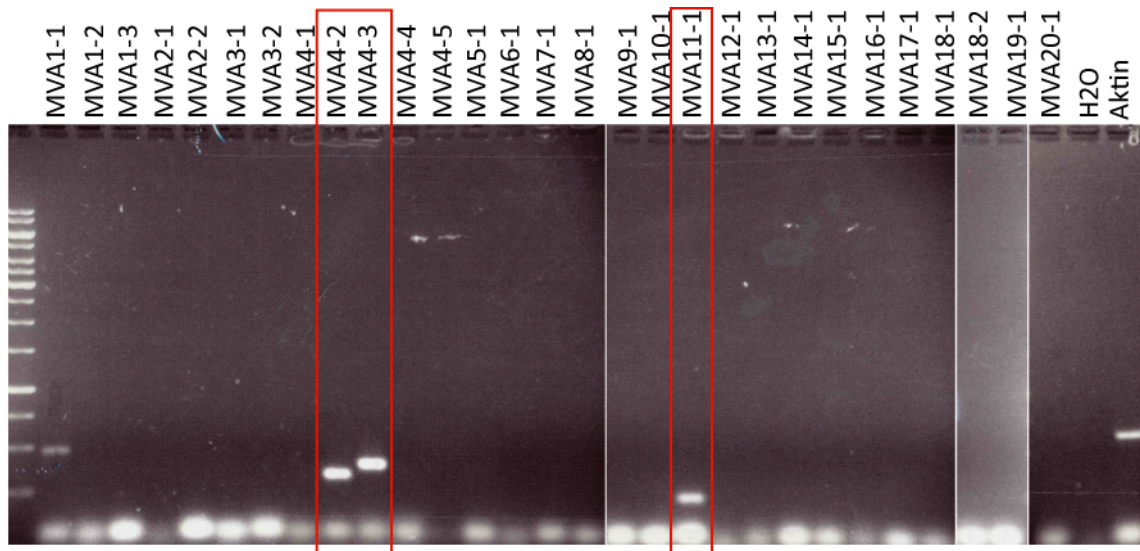


Abbildung 35: Analyse des Repertoires an exprimierten V α -Ketten des T-Zellklons 27.2.

Mittels einer PCR mit Primern (MVA1-1 bis MVA20-1), die spezifisch für mehrere V α -Ketten sind, wurde das Repertoire an V α -Ketten des TCR des T-Zellklons 27.2 analysiert. Die erwartete Größe der Fragmente liegt zwischen ca. 150 bis 400 bp. Die PCR wurde zweimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

Nach Identifizierung der V β -Kette 8.3 wurde im Durchflusszytometer noch zusätzlich überprüft, ob es sich bei den klonierten Zellen tatsächlich um einen T-Zellklon handelt. Hierzu wurden die Zellen im Durchflusszytometer auf die Anwesenheit der V β -Kette 8.3 analysiert (siehe Abbildung 38 im Anhang). Da nahezu 100% der Zellen nach Antikörperfärbung für die V β -Kette 8.3 positiv waren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Zellen tatsächlich um einen Klon handelt.

6.2.6.3 Klonierung der Gene eines CD19-spezifischen T-Zellrezeptors

Nach Identifizierung der exprimierten TCR-Ketten (V β 8.3, V α 4.9 und V α 11) im T-Zellklon 27.2, wurde mit deren molekularer Klonierung begonnen. Dies wurde in Kooperation von Elisa Kieback und Wolfgang Uckert (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) durchgeführt. Eine erste Analyse der Funktionalität der klonierten T-Zellrezeptor-Gene wurde ebenfalls in Kooperation von Elisa Kieback durchgeführt. Für diese Analyse wurden naive CD4⁺ T-Zellen mit einem Vektor, der für die V β -Kette 8.3 kodiert, in Kombination mit einem zweiten Vektor, der für die V α -Kette 11 kodiert, oder einem Vektor, der für die V α -Kette 4.9 kodiert, retroviral transduziert. Anschließend wurde, mittels eines Durchflusszytometers, die Expression der V β -Kette 8.3 auf der Zelloberfläche analysiert.

Abbildung 36 A zeigt, dass schon 4,26 % der nicht transduzierten T-Zellen aufgrund der endogenen T-Zellrezeptoren, eine V β 8.3 Kette aufwiesen. Nach Transduktion mit V β 8.3 und

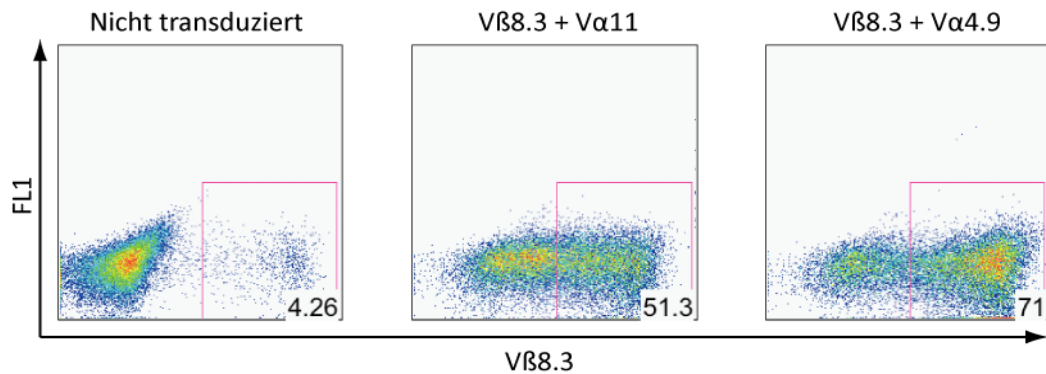
V α 11 sowie mit V β 8.3 und V α 4.9 waren allerdings deutlich mehr Zellen positiv für die V β -Kette 8.3 (51,3 % und 71 %). Dies zeigt, dass die V β -Kette mit beiden V α -Ketten einen T-Zellrezeptor bilden kann, der auf der Oberfläche der T-Zellen exprimiert wird.

Als nächstes wurde analysiert, ob transduzierte T-Zellen eine Reaktivität gegen CD19-Peptid 27-beladene Milzzellen und auch gegen Lymphomzellen aufweisen. Hierfür wurden 5×10^4 transduzierte T-Zellen mit 5×10^4 Milzzellen kokultiviert, die zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids 27 beladen worden waren. Ebenso wurden die transduzierten T-Zellen mit 5×10^4 primären Lymphomzellen kokultiviert. Als Negativkontrollen wurden die T-Zellen allein kultiviert, mit unbeladenen Milzzellen stimuliert oder mit Milzzellen stimuliert, die mit einem irrelevanten Peptid beladen waren. Nach Kokultivierung wurde jeweils die Sezernierung von IFN- γ in den Kulturüberstand mittels eines ELISA gemessen.

Abbildung 36 B zeigt, dass nur T-Zellen, die mit der V β -Kette 8.3 und der V α -Kette 4.9 transduziert wurden, IFN- γ nach Stimulation mit Peptid 27-beladenen Milzzellen sezernierten. Eine Sezernierung konnte nach Stimulation mit Milzzellen, die zuvor mit 10 μ g/ml oder 1 μ g/mL des CD19-Peptids 27 beladen worden waren, festgestellt werden. Diese T-Zellen zeigten keine Reaktivität in den Negativkontrollen sowie gegen die Lymphomzellen. T-Zellen, die mit V β 8.3 und V α 11 transduziert wurden sowie nicht transduzierte T-Zellen wiesen keine Reaktivität gegen Peptid-beladene Milzzellen oder die Lymphomzellen auf.

Dieses Ergebnis zeigt, dass der T-Zellrezeptor, bestehend aus V β 8.3 und V α 4.9, spezifisch für das CD19-Peptid 27 ist. Allerdings scheinen transduzierte T-Zellen, im Gegensatz zum T-Zellklon 27.2, nicht in der Lage zu sein, die primären Lymphomzellen zu erkennen.

A



B

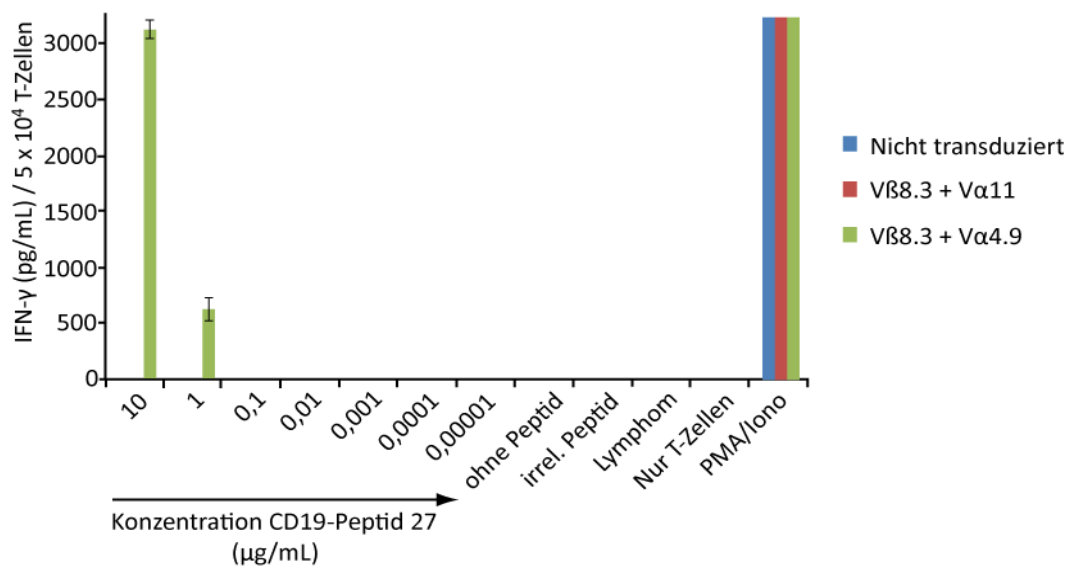


Abbildung 36: Klonierung der T-Zellrezeptor-Gene des T-Zellklons 27.2.

Nach molekularer Klonierung der T-Zellrezeptor-Gene des T-Zellklons 27.2 wurden naive $CD4^+$ T-Zellen retroviral mit der Vβ-Kette 8.3 in Kombination mit der Vα-Kette 11 (Vβ 8.3 + Vα11) oder 4.9 (Vβ 8.3 + Vα4.9) transduziert. Als Kontrolle dienten naive T-Zellen, die nicht transduziert wurden. (A) Analyse im Durchflusszytometer auf Oberflächenexpression der Vβ-Kette 8.3. (B) Analyse auf Spezifität gegen das CD19-Peptid 27 nach retroviraler Transduktion von naiven $CD4^+$ T-Zellen mittels Interferon-γ-ELISA. 5×10^4 T-Zellen wurden mit 5×10^4 Milzzellen, die zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen des CD19-Peptids 27 beladen worden waren sowie mit 5×10^4 CD19-positiven primären Lymphomzellen für ca. 20 Stunden stimuliert. Als Kontrollen wurden die T-Zellen allein kultiviert sowie T-Zellen mit Milzzellen, die mit einem irrelevanten Ovalbumin Peptid (irrel. Peptid) beladen waren, oder mit unbeladenen Milzzellen stimuliert. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm Standardabweichung. (Ausgeführt in Kooperation von Elisa Kieback)

7 Diskussion

Eine vielversprechende Alternative zu den konventionellen Krebstherapien ist die adoptive T-Zelltherapie. Diese ist besonders in der Behandlung viraler Tumorerkrankungen und in der Therapie eines Rezidivs der chronischen myeloischen Leukämie (CML) nach Knochenmarkstransplantation erfolgreich. Durch Kombination einer Lymphodepletion mit der adoptiven T-Zelltherapie konnte zudem in neueren Studien auch eine Remission bei Melanompatienten erzielt werden (Morgan et al., 2006, Rosenberg und Dudley, 2009).

Eines der Hauptprobleme für eine T-Zelltherapie ist allerdings die Wahl des Zielantigens. Ein ideales Antigen für eine solche Therapie sollte tumorspezifisch exprimiert werden und zusätzlich für das Wachstum oder das Überleben der Tumorzellen wichtig sein (Ho et al., 2003). Letzteres würde das Risiko reduzieren, dass Tumorzellen der T-Zelltherapie durch Entwicklung von Antigen-Verlust-Varianten entgehen können. Die meisten Proteine, die von Tumorzellen gebildet werden, sind aber Selbst-Antigene, welche auch von gesundem Gewebe exprimiert werden. Trotz beobachteter T-Zell-Immunantworten gegen mutierte Tumorproteine (Monach et al., 1995, Wolfel et al., 1995, Mumberg et al., 1996, Dubey et al., 1997), ist es äußerst schwierig, therapeutisch nutzbare Mutationen in Tumoren zu finden, die in einer großen Patientenzahl vorkommen (Offringa, 2009). Eine Ausnahme bilden hier die Virus-induzierten Tumoren.

Aufgrund der Schwierigkeiten, geeignete tumorspezifische Antigene für eine T-Zelltherapie zu finden, wurde auch nach tumorassoziierten Selbst-Antigenen gesucht, die für die T-Zelltherapie nützlich sein könnten (Boon et al., 1997). Allerdings erschwert die Toleranzinduktion während der T-Zell-Entwicklung, dass eine hoch-affine Immunantwort gegen diese Selbst-Antigene entstehen kann. Somit ist es häufig nicht möglich, humane T-Zellen zu erhalten, die eine hohe Affinität für ein solches Antigen aufweisen. Ein Ansatz zur Umgehung dieser Problematik ist die T-Zellrezeptor-Therapie. Bei dieser Therapie werden die Gene von hoch-affinen tumorspezifischen T-Zellrezeptoren in T-Zellen eines Patienten transferiert und diesen somit eine neue Tumorspezifität verliehen (siehe Abschnitt 3.3.2).

Eine Therapie mit hoch-affinen T-Zellen, die spezifisch für Selbst-Antigene sind, birgt jedoch auch enorme Risiken. So kann es vorkommen, dass die T-Zellen nicht nur die Tumorzellen eliminieren, sondern auch gesundes Gewebe zerstören, was im schlimmsten Fall zum Tod des Patienten führen könnte. Die entscheidende Frage für eine Therapie mit solchen T-Zellen ist deshalb, ob es ein therapeutisches Fenster zwischen Autoimmunität und Tumor-Abstoßung gibt. Aus diesem Grund sind vor einer Durchführung einer Therapie mit hoch-affinen T-Zellen am Menschen ausgiebige Studien an Mausmodellen ratsam, in denen die Risiken und

der therapeutische Nutzen analysiert werden. Zwei kürzlich durchgeführte klinische Studien, in denen ein ähnlicher Therapieansatz untersucht wurde, unterstreichen dies (Brentjens et al., 2010, Morgan et al., 2010). In diesen Studien wurden in T-Zellen mittels retroviraler Transduktion chimäre Antigenrezeptoren exprimiert, die HER-2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) und CD19 erkennen. Chimäre Antigenrezeptoren (CAR) haben Ähnlichkeit mit einem konventionellen TCR, erkennen jedoch ihr Antigen unabhängig von der Präsentation auf MHC-Molekülen. Diese Rezeptoren enthalten eine extrazelluläre antigenspezifische Domäne, welche von einem Antikörper abgeleitet ist, fusioniert mit der intrazellulären CD3- ζ Domäne des Korezeptors der T-Zellen und häufig zusätzlich fusioniert mit Domänen weiterer kostimulatorischer Signaltransduktionsmoleküle, wie beispielsweise CD28 (Brocker et al., 1993, Eshhar et al., 1993, Kowolik et al., 2006, Berry et al., 2009). In beiden Studien kam es während der Therapie mit diesen chimären Antigenrezeptoren zu gravierenden Nebenwirkungen, die zum Tode jeweils eines Patienten führten. Ausgiebige Studien in Mausmodellen hätten diese Risiken möglicherweise vorher offenbart. Zudem zeigten Studien in Mausmodellen, dass eine adoptive Zelltherapie mit hoch-affinen T-Zellen, die spezifisch für Selbst-Antigene sind, auch mit einem hohen Risiko für Nebenwirkungen verbunden ist (Bos et al., 2008). Für solche Studien ist die Maus ein idealer Modellorganismus, da es für viele Tumorantigene, die für die T-Zelltherapie interessant sein könnten, Knockout-Mäuse gibt. Da diese keine Toleranz gegenüber den Tumorantigenen aufweisen, kann in den Knockout-Mäusen leicht eine hoch-affine T-Zell-Immunantwort gegen solche Antigene induziert werden. Diese T-Zellen können dann direkt für Studien in Wildtyp-Mäusen verwendet werden. Ebenso können die Gene für die α - und β -Kette des Antigen-spezifischen TCR kloniert und in naive murine T-Zellen transduziert werden, um diesen für Therapiestudien eine neue Spezifität zu verleihen (Bendle et al., 2009, Schumacher und Restifo, 2009).

Um die Möglichkeit zu haben, T-Zelltherapien und TCR-Therapien für B-Zell-Lymphome in Modellsystemen zu studieren, wurden in dieser Arbeit zwei Mausmodelle hierfür entwickelt. In einem Modell ist das Zielantigen für die Therapie das humane c-MYC-Protein und im zweiten ist es murines CD19. Um eine T-Zelltherapie gegen humanes c-MYC in der Maus studieren zu können, muss allerdings zunächst ein transgener Mausstamm etabliert werden, der das humane c-MYC anstelle des murinen Orthologen exprimiert (hc-Myc-Mausstamm). Im Rahmen eines SFB-Transregio-Projekts, das gemeinsam mit der Gruppe von Dr. Armin Gerbitz (Charité Berlin, jetzt Universität Erlangen) durchgeführt wurde, beschränkte sich mein Anteil auf die Generierung der Maus mit dem humanisierten *c-Myc*-Gen, während die Immunantwort gegen das humane MYC-Protein von dem Berliner Doktoranden Florian Helm studiert wurde.

Für das zweite T-Zelltherapie-Modell wurde in einem CD19-defizienten Mausstamm eine T-Zell-Immunantwort gegen murines CD19 induziert. Die CD19-spezifischen T-Zellen können dann zur Analyse einer T-Zelltherapie in Wildtyp-Mäusen verwendet werden.

