Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Analyse spezifischer T-Zellen in einem murinen Tumor-Immunisierungsmodell

vorgelegt von

Carolin Lüking
aus Bielefeld

2005

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. med. R. Mocikat am Institut für Molekulare Immunologie der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit – betreut und von Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar vor der Fakultät vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erstellt.

München, 27.09.2005

(Carolin Lüking)

Dissertation eingereicht am	27.09.2005
1. Gutachter	Herr Prof. Dr. med. R. Mocikat
2. Gutachter	Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar
Mündliche Prüfung am	31.01.2006

INHALTSVERZEICHNIS 3

ABKÜRZUNGEN 7

ZUSAMMENFASSUNG 10

1. EINLEITUNG 13

1.1. Die angeborene und adaptive Immunantwort 13

1.1.1. T-Zellen 16

1.1.2. B-Zellen 20

1.2. Tumorimmunologische Grundlagen 21

1.2.1. Tumorantigene 21

1.2.2. Anti-Tumor-Antworten 22

1.2.3. Evasionsmechanismen 24

1.3. B-Zell-Lymphome 26

1.3.1. Passive Immuntherapien 27

1.3.2. Aktive Immuntherapien 27

1.4. Der Triomzell-Ansatz 28

1.5. Aufgabenstellung 31

2. MATERIAL UND METHODEN 33

2.1. Material 33

2.1.1. Mäuse 33

2.1.1.1. BALB/c-Mäuse 33

2.1.1.2. SCID-Mäuse 33

2.1.2. Zellen 33

2.1.2.1. Murine Zelllinien 33

2.1.2.2. Hybridome und Triome 34

2.1.3. Zellkulturmedien 34

2.1.4. PCR-Primer 34

2.1.5. Peptide 36

2.1.6. Antikörper 37

2.1.7. Puffer und Lösungen 37

2.1.8. Enzyme und Chemikalien 39

2.1.9. Kits 41
2.1.10. Geräte und sonstige Materialien 41

2.2. Zellbiologische Methoden 43
2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen 43
2.2.2. Bestimmung der Zellzahl 44
2.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen 44
2.2.4. Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen 44
2.2.5. T-Zell-Stimulationen 45
2.2.5.1. Langzeitstimulation 45
2.2.5.2. Kurzzeitstimulation 46
2.2.6. Magnetisches Sortieren von T-Zellen 46
2.2.6.1. Isolierung von T-Zellen aus Milzen und Lymphknoten 46
2.2.6.2. Anreicherung und Expansion von IFN-γ-positiven T-Zellen 47
2.2.6.3. Anreicherung von Vβ4- und Vβ6-positiven T-Zellen 48
2.2.7. Klonierungen 48
2.2.8. Peptidstimulationen zum Nachweis Idiotyp-spezifischer T-Zellen 49

2.3. Molekularbiologische Methoden 51
2.3.1. RNS-Extraktion 52
2.3.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren 52
2.3.3. Reverse Transkription der RNS in cDNS 53
2.3.4. RT-PCR 54
2.3.4.1. Qualitative RT-PCR 54
2.3.4.2. Quantitative RT-PCR 54
2.3.5. Gelelektrophorese 57
2.3.6. DNS-Extraktion aus Agarosegelen 57
2.3.7. Analyse des TZR-Vβ-Repertoires 58

2.4. Immunbiologische Methoden 59
2.4.1. ELISA zur Bestimmung der GM-CSF-Produktion 59
2.4.2. Durchflusszytometrie (FACS) 60
2.4.3. Luminex-System zur Bestimmung von Zytokinen 61

2.5. Tierexperimentelle Methoden 63
2.5.1. Präparation von Milz und Lymphknoten 63
2.5.2. Immunisierung von BALB/c-Mäusen 63
2.5.2.1. Vakzinierung mit BiV-Zellen 63

2.5.2.2. Immunisierung mit OVA-TCF1 64
2.5.3. Therapieversuche 64
2.5.4. Morphologische Untersuchungen 65
2.5.4.1. CFSE-markierte BiV-Zellen 65
2.5.4.2. GFP-transduzierte A20-Zellen 66

3. ERGEBNISSE 68

3.1. Bestimmung der Frequenz spezifischer T-Zellen 68
3.1.1. Markierung IFN-γ-produzierender Zellen 68
3.1.2. Anreicherung IFN-γ-positiver T-Zellen 70
3.1.3. *In-vitro*-Charakterisierung der T-Zellen 72
3.1.3.1. FACS-Analyse zur Aufklärung des Phänotyps der IFN-γ-produzierenden T-Zellen 72
3.1.3.2. TZR-Analyse angereicherter IFN-γ-produzierender T-Zellen 75
3.1.4. *In-vivo*-Versuche mit IFN-γ-angereicherten T-Zellen 76

3.2. Zytokin-Expressionsprofil der T-Zellen 78
3.2.1. Untersuchungen zum Aktivierungszustand und der Zytokinproduktion spezifischer T-Zellen während mehrerer Restimulationen 78
3.2.2. Zytokinprofile in Mausseren 81

3.3. Anreicherung von T-Zellen mit spezifischem TZR 83
3.3.1. *In-vitro*-Charakterisierung Vβ4- und Vβ6-positiver T-Zellen aus vakzinierten und naiven BALB/c-Mäusen 84
3.3.2. Anreicherung dieser T-Zellen 85
3.3.3. *In-vivo*-Versuche mit TZR-angereicherten T-Zellen 86

3.4. Klonierungen von T-Zellen aus vakzinierten Mäusen 87
3.4.1. Herstellung von T-Zell-Klonen 87
3.4.2. *In-vitro*-Charakterisierung der „Klone" 89
3.4.3. *In-vivo*-Versuche mit klonierten T-Zellen 93

3.5. Nachweis Idiotyp-spezifischer T-Zellen nach Restimulationen 95
3.5.1. Peptid-Abfrage-System 95
3.5.2. Qualitativer und semi-quantitativer *In-vitro*-Nachweis Idiotyp-spezifischer T-Zellen 96

3.6. Suche nach weiteren Abstoßungsantigenen im A20-B-Zell-Lymphom 98

3.7. Morphologische Untersuchungen zur Kompatimentierung von Triom- und A20-Zellen 99

3.7.1. Wanderung CFSE-markierter BiV-Zellen in BALB/c-Mäusen..... 102

3.7.2. Wanderung GFP-transduzierter A20-Zellen in SCID-Mäusen..... 103

3.7.3. Wanderung ^{64}Cu-markierter A20-Zellen in BALB/c-Mäusen 105

4. DISKUSSION 108

4.1. Untersuchung markierter und angereicherter tumorspezifischer T-Zellen 109

4.1.1. *In-vitro*-Charakterisierung der tumorspezifischen T-Zellen..... 110

4.1.2. Die tumorspezifischen Zellen im adoptiven Transfer..... 111

4.2. Untersuchungen zum Zytokin-Expressionsprofil 112

4.2.1. *In vitro* restimulierte T-Zellen 112

4.2.2. Mausseren..... 113

4.3. Angereicherte T-Zellen mit spezifischem TZR im adoptiven Transfer..... 114

4.4. Klonierte T-Zellen aus immunisierten Mäusen im adoptiven Transfer..... 116

4.5. Idiotyp-spezifische T-Zellen nach Restimulation..... 117

4.6. Weitere Abstoßungsantigene auf A20-Tumorzellen 118

4.7. Kompartimentierung von Triom- und A20-Zellen 119

4.8. Ausblick 120

LITERATURVERZEICHNIS 121

DANK..... 137

LEBENSLAUF 138

ABKÜRZUNGEN

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
cDNS	komplementäre DNS
CDR3	Komplementaritäts-bestimmende Region 3 (complementarity determining region 3)
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CP	Kreuzungspunkt (crossing point)
CpG	nichtmethylierte DNS-Motive bakterieller DNS (Cytosin-phospho-Guanin)
d	Tag
DC	dendritische Zelle
DNS	Desoxyribonukleinsäure (DNA)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotid-5-Triphosphat
dsDNS	Doppelstrang-DNS (double strand DNA)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	weiterentwickeltes, fluoreszierendes Quallenprotein (enhanced green fluorescent protein)
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsporptionsassay
FACS	fluoreszenzaktivierter Zell-Sortierer (fluorescence activated cell sorting)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum (FCS)
FSC	Vorwärtsstreuung (forward scatter)
FL	Fluoreszenz

g	Erdbeschleunigung (gravity)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
gp70	Glykoprotein-70
Gy	Gray
h	Stunde
hu	human
Id	Idiotyp
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
KÜ	Kulturüberstand
LK	Lymphknoten
LMP	Proteasom-Untereinheit (low molecular mass polypeptide)
MACS	magnetischer Zellsortierer (magnetic activated cell sorting)
MEM	modifiziertes Eagle-Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
Min.	Minute
MSCV	murines Stammzell-Virus
MuLV	murines Leukämie-Virus
mRNS	Boten-RNS (messenger RNA)
mu	murin
Neg.	Negativkontrolle
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd

PI	Propidiumjodid
POX	Peroxidase
PPR	Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors)
rad	Einheit für Energiedosis (radiation-absorbed dose)
Rest.	Restimulation
RNAse	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s.c.	subkutan
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt (severe combined immune deficiency)
SSC	Seitwärtsstreuung (side scatter)
ssDNS	Einzelstrang-DNS (single strand DNA)
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	thermus aquaticus (Bakterium)
TAP	Transporterprotein (transporter associated with antigen processing)
TE	Tris-EDTA-Puffer
Th	T-Helfer-Zelle
TIL	Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNS	Transfer-RNS
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Einheit (Unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Wachstumsfaktor (vascular endothelian growth factor)
Vol.	Volumen
ZTL	zytotoxische T-Zelle

ZUSAMMENFASSUNG

Die Triomzell-Vakzinierung ist ein neuer, überaus potenter Ansatz in der Immuntherapie maligner Lymphome. Aus A20-Lymphomzellen der Maus wurde durch Fusion mit der Ratten-Hybridomzelllinie 2.4G2 die Triomzelllinie BiV hergestellt. Die entstandenen Triomzellen enthalten potenziell alle Antigene der parentalen Lymphomzellen und zusätzlich die anti-Fcγ-Rezeptor-Spezifität des Hybridoms. Die Präsentation der Tumorantigene wird somit durch Redirektion gegen internalisierende Rezeptoren auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) ermöglicht. Durch Triom-Immunisierung konnte nicht nur ein Langzeit-Tumorschutz in Mäusen vermittelt werden, sondern es wurden sogar etablierte Tumoren abgestoßen. Der Tumorschutz wird dabei über $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen vermittelt, die humorale Immunantwort spielt nur eine untergeordnete Rolle.
Mehrfach *in vitro* restimulierte und adoptiv transferierte T-Zellen aus immunisierten Mäusen waren im Gegensatz zu identisch behandelten T-Zellen aus naiven Mäusen tumorprotektiv. Das war insofern erstaunlich, als beide T-Zellpopulationen *in vitro* den gleichen A20-spezifischen Aktivierungszustand zeigten. Ein eingeschränktes T-Zell-Rezeptor-(TZR-) Repertoire von *in vitro* restimulierten T-Zellen aus immunisierten Mäusen korrelierte mit dem Tumorschutz. Restimulierte T-Zellen aus naiven Mäusen zeigten hingegen keine Einschränkung im TZR-Repertoire.
Durch die Immunisierung der Mäuse erfolgt offensichtlich eine *In-vivo*-Aktivierung, die sich durch *In-vitro*-Stimulationen nicht nachstellen lässt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die spezifischen T-Zellen, die durch Triom-Immunisierung gewonnen wurden, näher untersucht werden. Dazu wurden zuerst tumorspezifische, IFN-γ produzierende T-Zellen näher charakterisiert. Die Frequenz dieser Zellen in immunisierten Mäusen war im Vergleich zu naiven Mäusen kaum erhöht. Durch *In-vitro*-Restimulation ließ sich diese Zellpopulation, wenn sie aus immunisierten Mäusen kam, jedoch schneller expandieren. Die Expansion betraf dabei hauptsächlich die IFN-γ^+CD4^+ T-Zellen. Nach adoptivem Transfer zweimal restimulierter, IFN-γ-angereicherter Zellen aus der Immunmaus zeigte sich, dass diese Zellen tumorprotektiv waren. IFN-γ^+ Zellen aus Naivmäusen waren nicht protektiv. Erstaunlicherweise war das TZR-Repertoire der protektiven T-Zellen zu diesem Zeitpunkt schon stark eingeschränkt. Ohne IFN-γ-Anreicherung konnte diese Beobachtung in früheren Versuchen erst am Ende der 9. Restimulation bei T-Zellen

aus immunisierten Mäusen gemacht werden. Die Einschränkung im Repertoire lässt darauf schließen, dass für die Tumorabstoßung wahrscheinlich nur wenige Antigene entscheidend sind. Allerdings müssen die T-Zellen *in vivo* schon mit diesen in Kontakt gekommen sein. Die *In-vitro*-Bedingungen können das offensichtlich nicht nachahmen. Dass nicht ein einzelnes Abstoßungsantigen für die Tumorabstoßung verantwortlich ist, zeigten die adoptiven Transferversuche von T-Zellen mit spezifischem TZR bzw. von T-Zell-Klonen. Das Repertoire der transferierten T-Zellen musste mindestens oligoklonal sein, damit es zu einem Tumorschutz kam. Die Rolle des Immunglobulin-Idiotyps (Ig-Id) als eines potenziellen Abstoßungsantigens sollte hierbei noch näher untersucht werden. Zwar war bekannt, dass der Ig-Id ein schwaches Tumorantigen ist und nur eine geringe Rolle für das Erlangen von Tumorimmunität spielt, aber die Induktion von Id-spezifischen T-Zellen durch Triom-Immunisierung war nicht auszuschließen und sollte quantifiziert werden. Die untergeordnete Rolle wurde durch die Ergebnisse untermauert, denn auch nach mehreren *In-vitro*-Restimulationen lag die Frequenz der Id-spezifischen T-Zellen unter der Nachweisgrenze des Testsystems. Bei der weiteren Suche nach überexprimierten Antigenen auf A20-Zellen sind bisher TERT und Bax identifiziert worden, aber ihr Potenzial zur Generierung tumorspezifischer T-Zellen muss noch überprüft werden.

Um die Unterschiede der T-Zellen von naiven und immunisierten Mäusen nach Immunisierung und während *In-vitro*-Restimulation näher zu untersuchen, wurde das Zytokinexpressionsmuster im Kulturüberstand verglichen. Dabei zeigte sich, dass es unter *In-vitro*-Bedingungen bei T-Zellen aus immunisierten Mäusen im Gegensatz zu denen aus naiven Mäusen sehr schnell zu einer gemischten Th-Antwort kam. Analysen des Serums sollten die Immunantwort nach Vakzinierung verdeutlichen. Auch hier konnte eine gemischte Th-Antwort beobachtet werden. Außerdem deuten hohe IL-10- und IL-12-Konzentrationen im Serum auf mature und aktivierte dendritische Zellen (DC) hin, die ihrerseits Antigene präsentieren und zytotoxische T-Zellen (ZTL) aktivieren können. Im Serum von naiven Mäusen waren keine der untersuchten Zytokine zu detektieren.

Über die Charakterisierung der durch Triom-Immunisierung erzeugten spezifischen T-Zellen hinausgehend wurde die Kompartimentierung von Vakzine- und Tumorzellen untersucht. Die unterschiedliche Lokalisierung beider Zelllinien kann eine mögliche Erklärung für Erfolg bzw. Misserfolg in der Therapiesituation sein. Die Befunde deuten darauf hin, dass die Triomzellen sehr schnell in Lymphknoten in der

Nähe der Applikationsstelle und in die Milz wandern. Dort überleben sie einige Zeit trotz ihres xenogenen Anteils und dienen als Antigenquelle. Die A20-Zellen hingegen sind nur kurzzeitig nach Applikation in wenigen Lymphknoten und der Milz zu beobachten. Bei i.v.-Gabe der Tumorzellen wird ein Teil von ihnen durch einen bisher unbekannten Mechanismus möglicherweise zerstört und ausgeschieden. Durch die so gesunkene Tumorlast ergibt sich eine mögliche Erklärung für die erfolgreiche Therapie nach i.v.-Gabe der A20-Zellen. Um diese Hypothese zu beweisen, sind aber noch weitere Untersuchungen nötig.

In dieser Arbeit wurde das erste Mal gezeigt, dass durch Triom-Immunisierung tumorspezifische und -protektive IFN-γ^+ T-Zellen entstehen, die durch *In-vitro*-Restimulation expandiert werden können. Da sie im Gegensatz zu IFN-γ^+ T-Zellen aus Naivmäusen am Ende der 2. Restimulation ein eingeschränktes TZR-Repertoire zeigen, müssen sie *in vivo* schon mit bestimmten Tumorantigenen in Kontakt gekommen sein. Die Identifizierung dieser Antigene steht noch aus. Der Idiotyp, obwohl er ein absolut Tumor-spezifisches Antigen ist, zählt nicht zu den entscheidenden Abstoßungsantigenen.

1. EINLEITUNG

Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe, Pathogene aufzuspüren und zu beseitigen. Für die Entwicklung unseres hoch differenzierten und anpassungsfähigen Immunsystems, wie es sich in der heutigen Form darstellt, hat die Evolution über 400 Millionen Jahre benötigt (Burmester und Pezzutto, 1998).

1.1. Die angeborene und adaptive Immunantwort

Entwicklungsgeschichtlich ältere Abwehrmaßnahmen werden als angeborene oder unspezifische Immunantwort bezeichnet, da sie zunächst unabhängig vom jeweiligen Erreger aktiv werden. Die angeborene Immunität wird durch Komplement, Granulozyten, Makrophagen und Natürliche Killer-(NK-) Zellen vermittelt (s. Abb. 1.1.-1). Die meisten Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren Mustererkennungsrezeptoren (PRR), die z.B. Lipopolysaccharide (Endotoxine) oder andere bakterielle Strukturen erkennen. Die angeborene Immunität ermöglicht also einen unspezifischen, ersten Schutz gegen Mikroorganismen und andere Eindringlinge. Aber sie spielt auch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von nachfolgenden, spezifischen Antworten des adaptiven Immunsystems.
Die Antigenerkennung durch die unspezifischen Abwehrzellen schafft ein Zytokinmilieu, das die weitere Immunreaktion entscheidend beeinflusst. Für die Einleitung einer spezifischen Antwort bedarf es der Präsentation von Antigenen durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ, z.B. Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, B-Zellen). Das Auswandern der APZ in die sekundären lymphatischen Gewebe (Milz, Lymphknoten, darmassoziierte lymphatische Gewebe) ruft eine systemische Immunantwort und spätere Gedächtnisreaktion hervor: Daran sind hauptsächlich T- und B-Lymphozyten beteiligt. Diese Zellen gehören zum so genannten spezifischen oder adaptiven Immunsystem. Nur T- und B-Zellen generieren während ihrer Ausdifferenzierung hochspezifische Antigenrezeptoren (BZR, TZR), die durch ein zufälliges Genrearrangement aus einer großen Auswahl von Keimbahn-Gensegmenten eine individuelle Struktur besitzen und somit eine Feinstruktur (Epitop) auf einem Antigen

erkennen können. Antigene können spezifische Lymphozytenklone, die sich jeweils durch eine spezifische Genumlagerung auszeichnen, aktivieren und bestimmte Zellleistungen induzieren (s. Abb. 1.1.-1). Zunächst werden die T-Zellen zur Teilung (klonale Proliferation) angeregt. Dadurch vergrößert sich die Zahl der Zellen mit eben dieser Spezifität. Erst danach können diese T-Zellen in nennenswertem Umfang biologische Effekte induzieren. Die Expansion eines Klons dauert mehrere Tage. Das Resultat einer aktiven Immunisierung z.B. ist eine solche erworbene Immunität, die dann effektiv gegen einen Erreger schützt. Durch die B- und T-Zellen besitzt das adaptive gegenüber dem angeborenen Immunsystem einen großen Vorteil: Während der erfolgreichen Abwehr eines Eindringlings oder Entfernung eines Antigens werden Antigen-spezifische Gedächtniszellen gebildet, die über lange Zeiträume im Körper des Individuums verbleiben. Treffen sie erneut auf spezifische antigene Strukturen, können sie eine schnellere und effektivere Immunantwort als beim erstmaligen Kontakt mit dem Antigen einleiten.