7.1 Generierung des hc-Myc-Mausstamms

Um einen Mausstamm zu generieren, der das humane c-MYC-Protein exprimiert, wurde das endogene murine *c-Myc*-Gen durch ein humanisiertes *c-Myc*-Gen (*hc-Myc*) ersetzt, wobei nicht-kodierende Sequenzen stromaufwärts (5') des CTG-Startcodons (siehe Abbildung 6) und stromabwärts (3') des Stoppcodons eine murine Sequenz aufweisen. Das *hc-Myc*-Gen wurde so konzipiert, dass beide humanen c-MYC Proteine exprimiert werden können, c-MYC2 vom ATG-Startcodon in Exon2 und c-MYC1 vom CTG-Startcodon in Exon1 (Hann et al., 1988). Aufgrund der murinen Sequenzen stromaufwärts (5') des CTG-Startcodons ist das *hc-Myc*-Gen unter der Kontrolle der murinen Myc-Promotoren P1 und P2 und wird vermutlich unter ähnlichen Bedingungen exprimiert, wie das murine *c-Myc*-Gen. Der dritte Promotor (P3) des murinen *c-Myc* Gens befindet sich aber im ersten Intron. Das *hc-Myc*-Gen weist allerdings humane Intron-Sequenzen und somit auch eine humane Sequenz für den Promotor P3 auf, welches formal gesehen ein Problem für die Maus-spezifische Regulation des Transgens darstellen könnte. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass dieses keine gravierenden Konsequenzen für die Regulation der Transkription des *hc-Myc* Gens hat, da 95 % der Transkripte des murinen *c-Myc* Gens von den Promotoren P1 und P2 starten (Ryan und Birnie, 1996) und lediglich 5 % der Transkripte bei Promotor P3 beginnen. Somit kann der größte Teil der Transkripte des *hc-Myc* Gens vermutlich normal gebildet werden. Darüber hinaus unterliegt die Regulation der Transkription in der Regel einer besonders hohen Konservierung. Die Sequenzübereinstimmung zwischen den murinen und humanen Introns liegt bei ca. 70% und ist in definierten Bereichen noch höher, was vermuten lässt, dass der humane Promotor P3 sowie andere humane regulatorische Elemente in den Introns in der Maus eine normale Regulation der Transkription ermöglichen.

In Abschnitt 6.1 ist gezeigt, dass der hc-Myc-Mausstamm erfolgreich generiert wurde. Die Mäuse tragen das *hc-Myc*-Gen über homologe Rekombination integriert im murinen *c-Myc*-Lokus und exprimieren das humane c-MYC-Protein. Da durch die homologe Rekombination das endogene murine *c-Myc*-Gen deletiert wurde, weisen Mäuse, die homozygot für das *hc-Myc*-Allel sind, kein murines *c-Myc*-Gen mehr auf. Dass das humane *c-MYC*-Gen das endogene murine *c-Myc*-Gen ersetzen kann, geht daraus hervor, dass homozygote hc-Myc-Mäuse sich normal entwickeln und lebensfähig sind, wohingegen eine Deletion des murinen *c-Myc* Gens zu früher embryonaler Letalität führt (Davis et al., 1993). In einer Studie von

Trumpf et al. konnte zudem gezeigt werden, dass eine Reduktion der c-MYC-Expression zu einer Reduzierung des Körpergewichts sowie des Gewichts und der Zellzahlen der Organe führt (Trumpf et al., 2001). Diese Studie zeigte auch, dass schon Mäuse mit nur einem funktionellen *c-Myc*-Allel ein reduziertes Körper- und Organgewicht aufweisen. Noch gravierender waren die phänotypischen Konsequenzen in Mäusen, die neben dem defekten *c-Myc*-Allel ein hypomorphes Allel aufwiesen. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen hatten diese eine signifikant reduzierte Körpergröße sowie reduzierte Organgrößen und reduzierte Zellzahlen in den Organen. Besonders betroffen schienen die lymphatischen Organe zu sein. Zudem konnte gezeigt werden, dass lymphatische Zellen nach Stimulation in vitro schlechter proliferierten. Wenn das humane c-MYC-Protein das murine Ortholog nur teilweise ersetzen würde, sollten hc-Myc-Mäuse einen ähnlichen Phänotyp haben. Aus Abschnitt 6.1.4 geht jedoch hervor, dass Mäuse, die homozygot oder heterozygot für das *hc-Myc*-Allel sind, weder ein reduziertes Körpergewicht noch ein reduziertes Gewicht der Milz, Nieren oder Leber im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aufwiesen. Ebenso hatten diese Mäuse keine reduzierten T- oder B-Zellzahlen in der Milz, den inguinalen Lymphknoten und dem Knochenmark. Zudem konnte gezeigt werden, dass B-Zellen aus homozygoten hc-Myc-Mäusen nach Stimulation mit LPS oder α -CD40/IL-4 in vitro ebenso stark proliferierten wie B-Zellen aus Wildtyp-Mäusen. Zusammenfassend geben diese Ergebnisse Grund zu der Annahme, dass das *hc-Myc*-Gen vergleichbar zum murinen Ortholog exprimiert wird und das endogene murine *c-Myc*-Gen vollständig ersetzen kann. Somit wurde das gesteckte Ziel erreicht, ein Mausmodell zu entwickeln, mit dessen Hilfe die Frage beantwortet werden kann, ob eine c-MYC-spezifische T-Zelltherapie zwangsläufig zur Entwicklung von Autoimmunität führt oder ob es ein therapeutisches Fenster zwischen tumorspezifischer Immunität und Autoimmunität gibt.

7.2 CD19 als Zielantigen für eine T-Zelltherapie

CD19 ist ein transmembranes Protein, welches in nahezu allen Differenzierungsstadien der B-Zellen exprimiert wird, außer auf Plasmazellen und Stammzellen (LeBien, 2000, Tedder et al., 1997). Viele maligne B-Zellerkrankungen weisen entsprechend eine CD19-Expression auf. CD19 wird fast ausschließlich auf B-Zellen exprimiert, was potentielle Nebenwirkungen einer CD19-spezifischen Therapie auf die B-Zellen reduzieren würde. Es gibt aber auch Hinweise, dass einige plasmazytoide dendritische Zellen CD19 exprimieren (Munn et al., 2004, Baban et al., 2005). Im Falle einer T-Zelltherapie würde das im schlimmsten Fall bedeuten, dass die B-Zellen und die CD19-positive Population der dendritischen Zellen eliminiert werden würden. Aus der Therapie mit dem CD20-spezifischen Antikörper Rituximab ist jedoch bekannt, dass Patienten sehr gut eine Weile ohne B-Zellen auskommen

können (Leget and Czuczman, 1998). Aus diesem Grund ist CD19 ein interessantes Ziel für Immuntherapien.

In diversen Studien wurden schon CD19-spezifische Antikörper analysiert (Daniel et al., 1998, Kipriyanov et al., 2002, Bruenke et al., 2005, Bargou et al., 2008, Horton et al., 2008). Ebenso ist CD19 ein häufig gewähltes Zielantigen für eine Therapie mit chimären Antigenrezeptoren (Brentjens et al., 2007, Boissel et al., 2009, Cheadle et al., 2010, Kochenderfer et al., 2010). In zwei Mausmodellen wurde sogar gezeigt, dass eine Therapie mit chimären Antigenrezeptoren mit Spezifität für murines CD19 keine gravierende Toxizität vermittelt (Cheadle et al., 2010, Kochenderfer et al., 2010). In diesen Studien kam es neben der Eliminierung von transplantierten Lymphomzellen zu einer B-Zell-Depletion, welche jedoch in einer therapeutischen Situation tolerierbar ist. Diese Studien unterstreichen somit die Machbarkeit von CD19-spezifischen T-Zelltherapien.

Studien zur T-Zelltherapie mit konventionellen T-Zellen oder TCR-transduzierten T-Zellen können sich aber von diesen Studien hinsichtlich der Induktion einer Autoimmunität sowie der Therapieerfolge unterscheiden. So haben chimäre Antigenrezeptoren (CAR) und konventionelle T-Zellrezeptoren unterschiedliche Signaltransduktionskapazitäten, weshalb die Immunreaktion entsprechender T-Zellen verschieden sein könnte. Ebenfalls erkennen chimäre Antigenrezeptoren, im Gegensatz zu normalen T-Zellrezeptoren, ihr Antigen unabhängig von der Präsentation auf MHC-Molekülen. Obwohl dies häufig als positive Eigenschaft beschrieben wird, die die therapeutische Anwendung erleichtert, kann dies auch ein Nachteil sein. So können nur konventionelle T-Zellen sowie TCR-transduzierte T-Zellen, aber nicht CAR-transduzierten T-Zellen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen stimuliert werden. Ebenso können auch Antigen-negative Zellen Fragmente von Antigen-positiven Zellen aufnehmen und das Antigen auf MHC-Molekülen kreuzpräsentieren, wodurch diese ein Ziel für normale oder TCR-transduzierte T-Zellen, aber nicht für CAR-transduzierte T-Zellen werden würden. Dies ist insbesondere im Fall der sogenannten Bystander-Eliminierung von Antigen-negativen Tumorzellen von Bedeutung (Spiotto et al., 2004, Spiotto und Schreiber, 2005, Zhang et al., 2008). Bei diesem Prozess eliminieren T-Zellen Zellen des Tumor-Stromas, die das Tumorantigen der Tumorzellen aufgenommen haben und auf MHC-Molekülen kreuzpräsentieren. Hierdurch kommt es indirekt zur Eliminierung von Tumorzellen, da die Nährstoffversorgung durch das Stroma zerstört wird. Dieser indirekte Mechanismus der Tumorzelleliminierung schließt auch Antigenverlustvarianten des Tumors mit ein und kann damit von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Immuntherapie sein (Spiotto et al., 2004, Spiotto und Schreiber, 2005, Zhang et al., 2008).

7.2.1 CD19 fungiert als Tumorabstoßungsantigen

Unter einem Tumor-Abstoßungsantigen ist allgemein ein Antigen zu verstehen, gegen das eine Immunantwort induziert werden kann, die effektiv genug ist die Eliminierung der Tumorzellen herbeizuführen (Gilboa, 1999). Ein immunogenes Tumorantigen ist jedoch nicht zwangsläufig auch ein gutes Tumor-Abstoßungsantigen.

Zunächst wurde in dieser Arbeit untersucht, ob CD19 ein gutes Abstoßungsantigen für B-Zell-Lymphome ist. Hierfür wurde eine CD19-positive Lymphomzelllinie subkutan in die Flanke von CD19-defizienten Mäusen und zur Kontrolle in Mäuse, die mindestens ein Wildtyp-*Cd19*-Allel aufwiesen, injiziert. Abschnitt 6.2.1 zeigt ein deutlich besseres Überleben der CD19-defizienten Mäuse nach Transfer von 1×10^5 und 1×10^6 Lymphomzellen verglichen mit der Kontrollgruppe, was die Vermutung nahe legt, dass die CD19-defizienten Mäuse eine Immunantwort gegen die Lymphomzellen entwickelten. Allerdings entwickelte ein geringer Prozentsatz an Kontrolltieren ebenfalls keinen Tumor, insbesondere nach Transfer von 1×10^5 Lymphomzellen. Möglicherweise haben diese Mäuse ebenfalls eine anti-Tumor-Immunantwort entwickelt, welche aber schwächer gewesen sein muss als in den CD19-defizienten Mäusen. Ebenso könnte es sein, dass die Lymphomzellen durch Zellen des angeborenen Immunsystems, beispielsweise NK-Zellen eliminiert wurden (Hallett und Murphy, 2006).

Dennoch zeigt der deutliche Unterschied im Überleben zwischen der CD19-defizienten Population und der Kontrollgruppe, dass CD19 wahrscheinlich ein sehr gutes Abstoßungsantigen ist. Der einzige Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen ist nämlich die Expression von CD19 in den Kontrolltieren und die damit verbundene Induktion einer Immuntoleranz gegen CD19. In CD19-defizienten Mäusen fungiert das CD19-Protein der Lymphomzellen hingegen als Fremdan antigen, weshalb diese im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine effektive CD19-spezifische Immunantwort generieren können. Eine solche CD19-spezifische Immunantwort führt vermutlich zur Abstoßung der Lymphomzellen.

Im Verlauf der Interaktion zwischen dem Immunsystem und Tumorzellen kommt es häufig zum Verlust der Antigenexpression oder zum Verlust der Expression von Proteinen, welche für die Antigenpräsentation von Bedeutung sind (Cheng und Loeb, 1993, Loeb, 1994). Insbesondere ein Verlust oder eine Herunterregulierung der MHC-Expression wurde mehrfach beobachtet (Momburg et al., 1987, Bodmer et al., 1993, Koopman et al., 2000, Algarra et al., 2004). Da in einigen CD19-defizienten Mäusen auch CD19 positive Tumoren auswuchsen, sind offensichtlich nicht alle Mäuse in der Lage, eine effiziente Immunantwort zu generieren. Interessanterweise verlieren die Tumorzellen auch nicht die Expression der

MHC-Moleküle. Womöglich ist das Wachstum der Tumoren in diesen Mäusen schneller als die Entstehung einer effektiven Immunantwort.

7.2.2 Die Bedeutung des Immunsystems für die Abstoßung der Lymphomzellen

Die Vermutung, dass das Immunsystem an der Abstoßung der Lymphomzellen beteiligt ist, wird durch die Entstehung von teilweise sehr großen Tumoren, welche in einigen Mäusen wieder verschwanden, unterstrichen. Diese Mäuse entwickelten vermutlich, erst nachdem sich schon ein Tumor gebildet hatte, eine effiziente anti-Tumor-Immunantwort.

Offensichtlich entwickeln CD19-defiziente Mäuse nach einem primären Transfer von Lymphomzellen auch eine Gedächtnis-Immunantwort, welche diese vor einem zweiten Transfer schützt. Dies zeigt, dass das adaptive Immunsystem an der Abstoßung der Lymphomzellen beteiligt ist, da nur B- und T-Zellen eine Gedächtnis-Immunantwort bilden können. Nach diesem Experiment stellte sich die Frage, ob T-Zellen oder Antikörper, welche von B-Zellen sezerniert werden, für die Abstoßung verantwortlich sind. Gerade in Betracht der Erfolge mit dem CD20-spezifischen Antikörper Rituximab in der Therapie von malignen B-Zell-Erkrankungen (Leget und Czuczman, 1998) und der Fortschritte mit CD19-spezifischen Antikörpern (Bargou et al., 2008) ist es gut möglich, dass auch Antikörper für die Abstoßung von Bedeutung sind. Mittels einer Depletion von T-Zellen vor Transfer der Lymphomzellen konnte jedoch gezeigt werden, dass T-Zellen für die Abstoßung essentiell sind. Eine T-zellabhängige Antikörper-Immunantwort als Ursache für die Lymphomabstoßung ist ausgeschlossen, da CD19-defiziente Mäuse nicht in der Lage sind, eine solche zu generieren (Rickert et al., 1995). Somit kann der Abstoßung der Lymphomzellen in den CD19-defizienten Mäusen nur eine Lymphom-spezifische T-Zell-Immunantwort zugrunde liegen.

Durch die immunhistologische Untersuchung von Tumorgewebe, welches im Durchmesser schrumpfte, wurde die Bedeutung der T-Zellen für die Abstoßung der Lymphomzellen unterstrichen. Diese zeigte eine deutliche Infiltration von CD3-positiven Zellen in schrumpfende Tumoren. Bemerkenswerterweise zeigte eine Färbung der Gewebe auf CD4-positive und CD8-positive Zellen, dass eine Infiltration von CD4-positiven Zellen und nicht von CD8-positiven Zellen vorlag. Da die Anzahl an CD3-positiven und CD4-positiven infiltrierenden Zellen sehr ähnlich ist, kann vermutet werden, dass es sich dabei um T-Helferzellen handelt. Zusammenfassend deuten diese Versuche darauf hin, dass CD19-defiziente Mäuse nach Transfer von 291-Lymphomzellen eine CD19-spezifische T-Zell-

Immunantwort und zwar vermutlich eine $CD4^+$ T-Zell-Immunantwort entwickeln, die sehr effektiv die Lymphomzellen eliminieren kann.

7.2.3 Induktion einer T-Zell-Immunantwort gegen murines CD19

Nachdem gezeigt werden konnte, dass T-Zellen für die Abstoßung von CD19-positiven Lymphomzellen in CD19-defizienten Mäusen verantwortlich sind, wurde versucht eine CD19-spezifische T-Zell-Immunantwort durch Vakzinierung in CD19-defizienten Mäusen zu induzieren. Von mehreren Strategien, die zur Vakzinierung ausprobiert wurden, war die Vakzinierung mit CD19-Peptiden in Kombination mit einer vorherigen Injektion eines CD19-kodierenden Plasmids am erfolgreichsten. Dies bestätigt die mehrfach beschriebene Beobachtung, dass eine Kombination unterschiedlicher Vakzinierungsstrategien die Immunantwort verstärkt (Tanghe et al., 2001, Pasquini et al., 2002, Wang et al., 2004b, Prud'homme, 2005).

Da auch $CD4^+$ T-Zellen für eine effiziente Vakzinierung gegen Tumorzellen benötigt werden (Ossendorp et al., 1998, Casares et al., 2001, Utermohlen et al., 2001, Knutson und Disis, 2005), wurden zur Synthese der Peptide neben MHC-Klasse I- auch Klasse II-Epitope im CD19-Protein mittels Algorithmen vorhergesagt (Rammensee et al., 1999, Lata et al., 2007). Für die Vakzinierung wurden lange CD19-Peptide (ca. 40 Aminosäuren) verwendet, da diese im Vergleich zu kurzen Peptiden nicht so schnell von den Enden her verdaut werden, wodurch T-Zell-Epitope zerstört werden könnten (Celis, 2002). Zudem müssen lange Peptide durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) aufgenommen und intrazellulär prozessiert werden, bevor sie auf der Zelloberfläche präsentiert werden können (Bijker et al., 2008, Melief und van der Burg, 2008). Kurze Peptide können hingegen direkt von außen an MHC-Moleküle auf allen Zellen, die die entsprechenden MHC-Moleküle exprimieren, binden, wodurch es zur Toleranzinduktion kommen kann (Toes et al., 1996a, Toes et al., 1996b).

Zur Vakzinierung der Tiere wurde in der Regel ein Gemisch von MHC-Klasse I- und Klasse II-Peptiden verwendet, so dass die Entstehung einer $CD8^+$ T-Zellantwort auch durch eine CD19-spezifische $CD4^+$ T-Zellantwort unterstützt werden kann. Idealerweise würden dieselben APZ sowohl MHC-Klasse I- als auch Klasse II-Peptide des CD19-Proteins präsentieren, sodass $CD4^+$ T-Zellen die APZ dazu lizensieren würden, MHC-Klasse I-Antigene den $CD8^+$ T-Zellen effizienter zu präsentieren (Bennett et al., 1998, Schoenberger et al., 1998).