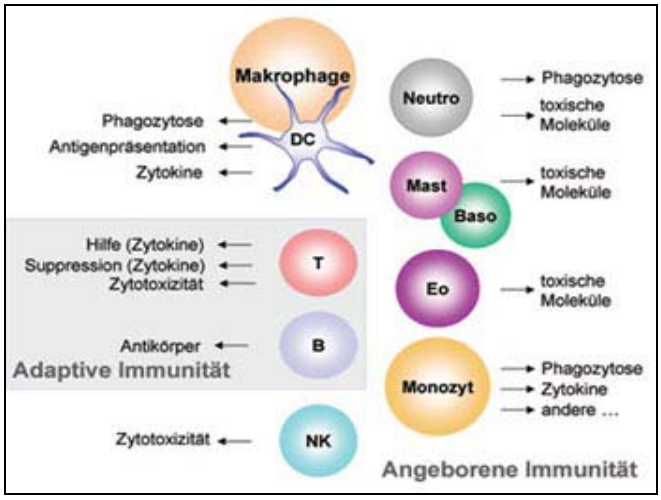


Abbildung 1.1-1: Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems und ihre Aufgaben (aus Schütt, 2004)

B: B-Zelle
Baso: Basophiler Granulozyt
DC: Dendritische Zelle
Eo: Eosinophiler Granulozyt
Mast: Mastzelle
Neutro: Neutrophiler Granulozyt
NK: Natürliche Killerzelle
T: T-Zelle

Im Gegensatz zur B-Zelle ist die T-Zelle nur in der Lage, Antigene zu erkennen, wenn ihr diese Antigene in Form prozessierter Peptide durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) präsentiert werden. Damit die T-Zelle dabei nicht anergisiert, sondern aktiviert wird, bedarf es eines zusätzlichen kostimulatorischen Signals von der APZ z.B. über die B7.1/7.2- (CD80-/CD86-) Moleküle, die mit dem CD28-Molekül der T-Zelle in Kontakt treten. Die von der APZ gebildeten Antigen-Peptide werden der T-Zelle im Zusammenhang mit MHC-Molekülen präsentiert. Diese werden von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes kodiert und in zwei Klassen, MHC-I

und MHC-II, eingeteilt. Während MHC-I-Moleküle im Allgemeinen Peptide von intrazellulären Antigenen präsentieren, werden Antigene, deren Peptide von MHC-II-Molekülen präsentiert werden, vorher von APZ aus dem Extrazellularraum durch Endo- oder Phagozytose aufgenommen.

Die Interaktion der T-Zelle mit dem MHC-Peptid-Komplex auf der APZ wird durch Korezeptoren stabilisiert. Dabei gibt es für die Moleküle jeder MHC-Klasse eine eigene Korezeptorklasse: Der CD8-Rezeptor bindet an MHC-I, der CD4-Rezeptor an MHC-II. Die CD4- und CD8-Moleküle werden auf funktionell unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen exprimiert, die dementsprechend als CD4- bzw. CD8-T-Zellen bezeichnet werden (s. Abb. 1.1.-2). Den CD8-T-Zellen kommt bei der Immunantwort hauptsächlich eine zytotoxische Rolle zu. Deswegen werden sie auch als zytotoxische T-Zellen (ZTL) bezeichnet. Die CD4-T-Zellen übernehmen größtenteils regulatorische Funktionen und werden auch als T-Helferzellen (Th) bezeichnet.

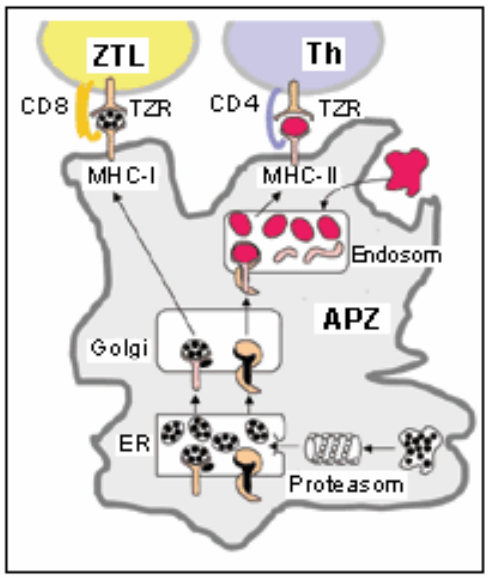


Abbildung 1.1.-2: Antigenpräsentation (verändert nach Schütt, 2004)

Phagozytose ist die Grundvoraussetzung für die Antigenpräsentation. Die Antigene werden im Endosom prozessiert, durch MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert und dann den T-Helferzellen präsentiert.
Zytotoxische T-Zellen hingegen können Antigene aus dem Zytoplasma (z.B. virale Peptide) nur auf MHC-Klasse-I-Molekülen und nach Prozessierung durch das Proteasom erkennen.
Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen (APZ).
ER: Endoplasmatisches Retikulum

Aktivierte $CD4^+$ T-Zellen können aufgrund der Sekretion unterschiedlicher Zytokine in Th1- oder Th2-Zellen unterteilt werden. Die beiden Untergruppen der $CD4^+$ T-Zellen erfüllen unterschiedliche Aufgaben. Th2-Zellen aktivieren speziell bei Primärantworten höchst effektiv B-Zellen, Th1-Zellen sind dagegen entscheidend für die Makrophagen- und ZTL-Aktivierung. Darüber hinaus beeinflussen sich beide Gruppen gegenseitig, indem die Zytokine des einen Typs die Aktivierung des anderen unterdrücken. Durch IL-12 und IFN-γ aktivierte Th1-Zellen produzieren IL-2, IFN-γ und LT (Lymphotoxin, TNF-β). Dabei kann das freigesetzte IFN-γ die Proliferation von Th2-Zellen verhindern. IL-4 hingegen kann die naiven $CD4^+$ Lymphozyten zu einer Differenzierung zu Th2-Zellen aktivieren. Diese produzieren dann IL-4, IL-5, IL-10 und TGF-β, wobei die beiden zuletzt Genannten das Wachstum und die Aktivierung von Th1-Zellen direkt und indirekt verhindern können. Weitere Zytokine wie IL-3, TNF-α und GM-CSF können von beiden Typen gebildet werden (Janeway und Travers, 1997).
Th1-Zellen führen zu einer zellulären Immunantwort. Durch die IL-2-Sekretion aktivieren sie $CD8^+$ Zellen (ZTL). Th2-Zellen hingegen stimulieren B-Zellen und haben somit einen Einfluss auf die humorale Immunantwort.

1.1.1. T-Zellen

Die Vorläuferzellen der T-Zellen, die Prä-Lymphozyten reifen im Knochenmark sowie in der fetalen Leber heran und wandern in den Thymus. Dort bildet sich der T-Zell-Rezeptor (TZR) aus und es findet eine Selektion der T-Zellen statt: Nur T-Zellen, die das passende MHC-Molekül in einer mittelstarken Bindung erkennen und nicht gegen Autoantigene gerichtet sind, können ausreifen und gelangen als funktionsfähige T-Zellen in die Zirkulation. Hier verbleiben die naiven T-Zellen bis zu einem eventuellen Antigenkontakt zunächst außerhalb der lymphatischen Organe. Nach Kontakt mit einem Antigen vermitteln T-Zellen eine zelluläre Immunantwort, da ihr Antigen-Rezeptor, der T-Zell-Rezeptor (TZR), als membrangebundenes Molekül exprimiert wird. Er besteht aus zwei Glykoproteinketten, α und β oder γ und δ, die jeweils miteinander über eine Disulfidbrücke verbunden sind und jeweils eine variable (V), eine konstante (C), eine Gelenk- (H) und eine Transmembranregion besitzen, an die sich ein zytoplasmatischer Schwanz anschließt (Abb. 1.1.-3).

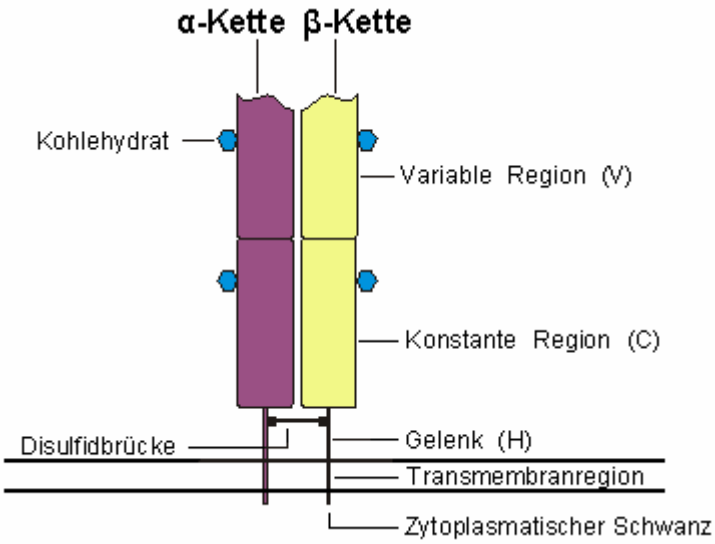


Abbildung 1.1.-3: Struktur eines αβ-T-Zell-Rezeptors

Der Rezeptor ist ein membrangebundenes Heterodimer aus α- und β-Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (nach Janeway und Travers, 1997).

Die α- und die β-Kette sind die am häufigsten exprimierten Gene des TZR (zu ca. 95%). Auf unreifen T-Zellen und auf einer Minderheit von T-Zellen im peripheren Blut findet man den γ/δ-TZR (ca. 5%) (Burmester und Pezzutto, 1998).

Die TZR-Kette der Maus wird aus Anteilen der V- (variable), D- (diversity), J- (joining) und C- (constant) Gensegmente gebildet, die alle räumlich getrennt auf Chromosom 14 liegen. Der β-Ketten-Locus umfasst 700-800kb und enthält im V-Bereich 20-30 Gensegmente. An diesen schließen sich in 3´-Richtung tandemartig zwei D-J-C-Gruppen an, von denen jede aus einem D-, sechs J- und einem C-Segment besteht. Bei der somatischen Rekombination wird zuerst ein D- mit einem J-Segment zu einer D-J-Gruppe verknüpft, die dann mit einem V-Segment zu einer V-D-J-Gruppe verbunden wird. Während dieses Umlagerungsprozesses werden an den Verknüpfungsstellen durch die terminale Desoxynukleotidyltransferase sogenannte N-Nukleotide zufällig eingefügt. Durch diese Vorgänge besitzen die Verknüpfungsstellen eine sehr hohe Variabilität.
Die variablen (V-) Teile des TZR werden auf Transkriptebene durch Spleißen mit den konstanten (C-) Regionen der Rezeptoren gekoppelt. Die V-Region des Rezeptors wird von den V-, D- und J-Gensegmenten kodiert, die C-Region mit dem

Gelenk und den Transmembran- und zytoplasmatischen Bereichen von den C-Gensegmenten (s. Abb. 1.1.-4).

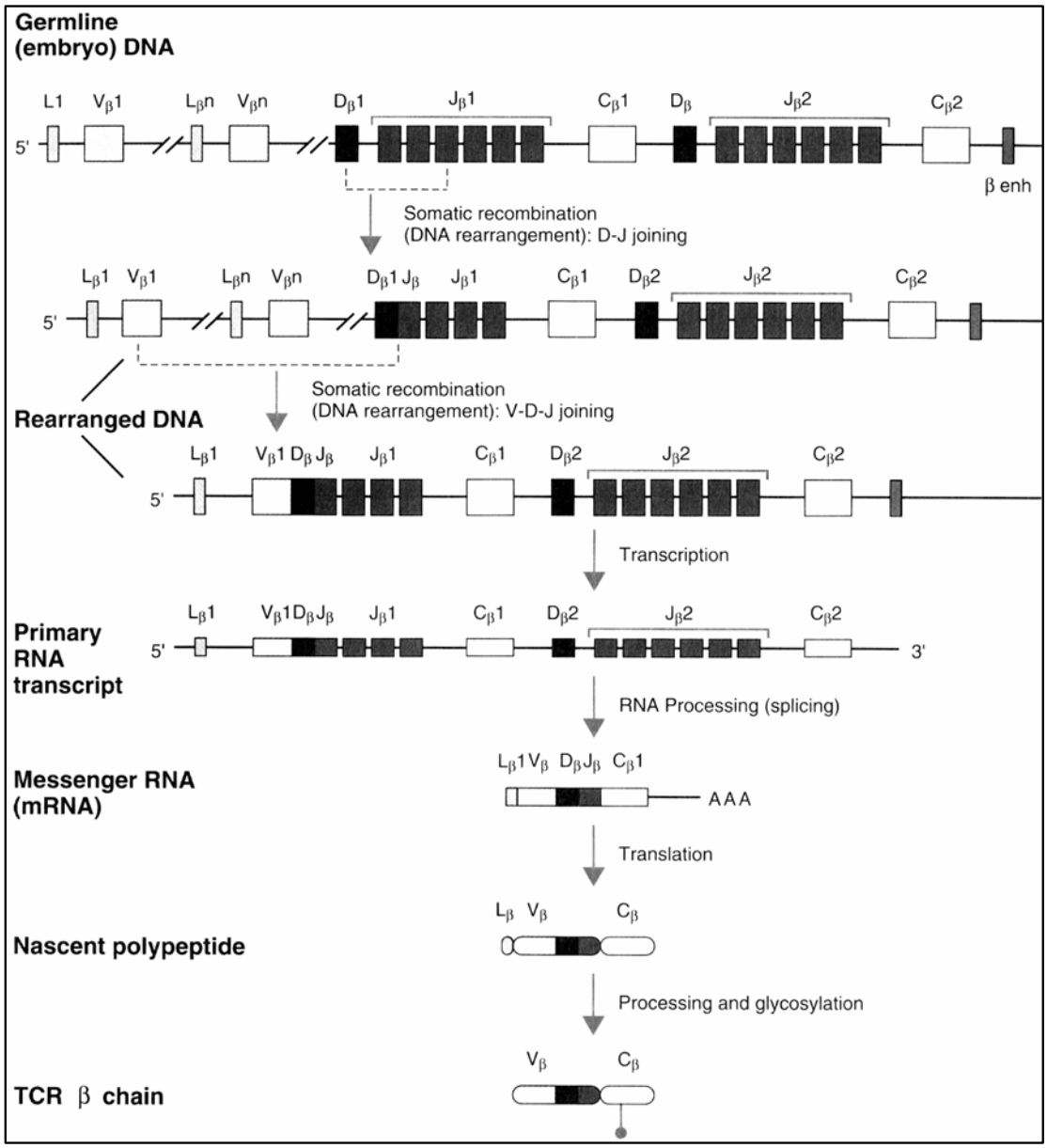


Abbildung 1.1.-4: Rekombination, Transkription und Synthese der β-Kette eines TZR in der Maus (aus Abbas et al., 1997)

Der β-Ketten-Locus, der 700-800kb umfasst, enthält im V-Bereich 20-30 Gensegmente, abhängig vom Mausstamm. An diesen schließen sich in 3´-Richtung tandemartig zwei D-J-C-Gruppen an: Jede besteht aus einem D-, sechs J- und einem C-Segment.
Nach der Umlagerung der D-J- und V-D-J-Gensegmente, bei denen nicht benötigte Segmente deletiert werden, wird das C-Gensegment und die Leader-Peptid-Sequenz durch Spleißen auf RNS-Ebene mit der V-D-J-Gruppe verknüpft.
enh: Enhancer
L: Leader-Peptid

Die sehr große Variabilität der Rezeptoren entsteht durch eine unterschiedliche Auswahl der J-Elemente (α- und β-Kette), die zusätzlich noch durch D-Segmente (β-Kette) verstärkt wird.

Auf Proteinebene entspricht der Bereich mit der höchsten Variabilität der CDR3 (complementarity determining region 3). Diese erstreckt sich über die Verknüpfungsbereiche der V-, D- und J-Gensegmente und kodiert für die Antigenbindungsstelle (s. Abb. 1.1.-5).

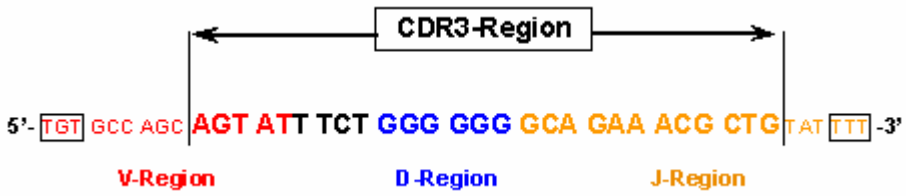


Abbildung 1.1.-5: Die Lage der CDR3-Region innerhalb der umgelagerten Vβ-Kette eines TZR. (aus K. Kronenberger, 2002)

Die CDR3-Region erstreckt sich über die V-D-J-Verknüpfungsstellen der β-Kette. *Per definitionem* beginnt sie an der dritten Aminosäure nach dem konservierten Cys im V-Gensegment (eingerahmt) und endet eine Aminosäure vor dem konservierten Phe-Gly-X-Gly-Motiv im J-Gensegment (erste Aminosäure eingerahmt). Sie umfasst fünf bis zwölf Aminosäuren in Abhängigkeit von der Anzahl der bei den Umlagerungsprozessen eingefügten N-Nukleotide und deletierten Basen. Die großgedruckten Basen gehören zu der CDR3-Region. Die eingefügten N-Nukleotide sind schwarz gekennzeichnet. Die Dreiergruppen der Basen entsprechen dem Leseraster. Hier handelt es sich um die Vβ6- und Jβ2.3-Gensegmente.
Cys: Cystein; Gly: Glycin; Phe: Phenylalanin

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

Da auf einer T-Zelle immer nur ein TZR-Typ exprimiert wird, kann über das Repertoire der Rezeptoren auf die Klonalität der Zellpopulation geschlossen werden. Das TZR-Repertoire wird mittels RT-PCR und Sequenzierung näher bestimmt. In BALB/c-Mäusen gibt es 18 funktionelle Vβ-Genfamilien, von denen 3 noch in Unterfamilien geteilt werden. Diese Vβ-Ketten werden außerdem noch mit

verschiedenen Jβ-Segmenten gepaart, so dass erst auf Sequenzniveau die Klonalität einer T-Zell-Population bewiesen werden kann.

1.1.2. B-Zellen

B-Lymphozyten differenzieren im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen als Reaktion auf Signale von Stromazellen (lösliche Zytokine, Zell-Zell-Kontakt). Nach verschiedenen Differenzierungsstufen exprimieren sie Immunglobulin-(Ig-) Moleküle als B-Zell-Rezeptoren (BZR) auf ihrer Zelloberfläche und wandern ständig zwischen Knochenmark und sekundären lymphatischen Organen, bis sie auf ein passendes Antigen treffen. Nach Antigenkontakt differenzieren die B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Die Antiköper sind in extrazellulären Flüssigkeiten und dem Blutplasma zu finden, weswegen diese Art der Immunantwort auch „humorale Antwort“ genannt wird. Neben der Fähigkeit zur Immunglobulinproduktion können B-Zellen aber auch als APZ fungieren, den T-Zellen somit antigene Peptide präsentieren und diese dadurch aktivieren.
Die BZR oder Immunglobulin-Moleküle werden von reifen B-Zellen auf ihren Zelloberflächen exprimiert sowie von terminal differenzierten B-Zellen (Plasmazellen) als Antikörper ins Blut abgegeben. Die Immunglobuline oder Antiköper sind aus jeweils zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten aufgebaut, die durch Disulfidgruppen miteinander verbunden sind. Jede Kette besteht aus einem variablen (V) und einem konstanten (C) Bereich. In den V-Bereichen liegen die Antigenbindungsstellen. Die C-Bereiche sind für Effektorfunktionen (z.B. Komplementbindung, Interaktion mit spezifischen Rezeptoren) zuständig. In Abhängigkeit vom benutzten C-Region-Gensegment unterteilt man die Immunglobuline in fünf Klassen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM.
In der variablen Domäne der schweren und der leichten Kette gibt es Bereiche, die eine extreme Variabilität der Aminosäure-(AS-) Sequenz aufweisen (hypervariable Region). Sie bestimmen die Spezifität der Antigenbindung und werden Komplementaritäts-determinierende Region (CDR) genannt. Die somatische Hypermutation in Kombination mit der somatischen Rekombination ermöglichen einem Individuum die Bildung von 10^{11} verschiedenen BZR bzw. Antikörpern (Davis und Bjorkmann, 1988).

1.2. Tumorimmunologische Grundlagen

Die ersten wissenschaftlich-theoretischen Ansätze zur Tumorimmunologie wurden Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelt. Schon damals nahm Paul Ehrlich an, dass es – ähnlich wie bei Infektionskrankheiten – möglich sei, eine Schutzimpfung gegen die Entstehung von Geschwülsten zu entwickeln. Der Gedanke, dass Tumorzellen durch das Immunsystem erkannt und bekämpft werden, ist seit Jahrzehnten Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

1.2.1. Tumorantigene

Bereits 1943 zeigte Gross, dass die intradermale Immunisierung von Mäusen gegen chemisch – mit Methylcholanthren – induzierte Sarkome die Tiere vor einem erneuten Anwachsen der Tumoren schützte. Man ging von einer spezifischen Immunantwort, die gegen Neoantigene auf den Tumoren gerichtet war, aus (Gross, 1943; Prehn et al., 1957; Klein et al., 1960). In einem Experiment von Basombrio, 1970, konnte nachgewiesen werden, dass die Antigene von Tumorzellen eines durch Kanzerogene induzierten Tumors einzigartig sind. Eine tumorinduzierte Immunität schützte die Versuchstiere immer nur vor dem Wachstum der zur Immunisierung eingesetzten Tumorzelle, eine immunologische Kreuzreaktivität zwischen unterschiedlichen durch Kanzerogene induzierten Tumoren bestand dort nicht.
In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass syngen transplantierte Tumorzellen in Empfängertieren, die zuvor mit bestrahlten Tumorzellen des gleichen Typs immunisiert worden waren, nicht zu einem Tumor anwuchsen (Boon et al., 1992). Man nahm auch hier an, dass die verwendeten Tumorzellen spezifische Antigene auf ihrer Zelloberfläche tragen. Das Immunsystem erkannte diese als fremd und eliminierte sie.

Zahlreiche Tumorantigene, die von T-Zellen erkannt werden, sind identifiziert worden (Boon und van der Bruggen, 1996; van den Eynde und van der Bruggen, 1997; Houghton et al., 2001; Rosenberg, 2001). Einige dieser Antigene werden ausschließlich von Tumoren exprimiert und werden daher Tumor-spezifische Antigene genannt. Diese Antigene entstehen durch Mutation oder Translokation von

zellulären Genen (z.B. β-Catenin, Cdk4, Ras). Diese Mutationen können direkt an der Kanzerogenese beteiligt sein. Eine weitere Gruppe von Antigenen sind die Tumor-assoziierten Antigene, die nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von anderen Zellen im Körper exprimiert werden. Krebs/Testis-Antigene (z.B. MAGE, BAGE, GAGE) werden von einer Reihe epithelialer Tumoren, aber auch im Hoden und der Plazenta, immunologisch besonders privilegierten Geweben, exprimiert. Überexprimierte nicht-mutierte Proteine (z.B. p53, Her2/neu) können ebenso als Tumorantigene für T-Zellen dienen. Zudem werden Antigene von onkogenen Viren auf Tumorzellen präsentiert. Die Expression von Tumorantigenen kann innerhalb eines Tumors heterogen sein, und ein einzelner Patient kann Immunreaktionen gegen viele Antigene entwickeln (Lee et al., 1999; Wortzel et al., 1983).

1.2.2. Anti-Tumor-Antworten

Zwei verschiedene Modelle für die Immunantwort gegen Tumoren wurden aufgestellt: das Konzept der „Immunüberwachung“ (immunosurveillance) und das „Gefahr-Modell“ (danger model).
Burnet stellte in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts die „Immunüberwachungs-Hypothese“ auf, die besagt, dass es die Aufgabe von im Organismus zirkulierenden T-Lymphozyten sei, neoplastische Zellen zu erkennen und abzutöten (Burnet, 1970, a und b). Er implizierte damit das Vorhandensein von tumorspezifischen Antigenen auf der Oberfläche von „spontan“ entarteten Zellen.
Nach dem „Gefahr-Modell“ setzt das Immunsystem professionelle APZ als Überwacher für Gewebeschäden ein. Beim Auftreten von Gefahrsignalen stimulieren die APZ eine T-Zell-Antwort.

Tumoren haben häufig eine heterogene MHC-Klasse-I-Expression. Deletionen, Umordnungen von MHC-Genen, Punktmutationen und Defekte auf transkriptioneller Ebene führen zu selektivem Verlust eines MHC-Haplotyps, -Locus oder -Allels. Natürliche Killerzellen des angeborenen Immunsystems spielen hier eine wichtige Rolle in der Immunüberwachung von Tumoren (Smyth et al., 2001), denn sie töten MHC-Klasse-I-defiziente Zellen, ein Phänomen, das zur Hypothese des „Fehlenden Selbst“ gehört (Pardoll, 2001). Die NK-Zell-Aktivität wird durch ein Gleichgewicht von aktivierenden und inhibierenden Signalen kontrolliert. Weitere Zellen der

angeborenen Immunität, die an der Immunreaktion gegen Tumoren beteiligt sind, sind Makrophagen und Neutrophile (Bonnotte et al., 2001; Di Carlo et al., 2001; Lollini und Forni, 1999). Sie können Tumoren durch direktes Töten, durch Zerstörung der Blutgefäße und der Matrix des Tumors und durch Inhibition der Angiogenese abstoßen. Außerdem präsentieren sie Tumorantigene und können andere Immunzellen, wie ZTL, NK-Zellen oder APZ stimulieren. Andererseits können inflammatorische Zellen durch Produktion von Tumorwachstumsfaktoren und durch Stimulation der Angiogenese jedoch auch zur Tumorprogression beitragen. Makrophagen und Neutrophile werden durch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und durch chemotaktische Faktoren zum Tumor gelockt.

Die zentrale Bedeutung der T-Lymphozyten bei der Bekämpfung neoplastischer Zellen konnte in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts in *In-vitro*-Experimenten bestätigt werden (Hewitt et al., 1976; Kedar et al., 1977). T-Zellen gehören zur adaptiven Immunität und sind die wichtigsten Immunzellen zur Überwachung von transformierten Zellen (Smyth et al., 2001; Sogn, 1998).
Die Erkennung und anschließende Zerstörung von Tumorzellen durch das Immunsystem ist ein komplexer Vorgang. Dabei sind sowohl Th-Zellen als auch ZTL beteiligt. Nur die Aktivierung und das Wechselspiel zwischen beiden Zelltypen gewähren eine optimale Immunabwehr.

Tumorzellen präsentieren auf ihrer Oberfläche Fragmente zytosolischer Proteine. Diese Fragmente sind assoziiert mit einem Komplex aus transmembranen Proteinkomponenten des MHC-Klasse-I. Wird von einer Tumorzelle ein Fragment präsentiert, das sich von den normalen Komponenten der Zelle unterscheidet und somit antigene Eigenschaften besitzt, können für das präsentierte Antigen spezifische ZTL diese Zellen erkennen und vernichten. Die Erkennung erfolgt über den TZR-Komplex auf der Oberfläche des Lymphozyten (Zinkernagel et al., 1975). In den nächsten Schritten kommt es durch die Bindung zwischen der APZ und dem ZTL auf dessen Oberfläche zur Expression von IL-2-Rezeptoren. Die Internalisierung von rezeptorgebundenem IL-2 löst die Proliferation der ZTL und die Differenzierung zu Effektorzellen aus. Es kommt zu einer massiven Vermehrung von tumorspezifischen ZTL, die in der Lage sind, die Tumorzellen gezielt zu eliminieren (s. Abb. 1.2.-1).

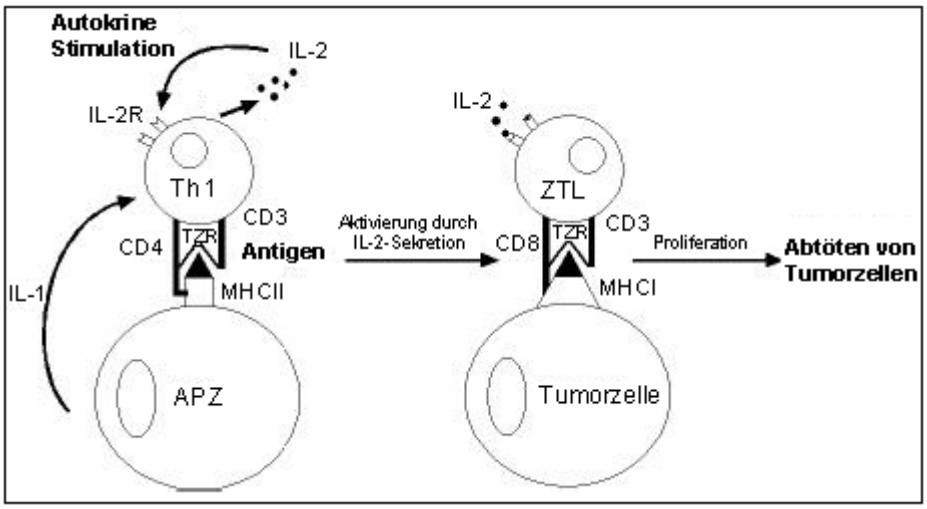


Abbildung 1.2.-1: Schematische Darstellung der Vorgänge, die zur Generierung einer T-Zell-vermittelten Anti-Tumor-Antwort führen (verändert nach Benjamini und Leskowitz, 1991)

Das IL-2 wird von Th1-Zellen freigesetzt, die durch Erkennung von Fremdantigen auf der APZ aktiviert wurden. Die Präsentation dieser Fremdantigene findet durch APZ statt, die darauf spezialisiert sind, anderen Zellen des Immunsystems Fremdantigene zu präsentieren. So nehmen sie auch Proteine von Tumorzellen auf, prozessieren sie und exponieren Fragmente dieser Tumorantigene in Verbindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. Das so präsentierte Tumor-spezifische Peptid wird von den entsprechenden Th1-Zellen über deren TZR-Komplex erkannt. Die APZ sezernieren dabei das zweite, neben der Antigenerkennung wichtige Aktivierungssignal für die Th1-Zellen, das Interleukin-1 (Cohen et al., 1987). Diese Aktivierung führt zu einer kurzzeitigen Sekretion von IL-2 durch die Th1-Zelle.

1.2.3. Evasionsmechanismen

Trotz der Antigenpräsentation von malignen Zellen und der Gegenwart von Immunzellen, die gegen diese Zellen reagieren könnten, wird das Immunsystem in vielen Fällen nicht aktiviert, sondern es „ignoriert“ den Tumor (Chen, 1998; Sogn, 1998). Faktoren, die diese immunologische Toleranz bedingen, sind z.B.:

1. Ignoranz
    - Fehlen von Gefahrensignalen (Fuchs und Matzinger, 1996)
    - Fehlen von Tumorantigenen in lymphoiden Organen (Ochsenbein et al., 1999 und 2001)
    - Wachstum in immunprivilegierten Regionen (Rocha et al., 1998)
    - Fehlen von Adhäsionsmolekülen (Ishido et al., 2000; Onrust et al., 1996; Piali et al., 1995)
    - physische Barriere durch Stroma (Ochsenbein et al., 2001; Singh et al., 1992)

2. Defekte Antigenprozessierung und -präsentation
    - Defekte in der Antigenprozessierung, z. B. TAP-, LMP-Defizienz (Cromme et al., 1994; Garrido et al., 1997, Hicklin et al., 1999; Johnsen et al., 1999; Restifo et al., 1993, Rotem-Yehudar et al., 1996; Seliger et al., 1997)
    - Mutation oder Herunterregulation von Tumorantigenen (Kim et al., 1975; Maeurer et al., 1996; Vasmel et al., 1989)
    - Mutation oder Herunterregulation von MHC-Genen (Blanchet et al., 1992; Bosshart und Jarrett, 1998; Garrido et al., 1997; Hicklin et al., 1999; Ishido et al., 2000; Natali et al., 1989, Seung et al., 1993)
    - Verlust von MHC-I (Bicknell et al., 1994)

3. Expression von immunsuppressiven Molekülen
    - Zytokine, wie IL-10 (Groux et al., 1998; Matsuda et al., 1994) und TGF-β (Gorelik und Flavell, 2001)

4. Induktion von Toleranz
    - Fehlen kostimulatorischer Moleküle (Baskar er al., 1996; Chen et al., 1993; Ishido et al., 2000; Schwartz, 1990)
    - Erzeugung regulatorischer T-Zellen (Matsui et al., 1999; Sakaguchi, 2000; Takahashi et al., 1988)

5. Apoptose-Resistenz
    - Expression anti-apoptotischer Moleküle
    - Herunterregulation/Mutation pro-apoptotischer Moleküle (Igney und Krammer, 2002)

1.3. B-Zell-Lymphome

Der Begriff „maligne Lymphome“ umfasst Morbus Hodgkin sowie die Gruppe der sogenannten Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Maligne Non-Hodgkin-Lymphome gehen von pathologisch veränderten B- und T-Zellen aus und können im Gegensatz zu Morbus Hodgkin leukämisch verlaufen. Sie stellen eine heterogene Krankheitsgruppe dar, zu der sowohl Lymphome mit niedrigem Malignitätsgrad (wie chronisch-lymphatische Leukämie, Haarzell-Leukämie, Immunozytom, Plasmozytom, Mantelzelllymphom) als auch mit einem hohen Malignitätsgrad (z.B. immunoblastisches, zentroblastisches und lymphoblastisches Lymphom) gehören.

Diese Erkrankungen wurden bis vor einigen Jahren nur mit Strahlentherapie und Zytostatika behandelt, wobei die Lymphome nicht zufrieden stellend auf diese Art von Therapie ansprachen. Immunologische Verfahren zur Krebsbekämpfung gewinnen immer mehr an Bedeutung. Voraussetzung jeder Immuntherapie oder Prophylaxe gegen Krebs ist das Vorhandensein von Tumorantigenen auf der Oberfläche entarteter Zellen sowie die Fähigkeit des Organismus, gegen diese Antigene immunologisch reagieren zu können.

Ein absolut Tumor-spezifisches Zielantigen von malignen B-Zellen ist der auf der Zelloberfläche exprimierte Immunglobulin-Idiotyp (Ig-Id) (Stevenson et al., 1990). Er entsteht durch das Rearrangement der Gensegmente der variablen Regionen von schweren und leichten Ketten. In der Literatur wird dem Ig-Id für Immuntherapien ein hoher Stellenwert beigemessen (Bogen et al., 2000; Hawkins et al., 1994; Pardoll, 1993; Wen et al., 2001). Allerdings hat sich der Ig-Id als ein schwaches Tumorantigen erwiesen.

1.3.1. Passive Immuntherapien

Ein wesentlicher therapeutischer Fortschritt des vergangenen Jahrzehnts war neben der Etablierung der Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation die Immuntherapie mit dem unkonjugierten gegen CD20 gerichteten monoklonalen Antikörper Rituximab. Erstmals seit Ende der 70er Jahre konnte eine Verbesserung des Gesamtüberlebens bei Patienten mit niedrig malignem Lymphom erzielt werden. Eine noch höhere Ansprechrate konnte mit Yttrium-90-markiertem Ibritumomab-Tiuxetan (Y-90-IT) bei CD20-positivem follikulärem Non-Hodgkin-Lymphom erreicht werden. Dabei ist der rekombinante monoklonale Antikörper mit einer radioaktiven Substanz, einem β-Strahler, verbunden, der gezielt die B-Zellen bestrahlt (Witzig et al., 2002, a und b). Neuere Studienergebnisse mit Tositumomab-^{131}I zeigen, dass es bei vorher unbehandelten Patienten mit fortgeschrittenem follikulärem Lymphom zu verlängerten klinischen und auf molekularer Ebene messbaren Remissionen kommt (Kaminski et al., 2005). Trotz des Einsatzes von modifizierten Antikörpern in der Therapie sind maligne Lymphome ebenso wie andere Krebsarten immer noch nicht heilbar.