Es ist nicht ungewöhnlich, dass nur gegen drei von acht synthetisierten Peptiden eine Immunantwort induziert werden konnte, da die Epitop-Vorhersagen mittels Algorithmen nur

Anhaltspunkte und keine definitiven Epitope liefern. Zudem konnte trotz der Verwendung mehrerer vorhergesagter MHC-Klasse I-Epitope für die Peptidsynthese nur eine CD4⁺ T-Zell-Immunantwort gegen die Peptide C, D und E induziert werden. Der reaktive Bereich der Peptide konnte auf die kurzen Peptide 27, 31 und 42 eingeschränkt werden. Allerdings ist hier anzumerken, dass die Abfrage der Immunantwort nur durch die Sezernierung von IFN- γ erfolgte. CD4⁺ T-Zellen, die bei Antigen-Erkennung nicht IFN- γ , sondern T_H2- oder T_H17-Zytokine sezernieren, wurden somit durch diese Versuche nicht erfasst. Aufgrund der Bedeutung der CD8⁺ T-Zellen, der T_H1-CD4⁺ T-Zellen sowie von IFN- γ für die antitumorale Immunantwort ist dieses Vorgehen jedoch gerechtfertigt (Coughlin et al., 1998, Mumberg et al., 1999, Hong et al., 2008, Disis und Park, 2009).

Nach Vakzinierung der Mäuse gegen CD19 konnte keine CD19-spezifische CD8⁺ T-Zell-Immunantwort nachgewiesen werden. Da die CD8⁺ T-Zellen auch keine CD19-positiven Wildtyp-B-Zellen erkannten, ist ausgeschlossen, dass das Ausbleiben eines Signals in den ELISA-Versuchen auf einer möglicherweise nicht optimal funktionierende Beladung der MHC-Klasse I-Moleküle mit den ca. 40 aa langen Peptiden beruht.

Immer mehr Studien unterstreichen die Bedeutung der CD4⁺ T-Zellen für die anti-Tumor-Immunantwort. Nach neuesten Erkenntnissen scheinen CD4⁺ T-Zellen in der Lage zu sein, viele Komponenten des Immunsystems für eine anti-Tumor-Immunantwort zu mobilisieren (Lauritzsen und Bogen, 1993, Hung et al., 1998, Mumberg et al., 1999, Corthay et al., 2005, Perez-Diez et al., 2007). Ebenso können tumorspezifische CD4⁺ T-Zellen auch die Entstehung einer effizienten zytotoxischen CD8⁺ T-Zellantwort unterstützen sowie auch selbst direkt gegen Tumorzellen Zytotoxizität entfalten (Bourgeois et al., 2002, Shedlock und Shen, 2003, Sun und Bevan, 2003, Bevan, 2004). Aus diesen Gründen wurde damit begonnen, CD19-spezifische CD4⁺ T-Zellen in vitro zu expandieren und Einzelzellklone zu etablieren. Allerdings konnte nur eine CD19-spezifische T-Zelllinie und hieraus ein T-Zellklon generiert werden. Sowohl für die T-Zelllinie, als auch für den Klon konnte gezeigt werden, dass diese auch CD19-positive Lymphomzellen erkennen. Interessanterweise zeigen die Zytokin-Array-Versuche, dass der T-Zellklon nach Stimulation mit den Lymphomzellen ein identisches Zytokin-Spektrum sezernierte, wie nach Stimulation mit Peptid-beladenen Milzzellen. Dies verdeutlicht, dass der T-Zellklon und somit auch die T-Zelllinie einen T-Zellrezeptor exprimiert, der eine so hohe Antigen-Affinität aufweist, dass auch die Erkennung geringer Mengen des natürlich prozessierten Antigens auf den Lymphomzellen möglich ist. Dies ist ein wichtiges Ergebnis, da durch die in vitro Stimulation mit Peptiden natürlich auch T-Zelllinien und Klone generiert werden könnten, die nur Peptid-beladene Zellen, nicht jedoch endogen prozessierende Tumorzellen erkennen würden und somit in einer anti-Tumor-Therapie nie eingesetzt werden könnten.

Die Analyse der Zytokin-Sezernierung zeigt zudem, dass der T-Zellklon nur Zytokine vom T_H1 -Typ, darunter $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, GM-CSF und IL-3 sezerniert. Es konnte keine Sezernierung von Zytokinen detektiert werden, die für T_H2 , T_H17 oder regulatorische T-Zellen spezifisch sind. Dies ist ebenfalls ein wichtiger Punkt, da mehrfach gezeigt werden konnte, dass T-Helferzellen des Typs T_H1 und die von T_H1 -Zellen sezernierten Zytokine $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ für die Eliminierung von Tumorzellen von Bedeutung sind (Nishimura et al., 1999, Hong et al., 2008, Disis und Park, 2009). Eine Analyse auf in vitro Zytotoxizität gegenüber den Lymphomzellen hat aber gezeigt, dass die $CD4^+$ T-Zelllinie 27 nicht in der Lage ist, die Lymphomzellen zu lysieren. In vivo könnte dies allerdings anders sein und die Zellen könnten zudem eine indirekte Zytotoxizität gegenüber den Lymphomzellen aufweisen, beispielsweise über Aktivierung weiterer Komponenten des Immunsystems.

7.2.4 CD19-spezifische T-Zellen in der Lymphomabstoßung

Um die Bedeutung CD19-spezifischer T-Zellen für die Abstoßung der Lymphomzellen weiter zu entschlüsseln, wurde die Immunantwort in Mäusen untersucht, die den Transfer der 291-Lymphomzellen überlebt hatten. Interessanterweise konnte nur eine CD19-spezifische $CD4^+$ T-Zell-Immunantwort, jedoch keine CD19-spezifische $CD8^+$ T-Zell-Immunantwort nachgewiesen werden, obwohl Peptide getestet wurden, die das gesamte CD19-Protein überspannen. Viele Mäuse hatten eine nachweisbare Immunantwort gegen das CD19-Peptid 27. Dies lässt vermuten, dass insbesondere eine $CD4^+$ T-Zell-Immunantwort, die spezifisch für das Peptid 27 ist, für die anti-Tumor-Immunantwort von Bedeutung ist. Dies wird dadurch bekräftigt, dass $CD4^+$ T-Zellen, die aus einem schrumpfenden Tumor einer Maus isoliert wurden, spezifisch CD19-Peptid 27 beladene Zellen erkannten. Interessanterweise erkannten sowohl diese Tumor-infiltrierenden $CD4^+$ T-Zellen als auch die $CD4^+$ T-Zellen von Mäusen, die einen Tumortransfer überlebt hatten, in vitro die Lymphomzellen.

Allerdings zeigten auch $CD8^+$ T-Zellen der Mäuse, die die Injektion der Lymphomzellen überlebt hatten, eine Reaktivität gegen die Lymphomzellen. Da die $CD8^+$ T-Zellen aber keine Reaktivität gegen murines CD19 zeigten, kann vermutet werden, dass diese ein weiteres Antigen erkennen. Hier sollte nochmal angemerkt werden, dass die 291-Lymphomlinie aus einem Lymphom der λ -MYC-Maus generiert wurde. Dieser Mausstamm entwickelt Burkitt-ähnliche Lymphome aufgrund einer Überexpression des humanen c-MYC-Proteins. Somit fungieren bei Transfer der 291-Lymphomlinie in CD19-defiziente Mäuse nicht nur CD19, sondern auch das humane c-MYC-Protein als Fremdanigen. Allerdings weisen das murine und das humane c-MYC-Protein über 90 % identische Aminosäuren auf. Somit kann eine hoch-affine T-Zell-Immunantwort nur gegen die wenigen Bereiche entstehen, in denen sich

die Proteine unterscheiden. Dies schließt die Entwicklung einer effizienten Immunantwort keineswegs aus. In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass wenige Abweichungen in einer Peptidsequenz ausreichen, um eine effiziente Immunantwort zu induzieren (Mandelboim et al., 1994, Boon und van der Bruggen, 1996, Mumberg et al., 1996, Boon et al., 1997, Dubey et al., 1997, Rosenberg, 1999). Da die 291-Lymphomzellen jedoch bei Transfer von 10^5 Tumorzellen in Wildtyp-Mäusen in der Regel nicht abgestoßen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass das humane c-MYC-Protein allein ein sehr schwaches Antigen ist. Allerdings könnte eine hoch-affine $CD4^+$ T-Zellantwort gegen murines CD19 auch die Entstehung einer tumorspezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort gegen andere Antigene unterstützen (Zajac et al., 1998, Toes et al., 1999). Hierfür kommt nicht nur das humane c-MYC-Protein in Betracht, sondern auch Mutationen in anderen Proteinen, die sich möglicherweise im Verlauf der Onkogenese angesammelt und zur Entstehung von Neoantigenen geführt haben. Möglicherweise kann das Immunsystem bei gleichzeitigem Vorhandensein einer effektiven $CD4^+$ T-Zellantwort eine $CD8^+$ T-Zellantwort gegen solche Antigene entwickeln. Da in schrumpfenden Tumoren aber nur eine Infiltration von $CD4$ -positiven Zellen und nicht von $CD8$ -positiven Zellen beobachtet wurde, kommt den $CD19$ -spezifischen $CD4^+$ T-Zellen vermutlich doch die entscheidende Bedeutung zu.

7.2.4.1 CD19-spezifische T-Zellen in der Prophylaxe vor Lymphomtransfer

Im Hinblick auf die Bedeutung von $CD4^+$ T-Zellen für die anti-Lymphom-Immunantwort in $CD19$ -defizienten Mäusen wurde damit begonnen, Mäuse vor Transfer der Lymphomzellen gegen $CD19$ -Peptide zu immunisieren, so dass eine $CD4^+$ T-Zell-Immunantwort gegen die Peptide C, D und E induziert wird. Ebenso wurde die $CD19$ -spezifische T-Zelllinie 27 in einem Ansatz kurz vor Transfer der Lymphomzellen den Mäusen injiziert.

Der Vakzinierungsversuch zeigt, dass sich die $CD19$ -Immunisierung positiv auf das Überleben der Mäuse auswirkte, verglichen mit einer Kontrollvakzinierung (OVA). Überraschenderweise war das Überleben der Mäuse nach Vakzinierung mit dem irrelevanten Antigen (OVA) und Transfer der Tumorzellen wesentlich geringer als das Überleben der mit Tumorzellen inokulierten nicht vakzinierten Mäuse. Dies hat möglicherweise darin seine Ursache, dass während der Vakzinierung ein CpG-Oligonukleotid als Adjuvans verwendet wurde. Für CpG-Oligonukleotide ist nämlich bekannt, dass diese die Proliferation von B-Zell-Lymphomen fördern können (Henault et al., 2005, Jahrsdorfer et al., 2005, Buhe et al., 2009). Möglicherweise verstärkt das Oligonukleotid das Wachstum der transferierten 291-B-Zell-Lymphomlinie, so dass die OVA-vakzinierten Mäuse deutlich schlechter in der Lage sind, eine effektive Immunantwort gegen die Lymphomzellen zu generieren, als nicht immunisierte

Wildtyp-Mäuse. Aufgrund der zusätzlichen Verwendung von inkompletten Freundschens Adjuvans (IFA) wird dieser Effekt möglicherweise noch verstärkt. Dieses bildet mit den Peptiden und dem CpG-Oligonukleotid eine Wasser-in-Öl Emulsion, aus der kontinuierlich über einen längeren Zeitraum Peptid und CpG freigegeben wird. Somit werden die Lymphomzellen vermutlich über einen längeren Zeitraum mit CpG stimuliert, was das Auswachsen weniger, möglicherweise schwach immunogener Zellen bei Vorliegen einer schwachen Immunantwort begünstigt. Durch die CD19-Vakzinierung liegt jedoch vermutlich gleich bei Injektion der Lymphomzellen eine starke Immunantwort vor, die das Wachstum der Zellen bekämpft und das Auswachsen von nicht immunogenen Tumorzellen erschwert.

Immunkompetition könnte eine weitere Ursache für das geringe Überleben in der Kontrollgruppe sein. Immunkompetition bedeutet, dass die T-Zellen um den Zellkontakt und somit die Aktivierung durch APZ sowie um Wachstumsfaktoren und Zytokine konkurrieren (Kedl et al., 2003). Im Fall der Ovalbumin-Vakzinierung könnte dies dazu führen, dass nach Vakzinierung so viele OVA-spezifische T-Zellen vorhanden sind, dass nach Lymphomtransfer keine zusätzliche Immunantwort gegen die Lymphomzellen entstehen kann.

Einige CD19-vakzinierter Mäuse entwickelten allerdings Tumoren. Interessanterweise konnte in diesen keine Infiltration von CD4-positiven Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 39 im Anhang). Dies kann zwei Ursachen haben: (1) Die Immunisierung hat nicht zur Induktion einer CD19-spezifischen CD4⁺ T-Zell-Immunantwort geführt. (2) Es könnte zwar eine CD4⁺ T-Zell-Immunantwort induziert worden sein, aber die Zellen sind nicht in der Lage gewesen, in das Tumorgewebe zu migrieren. Da die Immunisierung in der Regel sehr gut funktioniert hat, lässt dies vermuten, dass die CD19-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in manchen Mäusen nicht in das Tumorgewebe eingewandert sind und den Tumor deshalb möglicherweise auch nicht eliminiert haben.

Einen weiteren Hinweis für die bedeutende Rolle von CD19-spezifischen CD4⁺ T-Zellen liefert das T-Zelltransfer-Experiment. Verglichen mit der Kontrollgruppe (Transfer von naiven T-Zellen) zeigten die Mäuse nach Transfer der T-Zelllinie 27 ein erhöhtes Überleben. Obwohl diese Daten auf Grund der geringen Mäusezahlen noch nicht statistisch signifikant sind, verstärken sie dennoch in Kombination mit den anderen Ergebnissen das Bild, dass CD19-spezifische CD4⁺ T-Zellen für die Abstoßung der Lymphomzellen wichtig sind.

7.2.5 CD4⁺ T-Zellen als Mediatoren der Tumorabstoßung

Die Analyse der Immunantwort in Mäusen, die den Tumortransfer überlebt haben zeigt, dass CD19-defiziente Mäuse nach Transfer der 291-Lymphomzellen eine CD19-spezifische CD4⁺

T-Zell-Immunantwort entwickeln. Diese könnte für die Lymphomabstoßung von zentraler Bedeutung sein. Die immunhistochemischen Färbungen auf CD4⁺ T-Zell-Infiltration in schrumpfende Tumoren sowie die Analyse der CD19-Spezifität Tumor-infiltrierender CD4⁺ T-Zellen unterstützen diese Vermutung. Ebenso zeigen die Experimente zur Protektion der CD19-defizienten Mäuse vor einem Tumortransfer durch CD19-Vakzinierung und durch die Injektion einer CD19-spezifischen CD4⁺ T-Zelllinie, dass CD19-spezifischen CD4⁺ T-Zellen bei der Abstoßung der Lymphomzellen eine zentrale Bedeutung zukommen könnte. Durch die Vakzinierung wird nämlich nur eine CD19-spezifische CD4⁺ T-Zell-Immunantwort induziert und keine CD8⁺ T-Zell-Immunantwort. Weitere Unterstützung findet diese Theorie dadurch, dass die CD19-spezifische CD4⁺ T-Zelllinie 27 auch in vitro Lymphomzellen erkennt. Da die CD4⁺ T-Zelllinie 27 jedoch keine direkte Zytotoxizität gegenüber den Lymphomzellen in vitro aufweist, stellt sich die Frage, wie die CD4⁺ T-Zellen die Eliminierung der Tumorzellen bewerkstelligen können. Allerdings bedeutet die fehlende in vitro Zytotoxizität der T-Zelllinie im Calcein-Freisetzungstest nicht zwangsläufig, dass die CD19-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in vivo keine Zytotoxizität aufweisen. So ist z.B. denkbar, dass die CD4⁺ T-Zelllinie im Verlauf der langen in vitro Kultivierung zur Etablierung dieser Linie eine potentiell vorher vorhandene zytotoxische Aktivität verloren hat. Ebenso wird durch den Calcein-Freisetzungstest nur eine Lyse der Lymphomzellen detektiert, die innerhalb von wenigen Stunden abläuft. Diese schnelle Lyse wird in der Regel durch die Sezernierung von Perforin und Granzymen durch die T-Zellen induziert (Shresta et al., 1998). Zytotoxische T-Zellen können jedoch Zielzellen auch über die Interaktion von Todesrezeptor-Liganden (Fas-Ligand, TRAIL-Ligand, TNF- α) mit den entsprechenden Rezeptoren auf Tumorzellen (Fas, TRAIL, TNF-Rezeptor) eliminieren (Schattner et al., 1996, Thomas und Hersey, 1998). Diese Wege führen innerhalb von 12 bis 24 Stunden zur Auslösung der Apoptose und werden somit durch den Calcein-Freisetzungstest nicht erfasst (Shresta et al., 1998, Jedema et al., 2004). Durch diesen Versuch ist es zwar unwahrscheinlich geworden, dass die CD19-spezifischen CD4⁺ T-Zellen die Lymphomzellen über den Perforin/Granzym-Weg eliminieren, eine direkte Eliminierung über Todesrezeptoren ist damit aber nicht ausgeschlossen.

Möglicherweise findet die Eliminierung der Tumorzellen durch die CD4⁺ T-Zellen auch über einen indirekten Weg statt. So könnten die CD19-spezifischen CD4⁺ T-Zellen auch für die Entstehung einer tumorspezifischen CD8⁺ T-Zellantwort essentiell sein, durch welche dann die Lymphomzellen eliminiert werden (Bourgeois et al., 2002, Shedlock und Shen, 2003, Sun und Bevan, 2003, Bevan, 2004). Allerdings wird kontrovers diskutiert, ob CD4⁺ T-Zellen auch für die Entstehung einer primären CD8⁺ T-Zell-Immunantwort oder nur zur Entstehung einer effektiven Gedächtnis-Immunantwort von Bedeutung sind (Bevan, 2004). Unterstützung

findet ein solches Konzept durch das Vorhandensein einer Lymphom-spezifischen $CD8^+$ T-Zell-Immunantwort in Mäusen, die den Lymphomtransfer überlebt haben.