1.3.2. Aktive Immuntherapien

In der aktiven Immuntherapie wird versucht, Tumoren durch Gentherapie und durch tumorspezifische Aktivierung des Immunsystems zu bekämpfen. Dabei ist die Induktion einer systemischen Immunantwort gegen spezifische Tumorantigene, wie z.B. gegen den Immunglobulin-Idiotyp der B-Zell-Lymphome (Miller et al., 1982), ein großes Ziel der Tumorimmuntherapie. Auch bei anderen Tumorarten wird versucht, durch Vakzinierung mit genetisch veränderten Krebszellen, die Zytokine oder kostimulatorische Moleküle exprimieren, oder durch den Transfer von Tumor-spezifischen T-Zellen, eine systemische Antwort zu generieren:

- Adoptiver Transfer von tumorspezifischen T-Zellen (Egeter et al., 2000; Rosenberg et al., 1986; Rosenberg et al., 1988; Rosenberg et al., 1994)

- Vakzinierung mit genetisch modifizierten, zytokinsezernierenden Tumorzellen (Dranoff et al., 1993; Levitsky et al., 1996; Tepper und Mule, 1994)

- Vakzinierung mit gentechnisch modifizierten Tumorzellen, die kostimulatorische oder allogene MHC-Moleküle exprimieren (Chen et al., 1992; Plautz et al., 1993)

- Vakzinierung mit Tumor-DNS oder Tumor-Peptiden (Campbell et al., 1990; Irvine et al., 1996; Syrengelas und Levy, 1999)

- Vakzinierung mit DNS-/RNS-transfizierten oder peptidbeladenen DC (Ashley et al., 1997; Heiser et al., 2001, a und b; Ribas et al., 1999)

Viele dieser Ansätze stimulieren aber keine effiziente Immunantwort.

Ein Erfolg versprechender Ansatz ist die Vakzinierung mit Triomzellen, durch die eine Redirektion von Tumorantigenen gegen APZ und damit eine Induktion tumorspezifischer T-Zellen herbeigeführt wird.

1.4. Der Triomzell-Ansatz

Der Triomzell-Ansatz ist im A20-Lymphommodell der Maus in der Arbeitsgruppe Mocikat entwickelt worden. Ziel ist die verstärkte Präsentation Tumor-abgeleiteter Antigene durch professionelle APZ. Dies geschieht durch gezielte Redirektion der Antigene gegen internalisierende Rezeptoren auf APZ.
Zur Generierung der Triomzellen wird eine Lymphom-Zelle, hier das murine A20-B-Zell-Lymphom, mit einer xenogenen Hybridomzelle, dem 2.4G2-Rattenhybridom, fusioniert. Dieses produziert einen IgG2b-Ak mit Spezifität gegen internalisierende Fc-Rezeptoren (FcR), die auf APZ exprimiert werden. Als Fusionsprodukt entsteht die BiV-Triomzelle mit den Eigenschaften der parentalen Zellen: Sie enthält potenziell alle Antigene der Tumorzelle einschließlich des Ig-Id (Isotyp Maus-IgG2a) und exprimiert den anti-FcR-Antikörper sowohl in löslicher als auch membrangebundener Form.
Ursprünglich sollte in diesem Ansatz der Idiotyp des Lymphoms als tumorspezifisches Antigen gegen APZ redirigiert werden. Die Triomzelle bildet

nämlich einen bispezifischen Antikörper, der aus IgG2a und IgG2b besteht. Wegen der präferenziellen Paarung der IgG2b-Ketten der Ratte mit den IgG2a-Ketten der Maus (Lindhofer et al., 1995) bilden die Triom-Zellen tatsächlich den bispezifischen Antikörper, der aus Kulturüberstand gereinigt werden kann.

Wie *In-vivo*-Mausversuche zeigten, erlangen syngene Mäuse nach einer Vakzinierung mit BiV-Zellen einen Langzeit-Tumorschutz (Mocikat et al., 1997) und können sogar etablierte Tumoren abstoßen (Strehl et al., 1999). Allerdings ist dieser Schutz *in vivo* nicht nur vom Idiotyp, sondern vor allem von anderen, noch unbekannten Tumor-Antigenen abhängig (Kronenberger et al., 2002; Mocikat, pers. Mitteilung).

In weiteren Experimenten wurde die Bedeutung des Idiotyps für die Induktion der Tumorimmunität geklärt. Es zeigte sich, dass auch eine Triommutante, die den Idiotyp nicht mehr besitzt, aber den APZ-Bindungsarm exprimiert, Tumorschutz zu erzeugen vermag. Da andererseits Triomzellen, die den APZ-Bindungsarm verloren haben, keine effiziente Immunität induzieren, wird angenommen, dass - neben der Polyvalenz der Immunisierung sowie der verstärkten Kreuzpräsentation von Tumorantigenen auf Grund der Xenogenität der Triomzellen - eine Redirektion der gesamten Triomzelle gegen die APZ ein entscheidender Mechanismus der Tumorprotektion ist. Auf diese Weise kommt eine Antwort gegen beliebige, auch unbekannte Tumor-assoziierte Antigene zustande; der Tumor-Idiotyp dürfte nur eine untergeordnete Rolle spielen (Kronenberger et al., 2002).

Um den Mechanismus der Tumorprotektion aufzuklären, wurden die Titer der durch Triomvakzinierung induzierten anti-A20-Antikörper gemessen. Die humorale Antwort gegen den A20-Idiotyp wie auch gegen nicht spezifizierte A20-Antigene war sehr gering bzw. in einigen Mäusen nicht detektierbar (Mocikat et al., 1997). Hingegen zeigten Depletionsexperimente, dass die Tumorprotektion sowohl von $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen abhängig ist (Mocikat et al., 1997). Durch *In-vitro*-Stimulation von Milzzellen aus immunisierten Tieren konnten sogar T-Zellen generiert werden, durch die der Tumorschutz adoptiv übertragen werden konnte (Egeter et al., 2000). Die protektiven T-Zellen zeigten eine Einschränkung in ihrem TZR-Repertoire (Kronenberger, pers. Mitteilung), was auf eine Antigen-getriebene Selektion der TZR im Verlauf der Immunantwort hindeutet.

Vakzinierung mit Triomzellen erzeugt also eine zelluläre Immunität; der humoralen Antwort kommt wahrscheinlich nur untergeordnete Bedeutung zu.

Folgender Mechanismus liegt also der Triom-Immunisierung bzw. der Therapie etablierter A20-Lymphome zugrunde: Die Antikörper der Triom-Zellen werden an APZ redirigiert. Nach Bindung an FcγR auf der APZ-Oberfläche werden die Antigene über adsorptive Endozytose von der APZ aufgenommen. Die aufgenommenen Tumor-Antigene werden prozessiert und Peptide über MHC-Moleküle dem Immunsystem präsentiert. T-Zellen werden aktiviert und sind bei einem Zusammentreffen mit Tumorzellen in der Lage, diese zu zerstören (s. Abb. 1.4.-1).

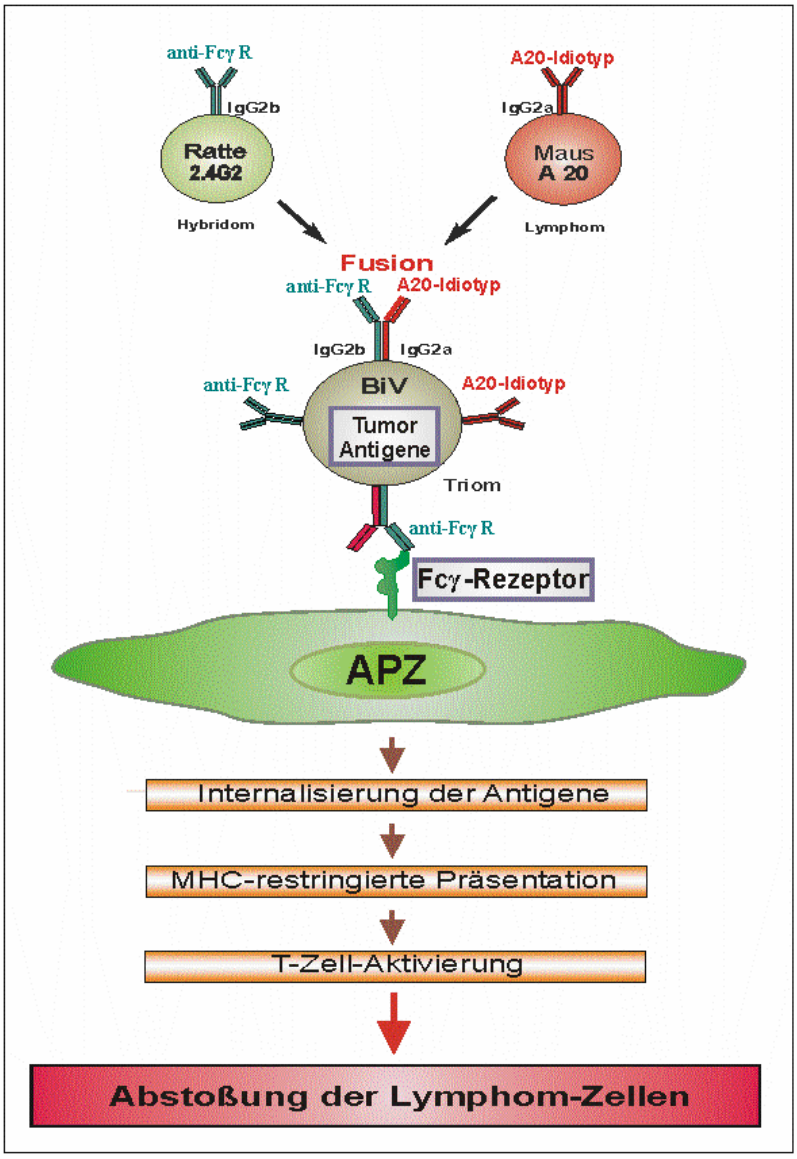


Abbildung 1.4.-1: Der Triomzell-Ansatz

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

1.5. Aufgabenstellung

Wie im vorherigen Kapitel angesprochen, ist die Vakzinierung mit Triomzellen ein überaus potenter Ansatz, um eine Immunantwort gegen maligne B-Zell-Lymphome zu induzieren. Es hatte sich gezeigt, dass der Tumorschutz weniger über den humoralen Arm der Immunabwehr als über den zellulären Arm vermittelt wird. Einige Aspekte dieser zellulären Immunantwort wurden im A20-Modell der Maus bereits untersucht.

Nach Triom-Immunisierung konnten in den Milzen der Mäuse keine A20-spezifischen, tumorprotektiven T-Zellen gefunden werden (Mocikat, persönliche Mitteilung). Wenn die Milzzellen jedoch *in vitro* mit A20-Zellen restimuliert wurden, zeigten sich T-Lymphozyten mit spezifischer Reaktivität gegen das A20-Lymphom. Dies wurde auch dann beobachtet, wenn die Splenozyten aus naiven Tieren gewonnen wurden und *in vitro* mit A20 restimuliert wurden. Allerdings bedurfte es in diesem Fall einer größeren Zahl von Stimulationsrunden. Weiterhin erwiesen sich trotz identischer *In-vitro*-Reaktivität und -Spezifität im adoptiven Transferexperiment nur diejenigen T-Lymphozyten als tumorprotektiv, welche aus immunisierten Mäusen stammten. In ihrem TZR-Repertoire zeigten tumorprotektive T-Zellen nach neun Restimulationen eine Einschränkung auf drei Banden. Auch diese Einschränkung wurde nicht beobachtet, wenn T-Zellen aus naiven Mäusen restimuliert wurden. Offensichtlich läuft also bei der *In-vivo*-Immunisierung ein Aktivierungsschritt ab, der *in vitro* nicht simuliert werden kann. Ziel dieser Arbeit ist es, Hinweise auf die Mechanismen zu erhalten, die dem differenziellen Verhalten der tumorreaktiven T-Zellen aus Immun- bzw. Naivmäusen zugrunde liegen könnten. Hierzu sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- In welcher Frequenz liegen tumorspezifische T-Zellen nach Isolierung aus der Maus sowie nach *In-vitro*-Restimulation vor? Wie verläuft die Kinetik der Entwicklung tumorspezifischer T-Zellen während der Restimulationen? Hierzu musste die IFN-γ-Einfang-Methode etabliert werden, mit deren Hilfe spezifische T-Zellen markiert, aber auch angereichert werden können.

- Sollte die mangelnde Tumorprotektivität unstimulierter T-Zellen auf deren geringer Frequenz beruhen, sollte man sie mittels IFN-γ-Einfang anreichern können. Die Frage lautete, ob man auf diese Weise auch ohne oder mit

weniger Restimulationsrunden T-Lymphozyten gewinnen kann, welche im adoptiven Transferexperiment tumorprotektiv sind.

- Entwickeln sich tumorspezifische T-Zellen nach *In-vivo*-Vakzinierung und/oder *In-vitro*-Stimulation zu einem CD4- oder CD8-Phänotyp? Gibt es hinsichtlich des Phänotyps einen Unterschied zwischen immunisierten und naiven Tieren?

- Welche Rolle spielt die Einschränkung des TZR-Repertoires für die Tumorprotektivität der T-Lymphozyten? Hierzu sollten T-Lymphozyten mit eingeschränktem TZR-Repertoire angereichert und adoptiv transferiert werden.

- Obwohl eine Idiotyp-spezifische Antwort bei der Tumorabstoßung keine Rolle spielte, konnte die Existenz Idiotyp-spezifischer T-Zellen in immunisierten Tieren bislang nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde die Frage gestellt, ob nach Vakzinierung T-Zellen beobachtet werden, die mit spezifischen Peptiden des A20-Idiotyps reagieren.

- Gibt es außer dem Immunglobulin-Idiotyp weitere Kandidaten-Antigene auf A20, welche für die Tumorabstoßung wichtig sein könnten?

- In welche Kompartimente wandern A20-Lymphomzellen sowie die Vakzinezellen nach der Injektion in die Maus?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Mäuse

Alle Mausversuche wurden im Tierstall des Hämatologikums durchgeführt und waren von der Regierung Oberbayern genehmigt worden.

2.1.1.1. BALB/c-Mäuse

Es wurde mit einem Inzuchtstamm gearbeitet; alle zu einem Stamm gehörigen Mäuse besitzen denselben Genotyp, sie sind syngen.

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

2.1.1.2. SCID-Mäuse

Die SCID-Mäuse wurden im Tierstall des Hämatologikums unter SPF-Bedingungen gezüchtet.

2.1.2. Zellen

2.1.2.1. Murine Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Literatur
A20	B-Zell-Lymphom; Ak-Isotyp: IgG2a	Kim et al., 1979 (ATCC TIB-208)
MPC11	B-Zell-Lymphom; Ak-Isotyp: IgG2b	Laskov und Scharf, 1970 (ATCC CCL-167)
CT26	Coloncarcinom	Rice et al., 2002

GFP-transduzierte A20-Zellen:

A20-Zellen wurden mit einem MSCV (murines Stammzell-Virus) abgeleiteten retroviralen Vektor transduziert, der von C. Miething, III. Med. Klinik, TU München, zur Verfügung gestellt wurde.

2.1.2.2. Hybridome und Triome

Zelllinie	Beschreibung	Literatur
2.4G2	Hybridom mit Spezifität gegen Maus FcγRII, Isotyp: Ratte-IgG2b	Unkeless, 1979 (ATCC HB-197)
BiV	Triom aus Rattenhybridom 2.4G2 und A20-Lymphom	Mocikat et al., 1997

2.1.3. Zellkulturmedien

Einfriermedium: 90% FKS, inaktiviert
10% DMSO

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

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

2.1.4. PCR-Primer

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Oligonukleotide von Herrn Linzner, GSF-Institut für Pathologie, mit einer ABI-Synthesemaschine hergestellt.
Sämtliche Primersequenzen sind in 5'→3'-Richtung angegeben.

Primer für die RNS-Umschreibung:

Oligo-dT(15) Mailhammer, GSF

Primerauswahl für die TZR-PCR:

5'-Primer:

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

Pannetier, 1993

3'-GC Primer:

CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCGG-
CTTGGGTGGAGTCACATTTCTC Labor Mocikat

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

Die Produktlängen liegen zwischen 188 und 265bp.

Primerauswahl für die quantitative RT-PCR:

	Antigen	Primer	Sequenz	Produktlänge
Pro-apoptotische Gene	Atm	5´	CAGGTATTGGACCTGTTGAA	496bp
		3´	ACCCGTAGGCTTTGGTATAG	
	Bax	5´	CCTTTTTGCTACAGGGTTTC	503bp
		3´	CATCTTCTTCCAGATGGTGA	
	p53	5´	CAAGAAGTCACAGCACATGA	590bp
		3´	CAGACTCCTCTGTAGCATGG	

Lüking

	Antigen	Primer	Sequenz	Produktlänge
Anti-apoptotische Gene	Bcl-X_L	5´	CCACCACAACTCTCTCTTCA	504bp
		3´	TGTCTCATTTATCCCAAGCAG	
	Mdm2	5´	CAGACGATAAGGGGAAAGAT	500bp
		3´	TTGTGAGCAGGTCAGCTAGT	
	Survivin	5´	AGGAGCATAGAAAGCACTCC	498bp
		3´	TCACAATCAGAACCAAGACC	
	TERT	5´	CCAGAGTGTCTTCAAAGCTG	500bp
		3´	TTGTCTGAAAGTCTGTGCTT	

Lüking

	Antigen	Primer	Sequenz	Produktlänge
Kontrollgen	β-Actin	5´	CCTAAGGCCAACCGTGAAAAG	645bp
		3´	TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA	

Li et al., 1993

2.1.5. Peptide

Außer dem Influenza- und dem OVA-TCF1-Peptid wurden die Peptide von Herrn Arnold, Genzentrum der LMU München, synthetisiert:

Peptidname	Peptidsequenz	Quelle
MO1	DYWGQGTEL-COOH	Armstrong et al., 2002
MO2	WTFGGGTKL-COOH	Lüking
MO3	DFTLEISRV-COOH	Armstrong et al., 2002
AH1	SPSYVYHQF-COOH	Rice et al., 2002
Influenza-Peptid	TYQRTRALV-COOH	Stevanović, UKT
TCF1	LDSPSTAGLKDARSPSPA-COOH	Kremmer, GSF

2.1.6. Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für diese Arbeit verwendet:

Antigen	Klon	Spezies	Isotyp	Markierung	Bezugsquelle
CD3	17A2	Ratte	IgG2b	FITC	Kremmer, GSF
CD4.2	L_3T_4	Ratte	IgG2b	FITC	Kremmer, GSF
CD8	Ly-2	Ratte	IgG2b	FITC	Kremmer, GSF
CD28	37.51	syrischer Hamster	IgG2, λ	unmarkiert, gereinigt	Pharmingen
CD49a	DX5	Ratte	IgM	PE	Pharmingen
GM-CSF	MP1-22E9	Ratte	IgG2a	unmarkiert	Pharmingen
GM-CSF	MP1-22E9	Ratte	IgG2a	biot.	Pharmingen
TCR-β	H57-597	armenischer Hamster	IgG2, λ	unmarkiert, gereinigt	Pharmingen
TCR Vβ4	KT	Ratte	IgG2b, κ	PE	Pharmingen
TCR Vβ4	KT	Ratte	IgG2b, κ	FITC	Pharmingen
TCR Vβ6	RR4-7	Ratte	IgG2b, λ	FITC	Pharmingen
	A95-1	Ratte	IgG2b, κ	FITC	Pharmingen
	A95-1	Ratte	IgG2b, κ	PE	Pharmingen

2.1.7. Puffer und Lösungen

2,5%iges Agarose-Gel,

für TZR-Analyse	Agarose, Ultra Pure	3,0g
	TAE, 1x	120ml
	Ethidiumbromid	11,0µl

DNS-Auftragspuffer, 2x	0,05% Xylencyanol
	0,05% Bromphenolblau
	70% Glycerin
	nach Biorad, München

ELISA-Ak-Puffer		10% FKS in PBS
ELISA-Carbonatpuffer	pH 9,5	0,2M Natriumcarbonat
ELISA-Substratpuffer	pH 5,0	0,1M Tris-Citrat
ELISA-Waschpuffer		0,5°/$_{oo}$ Tween in PBS
FACS-Puffer		2% FKS 1% Natriumazid 3mM Na-EDTA in PBS
H_20-DEPC		DEPC 150µl H_2Odest. ad 100ml nach Mülhardt, 1999
Lysepuffer, 10x	pH 7,4	Ammoniumchlorid 8,25g Kaliumhydrogencarbonat 1,00g Na-EDTA 37mg H_2Odest. ad 100ml nach Becton Dickinson, Heidelberg
TAE, 50x	pH 8,5	Tris Base 242,2g Eisessig 57,1ml Na-EDTA 18,61g H_20-DEPC ad 1000ml nach Mülhardt, 1999

Waschlösung für Dynal®-Kits	0,1% FKS in PBS nach Dynal, Hamburg
Waschpuffer für MACS-Kits	10% FKS 2mM Na-EDTA in PBS nach Miltenyi, Bergisch Gladbach
Zellfixierlösung	1% PFA in PBS

2.1.8. Enzyme und Chemikalien

Agarose, Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Avidin-Pox	Becton Dickinson, Heidelberg
1,2-Benzoldiamindihydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau, 2%ig	Merck, Darmstadt
1-Brom-3-Chlor-Propan	Sigma, Deisenhofen
CFSE	Molecular Probes C-1157
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
1kb-plus DNS-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Dynabeads® M-450 Sheep anti-Rat IgG	Dynal Biotech GmbH, Hamburg
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 10mg/ml	Merck, Darmstadt
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin, 87%ig	Merck, Darmstadt
Hefe-tRNS	Roche, Penzberg
IL-2, human	Amersham-Pharmacia, Freiburg und ICN, Eschwege
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen

Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Qiagen, Hilden
2-Merkaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, 1M	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
10x-Puffer B für die PCR	Promega, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
PFA	Sigma, Deisenhofen
Propidiumjodid	ICN, Eschwege
Ribonukleaseinhibitor RNasin	Promega, Mannheim
RNase-OFF™	AppliChem GmbH, Darmstadt
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure, 1M	Merck, Darmstadt
Streptavidin-PE	Dianova, Hamburg
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
Titriplex® III, Na-EDTA	Merck, Darmstadt
TRI-Reagent™	Molecular Research Center Cincinatti (USA)
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	10mM, pH 8,5
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	ICN, Eschwege
H_2O_2, 30%ig	Merck, Darmstadt
Xylencyanol, 2%ig	Merck, Darmstadt

2.1.9. Kits

BD SMART™ „PCR cDNA Synthesis Kit”	BD Bioscience, Heidelberg
Bio-Plex™ „Mouse Cytokine 18-Plex Panel”	
Bio-Plex™ „Mouse Cytokine Th1/Th2 Assay”	
Bio-Plex™ „Mouse Serum Diluent Kit”	
Bio-Plex™ „Cytokine Reagent Kit”	Bio-Rad, München
„First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)”	
„LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I”	
	Roche Diagnostics, Mannheim
„Mouse IFN-γ Secretion Assay, Cell Enrichment and Detection Kit”	
	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
„Dynabeads® Mouse pan T (Thy1.2)”	Dynal Biotech GmbH, Hamburg

2.1.10. Geräte und sonstige Materialien

Bestrahlungsanlage ^{137}Cs, HWM-D-2000	Gammacell, Ottawa (Kanada)
Brutschrank, CO_2-Auto-Zero	Heraeus, München
Einmalpipetten, 5/10/25ml	Greiner, Frickenhausen
Eismaschine AF 100AS	Scotsman, Mailand, (Italien)
ELISA-Lesegerät, Easy Reader SFplus	SLT, Altdorf (Österreich)
ELISA-Platten, Maxi-Sorp	Nunc, Wiesbaden
Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzzytometer, FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
CellQuest, FACS-Software	
Gefriertruhe/-schrank	Liebherr, Ochsenhausen
Gelapparatur DNA Sub Cell	Bio-Rad, München
Gelapparatur Geltray	Renner, Dannstadt

Geldokumentationssysteme:	
Gelprint 2000i	Biophotonics, Ann Arbor (USA)
InGenius System IG-E	Synoptics, Cambridge (UK)
Heizblock, DB-2A	Techne, Cambridge (UK)
IKA®-Schüttler MTS4	Fröbel Laborgeräte
Kühlzentrifuge 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Kulturplatten, 6-/24-/96-Loch	Greiner, Frickenhausen
Laborwaagen B6, P 120, PC 440	Mettler, Giessen
Lichtmikroskop, Auflicht	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop, Durchlicht	Zeiss, Göttingen
LightCycler® 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
Luminex Bio-Plex™ System	Bio-Rad, München
MACS Zelltrennsystem	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACSmix	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnet MPC®-1/MPC®-L	Dynal Biotech GmbH, Hamburg
Magnetrührer IKA RCT	Bachofer, Reutlingen
Magnetschiene	Dynal Biotech GmbH, Hamburg
Mehrkanalpipette, Transferpette	Brand, Wertheim
Mehrkanalpipette, Multistepper	Labsystems, Helsinki (Finnland)
Mikrowellengerät FM 3510	Moulinex, Frankreich
Milli-Q®, Reinstwasserherstellungssystem	Millipore
Neubauer-Zählkammer	neoLab, München
PCR-Thermocycler T-Gradient	Biometra®
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
pH-Meter pH391	WTW, Weilheim
Pipetten Eppendorf/Gilson	GSF-Zentrallager, Neuherberg
Pipettenspitzen Gilson/Greiner	GSF-Zentrallager, Neuherberg
Pipettierhilfe, Pipetus akku	Hirschmann, Eberstadt
Plattenzentrifuge Labofuge 6000	Heraeus, München
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttler TR 125	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Schüttler Vortex Genie 2	Bachofer, Reutlingen
Spektralphotometer Ultrospec® 1100	Amersham Bioscience, Freiburg
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Tischzentrifuge Hettich Mikroliter	Bachofer, Reutlingen

Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, München
UV-Transilluminator, 366nm	Bachofer, Reutlingen
UV-Transilluminator, 302nm/365nm	Synoptics, Cambridge (UK)
Wasserbad	Memmert, Schwabbach
Wasserbad Julabo U3	Bachofer, Reutlingen
Zentrifuge IEC 6000B	IEC, Bedfordshire (UK)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, München

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung der Zellen erforderten sterile Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen und anderen Pilzen zu vermeiden und wurden daher in einem Zellkulturlabor an speziellen Sterilarbeitsplätzen und in entsprechender Schutzkleidung durchgeführt. Darüber hinaus wurden ausschließlich gammabestrahlte Zellkulturmaterialien wie Kulturschalen, Kulturflaschen, Pipetten und Zentrifugenröhrchen der Firmen Renner, Falcon (Becton Dickinson), Greiner und Nunc verwendet.

Die Zelllinien wurden in den in Kapitel 2.1.3. beschrieben Medien kultiviert und alle 2 bis 3 Tage mit frischem Medium im Verhältnis 1:6 bis 1:10 versehen, so dass sich die Zelldichte im Bereich zwischen 10^5/ml bis 10^6/ml bewegte.

Bei adhärent wachsenden Zellen wurde alle 2 Tage das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. In 75cm^2-Flaschen wurden 2ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben, kurz geschwenkt, der Überstand abgesaugt und die Flasche 2 Min. im Brutschrank inkubiert. Sobald sich die Zellen abgelöst hatten, wurde ein Teil der Zellsuspension in eine neue, bereits mit Medium befüllte Flasche transferiert.

Eine Zellcharge wurden maximal 8 Wochen in Kultur gehalten. Dadurch sollte die Anreicherung von Mutanten möglichst verhindert werden.

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten.

2.2.2. Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurde einer frisch suspendierten Kultur ein Aliquot entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblaulösung gemischt. Der Farbstoff Trypanblau dringt nur in tote, nicht aber in lebendige Zellen ein, wodurch diese voneinander unterschieden werden können. Ein Teil der Farbstoff-Zell-Mischung wurde in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Anzahl der ungefärbten Zellen in mindestens 32 Kleinquadraten, entsprechend 2 Großquadraten, wurde bestimmt. Unter Berücksichtigung der Trypanblauverdünnung und dem Kammerfaktor 10^4 wurde die Lebendzellzahl folgendermaßen ermittelt:

Gezählte Zellzahl pro Großquadrat x 10^4 x 2 (Verdünnungsfaktor)

2.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden 3-5 x 10^6 Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, zügig in 1ml Einfriermedium (4°C) aufgenommen und in ein gekühltes Kryo-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden danach in Styroporkästen bei -80°C langsam tiefgefroren und nach 24 Std. in flüssigen Stickstoff überführt.
Die so eingefrorenen Zellen wurden bei Bedarf zügig bei 37°C aufgetaut, vorsichtig mit 10ml RPMI 1640 ohne L-Glutamin gemischt und 5 Min. bei 250g zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend in 5ml Basismedium (s. Kap. 2.1.3.) resuspendiert und in einer kleinen Kulturflasche 5-6 Std. im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und mit weiteren 5ml frischem Medium versorgt.

2.2.4. Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen

Milz und Lymphknoten wurden wie in Kap. 2.5.1. beschrieben aus den Mäusen entnommen und in verschiedene Petrischalen mit 4°C kaltem MEM-Medium überführt. Dort wurden die Organe mit dem Stempel steriler 10ml-Spritzen durch Zellsiebe gedrückt (40µm Maschendichte, Falcon). Die Milz- und Lymphknotenzellsuspensionen wurden mit Hilfe der Spritzen in ein Falcon-Röhrchen

überführt und getrennt aufgearbeitet. Zuerst wurden große Gewebestücke durch natürliche Sedimentation aus der Suspension entfernt. Danach wurden die Milzzellen getrennt von den Lymphknotenzellen weiterverarbeitet, da aus der Milzzellsuspension zuerst die Erythrozyten entfernt werden mussten. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach Zentrifugation (250g, 5 Min., 4°C) vorsichtig in 2,5ml 1x Lysepuffer resuspendiert. Nach 1 Min. wurden weitere 7,5ml PBS zugegeben und zentrifugiert. Es folgte ein Waschschritt mit PBS, der auch bei der Lymphknotenzellsuspension durchgeführt wurde. Danach wurden die Zellen in PBS resuspendiert, zusammengeführt und gezählt. Sowohl die Zellen als auch alle Reagenzien wurden bis zur Inkubation im Brutschrank bzw. bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gehalten.

2.2.5. T-Zell-Stimulationen

2.2.5.1. Langzeitstimulation

Für die Stimulationen wurden jeweils 4 x 10^6 zu stimulierende Zellen in einem Loch einer 24-Loch-Platte zusammen mit dem Stimulator (5 x 10^5 A20-Zellen, bestrahlt mit 100 Gy) in 2ml T-Zell-Medium inkubiert.
Nach 6 Tagen wurde eine weitere Stimulation durchgeführt: Die stimulierten Zellen wurden vereinigt, gezählt und in einer Dichte von 3-4 x 10^6 Zellen pro Loch wieder ausplattiert. Dazu kamen die Stimulatoren und 1 x 10^6 Milzzellen (APZ; bestrahlt mit 30 Gy). Nach 48 Std. wurde IL-2 als Wachstumsfaktor zugegeben (30 U/ml).
Jede weitere Restimulation wurde 7-10 Tage nach der vorangegangenen nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt, wobei ab der 3. Restimulationsrunde 1-2 x 10^6 T-Zellen pro Loch ausplattiert wurden.
Vor bestimmten Restimulationsrunden und am Ende der Langzeitrestimulation wurden je nach Zellzahl 2 x 10^5 bis 1 x 10^6 T-Zellen für die TZR-Repertoire-Analysen abgenommen und in einem Falcon-Röhrchen bei –80°C eingefroren.
Für die Zytokinmessungen wurde am Ende bestimmter Stimulationsrunden Kulturüberstand abgenommen, die Zellzahl/ml bestimmt und bis zur Messung bei –20°C eingefroren (s. Kap. 2.4.3.). Für die Bestimmung Idiotyp-spezifischer T-Zellen wurde die jeweils erforderliche Zellmenge nach der 6. oder 7. Restimulation abgezweigt und im Testsystem eingesetzt (s. Kap. 2.2.8.).

Die für FACS-Untersuchungen benötigten T-Zellen wurden vor der Weiterverarbeitung in FACS-Puffer aufgenommen (s. Kap. 2.4.2.).
Für *In-vivo*-Mausversuche wurden die benötigten T-Zellen einmal in PBS gewaschen und danach in dem für die entsprechende Endkonzentration notwendigen Volumen PBS aufgenommen (s. Kap. 2.5.3.).

2.2.5.2. Kurzzeitstimulation

Für die Kurzzeitstimulation wurden jeweils 4 x 10^6 Milz- und Lymphknotenzellen in einem Loch einer 24-Loch-Platte zusammen mit 5 x 10^5 A20-Zellen, bestrahlt mit 100 Gy, in 2ml T-Zell-Medium vereinigt. Diese Mischung wurde entweder 3 Std. oder 12 Std. im Brutschrank inkubiert und die stimulierten Zellen danach der IFN-γ-Anreicherung zugeführt (s. Kap. 2.2.6.2.).

2.2.6. Magnetisches Sortieren von T-Zellen

T-Zellen oder Subpopulationen von T-Zellen wurden mit Hilfe magnetischer Kügelchen separiert. Das Prinzip beruht auf der Inkubation der Zellsuspension mit Antikörpern, welche an super-paramagnetische Partikel gekoppelt sind, und anschließende Trennung der gebundenen von nicht gebundenen Zellen am Magneten. Dazu wurde das MACS-System von Miltenyi bzw. das „Dynabeads"-System von Dynal jeweils nach Angaben der Hersteller verwendet.

2.2.6.1. Isolierung von T-Zellen aus Milzen und Lymphknoten

Die Anreicherung von T-Zellen erfolgte immer direkt nach Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen (s. Kap. 2.2.4.) aus naiven oder vakzinierten Mäusen (s. Kap. 2.5.2.1.) und wurde mit einem Kit von Dynal durchgeführt.
Für die Klonierungen wurde der „*Dynabeads® Mouse pan T (Thy 1.2) Kit*" verwendet, bei dem die Partikel über einen Antikörper direkt an die T-Zellen binden. Gemäß Herstellerprotokoll wurden die an Mikrosphären gekoppelten T-Zellen über Nacht in T-Zell-Medium aufgenommen und in den Brutschrank gestellt. Am

folgenden Tag konnte man die Zellen durch heftiges Auf- und Abpipettieren von den Partikeln trennen und für weitere Versuche verwenden.

2.2.6.2. Anreicherung und Expansion von IFN-γ-positiven T-Zellen

Die Anreicherung erfolgte direkt nach Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen (s. Kap. 2.2.4.) oder im Anschluss an eine bestimmte Restimulationsrunde, meistens die 2. oder 3. (s. Kap. 2.2.5.) und wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierbei wurden die zu untersuchenden Zellen mit einem bispezifischen IFN-γ-Fänger-Ak inkubiert, der Spezifität einerseits gegen IgG2b, das auf der Zelloberfläche aller Leukozyten zu finden ist, andererseits gegen freigesetztes IFN-γ hat. Danach wurde ein PE-markierter Detektions-Ak zugegeben, der an das gebundene IFN-γ koppelt. Die Zellen konnten so markiert anschließend mit dem Durchflusszytometer vermessen werden. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Detektions-Ak erfolgte noch ein Inkubationsschritt mit einem anti-PE-MicroBead, einem Antikörper, der gegen PE gerichtet ist und außerdem einen super-paramagnetischen Partikel gebunden hat. Die IFN-γ-produzierenden Zellen brauchen nach diesem Inkubationsschritt nur noch an einem Magneten von den restlichen Zellen getrennt zu werden. Die so erhaltenen IFN-γ-positiven Zellen wurden abweichend vom Protokoll nochmals über eine Säule gegeben, um den Anteil der unspezifisch gebundenen toten Zellen zu minimieren. Ein kleiner Teil der angereicherten Zellen wurde für TZR-Analysen in TRI-Reagent™ (s. Kap. 2.3.1. und 2.3.4.1.) bei -80°C eingefroren und ein weiterer kleiner Teil im Durchflusszytometer (s. Kap. 2.4.2.) näher auf andere Oberflächenmarker untersucht.
Der Rest der Zellen wurde in 24-Loch-Platten in T-Zell-Medium weiter stimuliert. Dabei handelte es sich um eine unspezifische T-Zell-Expansion, bei der 1 x 10^5 IFN-γ-positive T-Zellen mit 1 x 10^6 Milzzellen (APZ; bestrahlt mit 30 Gy) in 2ml T-Zell-Medium mit jeweils 1µg anti-CD28- und anti-α/β-TZR-Antikörper in Kultur gebracht wurden. Am 3. Tag wurde die Zellzahl auf 2 x 10^5 Zellen/ml eingestellt und 5 U IL-2/ml dazugegeben (Becker, 2001, Hagani, 1999 und Harada, 1996). Die so expandierten Zellen wurden für *In-vivo*-Versuche (s. Kap. 2.5.3.) verwendet.

2.2.6.3. Anreicherung von Vβ4- und Vβ6-positiven T-Zellen

Auch diese Subpopulationen von T-Zellen wurden im Anschluss an eine bestimmte Restimulationsrunde, meistens die 2. oder 3. (s. Kap. 2.2.5.1.) angereichert. Für die Sortierung wurden Vβ4- und Vβ6-Primärantikörper mit Isotyp Ratte-IgG2b eingesetzt. Die Zellen wurden mit diesen beiden Antikörpern für 30 Min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll gereinigte Dynabeads® M-450 (Schaf anti-Ratte-IgG) in einer Konzentration von 4 Partikeln pro Zielzelle zugegeben. Diese Mischung wurde 20 Min. bei 4°C inkubiert und dabei vorsichtig gerollt. Die an Partikel und Antikörper gekoppelten Zellen wurden mittels eines Magneten von den restlichen Zellen getrennt. Ein kleiner Teil der angereicherten Vβ4- und Vβ6-positiven Zellen wurde über Nacht in T-Zell-Medium aufgenommen und am nächsten Tag von den an sie gekoppelten Mikrosphären durch heftiges Auf- und Abpipettieren getrennt. Die so gewonnenen angereicherten Zellen wurden für TZR-Analysen in TRI-Reagent™ (s. Kap. 2.3.1. und 2.3.4.1.) bei –80°C eingefroren und im Durchflusszytometer (s. Kap. 2.4.2.) auf Reinheit untersucht. Der Rest der Zellen wurde auch in T-Zell-Medium in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen pro 1,5ml aufgenommen, zusätzlich wurde 1µg anti-CD28-Antikörper zugegeben. Nach einer Woche in Kultur wurden diese Zellen in *In-vivo*-Versuchen (s. Kap. 2.5.3.) eingesetzt.