$CD4^+$ T-Zellen können darüber hinaus durch die Sezernierung von diversen Zytokinen verschiedene Effektorzellen des angeborenen Immunsystems rekrutieren, die zur Eliminierung der Tumorzellen beitragen, unter anderen Makrophagen und NK-Zellen (Lauritzsen und Bogen, 1993, Corthay et al., 2005, Perez-Diez et al., 2007). Für eine indirekte Tumoreliminierung scheint die Sezernierung von $IFN-\gamma$ durch die T-Zellen von zentraler Bedeutung zu sein (Mumberg et al., 1999). Diese Voraussetzung wird von den $CD19$ -spezifischen $CD4^+$ T-Zellen erfüllt, die nach Antigen-Stimulation $IFN-\gamma$ sezernierten. Desgleichen sezernierte die $CD19$ -spezifische T-Zelllinie 27 sowie der daraus isolierte T-Zellklon nach Stimulation mit Lymphomzellen $IFN-\gamma$. Nach neuen Erkenntnissen können $CD4^+$ T-Zellen auch durch die Sezernierung von Zytokinen, insbesondere durch $IFN-\gamma$, das Tumor-Stroma beeinflussen, wodurch die Abstoßung von Tumorzellen begünstigt wird (Qin und Blankenstein, 2000, Schietinger et al., 2010). Die Sezernierung von $IFN-\gamma$ kann beispielsweise Monozyten, Makrophagen und auch manche Tumorzellen aktivieren und diese dazu veranlassen, bestimmte Chemokine, beispielsweise $CXCL9$ (MIG) und $CXCL10$ (IP-10), zu sezernieren (Luster et al., 1985, Farber, 1990), welche die Blutversorgung des Tumors unterbinden können (Sgadari et al., 1996, Sgadari et al., 1997, Horton et al., 1998). Zusätzlich kann die Sezernierung von $IFN-\gamma$ auch einen direkten Einfluss auf die Tumorzellen haben. So kann $IFN-\gamma$ die Expression der MHC-Moleküle erhöhen, wodurch Immunantworten zytotoxischer T-Zellen forciert werden können (Boehm et al., 1997, Gonalons et al., 1998, Zhou, 2009). In der Literatur ist auch beschrieben, dass $IFN-\gamma$ Makrophagen dazu veranlassen kann Tumor-Nekrose-Faktoren und Stickstoff-Oxid zu sezernieren und tumorizidal zu werden (Xie et al., 1993, Boehm et al., 1997). Interessanterweise gibt es auch Hinweise, dass gerade T-Helferzellen des Typs T_H1 einen Entzündungsprozess auslösen können, der für die Eliminierung von B-Zell-Lymphomen wichtig ist. Hierbei werden Makrophagen durch Sezernierung von $IFN-\gamma$ dazu aktiviert, in die Tumoren einzuwandern und diese zu eliminieren (Haabeth et al., 2011). Makrophagen und NK-Zellen könnten somit Teil einer durch $CD19$ -spezifische $CD4^+$ T-Zellen induzierten anti-Lymphom-Immunantwort sein.

Zusätzlich kann auch die beobachtete Sezernierung von $TNF-\alpha$ von Bedeutung sein. Neben einer direkten anti-Tumor-Wirkung (Brouckaert et al., 1986, Sherwood et al., 1990, Bertazza und Mocellin, 2010), kann $TNF-\alpha$ auch natürliche Killerzellen für die Eliminierung der Tumorzellen mobilisieren (Pilaro et al., 1994, Smyth et al., 1998). Allerdings wird die anti-Tumor-Funktion von $TNF-\alpha$ sehr kontrovers diskutiert, da es auch Hinweise dafür gibt, dass $TNF-\alpha$ die Entstehung und die Proliferation von Tumorzellen begünstigen kann (Bertazza und Mocellin, 2010).

Der Zytokin-Array liefert auch Hinweise für eine Sezernierung der Chemokine CCL1, CCL3, CCL4 und CCL5 nach Stimulation der T-Zellen mit Peptid-beladenen Milzzellen und nach Stimulation mit den Lymphomzellen. Allerdings ist nicht klar, ob diese Chemokine direkt von den T-Zellen gebildet wurden, oder ob die Chemokinsezernierung von dem T-Zellklon induziert durch die Milzzellen und Tumorzellen erfolgte. Diese Chemokine können sowohl von T-Zellen, als auch von einigen Tumorzellen sezerniert werden und locken Immunzellen, wie NK-Zellen, Makrophagen und auch T-Zellen an (Miller und Krangel, 1992, Menten et al., 2002, Murphy et al., 2008). Zudem ist für CCL5 beschrieben, dass dieses Chemokin NK-Zellen aktivieren kann (Maghazachi et al., 1996). Möglicherweise infiltrieren CD19-spezifische $CD4^+$ T-Zellen das Tumorgewebe und sezernieren hier diese Chemokine oder veranlassen die Tumorzellen diese zu sezernieren, wodurch weitere Immunzellen zur Tumoreliminierung angelockt und aktiviert werden. Allerdings ist für einige dieser Chemokine auch eine Tumor-Wachstum-fördernde Eigenschaft beschrieben (Adler et al., 2003, Silva et al., 2007, Hoelzinger et al., 2010).

Zusammenfassend gibt es vielfältige Möglichkeiten, auf welche Weise CD19-spezifische $CD4^+$ T-Zellen Lymphomzellen auf direktem oder indirektem Wege eliminieren könnten. Möglicherweise ist in diesem Versuchsansatz die Eliminierung der Lymphomzellen ein komplexer Prozess, der nicht einem einzelnen Mechanismus folgt, sondern durch verschiedene Effektorzellen und -moleküle ausgelöst wird.

7.2.6 Klonierung der Gene eines CD19-spezifischen TCR

Um ein Mausmodell für eine CD19-spezifische T-Zellrezeptor-Therapie zu entwickeln, wurden die TCR-Gene des CD19-spezifischen T-Zellklons 27.2 kloniert. In dem T-Zellklon konnten eine funktionelle $V\beta$ - und zwei funktionelle $V\alpha$ -Ketten ($V\beta 8.3$, $V\alpha 4.9$ und $V\alpha 11$) identifiziert werden. Es ist nicht ungewöhnlich, dass eine T-Zelle neben einer β -Kette zwei α -Ketten exprimiert, die beide mit der β -Kette interagieren können (Casanova et al., 1991, Padovan et al., 1993, Kekalainen et al., 2010). In Kooperation mit Elisa Kieback (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) wurden die einzelnen TCR-Ketten molekular kloniert und naive T-Zellen mit retroviralen Vektoren, die für diese Ketten kodieren, transduziert. T-Zellen, die mit der β -Kette und der α -Kette 4.9 transduziert wurden, sind in der Lage Milzzellen zu erkennen, die mit dem CD19-Peptid 27 beladen worden waren. Somit konnte der CD19-spezifische TCR erfolgreich kloniert werden. Ebenso konnte durch retrovirale Transduktion der Gene für die beiden TCR-Ketten die CD19-Spezifität auf naive T-Zellen übertragen werden. Allerdings waren die transduzierten T-Zellen im Gegensatz zu dem T-Zellklon 27.2, aus dem der CD19-spezifische TCR kloniert worden war, nicht mehr in der Lage

Lymphomzellen zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass die transduzierten T-Zellen eine geringere Affinität für ihr Zielantigen aufweisen als der CD19-spezifische T-Zellklon 27.2. Die mit den TCR-Genen transduzierten naiven T-Zellen eignen sich somit nicht für Therapiestudien in einem Mausmodell mit dem c-MYC-getriebenen 291-B-Zell-Lymphom. Allerdings können diverse Strategien zur Erhöhung der Affinität eines klonierten TCR eingesetzt werden. Durch den Transfer der TCR-Gene in naive T-Zellen, die endogene TCR-Gene aufweisen, kann es zu einer Fehlpaarung der transduzierten Ketten mit den endogenen Ketten kommen. Interessanterweise reduziert eine solche Fehlpaarung auch die Oberflächenexpression des TCR und somit die Antigen-Affinität der T-Zelle, da die Bildung von fehlgepaarten TCR die Menge an CD3-Molekülen an dem TCR mit der gewünschten Spezifität reduziert (Kuball et al., 2007). Da bisher zwei separate Vektoren für die α - und die β -Kette verwendet wurden, kann die Oberflächenexpression des TCR in den transduzierten T-Zellen durch Verwendung eines retroviralen Vektors mit gekoppelter Expression für beide Ketten erhöht werden (Leisegang et al., 2008, Schmitt et al., 2009). Diese Strategie ermöglicht eine gleichmäßige Synthese der beiden TCR-Ketten, wodurch das Risiko einer Fehlpaarung mit endogenen Ketten reduziert wird. Durch die Verwendung einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) oder des viralen 2A Peptid-Linkers kann sowohl die α - als auch die β -Kette von einer mRNA translatiert werden (Arnold et al., 2004, Szymczak et al., 2004, Holst et al., 2006, Schmitt et al., 2009). Dabei wird zur Kopplung der Expression zweier Ketten dem 2A-Peptid der Vorzug gegeben (Leisegang et al., 2008), weil beim Einsatz einer IRES häufig die Expression des 5'-gelegenen Gens gegenüber dem 3'-gelegenen bevorzugt ist (Mizuguchi et al., 2000). Eine weitere Strategie zur Verbesserung der Oberflächenexpression ist die Einführung einer weiteren Disulfidbrücke, welche die Affinität der transduzierten Ketten zueinander erhöht und die Wahrscheinlichkeit für eine Fehlpaarung mit endogenen TCR-Ketten reduziert (Kuball et al., 2007). Zudem kann eine Optimierung der Kodons in den retroviralen Vektoren die Expression der einzelnen Ketten in den T-Zellen verbessern (Scholten et al., 2006).

Somit ist es auf vielfältige Art und Weise möglich, die Expression der TCR-Gene und die Affinität der transduzierten T-Zellen zu erhöhen und letztendlich die Erkennbarkeit von Lymphomzellen mit Hilfe der verbesserten transduzierten T-Zellrezeptoren wieder herzustellen.

8 Literaturverzeichnis

- Adler, E. P., Lemken, C. A., Katchen, N. S. & Kurt, R. A. 2003. A dual role for tumor-derived chemokine RANTES (CCL5). *Immunol Lett*, 90, 187-94.
- Algarra, I., Garcia-Lora, A., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F. & Garrido, F. 2004. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother*, 53, 904-10.
- Altmann, S. W., Johnson, G. D. & Prystowsky, M. B. 1991. Single proline substitutions in predicted alpha-helices of murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor result in a loss in bioactivity and altered glycosylation. *J Biol Chem*, 266, 5333-41.
- Amati, B., Alevizopoulos, K. & Vlach, J. 1998. Myc and the cell cycle. *Front Biosci*, 3, d250-68.
- Antony, P. A., Piccirillo, C. A., Akpınarli, A., Finkelstein, S. E., Speiss, P. J., Surman, D. R., Palmer, D. C., Chan, C. C., Klebanoff, C. A., Overwijk, W. W., Rosenberg, S. A. & Restifo, N. P. 2005. CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol*, 174, 2591-601.
- Apperley, J. F., Mauro, F. R., Goldman, J. M., Gregory, W., Arthur, C. K., Hows, J., Arcese, W., Papa, G., Mandelli, F., Wardle, D. & Et Al. 1988. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: importance of a graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol*, 69, 239-45.
- Arnold, P. Y., Burton, A. R. & Vignali, D. A. 2004. Diabetes incidence is unaltered in glutamate decarboxylase 65-specific TCR retrogenic nonobese diabetic mice: generation by retroviral-mediated stem cell gene transfer. *J Immunol*, 173, 3103-11.
- Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J. L. & Bataille, R. 2001. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*, 98, 3082-6.
- Baban, B., Hansen, A. M., Chandler, P. R., Manlapat, A., Bingaman, A., Kahler, D. J., Munn, D. H. & Mellor, A. L. 2005. A minor population of splenic dendritic cells expressing CD19 mediates IDO-dependent T cell suppression via type I IFN signaling following B7 ligation. *Int Immunol*, 17, 909-19.
- Baker, V. V., Borst, M. P., Dixon, D., Hatch, K. D., Shingleton, H. M. & Miller, D. 1990. c-myc amplification in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 38, 340-2.
- Banthia, V., Jen, A. & Kacker, A. 2003. Sporadic Burkitt's lymphoma of the head and neck in the pediatric population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 67, 59-65.
- Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmüller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P. A. & Kufer, P. 2008. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science*, 321, 974-7.
- Barry, M. & Bleackley, R. C. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*, 2, 401-9.
- Bendle, G. M., Haanen, J. B. & Schumacher, T. N. 2009. Preclinical development of T cell receptor gene therapy. *Curr Opin Immunol*, 21, 209-14.
- Bendle, G. M., Linnemann, C., Hooijkaas, A. I., Bies, L., De Witte, M. A., Jorritsma, A., Kaiser, A. D., Pouw, N., Debets, R., Kieback, E., Uckert, W., Song, J. Y., Haanen, J. B. & Schumacher, T. N. 2010. Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat Med*, 16, 565-70, 1p following 570.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F. & Heath, W. R. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*, 393, 478-80.
- Berry, L. J., Moeller, M. & Darcy, P. K. 2009. Adoptive immunotherapy for cancer: the next generation of gene-engineered immune cells. *Tissue Antigens*, 74, 277-89.
- Bertazza, L. & Mocellin, S. 2010. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. *Curr Med Chem*, 17, 3337-3352.
- Bevan, M. J. 2004. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol*, 4, 595-602.

- Bijker, M. S., Van Den Eeden, S. J., Franken, K. L., Melief, C. J., Van Der Burg, S. H. & Offringa, R. 2008. Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur J Immunol*, 38, 1033-42.
- Bleakley, M. & Riddell, S. R. 2004. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*, 4, 371-80.
- Bociek, R. G. 2005. Adult Burkitt's lymphoma. *Clin Lymphoma*, 6, 11-20.
- Bodmer, W. F., Browning, M. J., Krausa, P., Rowan, A., Bicknell, D. C. & Bodmer, J. G. 1993. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*, 690, 42-9.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, 15, 749-95.
- Boissel, L., Betancur, M., Wels, W. S., Tuncer, H. & Klingemann, H. 2009. Transfection with mRNA for CD19 specific chimeric antigen receptor restores NK cell mediated killing of CLL cells. *Leuk Res*, 33, 1255-9.
- Bollard, C. M., Gottschalk, S., Leen, A. M., Weiss, H., Straathof, K. C., Carrum, G., Khalil, M., Wu, M. F., Huls, M. H., Chang, C. C., Gresik, M. V., Gee, A. P., Brenner, M. K., Rooney, C. M. & Heslop, H. E. 2007. Complete responses of relapsed lymphoma following genetic modification of tumor-antigen presenting cells and T-lymphocyte transfer. *Blood*, 110, 2838-45.
- Boon, T., Coulie, P. G. & Van Den Eynde, B. 1997. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today*, 18, 267-8.
- Boon, T., Coulie, P. G., Van Den Eynde, B. J. & Van Der Bruggen, P. 2006. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol*, 24, 175-208.
- Boon, T. & Van Der Bruggen, P. 1996. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med*, 183, 725-9.
- Booth, K., Burkitt, D. P., Bassett, D. J., Cooke, R. A. & Biddulph, J. 1967. Burkitt lymphoma in Papua, New Guinea. *Br J Cancer*, 21, 657-64.
- Bornkamm, G. W. 2009. Epstein-Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: an unresolved issue. *Semin Cancer Biol*, 19, 351-65.
- Bos, R., Van Duikeren, S., Morreau, H., Franken, K., Schumacher, T. N., Haanen, J. B., Van Der Burg, S. H., Melief, C. J. & Offringa, R. 2008. Balancing between antitumor efficacy and autoimmune pathology in T-cell-mediated targeting of carcinoembryonic antigen. *Cancer Res*, 68, 8446-55.
- Boshoff, C. & Weiss, R. 2002. AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer*, 2, 373-82.
- Bourgeois, C., Veiga-Fernandes, H., Joret, A. M., Rocha, B. & Tanchot, C. 2002. CD8 lethargy in the absence of CD4 help. *Eur J Immunol*, 32, 2199-207.
- Boxer, L. M. & Dang, C. V. 2001. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene*, 20, 5595-610.
- Brasseur, F., Rimoldi, D., Lienard, D., Lethe, B., Carrel, S., Arienti, F., Suter, L., Vanwijck, R., Bourlond, A., Humblet, Y. & Et Al. 1995. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer*, 63, 375-80.
- Brentjens, R., Yeh, R., Bernal, Y., Riviere, I. & Sadelain, M. 2010. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther*, 18, 666-8.
- Brentjens, R. J., Santos, E., Nikhamin, Y., Yeh, R., Matsushita, M., La Perle, K., Quintas-Cardama, A., Larson, S. M. & Sadelain, M. 2007. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin Cancer Res*, 13, 5426-35.
- Brocker, T., Peter, A., Traunecker, A. & Karjalainen, K. 1993. New simplified molecular design for functional T cell receptor. *Eur J Immunol*, 23, 1435-9.
- Brouckaert, P. G., Leroux-Roels, G. G., Guisez, Y., Tavernier, J. & Fiers, W. 1986. In vivo anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN-gamma, on a syngeneic murine melanoma. *Int J Cancer*, 38, 763-9.
- Bruenke, J., Barbin, K., Kunert, S., Lang, P., Pfeiffer, M., Stieglmaier, K., Niethammer, D., Stockmeyer, B., Peipp, M., Repp, R., Valerius, T. & Fey, G. H. 2005. Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and FcgammaRIII (CD16). *Br J Haematol*, 130, 218-28.