2.2.7. Klonierungen

Es gab verschiedene Ansätze, T-Zellen aus vakzinierten BALB/c-Mäusen (s. Kap. 2.5.2.1.) zu klonieren (s. Abb. 2.2.-1 und Tab. 2.2.-1).
Die Zellen wurden alle 3 Wochen mit bestrahlten A20-Zellen (100 Gy) und Milzzellen (30 Gy) restimuliert (s. Tab. 2.2.-1).
Bei jeder Restimulation wurde aus den Löchern jeweils 100µl verbrauchtes Medium abgenommen und durch frisches T-Zell-Medium ersetzt. Ebenso wurden am Tag 2 nach der Restimulation 3 U IL-2 pro Loch zugegeben.
In einigen Ansätzen begannen T-Zellen zu proliferieren. Diese wurden, wenn sie dicht genug gewachsen waren, weiter expandiert, indem die Zellen in Löcher einer 24-Loch-Platte überführt und dort in 2ml T-Zell-Medium aufgenommen wurden. Die

Stimulator- und APZ ebenso wie die IL-2-Menge wurden auf das neue Gesamtvolumen hochgerechnet.
Die erhaltenen Klone wurden in *In-vivo*-Versuchen (s. Kap. 2.5.3.) eingesetzt, ebenso wurde das TZR-Repertoire untersucht (s. Kap. 2.3.4.1.).

Tabelle 2.2.-1: Klonierungsansätze

Ausgangszahl der eingesetzten Zellen	**1. Restimulation** nach 3 Wochen	**2. Restimulation** nach weiteren 3 Wochen	**... bis zur 9. Restimulation**
4.000 Milz- und LK-Zellen bzw. **2.000 T-Zellen**	+ 1.000 bestr. A20-Zellen + 500 bestr. Milz-Zellen	+ 1.000 bestr. A20-Zellen + 5.000 bestr. Milz-Zellen	+ 1.000 bestr. A20-Zellen + 5.000 bestr. Milz-Zellen
40.000 Milz- und LK-Zellen bzw. **20.000 T-Zellen**	+ 10.000 bestr. A20-Zellen + 5.000 bestr. Milz-Zellen	+ 10.000 bestr. A20-Zellen + 5.000 bestr. Milz-Zellen	+ 10.000 bestr. A20-Zellen + 5.000 bestr. Milz-Zellen
400.000 Milz- und LK-Zellen bzw. **200.000 T-Zellen**	+ 100.000 bestr. A20-Zellen + 50.000 bestr. Milz-Zellen	+ 100.000 bestr. A20-Zellen + 50.000 bestr. Milz-Zellen	+ 100.000 bestr. A20-Zellen + 50.000 bestr. Milz-Zellen

2.2.8. Peptidstimulationen zum Nachweis Idiotyp-spezifischer T-Zellen

Für den Nachweis Idiotyp-spezifischer T-Zellen wurden restimulierte T-Zellen (s. Kap. 2.2.5.1.) eingesetzt, die sechs- bis sieben Mal restimuliert wurden.
Zuerst wurden Milzzellen (mit 30 Gy bestrahlt) aus BALB/c-Mäusen mit bestimmten Peptiden (s. Kap. 2.1.5.) in U-96-Loch-Platten 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die o.a. T-Zellen dazugegeben und die Platten in den Brutschrank gestellt (s. Tab. 2.2.-2). Nach 24 und 48 Std. wurde der Kulturüberstand abgenommen und mittels eines ELISA die GM-CSF-Produktion der einzelnen Ansätze überprüft (s. Kap. 2.4.1.).

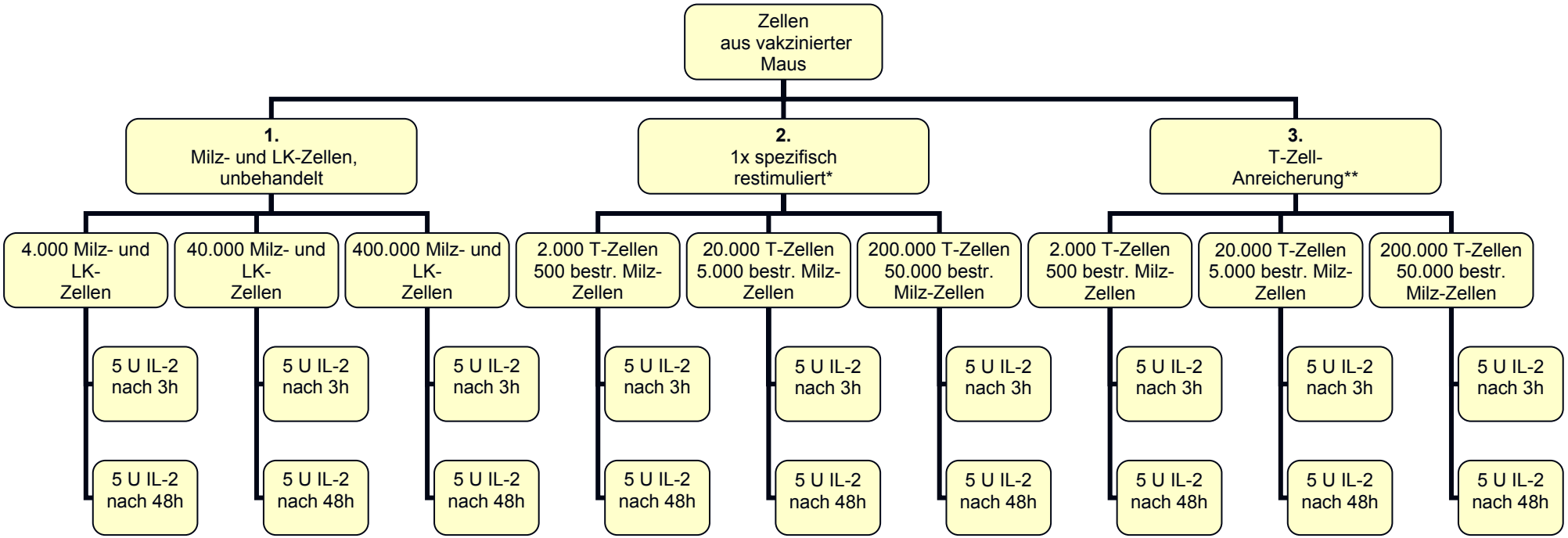


Abbildung 2.2.-1: Übersicht über die verschiedenen Klonierungsansätze

Die Zellzahlen beziehen sich auf jeweils ein Loch einer U-96-Loch-Platte und 200µl T-Zell-Medium.

* Diese Zellen wurden einmal, wie in Kap. 2.2.5.1. beschrieben, stimuliert, bevor sie für die Klonierung eingesetzt wurden.
** Für diesen Klonierungsansatz wurden T-Zellen eingesetzt, die durch Positivanreicherung gewonnen wurden (s. Kap. 2.2.6.1.).

Als Kontrollsystem wurden Milzzellen aus OVA-TCF1-immunisierten Mäusen (s. Kap. 2.5.2.2.) gewählt. TCF1 ist ein Peptid, das an OVA gekoppelt wurde (s. Kap. 2.1.5.). Diese Zellen wurden in einer Konzentration von 2 x 10^6 pro Milliliter mit 10µg TCF1-Peptid eine Woche lang stimuliert (24-Loch-Platten, 2ml pro Loch). Den so gewonnenen „T-Zellen" wurde das TCF1-Peptid mit Hilfe bestrahlter Milzzellen erneut präsentiert, so dass die T-Zellen GM-CSF produzierten und als Positivkontrolle für die Peptidpräsentation und -erkennung verwendet werden konnten.

Tabelle 2.2.-2 : Ansätze für den Nachweis Idiotyp-spezifischer T-Zellen in U-96-Lochplatten

	Test der spezifischen T-Zellen	**Kontrollsystem für Peptidpräsentation und –erkennung**
Menge der Peptid-präsentierenden Milzzellen	2,5 x 10^5	2,5 x 10^5
Konzentration der einzelnen Peptide (MO1, MO2, MO3, AH1, Influenza-Peptid)	10µg/ml	-
TCF1-Peptid	-	10µg/ml
Menge der T-Zellen	2,5 x 10^5	2,5 x 10^5

Das Gesamtvolumen pro Loch betrug 200µl. Es wurde T-Zell-Medium verwendet.

Als weitere Kontrollen wurden nicht beladene Milzzellen gegen T-Zellen, Peptid-beladene Milzzellen ohne T-Zellen und T-Zell-Medium allein auf GM-CSF-Produktion getestet. Als Negativkontrolle für die Peptiderkennung wurden die spezifischen T-Zellen gegen ein Nucleoprotein des Influenza-A-Virus, Stamm Puerto Rico 8/34, welches H2-K^d-restringiert ist, getestet.

2.3. Molekularbiologische Methoden

Proben und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei -20°C aufbewahrt.
Pipettierschritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, auf Eis durchgeführt.

2.3.1. RNS-Extraktion

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

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

Die Extraktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt: Die Zellen wurden abzentrifugiert, in TRI-Reagent™ aufgenommen und lysiert. Nach Extraktion mittels Brom-Chlor-Propan (Chloroformersatz) wurde die RNS mit Isopropanol gefällt, mit Ethanol gewaschen und schließlich in H_2O-DEPC aufgenommen. Zur vollständigen Lösung der RNS wurde sie 15 Min. bei 56°C in einem Heizblock inkubiert. Gelagert wurde die RNS bei –80°C.

2.3.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Das Absorptionsspektrum von doppel- und einzelsträngigen Nukleinsäuren hat sein Maximum bei einer Wellenlänge von 260nm. Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde deshalb mittels eines Spektralphotometers deren Extinktion (optische Dichte, OD) bei 260nm in Quarzküvetten bestimmt und wie folgt errechnet:

OD_{260} (dsDNS) x 50 x Verdünnung = $c_{(dsDNS)}$ [µg/µl]
OD_{260} (ssDNS) x 33 x Verdünnung = $c_{(ssDNS)}$ [µg/µl]
OD_{260} (RNS) x 40 x Verdünnung = $c_{(RNS)}$ [µg/µl]

Verunreinigungen in Nukleinsäurepräparationen stellen neben den Fällungsreagenzien vornehmlich zelluläre Proteine dar. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280nm liegt, ergibt sich aus dem Quotienten der Extinktionen bei λ = 260nm und λ = 280nm ein Parameter für die Reinheit der Nukleinsäurelösung; üblicherweise liegt der OD_{260}/OD_{280}-Quotient für DNS-Päparationen bei 1,8 und für RNS-Präparationen bei 1,6.

2.3.3. Reverse Transkription der RNS in cDNS

Die Umschreibung der RNS in cDNS erfolgte mit dem *„First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)*“ der Firma Roche. Für die reverse Transkription wurde eine Mischung hergestellt, die pro Ansatz (20µl) folgende Reagenzienmengen enthielt (Tab. 2.3.-1):

Tabelle 2.3.-1: Zusammensetzung der Reagenzien für die reverse Transkription

	Volumen	Endkonzentration
10x PCR-Puffer (100mM Tris, 500mM KCl)	2,0µl	1x
25mM $MgCl_2$	4,0µl	5mM
Desoxyribonukleotid-Mix (jeweils 10mM)	2,0µl	1mM
Oligo dT	2,0µl	1,6µg
RNase Inhibitor	1,0µl	50 U
AMV Reverse Transkriptase	0,8µl	≥ 20 U
RNS-Probe	3,0µg	
Wasser (RNase-frei)	ad 20µl	

Der Ansatz wurde 10 Min. bei 25°C gehalten, danach 60 Min. bei 42°C inkubiert und zum Schluß für 5 Min. auf 99°C erhitzt, bevor der Ansatz auf Eis gestellt oder bei –20°C eingefroren wurde.

Des Weiteren wurde für die Umschreibung von RNS in cDNS der „*BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit*“ der Firma BD Bioscience eingesetzt, wenn die Gesamt-RNS-Menge so gering (unter 3µg) war, dass die oben beschriebene reverse Transkription nicht erfolgversprechend gewesen wäre. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll.

2.3.4. RT-PCR

2.3.4.1. Qualitative RT-PCR

Für sämtliche Amplifikationen im 20µl-Ansatz wurden verwendet: 10x Puffer, dNTPs (10mM), Taq-Polymerase (5 U/µl), PCR-H_2O, $MgCl_2$ (25mM) und entsprechende 5'-/3'-Primer und cDNS. Die eingesetzen Mengen ergeben sich jeweils aus Tabelle 2.3.-2 und die PCR-Bedingungen aus Tabelle 2.3.-3.
Der 10x Puffer beinhaltet: 500mM KCl, 100mM TrisHCl (pH 9.0), 15mM $MgCl_2$ und 1% Triton X-100.

Tabelle 2.3.-2: PCR-Komponenten

	cDNS	10x-Puffer	dNTPs	Taq-Pol.	$MgCl_2$	5'-Primer	3'-Primer	PCR-H_2O
TZR-Expr.	1,0µl	2,0µl	0,4µl	0,2µl	0,2µl	1,2µl	1,4µl	6,4µl
Neg.-Ko.	-	2,0µl	0,4µl	0,2µl	0,2µl	1,2µl	1,4µl	7,4µl

TZR-Expr.: PCR mit cDNS aus T-Zell-Stimulationen
Neg.-Ko.: PCR ohne cDNS als Negativ-Kontrolle für die PCR-Komponenten

Tabelle 2.3.-3: PCR-Bedingungen

Anfangsdenaturierung	2 Min.	94°C	
Amplifikation:			
Denaturierung	30 Sek.	94°C	
Primeranlagerung	45 Sek.	60°C	
Elongation	60 Sek.	72°C	→ 40 Zyklen
Termination	10 Min.	72°C	

2.3.4.2. Quantitative RT-PCR

Die quantitative „real-time-PCR" mit Hilfe des LightCycler™ -Systems ist eine hoch sensitive Methode, um die Ausgangsmenge an DNS einer Probe quantitativ zu bestimmen.
Das Prinzip der Methode basiert darauf, dass die Zyklenzahl, nach der die PCR-Reaktion in den linear-logarithmischen Bereich eintritt (d.h. näherungsweise Verdopplung der Amplifikatmenge nach jedem Zyklus), abhängig ist von der

eingesetzten DNS-Ausgangsmenge. Je größer die Ausgangsmenge, desto früher geht die PCR-Reaktion in den logarithmisch-linearen Bereich über.

Die Detektion von Signalen (PCR-Produktmenge) basiert auf Messung der Fluoreszenz des in dsDNS eingebauten Farbstoffes SYBR-Green am Ende der Elongationsphase (siehe Abb. 2.3.-1).

SYBR-Green bindet nur an dsDNS-Moleküle und zeigt nur dann eine starke Fluoreszenzintensität (Faktor 100 im Vergleich zu ungebundenem SYBR-Green). Die Menge an eingebautem SYBR-Green ist proportional zur Amplifikatmenge.

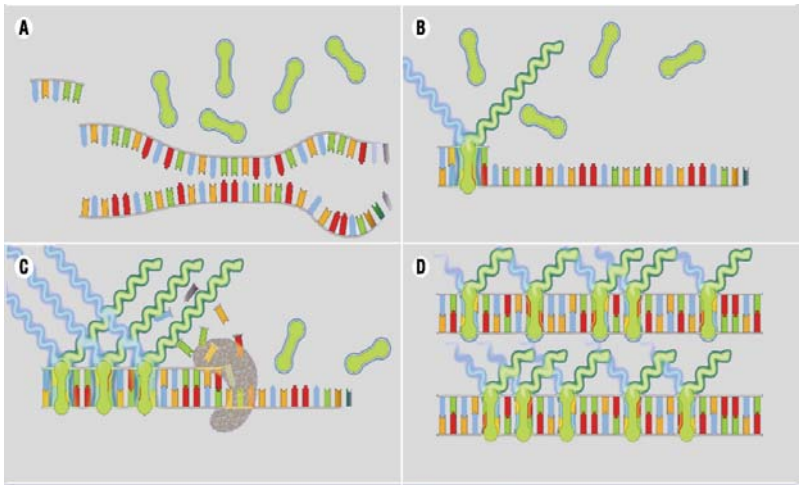


Abbildung 2.3.-1: Messung der PCR-Produktmenge über die Fluoreszenzintensität von SYBR-Green im LightCycler (Abb. modifiziert aus Anleitung des Herstellers)

Die cDNS wird denaturiert (A) und der Farbstoff SYBR-Green während der DNS-Synthese in den Doppelstrang eingebaut, wodurch er nach Anregung mit blauem Licht fluoresziert (B, C). Die Fluoreszenz der Probe wird am Ende der Elongationsphase gemessen. Sie ist proportional zur PCR-Produktmenge (D).

Tabelle 2.3.-4: Komponenten der quantitativen RT-PCR, 20µl-Ansatz

	cDNS	SYBR Green MM	$MgCl_2$	5'-Primer	3'-Primer	PCR-H_2O
Antigen-expression	2,0µl	2,0µl	3,2µl	1,5µl	1,5µl	9,8µl
Neg.-Ko.	-	2,0µl	3,2µl	1,5µl	1,5µl	11,8µl

cDNS: aus Milzzellen, BiV-Zellen, 2.4G2-Zellen oder A20-Zellen
MM: Mastermix (enthält: DNS SYBR-Green 10x konz., FastStart Taq, Puffer, dNTP, SYBR-Green I Fluoreszenzfarbstoff, 10mM $MgCl_2$)
Neg.-Ko.: PCR ohne cDNS als Negativ-Kontrolle für die PCR-Komponenten
Endkonzentration $MgCl_2$: 5mM
Endkonzentration 5´- bzw. 3´-Primer: 15pmol

Tabelle 2.3.-5: Bedingungen für die quantitative RT-PCR

Anfangsdenaturierung	10 Min.	95°C	
Amplifikation:			
Denaturierung		95°C	
Primeranlagerung	10 Sek.	58°C	
Elongation	25 Sek.	72°C	→ 35 Zyklen
Termination	30 Sek.	40°C	

Um die Ausgangsmengen an DNS in den verschiedenen Proben relativ zueinander zu vergleichen, wird ein bestimmter Fluoreszenzwert festgelegt (mit Hilfe der so genannten Kreuzungslinie, s. Abb. 2.3.-2). Die Kreuzungslinie sollte bei allen Experimenten auf der gleichen Höhe liegen, um die Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten. Sie wurde bei allen Versuchen auf den Fluoreszenzwert 1,000 gelegt. Die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz der Amplifikate diesen Wert erreicht, entspricht dem Kreuzungspunkt (CP). Je höher die Zyklenzahl, desto niedriger die Menge an Ausgangs-DNS.

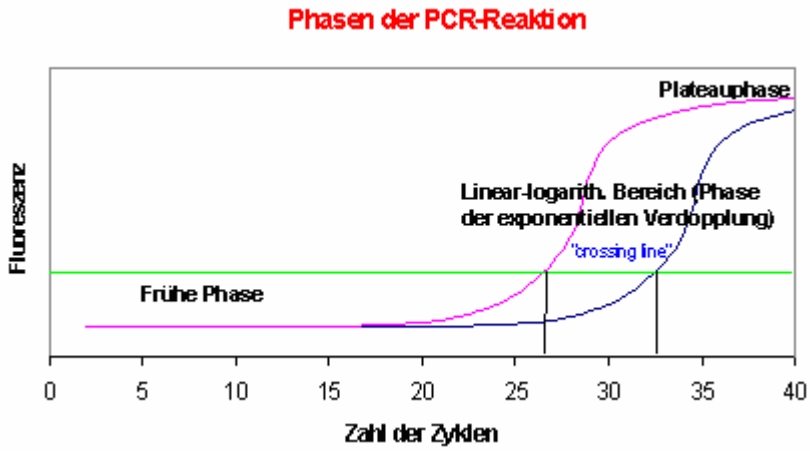


Abbildung 2.3.-2 : Die drei Phasen der PCR-Reaktion (halblogarithmische Darstellung)

1. Frühe Phase:
Das Hintergrundsignal (unspezifische Fluoreszenz) übersteigt das spezifische Signal der PCR-Produkte.
2. Exponentielle Verdopplungsphase:
Amplifikatmenge zum Zeitpunkt t: $N = N_0 \times E^n$
(N_0: Anfangsmenge; E: Effizienz; n: Anzahl der Zyklen)
Die Effizienz sollte im Idealfall E=2 betragen
(= Verdopplung der Amplifikatmenge nach jedem Zyklus)
3. Plateauphase:
Die Amplifikatmenge bleibt konstant, da nun ein Überschuss an Amplifikaten vorliegt und Oligonukleotide sowie Taq-Polymerase nahezu verbraucht sind.

Die Auswertung der Antigen-Expressionsanalysen erfolgte durch relative Quantifizierung. Die Expression der Abstoßungsantigene wurde auf Normalgewebe (Milz) und auf die Expression eines Haushaltsgens (β-Actin) in der jeweiligen Zelllinie normiert:

Berechnungsformel:	$2^{(CP(1)-CP(3))-(CP(2)-CP(4))}$

CP(1), erhalten mit β-Actin und cDNS der jeweiligen Zelllinie (A20, BiV, 2.4G2)
CP(2), erhalten mit β-Actin und cDNS der Milzzellen
CP(3), erhalten mit untersuchtem Abstoßungsantigen und cDNS der jeweiligen Zelllinie
CP(4), erhalten mit untersuchtem Abstoßungsantigen und cDNS der Milzzellen

2.3.5. Gelelektrophorese

Um die PCR-Produkte zu analysieren, wurden jeweils 10µl eines PCR-Ansatzes zusammen mit 2µl DNS-Auftragspuffer in die Tasche eines 2,5%igen Agarose-Gels (120ml 1x TAE, 3g Agarose, 10µl Ethidiumbromid) gefüllt. Als Größenmarker wurde eine 1kb-plus Leiter verwendet, von der 1,0µl pro Geltasche zugegeben wurden zusammen mit 10µl PCR-H_2O und 2µl Auftragspuffer. Nach einer Laufzeit von 35-40 Min. in einer Horizontalgelapparatur in 1x TAE bei einer Spannung von 130V wurden die Produktbanden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.3.6. DNS-Extraktion aus Agarosegelen

Für die Isolierung der DNS-Fragmente aus dem Gel zwecks Sequenzierung wurde der „*QIAquick® Gel Extraction Kit*“ der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mit 3 Volumenteilen des Puffers QG 10 Min. bei 50°C inkubiert, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurde 1 Volumenteil Isopropanol zugegeben, gemischt und die Probe auf eine QIAquick-Säule gegeben. Danach wurde 1 Min. bei 13000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 750µl Puffer PE gewaschen (1 Min., 13000rpm). Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule durch einminütiges Zentrifugieren bei 13000rpm getrocknet. Das DNS-Fragment wurde mit 30µl DNase-freiem Wasser eluiert, indem die Säule

1 Min. mit dem Wasser inkubiert und anschließend 1 Min. bei 13000rpm zentrifugiert wurde.

2.3.7. Analyse des TZR-Vβ-Repertoires

Das TZR-Vβ-Repertoire wurde mittels RT-PCR und Sequenzierung untersucht. Die 5'-Primer repräsentieren die 18 Familien der variablen (V-) Region der TZR-β-Kette der BALB/c-Maus. Die Familien Vβ3, Vβ5 und Vβ8 sind in Unterfamilien aufgeteilt. Es gibt folgende Vβ-Familien:

Vβ-Familien	1	2	3.1	4	5.1	5.2	6	7	8.1	8.2	8.3
	9	10	11	12	13	14	15	16	18	20	–

Die 21 5'-Primer für die PCR wurden in der Primerauswahl (s. Kap. 2.1.4.) so ausgewählt, dass sie jeweils nur in einer der 21 Vβ-Familien/Unterfamilien spezifisch binden. Der spezifische Primer erhielt dabei den gleichen Namen wie die Familie. Weiterhin wurde ein 3'-Primer ausgewählt, der im 5'-Bereich der konstanten Region der β-Kette (C-Region) bindet. In jeder PCR gab es 22 Parallelansätze; in jedem wurde ein anderer 5'-Primer mit dem 3'-Primer eingesetzt. Die so erhaltenen Amplifikate haben eine Länge von 188 bis 265bp. Ein Parallelansatz diente als Negativkontrolle und enthielt keine cDNS.
Durch die Primerwahl wurde erreicht, dass in der PCR DNS-Fragmente der rearrangierten Vβ-Ketten amplifiziert wurden, innerhalb derer sich ein Teil der V-, die sich daran anschließenden D- und J-Regionen sowie der 5'-Bereich der C-Region befanden (Abb. 2.3.-3).

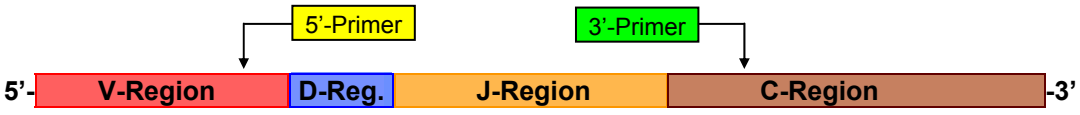


Abbildung 2.3.-3: Primerbindungsstellen innerhalb der rearrangierten Vβ-Kette des TZR

Für die RT-PCR der TZR-Repertoires wurden 21 5'-Primer und ein 3'-Primer ausgesucht. Die 5'-Primer sind jeweils zu einem bestimmten Bereich der V-Region komplementär, der 3'-Primer bindet im 5'-Bereich der C-Region. Der dazwischenliegende DNS-Bereich enthält neben der D- auch die J-Region (aus K. Kronenberger, 2002).

Für die J-Region kodieren 12 Gensegmente in zwei Clustern:

Jβ-Familien	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.7

Die Nomenklatur wurde für Jβ1 aus Gascoigne et al., 1984 und für Jβ2 aus Malissen et al., 1984 entnommen.

Durch Sequenzierung der gewonnenen Amplifikate kann auch die Basenabfolge der beteiligten D- und J-Regionen ermittelt werden, die beide ebenfalls entscheidend zur Variabilität des TZR beitragen. Mischsequenzen innerhalb einer Subgruppe treten häufig auf und können durch Sequenzierung sichtbar gemacht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden außer Haus an einem ABI-Sequenziergerät der Firma Sequiserve, Vaterstetten, durchgeführt.

2.4. Immunbiologische Methoden

Die Versuche wurden alle unsteril durchgeführt.

2.4.1. ELISA zur Bestimmung der GM-CSF-Produktion

Im ELISA wird ein bestimmtes Epitop auf einem Antigen (Ag) von einem spezifischen Antikörper (Ak) erkannt. Im „Sandwich"-ELISA wird eine Mikrotiterplatte mit dem Ak beschichtet. Sind Ag im Untersuchungsmaterial (hier Kulturüberstand) vorhanden, binden sie an den Ak. Die Menge des gebundenen Ag aus der Probe wird durch die Zugabe eines markierten Zweitantikörpers, der ebenfalls an das Ag bindet, ermittelt. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Ansätze bei Raumtemperatur durchgeführt.
Eine ELISA-Platte wurde mit dem entsprechenden unmarkierten Fänger-Ak in einer Konzentration von 5µg/ml in 50µl Carbonat-Puffer beschichtet und entweder über Nacht bei 4°C oder 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit Waschpuffer zweimal gewaschen, daraufhin wurden alle Löcher mit je 400µl einer Ak-Puffer-Lösung abgedeckt und 2 Std. geschüttelt. Nach einem Waschschritt mit Waschpuffer

wurden 50µl Kulturüberstand (KÜ) zugegeben und 30 Min. geschüttelt. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der POX-markierte Detektions-Ak in einer 1:1000-Verdünnung in 50µl Ak-Puffer zugegeben und 30 Min. geschüttelt. Wenn der Detektions-Ak biotinyliert war, musste zusätzlich 30 Min. mit Avidin-Pox 1:1000 inkubiert werden.

Währenddessen wurde 1 Tablette 1,2-Benzoldiamindihydrochlorid (10mg) in 15ml Substratpuffer im Dunkeln gelöst, nach Auflösen der Tablette wurde 7µl 30%ige H_2O_2-Lösung zugegeben. Von dieser so genannten Substratlösung wurden nach mindestens siebenmaligem Waschen der Platten und anschließendem Trockenklatschen 100µl pro Loch eingesetzt. Die Platten wurden 10 bis 20 Min. geschüttelt, bis eine konstante Farbentwicklung zu erkennen war. Danach wurde die Extinktion im ELISA-Lesegerät bei 405nm gemessen.
In der Negativkontrolle wurde die Hintergrundextinktion bestimmt, indem Medium bzw. FKS/PBS anstatt des KÜ verwendet wurde. Als Positivkontrolle wurde der KÜ von der GM-CSF-sezernierenden Zelllinie 1F5 eingesetzt.

2.4.2. Durchflusszytometrie (FACS)

Im FACS kann man Zellen auf unterschiedliche intra- und extrazellulär vorhandene Strukturen fluoreszenzdurchflusszytometrisch untersuchen. Dabei werden die zu untersuchenden Molekülstrukturen von Antikörpern, an die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, gebunden. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionsspektren können diese verschiedenen Farbstoffe später im FACS voneinander getrennt werden.
Die markierten Zellen werden durch eine Kapillare in das Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) eingesogen und dort von einem Argonlaser mit der Anregungswellenlänge von λ = 488nm bestrahlt. Die Wellenlänge des von den angeregten Elektronen emittierten Lichts ist dann jeweils von dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wird von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an die Detektoren weitergeleitet. Über die Software CellQuest werden diese Informationen sichtbar und auswertbar gemacht. So können Aussagen über die Größe (Vorwärtsstreuung, FSC), die Granulation (Seitwärtsstreuung, SSC) und die Fluoreszenz (FL) der Zellen getroffen werden.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Expression von Zelloberflächenproteinen bestimmt. Dazu wurden 2-5 x 10^5 Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 1200rpm sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 50µl FACS-Puffer resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden die fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper gegeben, deren optimale Konzentration in Vorversuchen ermittelt wurde. Die Inkubationzeit lag, abhängig von der Fluoreszenzmarkierung, zwischen 20 und 30 Min. und wurde bei 4°C im Dunkeln durchgeführt. Nicht-gebundene Antikörper wurden durch einmalige Zugabe von 1ml FACS-Puffer, anschließendem Zentrifugieren bei 1600rpm und Dekantieren des Überstandes entfernt. Falls der Detektionsantikörper Biotin-markiert war, musste ein weiterer Inkubationsschritt mit Streptavidin-PE 1:1000 eingefügt werden.
Wenn die Zellen direkt vermessen werden sollten, wurde nach dem Waschen das Zellsediment in 250µl FACS-Puffer resuspendiert und Propidiumjodid (PI; 100µg/ml) im Verhältnis 1:100 zugegeben, um die toten von den lebenden Zellen bei der FACS-Messung abgrenzen zu können.
Das Propidium-Kation ist nicht in der Lage, die intakte Plasmamembran von lebenden Zellen zu überwinden und reichert sich daher nur in Zellen an, welche die Integrität der Plasmamembran bereits verloren haben. Das Propidium-Kation interkaliert in der DNS und ist über sein spezifisches Emissionsspektrum detektierbar.
Die Negativkontrollen bestanden bei direkt markierten Antikörpern aus einem Antikörper mit gleichem Isotyp, jedoch irrelevanter Spezifität. Bei biotinylierten Antikörpern wurde die Negativkontrolle nur mit Streptavidin-PE inkubiert.
Alternativ wurden die Zellen mit 1%iger PFA-Lösung fixiert und dunkel bei 4°C gelagert. Damit war es möglich, die Proben auch noch nach mehreren Tagen zu messen.

2.4.3. Luminex-System zur Bestimmung von Zytokinen

Das Luminex-System ermöglicht eine simultane Messung (Multiplex-Messung) mehrerer Zytokine im Serum oder Überstand einer Zellsuspension. Das System benutzt Polystyren-Kügelchen.
Die Kügelchen können in verschiedenen Verhältnissen mit zwei Fluorophoren beladen werden. Es stehen jeweils 10 Farbabstufungen pro Fluorophor zur

Verfügung, so dass es 10^2 mögliche Farbkodierungen für die Kügelchen gibt, theoretisch also 100 verschiedene Zytokine gleichzeitig in dem Kulturüberstand oder Serum gemessen werden können.
Im ersten Schritt der Reaktion bindet ein monoklonaler Antikörper, der an ein 5,5µm großes Kügelchen mit bestimmter Eigenfluoreszenz kovalent gebunden ist, an ein bestimmtes Zytokin. In einem weiteren Schritt bindet ein Biotin-markierter Antikörper an ein anderes Epitop des Zytokins. Diese Bindung wird wiederum über Phycoerythrin-(PE)-gekoppeltes Streptavidin quantifiziert. Somit kann die Photozelle im Gerät über die erste Fluoreszenz des Kügelchens die Art des Zytokins (Qualität), und über die Intensität der zweiten Fluoreszenz (PE) die Menge (Quantität) des vorhandenen Zytokins ermitteln.
Im Reagenziensatz enthaltene Standardkonzentrationen der Zytokine ermöglichen eine Quantifizierung jedes Analyten über seine Standardkurve.

In dieser Arbeit wurden Kulturüberstände aus verschiedenen Restimulationen (s. Kap. 2.2.5.1.) und Seren von vakzinierten Mäusen (s. Kap. 2.5.2.1.) und unbehandelten BALB/c-Mäusen untersucht. Für die Serumgewinnung wurde Herzblut aus Tieren entnommen und anschließend zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und wie die Kulturüberstände bei –20°C bis zur Zytokinanalyse aufbewahrt.
Es wurden zwei verschiedene Kits der Firma Bio-Rad benutzt, mit denen unterschiedliche Zytokine detektiert und quantifiziert werden konnten (Tab. 2.4.-1). Die Vorbereitung und Messung der Tests folgte dem Herstellerprotokoll.
Als Negativkontrolle wurden T-Zell-Medium und die Probenverdünnungslösung ("*Sample Diluent*" der Fa. Bio-Rad) verwendet. Bei Vermessung der Mausseren wurden diese noch 1:1 bzw. 1:3 mit Serumverdünnungslösung ("*Serum Diluent*" der Fa. Bio-Rad) versetzt. Als Negativkontrolle diente hier die Serum-verdünnungslösung. Die Proben wurden zusammen mit den Standards und der entsprechenden Verdünnungsreihe auf derselben 96-Loch-Analysenplatte der Fa. Bio-Rad vermessen. Der Kalibrierungsbereich für alle Zytokine lag zwischen 32.000 und 1,95pg/ml. Die Konzentrationen der Analyten wurden automatisch von der Bio-Plex-Software berechnet.

Tabelle 2.4.-1: Verwendete Kits und gemessene Zytokine

Kits	Gemessene Zytokine
Bio-Plex™ Mouse Cytokine 18-Plex Panel	IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, KC, MIP-1α, RANTES, TNF-α
Bio-Plex™ Mouse Cytokine Th1/Th2 Assay	IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12(p70), GM-CSF, IFN-γ, TNF-α

2.5. Tierexperimentelle Methoden

2.5.1. Präparation von Milz und Lymphknoten

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Asphyxie in CO_2-Atmosphäre. Anschließend wurden die Mäuse in 80%igen Ethanol getaucht und in einer Sterilbank auf einem Korkblock fixiert. Die Milz und die inguinalen, axilliären und mesenterialen Lymphknoten wurden mit sterilem Präparierbesteck entnommen. Die weitere Verarbeitung der Milzen und Lymphknoten ist in Kapitel 2.2.4. beschrieben.

2.5.2. Immunisierung von BALB/c-Mäusen

2.5.2.1. Vakzinierung mit BiV-Zellen

Die Zellen wurden vor Applikation einmal mit PBS gewaschen. Für die Triomzellvakzinierung einer Maus wurden jeweils 10^5 BiV-Zellen i.p. gespritzt und zwar 28 und 7 Tage vor der Organentnahme (s. Abb. 2.5.-1).

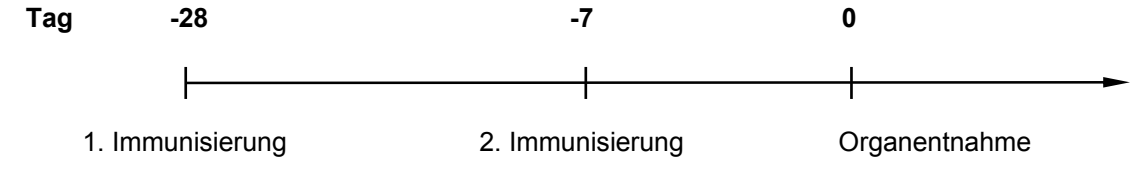


Abbildung 2.5.-1: Applikationsschema bei der Präimmunisierung

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

2.5.2.2. Immunisierung mit OVA-TCF1

Für die Immunisierung mit OVA-TCF1-Peptid wurden für jeden Versuch 3 Mäuse 14 Tage vor Untersuchung der A20-restimulierten T-Zellen auf Idiotyp-spezifische T-Zellen mit 50µl OVA-TCF1-Peptid (2µg/ml) und 10µl CpG in PBS i.p. und s.c. im Verhältnis 1:1 gespritzt (s. Abb. 2.5.-2).
Nach 7 Tagen wurden die Milzen der 3 Mäuse entnommen und, wie in Kap. 2.2.4. beschrieben, aufgearbeitet. Dabei wurden die Milzzellen der 3 Mäuse nicht vereinigt, sondern getrennt behandelt. Die Milzzellen wurden anschließend 7 Tage mit TCF1-Peptid *in vitro* restimuliert (s. Kap. 2.2.8.).