- Buhe, V., Guerrier, T., Youinou, P., Berthou, C. & Loisel, S. 2009. CpG ODN enhances the efficacy of rituximab in non-Hodgkin lymphoma. *Ann N Y Acad Sci*, 1173, 858-64.
- Burkitt, D. 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*, 46, 218-23.
- Burkitt, D. & O'conor, G. T. 1961. Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer*, 14, 258-69.
- Burnet, F. M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*, 13, 1-27.
- Campbell, D. J. & Koch, M. A. 2011. Phenotypical and functional specialization of FOXP3(+) regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 11, 119-30.
- Casanova, J. L., Romero, P., Widmann, C., Kourilsky, P. & Maryanski, J. L. 1991. T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a Plasmodium berghei nonapeptide: implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. *J Exp Med*, 174, 1371-83.
- Casares, N., Lasarte, J. J., De Cerio, A. L., Sarobe, P., Ruiz, M., Melero, I., Prieto, J. & Borrás-Cuesta, F. 2001. Immunization with a tumor-associated CTL epitope plus a tumor-related or unrelated Th1 helper peptide elicits protective CTL immunity. *Eur J Immunol*, 31, 1780-9.
- Celis, E. 2002. Getting peptide vaccines to work: just a matter of quality control? *J Clin Invest*, 110, 1765-8.
- Cheadle, E. J., Hawkins, R. E., Batha, H., O'Neill, A. L., Dovedi, S. J. & Gilham, D. E. 2010. Natural expression of the CD19 antigen impacts the long-term engraftment but not antitumor activity of CD19-specific engineered T cells. *J Immunol*, 184, 1885-96.
- Cheng, K. C. & Loeb, L. A. 1993. Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. *Adv Cancer Res*, 60, 121-56.
- Coccoris, M., Swart, E., De Witte, M. A., Van Heijst, J. W., Haanen, J. B., Schepers, K. & Schumacher, T. N. 2008. Long-term functionality of TCR-transduced T cells in vivo. *J Immunol*, 180, 6536-43.
- Cole, M. D. & Nikiforov, M. A. 2006. Transcriptional activation by the Myc oncoprotein. *Curr Top Microbiol Immunol*, 302, 33-50.
- Cooper, L. J., Kalos, M., Lewinsohn, D. A., Riddell, S. R. & Greenberg, P. D. 2000. Transfer of specificity for human immunodeficiency virus type 1 into primary human T lymphocytes by introduction of T-cell receptor genes. *J Virol*, 74, 8207-12.
- Corthay, A., Skovseth, D. K., Lundin, K. U., Rosjo, E., Omholt, H., Hofgaard, P. O., Haraldsen, G. & Bogen, B. 2005. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity*, 22, 371-83.
- Coughlin, C. M., Salhany, K. E., Gee, M. S., Latemple, D. C., Kotenko, S., Ma, X., Gri, G., Wysocka, M., Kim, J. E., Liu, L., Liao, F., Farber, J. M., Pestka, S., Trinchieri, G. & Lee, W. M. 1998. Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity*, 9, 25-34.
- Cretney, E., Street, S. E. & Smyth, M. J. 2002. TNF contributes to the immunopathology of perforin/Fas ligand double deficiency. *Immunol Cell Biol*, 80, 436-40.
- Cullen, S. P. & Martin, S. J. 2008. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*, 15, 251-62.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L. & Zou, W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10, 942-9.
- Daniel, P. T., Kroidl, A., Kopp, J., Sturm, I., Moldenhauer, G., Dorken, B. & Pezzutto, A. 1998. Immunotherapy of B-cell lymphoma with CD3 \times 19 bispecific antibodies: costimulation via CD28 prevents "veto" apoptosis of antibody-targeted cytotoxic T cells. *Blood*, 92, 4750-7.
- Davis, A. C., Wims, M., Spotts, G. D., Hann, S. R. & Bradley, A. 1993. A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev*, 7, 671-82.
- De Witte, M. A., Bendle, G. M., Van Den Boom, M. D., Coccoris, M., Schell, T. D., Tevethia, S. S., Van Tinteren, H., Mesman, E. M., Song, J. Y. & Schumacher, T. N. 2008. TCR gene therapy of spontaneous prostate carcinoma requires in vivo T cell activation. *J Immunol*, 181, 2563-71.

- Dembic, Z., Haas, W., Weiss, S., Mccubrey, J., Kiefer, H., Von Boehmer, H. & Steinmetz, M. 1986. Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature*, 320, 232-8.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. & Klein, L. 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol*, 2, 1032-9.
- Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J. & Schreiber, R. D. 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, 1, 447-56.
- Disis, M. L., Bernhard, H. & Jaffee, E. M. 2009. Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment. *Lancet*, 373, 673-83.
- Disis, M. L. & Park, K. H. 2009. Immunomodulation of breast cancer via tumor antigen specific Th1. *Cancer Res Treat*, 41, 117-21.
- Dossett, M. L., Teague, R. M., Schmitt, T. M., Tan, X., Cooper, L. J., Pinzon, C. & Greenberg, P. D. 2009. Adoptive immunotherapy of disseminated leukemia with TCR-transduced, CD8+ T cells expressing a known endogenous TCR. *Mol Ther*, 17, 742-9.
- Dubey, P., Hendrickson, R. C., Meredith, S. C., Siegel, C. T., Shabanowitz, J., Skipper, J. C., Engelhard, V. H., Hunt, D. F. & Schreiber, H. 1997. The immunodominant antigen of an ultraviolet-induced regressor tumor is generated by a somatic point mutation in the DEAD box helicase p68. *J Exp Med*, 185, 695-705.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., Robinson, M. R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., White, D. E. & Rosenberg, S. A. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*, 298, 850-4.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Royal, R. E., Kammula, U., White, D. E., Mavroukakis, S. A., Rogers, L. J., Gracia, G. J., Jones, S. A., Mangiameli, D. P., Pelletier, M. M., Gea-Banacloche, J., Robinson, M. R., Berman, D. M., Filie, A. C., Abati, A. & Rosenberg, S. A. 2005. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 23, 2346-57.
- Dudley, M. E., Yang, J. C., Sherry, R., Hughes, M. S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P. F., Huang, J., Citrin, D. E., Leitman, S. F., Wunderlich, J., Restifo, N. P., Thomasian, A., Downey, S. G., Smith, F. O., Klapper, J., Morton, K., Laurencot, C., White, D. E. & Rosenberg, S. A. 2008. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol*, 26, 5233-9.
- Duffy, M. J., Shering, S., Sherry, F., Mcdermott, E. & O'higgins, N. 2000. CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer. *Int J Biol Markers*, 15, 330-3.
- Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21, 137-48.
- Durbin, J. E., Hackenmiller, R., Simon, M. C. & Levy, D. E. 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*, 84, 443-50.
- Echeverri, C., Fisher, S., King, D. & Craig, F. E. 2002. Immunophenotypic variability of B-cell non-Hodgkin lymphoma: a retrospective study of cases analyzed by flow cytometry. *Am J Clin Pathol*, 117, 615-20.
- Edgar, B. A., Britton, J., De La Cruz, A. F., Johnston, L. A., Lehman, D., Martin-Castellanos, C. & Prober, D. 2001. Pattern- and growth-linked cell cycles in Drosophila development. *Novartis Found Symp*, 237, 3-12; discussion 12-8, 36-42.
- Ehrlich, P. 1909. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 5, 273-290.
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. & Schindler, D. G. 1993. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 720-4.
- Ettinghausen, S. E. & Rosenberg, S. A. 1986. The adoptive immunotherapy of cancer using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Springer Semin Immunopathol*, 9, 51-71.

- Falkenburg, J. H., Wafelman, A. R., Joosten, P., Smit, W. M., Van Bergen, C. A., Bongaerts, R., Lurvink, E., Van Der Hoorn, M., Kluck, P., Landegent, J. E., Kluin-Nelemans, H. C., Fibbe, W. E. & Willemze, R. 1999. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood*, 94, 1201-8.
- Farber, J. M. 1990. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5238-42.
- Felsher, D. W. & Bishop, J. M. 1999. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell*, 4, 199-207.
- Fernandez-Miguel, G., Alarcon, B., Iglesias, A., Bluethmann, H., Alvarez-Mon, M., Sanz, E. & De La Hera, A. 1999. Multivalent structure of an alphabeta T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1547-52.
- Fujiwara, H., Fukuzawa, M., Yoshioka, T., Nakajima, H. & Hamaoka, T. 1984. The role of tumor-specific Lyt-1+2- T cells in eradicating tumor cells in vivo. I. Lyt-1+2- T cells do not necessarily require recruitment of host's cytotoxic T cell precursors for implementation of in vivo immunity. *J Immunol*, 133, 1671-6.
- Gardby, E., Chen, X. J. & Lycke, N. Y. 2001. Impaired CD40-signalling in CD19-deficient mice selectively affects Th2-dependent isotype switching. *Scand J Immunol*, 53, 13-23.
- Gattinoni, L., Finkelstein, S. E., Klebanoff, C. A., Antony, P. A., Palmer, D. C., Spiess, P. J., Hwang, L. N., Yu, Z., Wrzesinski, C., Heimann, D. M., Surh, C. D., Rosenberg, S. A. & Restifo, N. P. 2005. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med*, 202, 907-12.
- Gilboa, E. 1999. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*, 11, 263-70.
- Goncalons, E., Barrachina, M., Garcia-Sanz, J. A. & Celada, A. 1998. Translational control of MHC class II I-A molecules by IFN-gamma. *J Immunol*, 161, 1837-43.
- Greenberg, P. D., Kern, D. E. & Cheever, M. A. 1985. Therapy of disseminated murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-1+,2- T cells. Tumor eradication does not require participation of cytotoxic T cells. *J Exp Med*, 161, 1122-34.
- Grigg, A. & Ritchie, D. 2004. Graft-versus-lymphoma effects: clinical review, policy proposals, and immunobiology. *Biol Blood Marrow Transplant*, 10, 579-90.
- Haabeth, O. A., Lørvik, K. B., Hammarström, C., Donaldson, I. M., Haraldsen, G., Bogen, B. & Corthay, A. 2011. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nat Commun*, 2, 240.
- Hallett, W. H. & Murphy, W. J. 2006. Positive and negative regulation of Natural Killer cells: therapeutic implications. *Semin Cancer Biol*, 16, 367-82.
- Hann, S. R., Dixit, M., Sears, R. C. & Sealy, L. 1994. The alternatively initiated c-Myc proteins differentially regulate transcription through a noncanonical DNA-binding site. *Genes Dev*, 8, 2441-52.
- Hann, S. R. & Eisenman, R. N. 1984. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol*, 4, 2486-97.
- Hann, S. R., King, M. W., Bentley, D. L., Anderson, C. W. & Eisenman, R. N. 1988. A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell*, 52, 185-95.
- Hann, S. R., Sloan-Brown, K. & Spotts, G. D. 1992. Translational activation of the non-AUG-initiated c-myc 1 protein at high cell densities due to methionine deprivation. *Genes Dev*, 6, 1229-40.
- Heller, K. N., Gurer, C. & Munz, C. 2006. Virus-specific CD4+ T cells: ready for direct attack. *J Exp Med*, 203, 805-8.
- Henault, M., Lee, L. N., Evans, G. F. & Zuckerman, S. H. 2005. The human Burkitt lymphoma cell line Namalwa represents a homogenous cell system characterized by high levels of Toll-like receptor 9 and activation by CpG oligonucleotides. *J Immunol Methods*, 300, 93-9.
- Henriksson, M. & Luscher, B. 1996. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*, 68, 109-82.
- Heslop, H. E. & Brenner, M. K. 2008. The clone ranger? *Mol Ther*, 16, 1520-1.
- Heslop, H. E., Ng, C. Y., Li, C., Smith, C. A., Loftin, S. K., Krance, R. A., Brenner, M. K. & Rooney, C. M. 1996. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med*, 2, 551-5.

- Heslop, H. E. & Rooney, C. M. 1997. Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*, 157, 217-22.
- Heslop, H. E., Slobod, K. S., Pule, M. A., Hale, G. A., Rousseau, A., Smith, C. A., Bollard, C. M., Liu, H., Wu, M. F., Rochester, R. J., Amrolia, P. J., Hurwitz, J. L., Brenner, M. K. & Rooney, C. M. 2010. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood*, 115, 925-35.
- Ho, W. Y., Blattman, J. N., Dossett, M. L., Yee, C. & Greenberg, P. D. 2003. Adoptive immunotherapy: engineering T cell responses as biologic weapons for tumor mass destruction. *Cancer Cell*, 3, 431-7.
- Hoelzinger, D. B., Smith, S. E., Mirza, N., Dominguez, A. L., Manrique, S. Z. & Lustgarten, J. 2010. Blockade of CCL1 inhibits T regulatory cell suppressive function enhancing tumor immunity without affecting T effector responses. *J Immunol*, 184, 6833-42.
- Holst, J., Vignali, K. M., Burton, A. R. & Vignali, D. A. 2006. Rapid analysis of T-cell selection in vivo using T cell-receptor retrogenic mice. *Nat Methods*, 3, 191-7.
- Hong, S., Qian, J., Yang, J., Li, H., Kwak, L. W. & Yi, Q. 2008. Roles of idiotype-specific t cells in myeloma cell growth and survival: Th1 and CTL cells are tumoricidal while Th2 cells promote tumor growth. *Cancer Res*, 68, 8456-64.
- Horton, H. M., Bennett, M. J., Pong, E., Peipp, M., Karki, S., Chu, S. Y., Richards, J. O., Vostiar, I., Joyce, P. F., Repp, R., Desjarlais, J. R. & Zhukovsky, E. A. 2008. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res*, 68, 8049-57.
- Horton, M. R., Mckee, C. M., Bao, C., Liao, F., Farber, J. M., Hodge-Dufour, J., Pure, E., Oliver, B. L., Wright, T. M. & Noble, P. W. 1998. Hyaluronan fragments synergize with interferon-gamma to induce the C-X-C chemokines mig and interferon-inducible protein-10 in mouse macrophages. *J Biol Chem*, 273, 35088-94.
- Houghton, A. N., Gold, J. S. & Blachere, N. E. 2001. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol*, 13, 134-40.
- Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D. & Levitsky, H. 1994. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science*, 264, 961-5.
- Huber, C. H. & Wolfel, T. 2004. Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130, 367-74.
- Hughes, M. S., Yu, Y. Y., Dudley, M. E., Zheng, Z., Robbins, P. F., Li, Y., Wunderlich, J., Hawley, R. G., Moayeri, M., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. 2005. Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. *Hum Gene Ther*, 16, 457-72.
- Hulkkonen, J., Vilpo, L., Hurme, M. & Vilpo, J. 2002. Surface antigen expression in chronic lymphocytic leukemia: clustering analysis, interrelationships and effects of chromosomal abnormalities. *Leukemia*, 16, 178-85.
- Hunder, N. N., Wallen, H., Cao, J., Hendricks, D. W., Reilly, J. Z., Rodmyre, R., Jungbluth, A., Gnjjatic, S., Thompson, J. A. & Yee, C. 2008. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med*, 358, 2698-703.
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D. & Levitsky, H. 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*, 188, 2357-68.
- Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H. & Isaacson, P. G. 2008. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*, 112, 4384-99.
- Jahrsdorfer, B., Muhlenhoff, L., Blackwell, S. E., Wagner, M., Poeck, H., Hartmann, E., Jox, R., Giese, T., Emmerich, B., Endres, S., Weiner, G. J. & Hartmann, G. 2005. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Cancer Res*, 11, 1490-9.
- Jedema, I., Van Der Werff, N. M., Barge, R. M., Willemze, R. & Falkenburg, J. H. 2004. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood*, 103, 2677-82.
- Jiang, Y. Z., Mavroudis, D., Dermime, S., Hensel, N., Couriel, D., Molldrem, J. & Barrett, A. J. 1996. Alloreactive CD4+ T lymphocytes can exert cytotoxicity to chronic myeloid leukaemia cells processing and presenting exogenous antigen. *Br J Haematol*, 93, 606-12.

- Johnson, L. A., Morgan, R. A., Dudley, M. E., Cassard, L., Yang, J. C., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Royal, R. E., Sherry, R. M., Wunderlich, J. R., Lee, C. C., Restifo, N. P., Schwarz, S. L., Cogdill, A. P., Bishop, R. J., Kim, H., Brewer, C. C., Rudy, S. F., Vanwaes, C., Davis, J. L., Mathur, A., Ripley, R. T., Nathan, D. A., Laurencot, C. M. & Rosenberg, S. A. 2009. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 114, 535-46.
- Johnston, L. A. & Gallant, P. 2002. Control of growth and organ size in *Drosophila*. *Bioessays*, 24, 54-64.
- Kalter, S. P., Riggs, S. A., Cabanillas, F., Butler, J. J., Hagemeister, F. B., Mansell, P. W., Newell, G. R., Velasquez, W. S., Salvador, P., Barlogie, B. & Et Al. 1985. Aggressive non-Hodgkin's lymphomas in immunocompromised homosexual males. *Blood*, 66, 655-9.
- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J. & Schreiber, R. D. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7556-61.
- Kedl, R. M., Kappler, J. W. & Marrack, P. 2003. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Curr Opin Immunol*, 15, 120-7.
- Kekalainen, E., Hanninen, A., Maksimow, M. & Arstila, T. P. 2010. T cells expressing two different T cell receptors form a heterogeneous population containing autoreactive clones. *Mol Immunol*, 48, 211-8.
- Kessels, H. W., Wolkers, M. C., Van Den Boom, M. D., Van Der Valk, M. A. & Schumacher, T. N. 2001. Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nat Immunol*, 2, 957-61.
- Kipriyanov, S. M., Cochlovius, B., Schafer, H. J., Moldenhauer, G., Bahre, A., Le Gall, F., Knackmuss, S. & Little, M. 2002. Synergistic antitumor effect of bispecific CD19 x CD3 and CD19 x CD16 diabodies in a preclinical model of non-Hodgkin's lymphoma. *J Immunol*, 169, 137-44.
- Klein, G. 1983. Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. *Cell*, 32, 311-5.
- Knutson, K. L. & Disis, M. L. 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 54, 721-8.
- Kochenderfer, J. N., Yu, Z., Frasheri, D., Restifo, N. P. & Rosenberg, S. A. 2010. Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells. *Blood*, 116, 3875-86.
- Kolb, H. J. 2008. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*, 112, 4371-83.
- Kolb, H. J., Mittermuller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M. & Wilmanns, W. 1990. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*, 76, 2462-5.
- Kolb, H. J., Rieder, I., Rodt, H., Netzel, B., Grosse-Wilde, H., Scholz, S., Schaffer, E., Kolb, H. & Thierfelder, S. 1979. Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VI. Graft-versus-host tolerance in DLA-incompatible dogs after in vitro treatment of bone marrow with absorbed antithymocyte globulin. *Transplantation*, 27, 242-5.
- Kolb, H. J., Schattenberg, A., Goldman, J. M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D., Van Rhee, F., Mittermueller, J., De Witte, T., Holler, E. & Ansari, H. 1995. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*, 86, 2041-50.
- Kolb, H. J., Schmid, C., Barrett, A. J. & Schendel, D. J. 2004. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood*, 103, 767-76.
- Koopman, L. A., Corver, W. E., Van Der Slik, A. R., Giphart, M. J. & Fleuren, G. J. 2000. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med*, 191, 961-76.
- Kovalchuk, A. L., Qi, C. F., Torrey, T. A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S. S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., Bornkamm, G. W., Janz, S. & Morse, H. C., 3rd 2000. Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med*, 192, 1183-90.
- Kowolik, C. M., Topp, M. S., Gonzalez, S., Pfeiffer, T., Olivares, S., Gonzalez, N., Smith, D. D., Forman, S. J., Jensen, M. C. & Cooper, L. J. 2006. CD28 costimulation provided through a

- CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res*, 66, 10995-1004.
- Kremmer, E., Mysliwicz, J. & Thierfelder, S. 1997. Induction and suppression of anti-antibodies to syngeneic T cell-binding antibodies in mice. *Clin Exp Immunol*, 109, 180-4.
- Kuball, J., Dossett, M. L., Wolfl, M., Ho, W. Y., Voss, R. H., Fowler, C. & Greenberg, P. D. 2007. Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. *Blood*, 109, 2331-8.
- Labrecque, N., Whitfield, L. S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C. & Mathis, D. 2001. How much TCR does a T cell need? *Immunity*, 15, 71-82.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- Laird, P. W., Zijderfeld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R. & Berns, A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, 19, 4293.
- Lata, S., Bhasin, M. & Raghava, G. P. 2007. Application of machine learning techniques in predicting MHC binders. *Methods Mol Biol*, 409, 201-15.
- Lauritzen, G. F. & Bogen, B. 1993. The role of idiotype-specific, CD4+ T cells in tumor resistance against major histocompatibility complex class II molecule negative plasmacytoma cells. *Cell Immunol*, 148, 177-88.
- Lebien, T. W. 2000. Fates of human B-cell precursors. *Blood*, 96, 9-23.
- Leget, G. A. & Czuczman, M. S. 1998. Use of rituximab, the new FDA-approved antibody. *Curr Opin Oncol*, 10, 548-51.
- Leisegang, M., Engels, B., Meyerhuber, P., Kieback, E., Sommermeyer, D., Xue, S. A., Reuss, S., Stauss, H. & Uckert, W. 2008. Enhanced functionality of T cell receptor-redirectioned T cells is defined by the transgene cassette. *J Mol Med*, 86, 573-83.
- Lesinski, G. B., Anghelina, M., Zimmerer, J., Bakalakos, T., Badgwell, B., Parihar, R., Hu, Y., Becknell, B., Abood, G., Chaudhury, A. R., Magro, C., Durbin, J. & Carson, W. E., 3rd 2003. The antitumor effects of IFN-alpha are abrogated in a STAT1-deficient mouse. *J Clin Invest*, 112, 170-80.
- Levine, A. M. 1994. Lymphoma complicating immunodeficiency disorders. *Ann Oncol*, 5 Suppl 2, 29-35.
- Li, L. P., Lampert, J. C., Chen, X., Leitao, C., Popovic, J., Muller, W. & Blankenstein, T. 2010. Transgenic mice with a diverse human T cell antigen receptor repertoire. *Nat Med*, 16, 1029-34.
- Liang, X., Weigand, L. U., Schuster, I. G., Eppinger, E., Van Der Griendt, J. C., Schub, A., Leisegang, M., Sommermeyer, D., Anderl, F., Han, Y., Ellwart, J., Moosmann, A., Busch, D. H., Uckert, W., Peschel, C. & Krackhardt, A. M. 2010. A single TCR alpha-chain with dominant peptide recognition in the allorestricted HER2/neu-specific T cell repertoire. *J Immunol*, 184, 1617-29.
- Lieberman, J. 2003. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*, 3, 361-70.
- Lindencrona, J. A., Preiss, S., Kammertoens, T., Schuler, T., Piechocki, M., Wei, W. Z., Seliger, B., Blankenstein, T. & Kiessling, R. 2004. CD4+ T cell-mediated HER-2/neu-specific tumor rejection in the absence of B cells. *Int J Cancer*, 109, 259-64.
- Liu, P., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. 2003. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res*, 13, 476-84.
- Loeb, L. A. 1994. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*, 54, 5059-63.
- Luster, A. D., Unkeless, J. C. & Ravetch, J. V. 1985. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*, 315, 672-6.
- Maghazachi, A. A., Al-Aoukaty, A. & Schall, T. J. 1996. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur J Immunol*, 26, 315-9.
- Magrath, I. 1990. The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res*, 55, 133-270.
- Malmberg, K. J. & Ljunggren, H. G. 2006. Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance. *Semin Cancer Biol*, 16, 16-31.
- Mandelboim, O., Berke, G., Fridkin, M., Feldman, M., Eisenstein, M. & Eisenbach, L. 1994. CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature*, 369, 67-71.

- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S. & Ruco, L. 1992. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*, 13, 265-70.
- Marijt, W. A., Heemskerk, M. H., Kloosterboer, F. M., Goulmy, E., Kester, M. G., Van Der Hoorn, M. A., Van Luxemburg-Heys, S. A., Hoogeboom, M., Mutis, T., Drijfhout, J. W., Van Rood, J. J., Willemze, R. & Falkenburg, J. H. 2003. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2742-7.
- Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J. & Ferrone, S. 2000. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*, 74, 181-273.
- Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., Geraghty, D. E., Hansen, J. A., Hurley, C. K., Mach, B., Mayr, W. R., Parham, P., Petersdorf, E. W., Sasazuki, T., Schreuder, G. M., Strominger, J. L., Svejgaard, A., Terasaki, P. I. & Trowsdale, J. 2005. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens*, 65, 301-69.
- Melief, C. J. & Van Der Burg, S. H. 2008. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer*, 8, 351-60.
- Menten, P., Wuyts, A. & Van Damme, J. 2002. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 455-81.
- Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., Carver-Moore, K., Dubois, R. N., Clark, R., Aguet, M. & Schreiber, R. D. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84, 431-42.
- Miller, M. D. & Krangel, M. S. 1992. The human cytokine I-309 is a monocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2950-4.
- Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E. & Hayakawa, T. 2000. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther*, 1, 376-82.
- Momburg, F., Herrmann, B., Moldenhauer, G. & Moller, P. 1987. B-cell lymphomas of high-grade malignancy frequently lack HLA-DR, -DP and -DQ antigens and associated invariant chain. *Int J Cancer*, 40, 598-603.
- Monach, P. A., Meredith, S. C., Siegel, C. T. & Schreiber, H. 1995. A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity*, 2, 45-59.
- Morgan, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., Zheng, Z., Nahvi, A., De Vries, C. R., Rogers-Freezer, L. J., Mavroukakis, S. A. & Rosenberg, S. A. 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, 314, 126-9.
- Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M. & Rosenberg, S. A. 2010. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, 18, 843-51.
- Mumberg, D., Monach, P. A., Wanderling, S., Philip, M., Toledano, A. Y., Schreiber, R. D. & Schreiber, H. 1999. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8633-8.
- Mumberg, D., Wick, M. & Schreiber, H. 1996. Unique tumor antigens redefined as mutant tumor-specific antigens. *Semin Immunol*, 8, 289-93.
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Hou, D., Baban, B., Lee, J. R., Antonia, S. J., Messina, J. L., Chandler, P., Koni, P. A. & Mellor, A. L. 2004. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest*, 114, 280-90.
- Muranski, P., Boni, A., Wrzesinski, C., Citrin, D. E., Rosenberg, S. A., Childs, R. & Restifo, N. P. 2006. Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go? *Nat Clin Pract Oncol*, 3, 668-81.
- Muranski, P. & Restifo, N. P. 2009. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4(+) T cells. *Curr Opin Immunol*, 21, 200-8.
- Murphy, K. P., Travers, P., Walport, M. & Janeway, C. 2008. *Janeway's immunobiology*, New York, Garland Science.

- Muul, L. M., Spiess, P. J., Director, E. P. & Rosenberg, S. A. 1987. Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *J Immunol*, 138, 989-95.
- Natali, P. G., Nicotra, M. R., Bigotti, A., Ventura, I., Slamon, D. J., Fendly, B. M. & Ullrich, A. 1990. Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer*, 45, 457-61.
- Nesbit, C. E., Tersak, J. M. & Prochownik, E. V. 1999. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*, 18, 3004-16.
- Nishimura, T., Iwakabe, K., Sekimoto, M., Ohmi, Y., Yahata, T., Nakui, M., Sato, T., Habu, S., Tashiro, H., Sato, M. & Ohta, A. 1999. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med*, 190, 617-27.
- Offringa, R. 2009. Antigen choice in adoptive T-cell therapy of cancer. *Curr Opin Immunol*, 21, 190-9.
- Ossendorp, F., Mengede, E., Camps, M., Filius, R. & Melief, C. J. 1998. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J Exp Med*, 187, 693-702.
- Ostrand-Rosenberg, S. 2005. CD4⁺ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Invest*, 23, 413-9.
- Otero, D. C., Anzelon, A. N. & Rickert, R. C. 2003. CD19 function in early and late B cell development: I. Maintenance of follicular and marginal zone B cells requires CD19-dependent survival signals. *J Immunol*, 170, 73-83.
- Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Giachino, C. & Lanzavecchia, A. 1995. Dual receptor T-cells. Implications for alloreactivity and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*, 756, 66-70.
- Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M. & Lanzavecchia, A. 1993. Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science*, 262, 422-4.
- Pannetier, C., Cochet, M., Darche, 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, 4319-23.
- Papadopoulos, E. B., Ladanyi, M., Emanuel, D., Mackinnon, S., Boulad, F., Carabasi, M. H., Castro-Malaspina, H., Childs, B. H., Gillio, A. P., Small, T. N. & Et Al. 1994. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, 330, 1185-91.
- Pasquini, S., Peralta, S., Missiaglia, E., Carta, L. & Lemoine, N. R. 2002. Prime-boost vaccines encoding an intracellular idiotype/GM-CSF fusion protein induce protective cell-mediated immunity in murine pre-B cell leukemia. *Gene Ther*, 9, 503-10.
- Perez-Diez, A., Joncker, N. T., Choi, K., Chan, W. F., Anderson, C. C., Lantz, O. & Matzinger, P. 2007. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*, 109, 5346-54.
- Pilaro, A. M., Taub, D. D., McCormick, K. L., Williams, H. M., Sayers, T. J., Fogler, W. E. & Wiltrot, R. H. 1994. TNF-alpha is a principal cytokine involved in the recruitment of NK cells to liver parenchyma. *J Immunol*, 153, 333-42.
- Prud'homme, G. J. 2005. DNA vaccination against tumors. *J Gene Med*, 7, 3-17.
- Qin, Z. & Blankenstein, T. 2000. CD4⁺ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*, 12, 677-86.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. & Stevanovic, S. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50, 213-9.
- Rickert, R. C., Rajewsky, K. & Roes, J. 1995. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature*, 376, 352-5.
- Rickert, R. C., Roes, J. & Rajewsky, K. 1997. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*, 25, 1317-8.
- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E. & Greenberg, P. D. 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*, 257, 238-41.
- Rodt, H., Kolb, H. J., Netzel, B., Rieder, I., Janka, G., Belohradsky, B., Haas, R. J. & Thierfelder, S. 1979. GVHD suppression by incubation of bone marrow grafts with anti-T-cell globulin:

- effect in the canine model and application to clinical bone marrow transplantation. *Transplant Proc*, 11, 962-6.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S. K., Sixbey, J. W., Gan, Y., Srivastava, D. K., Bowman, L. C., Krance, R. A., Brenner, M. K. & Heslop, H. E. 1998. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*, 92, 1549-55.
- Rosenberg, S. 1985. Lymphokine-activated killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst*, 75, 595-603.
- Rosenberg, S. A. 1999. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity*, 10, 281-7.
- Rosenberg, S. A. & Dudley, M. E. 2009. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol*, 21, 233-40.
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., Chang, A. E., Schwartzentruber, D. J., Aebersold, P., Leitman, S., Linehan, W. M., Seipp, C. A. & Et Al. 1993. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst*, 85, 622-32.
- Rudiger, T. & Muller-Hermelink, H. K. 2002. [WHO-classification of malignant lymphomas]. *Radiologe*, 42, 936-42.
- Ryan, K. M. & Birnie, G. D. 1996. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J*, 314 (Pt 3), 713-21.
- Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 22, 531-62.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. 2009. Human Th17 cells in infection and autoimmunity. *Microbes Infect*, 11, 620-4.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M. & Smith, M. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 265, 687-95.
- Sato, S., Miller, A. S., Howard, M. C. & Tedder, T. F. 1997. Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19. *J Immunol*, 159, 3278-87.
- Sato, S., Steeber, D. A. & Tedder, T. F. 1995. The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11558-62.
- Schattner, E. J., Mascarenhas, J., Bishop, J., Yoo, D. H., Chadburn, A., Crow, M. K. & Friedman, S. M. 1996. CD4⁺ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells. *Blood*, 88, 1375-82.
- Schietinger, A., Philip, M., Liu, R. B., Schreiber, K. & Schreiber, H. 2010. Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4(+) and CD8(+) T cells during the effector phase. *J Exp Med*, 207, 2469-77.
- Schmitt, T. M., Ragnarsson, G. B. & Greenberg, P. D. 2009. T cell receptor gene therapy for cancer. *Hum Gene Ther*, 20, 1240-8.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., Van Der Voort, E. I., Offringa, R. & Melief, C. J. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 393, 480-3.
- Scholten, K. B., Kramer, D., Kueter, E. W., Graf, M., Schoedl, T., Meijer, C. J., Schreurs, M. W. & Hooijberg, E. 2006. Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. *Clin Immunol*, 119, 135-45.
- Schub, A., Schuster, I. G., Hammerschmidt, W. & Moosmann, A. 2009. CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy. *J Immunol*, 183, 6819-30.
- Schumacher, T. N. & Restifo, N. P. 2009. Adoptive T cell therapy of cancer. *Curr Opin Immunol*, 21, 187-9.
- Schuster, I. G., Busch, D. H., Eppinger, E., Kremmer, E., Milosevic, S., Hennard, C., Kuttler, C., Ellwart, J. W., Frankenberger, B., Nossner, E., Salat, C., Bogner, C., Borkhardt, A., Kolb, H. J. & Krackhardt, A. M. 2007. Allorestricted T cells with specificity for the FMNL1-derived peptide PP2 have potent antitumor activity against hematologic and other malignancies. *Blood*, 110, 2931-9.

- Schwenk, F., Baron, U. & Rajewsky, K. 1995. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*, 23, 5080-1.
- Seliger, B., Maeurer, M. J. & Ferrone, S. 2000. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today*, 21, 455-64.
- Sgadari, C., Angiolillo, A. L., Cherney, B. W., Pike, S. E., Farber, J. M., Koniaris, L. G., Vanguri, P., Burd, P. R., Sheikh, N., Gupta, G., Teruya-Feldstein, J. & Tosato, G. 1996. Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13791-6.
- Sgadari, C., Farber, J. M., Angiolillo, A. L., Liao, F., Teruya-Feldstein, J., Burd, P. R., Yao, L., Gupta, G., Kanegane, C. & Tosato, G. 1997. Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo. *Blood*, 89, 2635-43.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J. & Schreiber, R. D. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410, 1107-11.
- Shedlock, D. J. & Shen, H. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*, 300, 337-9.
- Sherwood, E. R., Pitt Ford, T. R., Lee, C. & Kozlowski, J. M. 1990. Therapeutic efficacy of recombinant tumor necrosis factor alpha in an experimental model of human prostatic carcinoma. *J Biol Response Mod*, 9, 44-52.
- Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A. & Ley, T. J. 1998. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol*, 10, 581-7.
- Silva, T. A., Ribeiro, F. L., Oliveira-Neto, H. H., Watanabe, S., Alencar Rde, C., Fukada, S. Y., Cunha, F. Q., Leles, C. R., Mendonca, E. F. & Batista, A. C. 2007. Dual role of CCL3/CCR1 in oral squamous cell carcinoma: implications in tumor metastasis and local host defense. *Oncol Rep*, 18, 1107-13.
- Singh, R. & Bandyopadhyay, D. 2007. MUC1: a target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*, 6, 481-6.
- Smyth, M. J., Kelly, J. M., Baxter, A. G., Korner, H. & Sedgwick, J. D. 1998. An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *J Exp Med*, 188, 1611-9.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98, 503-17.
- Spiotto, M. T., Rowley, D. A. & Schreiber, H. 2004. Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nat Med*, 10, 294-8.
- Spiotto, M. T. & Schreiber, H. 2005. Rapid destruction of the tumor microenvironment by CTLs recognizing cancer-specific antigens cross-presented by stromal cells. *Cancer Immun*, 5, 8.
- Stewart, T. J. & Abrams, S. I. 2008. How tumours escape mass destruction. *Oncogene*, 27, 5894-903.
- Strauss, L., Bergmann, C., Szczepanski, M., Gooding, W., Johnson, J. T. & Whiteside, T. L. 2007. A unique subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*, 13, 4345-54.
- Street, S. E., Cretney, E. & Smyth, M. J. 2001. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, 97, 192-7.
- Sullivan, K. M., Weiden, P. L., Storb, R., Witherspoon, R. P., Fefer, A., Fisher, L., Buckner, C. D., Anasetti, C., Appelbaum, F. R., Badger, C. & Et Al. 1989. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood*, 73, 1720-8.
- Sun, J. C. & Bevan, M. J. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science*, 300, 339-42.
- Szymczak, A. L., Workman, C. J., Wang, Y., Vignali, K. M., Dilioglou, S., Vanin, E. F. & Vignali, D. A. 2004. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol*, 22, 589-94.
- Tada, T., Ohzeki, S., Utsumi, K., Takiuchi, H., Muramatsu, M., Li, X. F., Shimizu, J., Fujiwara, H. & Hamaoka, T. 1991. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function.

- Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol*, 146, 1077-82.
- Tanghe, A., D'souza, S., Rosseels, V., Denis, O., Ottenhoff, T. H., Dalemans, W., Wheeler, C. & Huygen, K. 2001. Improved immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85 by protein boosting. *Infect Immun*, 69, 3041-7.
- Tedder, T. F., Inaoki, M. & Sato, S. 1997. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity*, 6, 107-18.
- Tedder, T. F., Zhou, L. J. & Engel, P. 1994. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today*, 15, 437-42.
- Thomas, W. D. & Hersey, P. 1998. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol*, 161, 2195-200.
- Toes, R. E., Blom, R. J., Offringa, R., Kast, W. M. & Melief, C. J. 1996a. Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J Immunol*, 156, 3911-8.
- Toes, R. E., Offringa, R., Blom, R. J., Melief, C. J. & Kast, W. M. 1996b. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7855-60.
- Toes, R. E., Ossendorp, F., Offringa, R. & Melief, C. J. 1999. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med*, 189, 753-6.
- Torre-Amione, G., Beauchamp, R. D., Koeppen, H., Park, B. H., Schreiber, H., Moses, H. L. & Rowley, D. A. 1990. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1486-90.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- Treszl, A., Adany, R., Rakosy, Z., Kardos, L., Begany, A., Gilde, K. & Balazs, M. 2004. Extra copies of c-myc are more pronounced in nodular melanomas than in superficial spreading melanomas as revealed by fluorescence in situ hybridisation. *Cytometry B Clin Cytom*, 60, 37-46.
- Trumpf, A., Refaeli, Y., Oskarsson, T., Gasser, S., Murphy, M., Martin, G. R. & Bishop, J. M. 2001. c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature*, 414, 768-73.
- Turk, M. J., Guevara-Patino, J. A., Rizzuto, G. A., Engelhorn, M. E., Sakaguchi, S. & Houghton, A. N. 2004. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med*, 200, 771-82.
- Uckun, F. M., Jaszcz, W., Ambrus, J. L., Fauci, A. S., Gajl-Peczalska, K., Song, C. W., Wick, M. R., Myers, D. E., Waddick, K. & Ledbetter, J. A. 1988. Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. *Blood*, 71, 13-29.
- Utermohlen, O., Schulze-Garg, C., Warnecke, G., Gugel, R., Lohler, J. & Deppert, W. 2001. Simian virus 40 large-T-antigen-specific rejection of mKSA tumor cells in BALB/c mice is critically dependent on both strictly tumor-associated, tumor-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes and CD4(+) T helper cells. *J Virol*, 75, 10593-602.
- Vajdic, C. M. & Van Leeuwen, M. T. 2009. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer*, 125, 1747-54.
- Van Den Eynde, B. J. & Boon, T. 1997. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int J Clin Lab Res*, 27, 81-6.
- Verrou, C., Zhang, Y., Zurn, C., Schamel, W. W. & Reth, M. 1999. Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. *Biol Chem*, 380, 1435-8.
- Vita, M. & Henriksson, M. 2006. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol*, 16, 318-30.
- Voss, R. H., Kuball, J. & Theobald, M. 2005. Designing TCR for cancer immunotherapy. *Methods Mol Med*, 109, 229-56.

- Wang, H. Y., Lee, D. A., Peng, G., Guo, Z., Li, Y., Kiniwa, Y., Shevach, E. M. & Wang, R. F. 2004a. Tumor-specific human CD4⁺ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity*, 20, 107-18.
- Wang, Q. M., Sun, S. H., Hu, Z. L., Yin, M., Xiao, C. J. & Zhang, J. C. 2004b. Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting. *Vaccine*, 22, 3622-7.
- Wang, S. & El-Deiry, W. S. 2003. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, 22, 8628-33.
- Watts, T. H. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol*, 23, 23-68.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer Zum Buschenfelde, K. H. & Beach, D. 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, 269, 1281-4.
- Xie, Q. W., Whisnant, R. & Nathan, C. 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 177, 1779-84.
- Yang, W., Agrawal, N., Patel, J., Edinger, A., Osei, E., Thut, D., Powers, J. & Meyerson, H. 2005. Diminished expression of CD19 in B-cell lymphomas. *Cytometry B Clin Cytom*, 63, 28-35.
- Yoshida, R., Yoshioka, T., Yamane, S., Matsutani, T., Toyosaki-Maeda, T., Tsuruta, Y. & Suzuki, R. 2000. A new method for quantitative analysis of the mouse T-cell receptor V region repertoires: comparison of repertoires among strains. *Immunogenetics*, 52, 35-45.
- Zajac, A. J., Murali-Krishna, K., Blattman, J. N. & Ahmed, R. 1998. Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Curr Opin Immunol*, 10, 444-9.
- Zeeb, H. & Blettner, M. 2001. [Increasing incidence and mortality of non-Hodgkin lymphomas. An epidemiological review of recent studies on risk factors for non-Hodgkin lymphoma]. *Med Klin (Munich)*, 96, 87-100.
- Zhang, B., Zhang, Y., Bowerman, N. A., Schietinger, A., Fu, Y. X., Kranz, D. M., Rowley, D. A. & Schreiber, H. 2008. Equilibrium between host and cancer caused by effector T cells killing tumor stroma. *Cancer Res*, 68, 1563-71.
- Zhou, F. 2009. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int Rev Immunol*, 28, 239-60.

9 Anhang

I. Zusätzliche Abbildungen

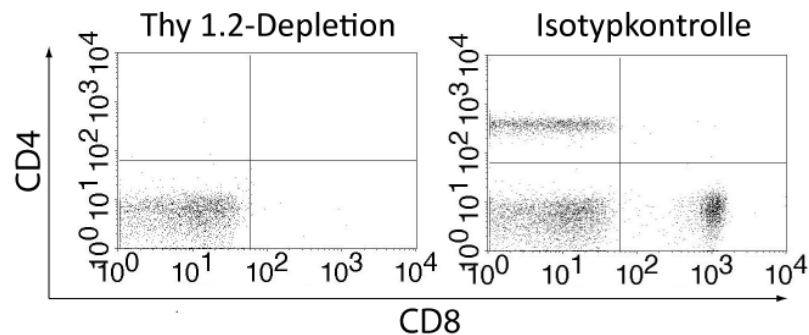


Abbildung 37: Nachweis der Depletion von T-Zellen mittels des α -Thy 1.2 Antikörpers.

Nach T-Zelldepletion wurde Schwanzblut aus den Mäusen isoliert und im Durchflusszytometer auf Anwesenheit von T-Zellen analysiert. In den Abbildungen sind nur Zellen gezeigt, die TO-PRO-3 negativ (lebende Zellen) und CD3-positiv sind.

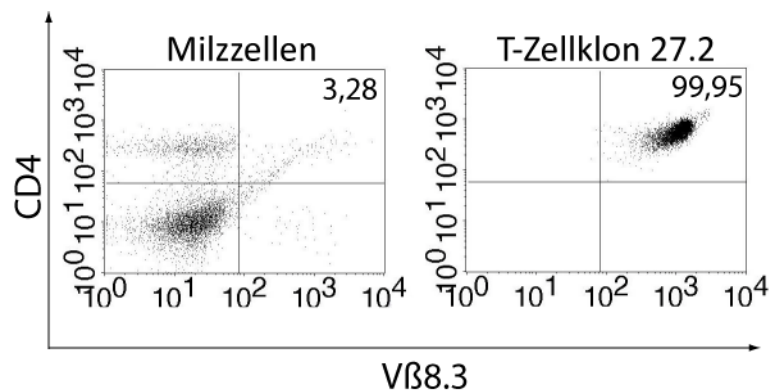


Abbildung 38: Analyse auf Expression der Vβ-Kette 8.3 im T-Zellklon 27.2.

Zellen des T-Zellklons 27.2 wurden im Durchflusszytometer auf die Expression der TCR-Vβ-Kette 8.3 mit einem spezifischen Antikörper analysiert. Als Kontrolle wurden Milzzellen einer C57BL6-Wildtyp-Maus verwendet. In den Abbildungen sind nur lebende Zellen (TO-PRO-3-negativ) gezeigt. Der prozentuale Wert an Vβ8.3-positiven CD4⁺ T-Zellen ist jeweils angegeben.

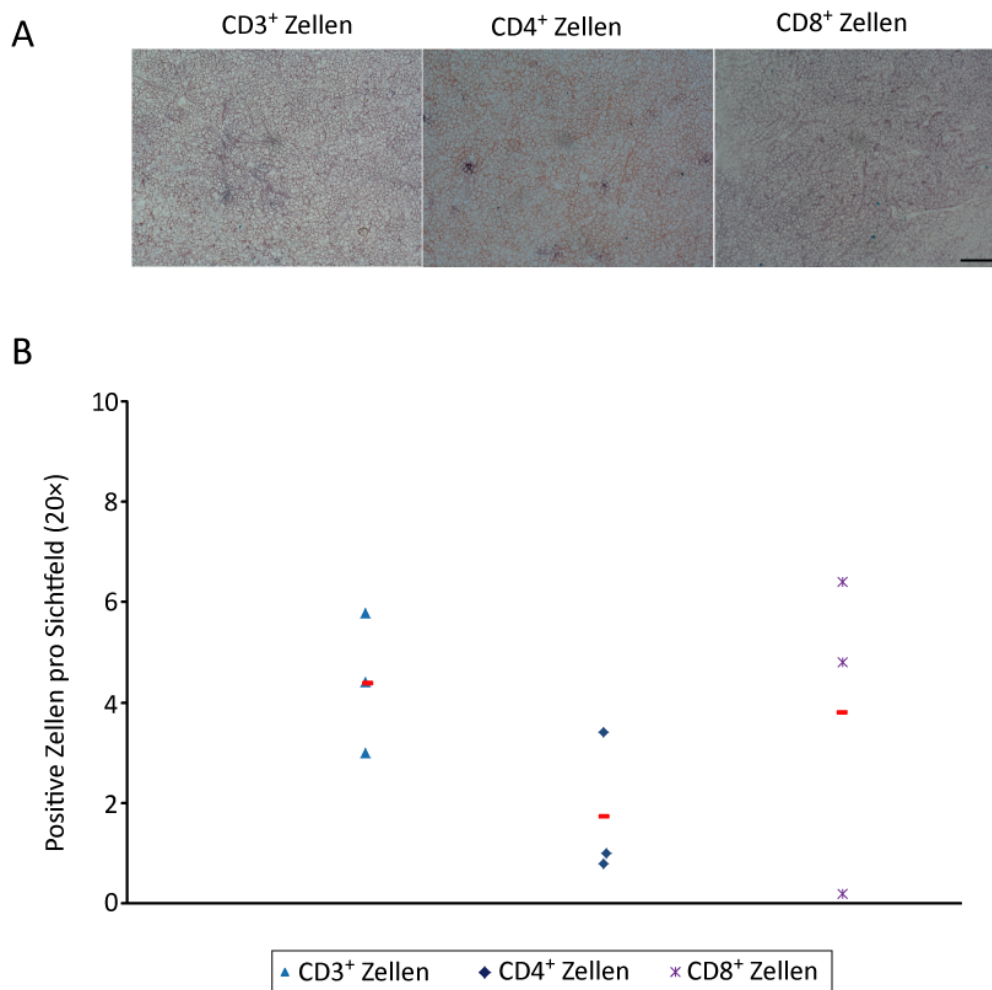


Abbildung 39: T-Zellinfiltration in Tumoren vakzinierter Mäuse.

Ausgewachsene Tumoren (Durchmesser ≥ 10 mm) wurden immunhistochemisch auf die Infiltration von CD3, CD4 und CD8-positiven T-Zellen analysiert. (A) Das Lymphomgewebe wurde mit α -IgM (Lymphomzellen - rot) und zusätzlich mit α -CD3, α -CD4 oder α -CD8 (blau) gefärbt. Vergrößerung: 20 \times . Der Balken entspricht 100 μ m. (B) Anzahl CD3-, CD4- und CD8-positiver Zellen pro Sichtfeld (20 \times Vergrößerung). Jedes Symbol repräsentiert eine Tumorseite.

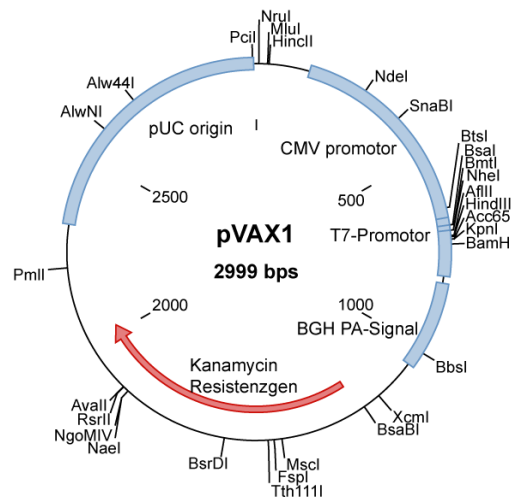
II. Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure(n)		Rekombinase F1p
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol	fwd	vorwärts
Amp.	Ampicillin	g	Gramm
Anr.	Anregungsmaximum	G418	Geneticin
APC	allophycocyanin	Gy	Gray (Einheit)
APS	Ammoniumpersulfat	GvHD	<u>G</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>h</u> ost <u>d</u> isease
APZ	antigenpräsentierende Zellen	H ₂ O	Wasser
ATG	Startcodon	hc-Myc	humanisiertes c-Myc
ATP	Adenosintriphosphat	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
BAC	<u>B</u> acterial <u>a</u> rtificial <u>c</u> hromosome	HLA	human leukocyte antigen
bp	Basenpaar (e)	HRP	Meerrettich Peroxidase
bpA	Bovines Polyadenylierungssignal	HSV-TK	Thymidinkinase-Gen des Herpes-simplex-Virus Typ1
BCR	B-Zell-Rezeptor		
BL	Burkitt-Lymphom	hum.	Feuchtigkeit (humidity)
BSA	Rinder-Serum Albumin	i.p.	intraperitoneal
CAR	chimäre Antigenrezeptoren	IFA	inkomplettes Freundsches
cDNA	copy-DNA		Adjuvans
CIP	Kälberdarm-Phosphatase	IFN-γ	Interferon-γ
CFSE	CFDA-SE Carboxy-Fluoreszin	Ig	Immunoglobulin
	Diacetat succinimidyl Ester	IHC	Immunhistochemie
CMV	Cytomegaloviren	IL	Interleukin
CpG	CpG-Oligonukleotid	i.m.	intramuskulär
Cre	Protein Rekombinase des P1	Iono	Ionomycin
	Phagen	Irrel.	irrelevant
CTG	Startcodon	IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
DC	dendritische Zellen	ITAM	immunoreceptor tyrosine-based
DEPC	diethylpyrocarbonate		activation motif
d.h.	das heißt	i.v.	intravenös
DLI	Donor-Lymphozyten Infusion	JAK	Janus-Kinase
DMEM	Dulbeccos Modifikation des	JNK	c-Jun-Kinase
	Eagle Mediums	kb	Kilobase
DMSO	Dimethylsulfoxid	kDa	Kilodalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure	KMT	Knochenmarkstransplantation
DNase	Desoxyribonuclease	L	Liter
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
EBV	Epstein-Barr-Virus	LB	Luria Bertani
EDTA	Ethylen-Diamin-tetra-Acetat	LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
EF-Zellen	embryonale Fibroblastenzellen	LIF	Leukämie inhibierender Faktor
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay	loxP	locus of crossover (x) im Phagen P1
ELISPOT	Enzyme linked immunospot technique	M	molar
Emis.	Emission	MACS	Magnetic associated cell sorting
ES-Zellen	embryonale Stammzellen		Cell Sorting
et al.	und andere (et alii)	MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
E:T	Effektor zu Zielzellen	mg	Milligramm
FACS	Fluoreszenz-assozierte Durchflusszytometrie	μCi	Mikrocurie
	fötales Kälberserum	μF	Mikrofaraday
FCS		mg	Milligramm
FITC	fluorescein isothiocyanate	μg	Mikrogramm
FRT	Erkennungssequenz der	MHC	<u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex

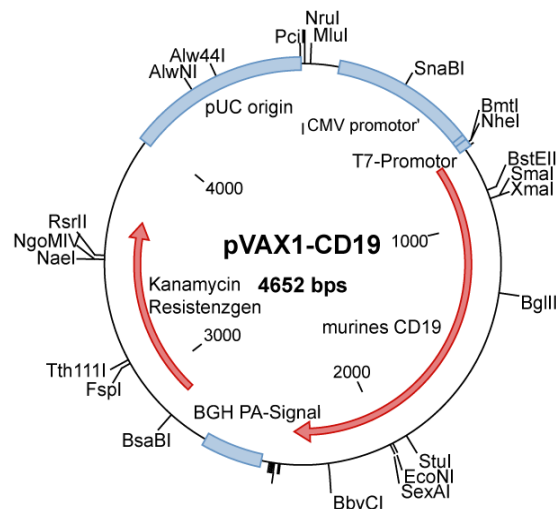
Min.	Minute	μL	Mikroliter
mL	Milliliter	mM	Millimol
μM	Mikromolar	STAT	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransducers and <u>A</u> ctivators of <u>T</u> ranscription
MMC	Mitomycin	s.U.	siehe unten
mRNA	Boten RNA (messenger RNA)	TAA	Tumorassoziierte Antigene
msec	Millisekunden	TCR	T-Zellrezeptor
mu. c-Myc	murines c-Myc	TE	Tris-EDTA
mV	Millivolt	TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β
N	Normal	T _H	T-Helferzelle
Neo	Neomycin	T _H 1	Typ1-T-Helferzellen
<i>neo^r</i> -Gen	Neomycinresistenz-Gen	T _H 2	Typ2-T-Helferzellen
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom	T _H 17	Typ17-T-Helferzellen
NK	Natürliche Killerzellen	TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
ng	Nanogramm	TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren
nm	Nanometer	T _N	naive T-Zellen
OD	optische Dichte	TNF	Tumornekrosefaktor
ORF	offener Leserahmen	TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
OVA	Hühner Ovalbumin	TO-PRO-3	TO-PRO-3 Iodid
PAA	Polyacrylamid	TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
PBL	periphere Blut-Lymphozyten	TRAIL	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor <u>R</u> elated <u>A</u> poptosis <u>I</u> nducing <u>L</u> igand
PBS	Phosphat-gepufferte Saline)	T _{reg}	regulatorische T-Zellen
PCR	Polymerasekettenreaktion	U	Units Enzym Einheit
PE	phycoerythrin	ÜN	über Nacht
PerCP	peridinin chlorophyll protein	UV	ultraviolettes Licht
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat	V	Volt
PTLD	post transplant lymphoproliferative disorder	Vα	variable Region der TCR-α Kette
PVDF	polyvinyliden fluoride	Vβ	variable Region der TCR-β Kette
rev	rückwärts (reverse)	v/v	Volumen pro Volumen
RFP	rotes fluoreszierendes Protein	w/v	Gewicht pro Volumen
RNA	Ribonukleinsäure	wt	Wildtyp
RNAse	Ribonuclease	%	Prozent
rpm	Umdrehungen pro Minute	°C	Grad Celsius
RT	Raumtemperatur	Ω	Ohm
SA	Streptavidin	× g	x-fache Erdbeschleunigung
SDS	Natriumdodecylsulfat		
s	Sekunde		
s.o.	siehe oben		
SOB	<u>S</u> uper <u>O</u> ptimal <u>B</u> roth		

III. Plasmidkarten

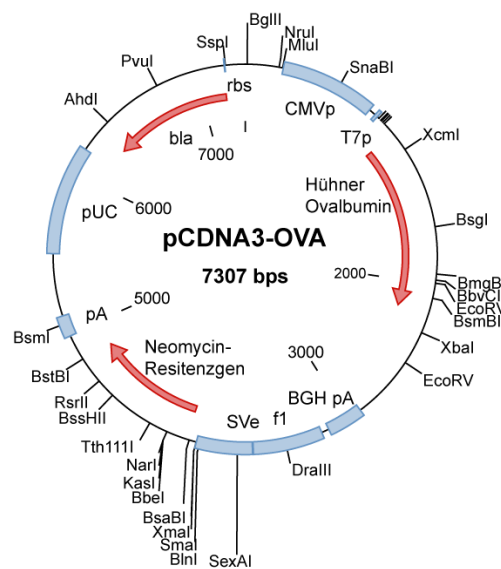
a) pVAX1™ (Invitrogen)



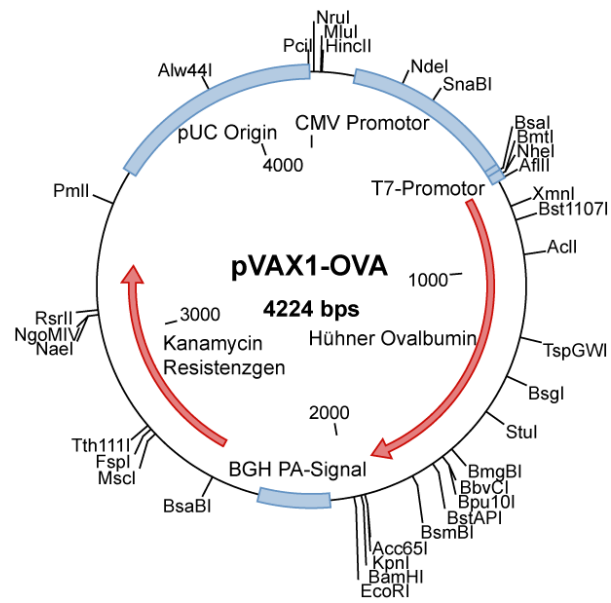
b) pVAX1-CD19



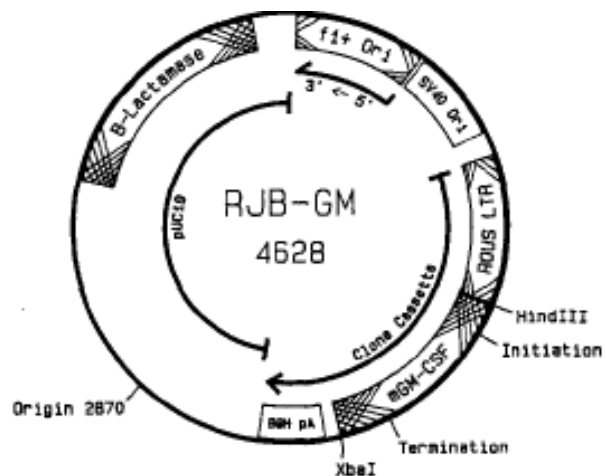
c) pCDNA3-OVA (Josef Mautner, Helmholtz Zentrum München)



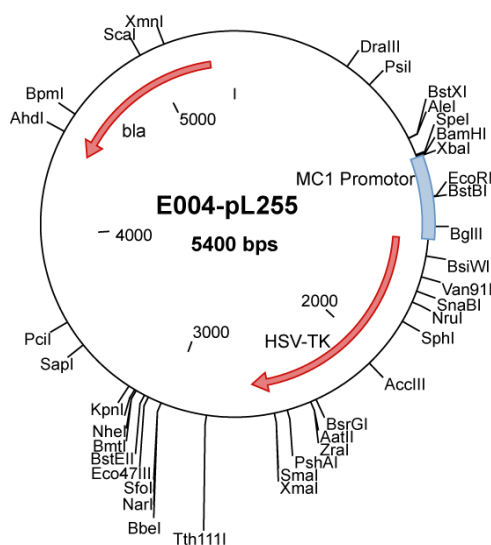
d) pVAX1-OVA



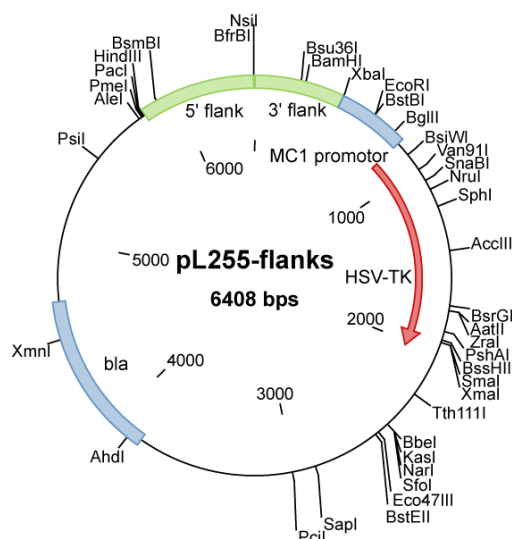
e) pRJB-GM (Altmann et al., 1991)



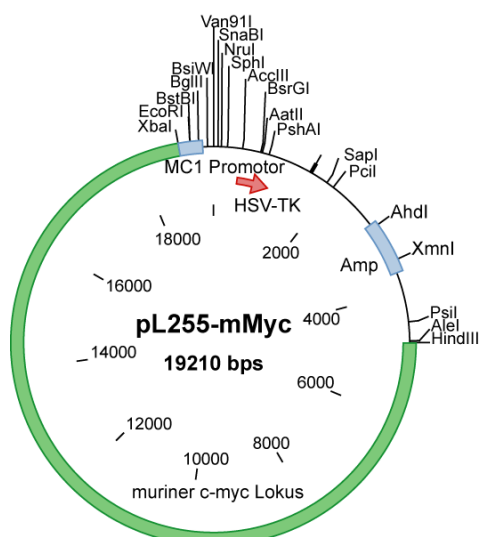
f) E004-pL255 (Ingo Burtcher, Helmholtz Zentrum München)



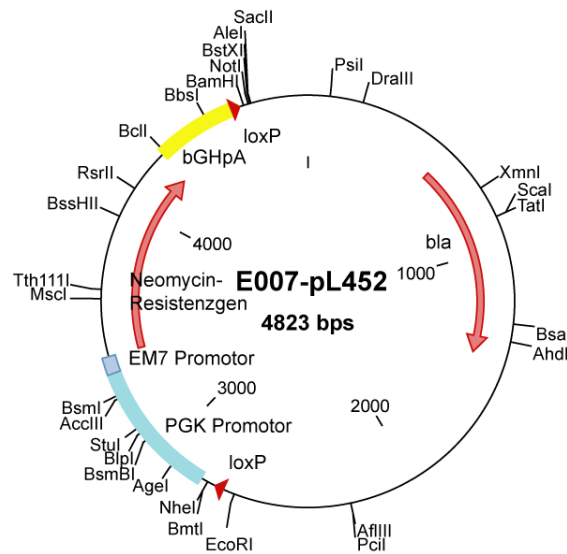
g) pL255-flanks



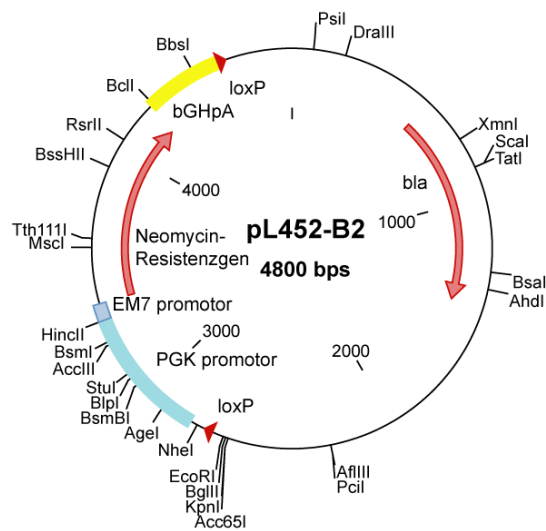
h) pL255-mMyc



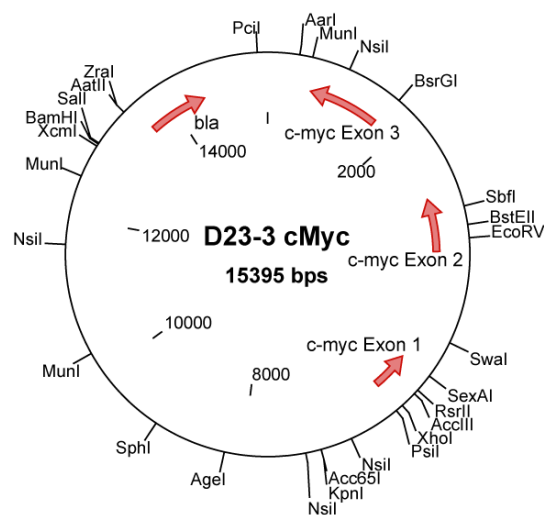
i) E007-pL452 (Ingo Burtscher, Helmholtz Zentrum München)



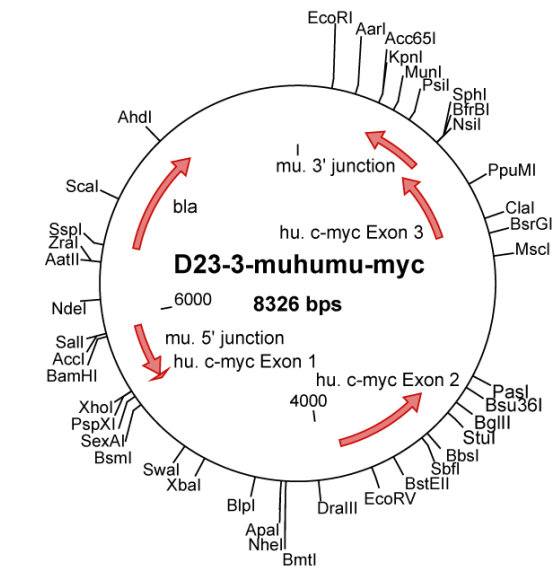
j) pL452-B2



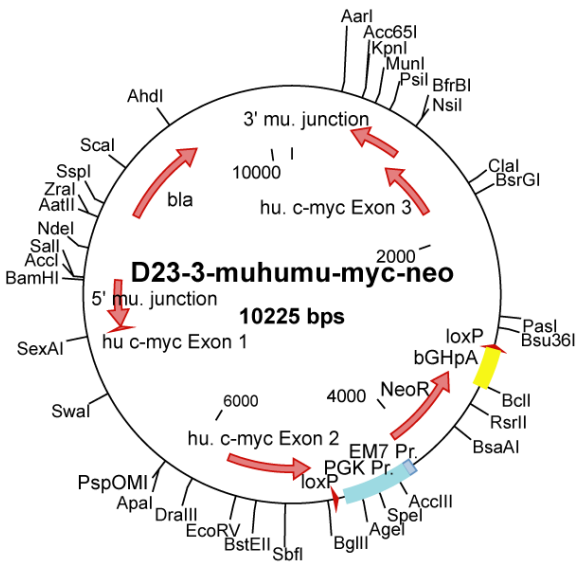
k) D23-3 cMyc



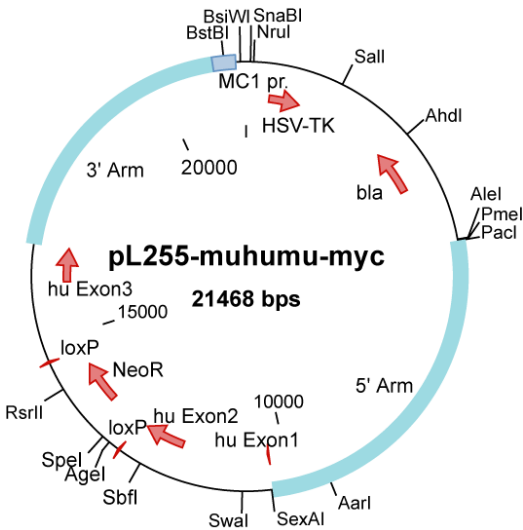
l) D23-3-muhumu-MYC



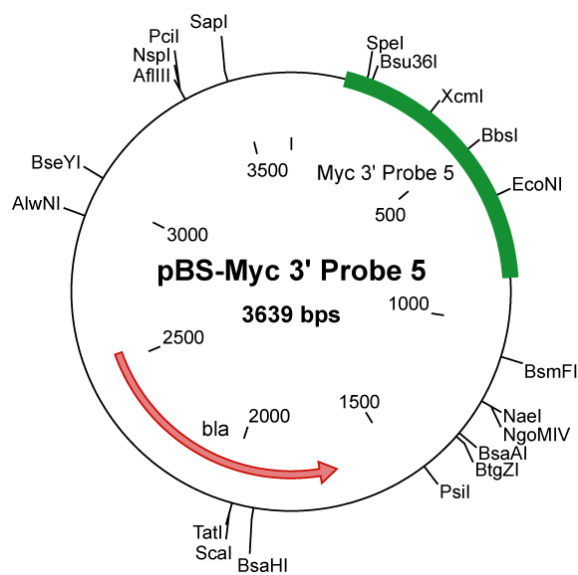
m) D23-3-muhumu-MYC-neo



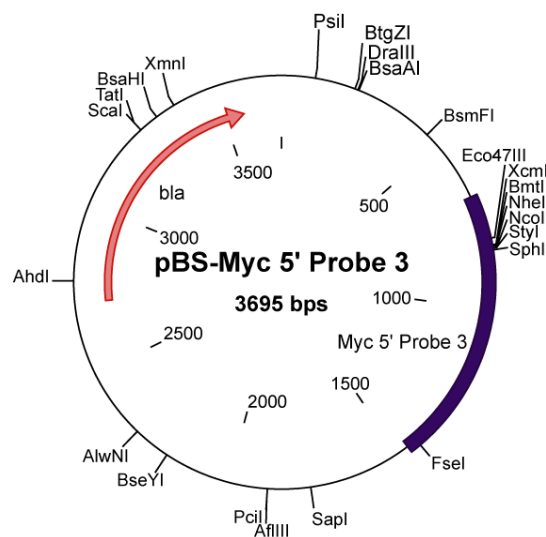
n) pL255-muhumu-MYC



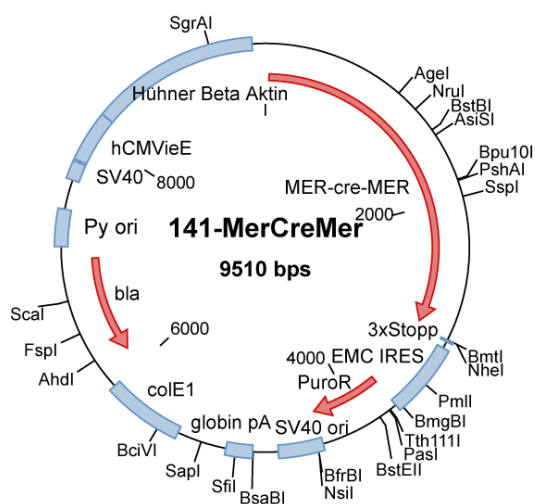
o) pBS-MYC 3' Probe 5 (Georg Bornkamm, Helmholtz Zentrum München)



p) pBS-MYC 5' Probe 3



q) 141-MerCreMer (Verrou et al., 1999)



IV. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben und so die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichten.

Ein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Georg W. Bornkamm für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die Betreuung und sein intensives Interesse. Danken möchte ich ebenfalls für die Möglichkeit sehr unabhängig zu arbeiten, welche mich nicht nur in meiner Doktorarbeit weiter gebracht hat. Nicht zuletzt möchte ich mich auch für das kritische Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Danken möchte ich auch PD Dr. Josef Mautner für die intensive experimentelle sowie fachliche Betreuung, welche mich stetig voran gebracht hat. Bedanken möchte ich mich zusätzlich dafür, dass er stets ein offenes Ohr für jegliche Probleme hatte.

Bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß möchte ich mich für die Erstbegutachtung und Vertretung meiner Arbeit seitens der Ludwig Maximilians Universität bedanken.

Danken möchte ich auch PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl für die experimentelle Betreuung während der Generierung des transgenen Mausstamms.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Armin Gerbitz und Dr. Thomas Kammertöns für die externe Betreuung meiner Doktorarbeit sowie für die vielen hilfreichen Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Elisabeth Kremmer für die Bereitstellung großer Mengen zahlreicher Antikörper sowie bei Prof. Dr. Wolfgang Uckert und Dr. Elisa Kieback für die molekulare Klonierung des T-Zellrezeptors.

Ein großer Dank gilt ebenfalls Michael Hagemann, Martina Möschter, Franziska Liebel, Silke Spallek und Sabine Schlink für die großartige Arbeit im Tierstall und die ständige Unterstützung bei diversen Schwierigkeiten.

Danken möchte ich ebenfalls allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Bornkamm und Mautner für die tolle Atmosphäre im Labor und die häufige Unterstützung bei zahlreichen Problemen. Ein besonderer Dank gilt Frau Brigitte Lechner und Frau Cornelia Kuklik-Roos für die sehr gute Einarbeitung in das Labor und die Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit. Danken möchte ich auch Frau Camilla Ladinig für die sehr gute experimentelle Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich zusätzlich bei Frau Sylvia Manglkammer für die Unterstützung bei sämtlichen administrativen Angelegenheiten.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Familie für die moralische Unterstützung zur Anfertigung dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin Samantha Feicht nicht nur für die experimentelle Unterstützung, sondern auch dafür, dass sie immer hinter mir stand und mich bei der Lösung von Problemen jeglicher Art unterstützt hat. Ich liebe dich und freue mich auf eine gemeinsame und erfolgreiche Zukunft.

V. Lebenslauf

Name: Lehmann
Vorname: Frank Michael
Geboren am: 18.11.1982
in: Bielefeld

Promotion:

03.2008 – heute Promotion am Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Am Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik,
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georg Bornkamm
Thema: Etablierung von Mausmodellen für die T-Zelltherapie
von B-Zell-Lymphomen

Studium:

02.2008 Diplom Molekulare Biotechnologie
06.2007 - 02.2008 Diplomarbeit am Lehrstuhl für zelluläre Genetik;
Technische Fakultät; Universität Bielefeld;
Thema: Ein Beitrag zur Charakterisierung des Serpinoms von
Drosophila melanogaster
09.2005 Vordiplom molekulare Biotechnologie

Abitur:

09.1999 – 06.2002 Gymnasium am Waldhof, Bielefeld.

Praktika:

02.2006 – 03.2006 Herz und Diabeteszentrum NRW
Forschungslabor des Diabeteszentrums

VI. Eidesstattliche Versicherung

Erklärung

Diese Dissertation wurde von März 2008 bis September 2011 am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik des Helmholtz Zentrums München in der Arbeitsgruppe von Prof Dr. Georg Bornkamm erstellt und von Prof. Dr. Elisabeth Weiß betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Frank Michael Lehmann, geboren am 18. November 1982 in Bielefeld, ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Sämtliche Experimente wurden von mir selbst durchgeführt, sofern nicht explizit auf Dritte verwiesen wird.

Diese Dissertation hat nicht in gleicher oder ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe weder bereits früher Doktorgrade erworben noch versucht zu erwerben.

München, den

Frank Michael Lehmann