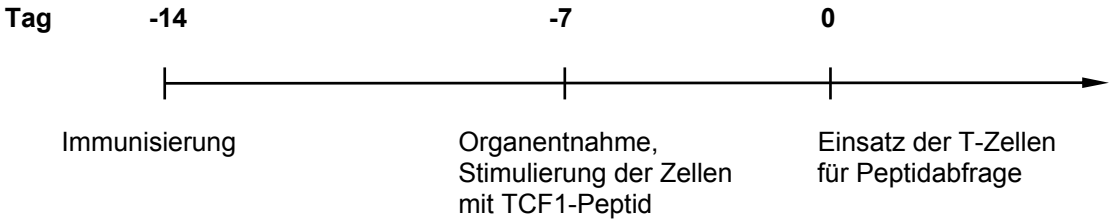


Abbildung 2.5.-2: Applikationsschema bei der Immunisierung mit OVA-TCF1-Peptid

Nach Immunisierung am Tag -14 erfolgt die Milzentnahme am Tag -7. Diese Milzzellen werden eine Woche mit TCF1-Peptid *in vitro* stimuliert, bevor sie als Positivkontrolle bei der Idiotyp-spezifischen Peptidabfrage von A20-restimulierten T-Zellen eingesetzt werden.

2.5.3. Therapieversuche

In den Therapieansätzen wurden unbehandelten, naiven BALB/c-Mäusen 8 x 10^5 A20-Tumorzellen (Letaldosis) zusammen mit 5 x 10^5 *in vitro* restimulierten T-Zellen verabreicht. Die A20-restimulierten T-Zellen wurden bei einigen Versuchen vor Applikation wie in Kap. 2.2.6.2. oder 2.2.6.3. angereichert. Die Zellmischungen wurden hauptsächlich i.p., teilweise aber auch i.v., gespritzt.

2.5.4. Morphologische Untersuchungen

Um zu klären, wohin die Vakzinezellen und die Tumorzellen nach Gabe in die Maus wandern, wurden beide Zelllinien so bearbeitet, dass sie in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden konnten.

2.5.4.1. CFSE-markierte BiV-Zellen

Um die BiV-Zellen im Mikroskop von den anderen Lymphknoten- und Milzzellen der BALB/c-Mäuse zu unterscheiden, wurden sie vor der Injektion in Mäuse mit dem nicht-toxischen Fluorochrom CFSE markiert, welches nach Eindringen in die Zelle durch nicht-spezifische Esterasen gespalten wird und danach im Zytoplasma der Zellen für einige Tage verbleibt. Proliferiert die Zelle, so wird die Menge an CFSE bei jeder Teilung auf die Tochterzellen verteilt. Dieser Verlust an Fluoreszenzintensität kann im FACS detektiert, ebenso unter einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

Zur Markierung wurden 1 x 10^6 BiV-Zellen mit 6,25mM CFSE in einem Milliliter 1%igem FKS-RPMI-Medium bei 37°C 10 Min. inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 200µl FKS gestoppt und die Zellen anschließend mindestens 2x mit je 20ml Medium gewaschen (1700rpm, 5 Min.). Um die CFSE-markierten BiV-Zellen in die Maus zu spritzen, wurde die pro Maus gewünschte Zellzahl in 300µl PBS aufgenommen und durch ein Zellsieb (40µm Maschendichte, Falcon) gegeben, um Zellklumpen aufzulösen.
Die CFSE-markierten BiV-Zellen wurden in verschiedenen Mengen und Applikationsrouten (i.p. und s.c.) verabreicht. Danach wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (Tabelle 2.5.-1) aus diesen Mäusen verschiedene Lymphknoten (LK) entnommen (s. Kap. 2.5.1.). Bei s.c.-Gabe der CFSE-markierten BiV-Zellen wurden nur die axillären und inguinalen Lymphknoten auf der ipsilateralen Seite für die weiteren Versuche verwendet.

Tabelle 2.5.-1: Applikationsrouten, Zellzahlen, Entnahmezeitpunkte und untersuchte Organe bei Mausversuchen mit CFSE-markierten BiV-Zellen

Applikationsroute	i.p.	s.c.
applizierte Zellzahl	4 x 10^6 Zellen	2 x 10^6 Zellen
Zeitpunkt der Entnahme		
1,5h	+	+
5h	+	+
24h	+	+
48h	+	-
entnommene Organe		
axilläre LK	-	+
inguinale LK	-	+
mesenteriale LK	+	-

Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in einer Konzentration von 1 x 10^5 Zellen pro Loch in einer Flachboden-96-Loch-Platte ausgesät. Nachdem die Zellen sich abgesetzt hatten, wurden sie unter dem Fluoreszenzmikroskop (eGFP-Filter) ausgewertet, indem die fluoreszierenden Zellen gezählt wurden. Anschließend kamen die Platten für 14 Tage in den Brutschrank. Während dieser Zeit wurden die Platten unter dem Fluoreszenzmikroskop alle 2-3 Tage kontrolliert und die fluoreszierenden Zellhäufchen quantifiziert.

2.5.4.2. GFP-transduzierte A20-Zellen

Die A20-Zellen konnten zwar mit CFSE markiert werden, allerdings verminderte sich die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen aufgrund der schnellen Teilungsrate der Tumorzellen rapide, so dass ein anderes System für die Quantifizierung der A20-Zellen in Milz und Lymphknoten gefunden werden musste.

Für die weiteren Untersuchungen wurden die A20-Zellen stabil mit einem eGFP-Vektor transfiziert (s. Kap. 2.1.2.1.). Um eine möglichst reine GFP-A20-Population zu bekommen, wurden die Zellen nach der Transfektion mit einem Zellsortiergerät (MoFlo) steril sortiert (Ellwart, GSF).

Da GFP ein starkes Immunogen ist, werden die GFP-transduzierten A20-Zellen in BALB/c-Mäusen schnell eliminiert, so dass bei den weiteren Mausversuchen auf SCID-Mäuse zurückgegriffen wurde.

Auch die GFP-transduzierten A20-Zellen wurden in verschiedenen Mengen und Applikationsrouten verabreicht. Auch hier wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (s. Tab. 2.5.-2) verschiedene Lymphknoten (LK) und die Milz aus den Mäusen entnommen (s. Kap. 2.5.1.) und entsprechend Kapitel 2.2.4. aufgearbeitet.

Tabelle 2.5.-2: Applikationsrouten, Zellzahlen, Entnahmezeitpunkte und untersuchte Organe bei Mausversuchen mit GFP-transduzierten A20-Zellen

Applikationsroute	i.p.	i.v.
applizierte Zellzahl	2 x 10^6 Zellen	2 x 10^6 Zellen
Mausstamm	SCID	
Zeitpunkt der Entnahme		
1,5h	+	+
5h	+	+
24h	+	+
entnommene Organe		
axilläre LK	+	+
inguinale LK	+	+
mesenteriale LK	+	+
Milz	+	+
Auswertung	limitierende Verdünnung	

Die erhaltenen Zellen wurden, wie bei den markierten BiV-Zellen in Kapitel 2.5.4.1. beschrieben, in Flachboden-96-Loch-Platten ausgesät. Allerdings wurde bei den pro Loch eingebrachten Zellen Rücksicht auf die geringeren Zellzahlen in Lymphknoten und Milzen bei SCID-Mäusen genommen und nur eine Konzentration von 1 x 10^4 Zellen ausplattiert. Die Platten wurden ebenfalls direkt nach dem Ausplattieren und nach wenigen Tagen unter dem Fluoreszenzmikroskop (eGFP-Filter) quantitativ ausgewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Bestimmung der Frequenz spezifischer T-Zellen

Wie schon zuvor in unserem Labor gezeigt werden konnte, vermitteln T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen, die mehrmals mit A20-Zellen restimuliert wurden, nach adoptivem Transfer einen Langzeittumorschutz in der Maus. In gleicher Weise restimulierte T-Zellen aus der Naivmaus hingegen konnten *in vivo* keine Tumorprotektivität vermitteln, obwohl sie *in vitro* den gleichen Aktivierungszustand sowie Tumorspezifität zeigten (Kronenberger et al., 2002). Diese Befunde deuteten darauf hin, dass *in vivo* durch die Immunisierung mit Triomzellen ein Aktivierungsprozess stattfinden muss, der *in vitro* nicht nachstellbar ist.

IFN-γ ist ein essenziell wichtiges Zytokin bei der Tumorabstoßung (Barth et al., 1991; Becker et al., 2001; Qin et al., 2000). Es wird von ZTL und Th1-Zellen gebildet und ist das wichtigste makrophagenaktivierende Zytokin (Janeway und Travers, 1997).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Voraussetzungen, die die tumorprotektiven Eigenschaften der IFN-γ-produzierenden T-Zellen im Triom-Ansatz ausmachen.

3.1.1. Markierung IFN-γ-produzierender Zellen

Zunächst sollte untersucht werden, ob der bei adoptivem Transfer beobachtete differenzielle Effekt der T-Zellen auf eine unterschiedliche Frequenz der tumorspezifischen T-Zellen zurückzuführen ist. Um die Frequenz der tumorspezifischen T-Zellen ohne und nach Stimulation zu bestimmen, wurden die jeweiligen Zellen mittels der IFN-γ-Einfang-Methode von Miltenyi (s. Kap. 2.2.6.2.) markiert und im Durchflusszytometer quantifiziert.
Wie aus Tabelle 3.1.-1 zu entnehmen ist, war es durch *In-vitro*-Stimulation möglich, die Frequenz der IFN-γ-produzierenden T-Zellen bei naiven und immunisierten Mäusen zu erhöhen.

Tabelle 3.1.-1: Frequenz IFN-γ-positiver T-Zellen aus Naiv- und Immunmäusen ohne und nach *In-vitro*-Stimulation

	naive Mäuse	immunisierte Mäuse
ohne Stimulation	2,25%	2,80%
am Ende der 1. Rest.	2,60%	3,70%

Rest.: Restimulation

Wie man diesem Versuch noch entnehmen kann, war die Frequenz tumorspezifischer, IFN-γ-produzierender T-Zellen aus immunisierten Mäusen ohne Stimulation um 25% höher als die aus naiven Mäusen, nach Restimulation sogar um 40%.

Abweichend von der etablierten Langzeitrestimulation wurde eine neue Methode gesucht, die tumorspezifischen T-Zellen in kürzerer Zeit als bisher zu generieren. Dazu wurden 3- und 12-Stunden-Kurzzeitstimulationen getestet (s. Abb. 3.1.-1).

Die Ausgangsfrequenz der IFN-γ-produzierenden T-Zellen aus immunisierten Mäusen war in diesem Versuch gegenüber der Frequenz aus naiven BALB/c-Mäusen um 14% erhöht.
Als weitere Beobachtung konnte festgehalten werden, dass die Kurzzeitstimulationen nicht den erhofften Effekt zeigten: Die Frequenz der IFN-γ-produzierenden T-Zellen nahm nach 3- bzw. 12-Stunden-Stimulation nicht zu, es war sogar eine deutliche Abnahme der Frequenz um bis zu 30% im Vergleich mit nicht stimulierten Zellen zu sehen. Dabei machte es keinen Unterschied, woher die ursprünglichen Zellen (Naivmaus *vs.* Immunmaus) stammten (s. Abb. 3.1.-1).

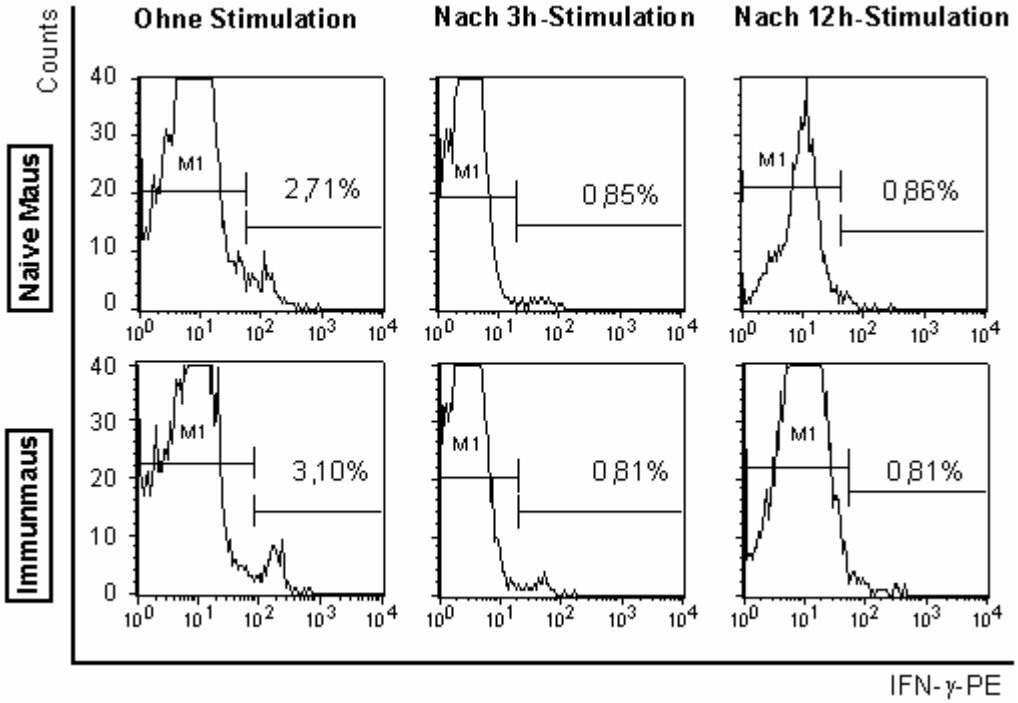


Abbildung 3.1.-1: Frequenz der IFN-γ-positiven T-Zellen aus Naiv- und Immunmäusen ohne *In-vitro*-Stimulation sowie nach 3- und 12-Stunden-Kurzzeitstimulation gegen bestrahlte A20-Zellen

Die Zellen wurden direkt nach Entnahme aus den Mäusen und zu den entsprechenden Zeitpunkten der Kurzzeitstimulationen mit dem bispezifischen Fänger-Ak der Fa. Miltenyi inkubiert. Nach Ende der 45-minütigen Inkubationszeit im Brutschrank wurde der PE-markierte Detektions-Ak dazugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 Min. auf Eis wurden die Zellen gewaschen und im Durchflusszytometer vermessen. Als Negativkontrolle wurden jeweils Zellen vor der Inkubation mit dem Fänger-Ak abgenommen und nur mit dem Detektions-Ak inkubiert und diese Einstellungen am Durchflusszytometer für die eigentliche Messung der Zellen übernommen. Tote Zellen wurden durch PI-Markierung ausgegrenzt.

3.1.2. Anreicherung IFN-γ-positiver T-Zellen

Anschließend wurden Anreicherungen IFN-γ-produzierender Zellen nach 3- und 12-Stunden-Kurzzeitstimulation, sowie nach Langzeitstimulation durchgeführt. Die Zellen wurden vor und nach Anreicherung der IFN-γ-produzierenden Zellen gezählt, dabei wurden tote Zellen durch Markierung mit Trypanblau ausgegrenzt (s. Tab. 3.1.-2). Damit konnte die Frequenz der *in vitro* angereicherten IFN-γ-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen ermittelt werden.

Es zeigte sich ein deutlicher Frequenzunterschied von angereicherten IFN-γ-produzierenden Zellen nach einer Langzeitstimulation zwischen naiven und

immunisierten Mäusen: Dieser Unterschied belief sich auf das 5-fache zugunsten der Ursprungszellen aus immunisierten Mäusen (1,25% *vs.* 0,25%; s. Tab. 3.1.-2).
Bei den Kurzzeitstimulationsversuchen zeigte sich, dass auch hier die Frequenz nicht nur nach der Markierung, sondern auch nach Anreicherung sehr niedrig war. Von weiteren Kurzzeitstimulationsversuchen wurde daraufhin Abstand genommen und bei den folgenden Versuchen wieder auf die etablierte Langzeitstimulation zurückgegriffen.

Tabelle 3.1.-2: Frequenz der IFN-γ-positiven T-Zellen nach 3- und 12-Stunden-Kurzzeitstimulation im Vergleich zu der Frequenz nach Langzeitstimulation (7d)

	3h-Stimulation		12h-Stimulation		7d-Stimulation	
	NM	IM	NM	IM	NM	IM
Frequenz-ermittlung durch FACS-Analyse	0,85%	0,81%	0,86%	0,81%	n.d.*	n.d.*
Frequenz-ermittlung durch Auszählen der Zellen nach magnetischer Trennung	0,25%	0,20%	n.d.*	n.d.*	0,25%	1,25%

Für die Frequenzermittlung durch FACS-Analyse wurden die restimulierten Zellen mit IFN-γ-Fänger- und -Detektions-Ak (PE) nach Anweisung im Miltenyi-Protokoll behandelt und dann 2,5 x 10^5 Zellen vermessen. Die restlichen Zellen wurden mit anti-PE-MicroBeads versetzt und dann mit Hilfe des MACS-Magneten die positiven von den negativen Zellen getrennt. Der Trennungsschritt über die Säule wurde mit der ersten positiven Fraktion wiederholt, um eine hohe Reinheit zu erlangen, da auch viele tote Zellen unspezifisch an der Säule gebunden werden. Die Zellzahl wurde dann mit Hilfe einer Zählkammer ermittelt.
IM: mit BiV-Zellen immunisierte Maus
NM: BALB/c-Maus
* n.d.: die Frequenzermittlung wurde für die jeweilige Stimulation nicht durchgeführt

Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass die Frequenz IFN-γ-produzierender Zellen aus Immunmäusen vor Stimulation leicht erhöht ist und nach 7-Tage-Stimulation gegen A20-Zellen deutlicher ansteigt als bei Naivmäusen. Nach Anreicherung der IFN-γ-positiven Zellen ist das Ergebnis sogar noch stärker zugunsten der Zellen aus immunisierten Mäusen verschoben.

3.1.3. *In-vitro*-Charakterisierung der T-Zellen

3.1.3.1. FACS-Analyse zur Aufklärung des Phänotyps IFN-γ-produzierender T-Zellen

Um diese IFN-γ-produzierenden T-Zellen hinsichtlich ihres Phänotyps zu charakterisieren, wurden weitere Analysen mit dem Durchflusszytometer durchgeführt.
Es hatte sich in vorhergegangenen Versuchen in unserem Labor herausgestellt, dass bei dem Langzeitstimulationsansatz hauptsächlich $CD3^+CD4^+$ T-Zellen entstehen (Kronenberger, pers. Mitteilung) und dass in dem A20-B-Zell-Tumormodell $CD3^+CD4^+$ T-Zellen einen vollkommenen Langzeittumorschutz vermitteln können (Egeter et al., 2000). Somit wurde vermutet, dass insbesondere die IFN-γ-produzierenden, tumorspezifischen T-Zellen einen $CD4^+$ Phänotyp aufweisen würden.

Die Zellen wurden mit IFN-γ-Fänger- und PE-Detektions-Ak behandelt. Anschließend wurde mit anti-CD4-FITC- bzw. anti-CD8-FITC-Ak gegengefärbt. Die entsprechenden Isotypkontrollen wurden zur Geräteeinstellung verwendet. Es wurden T-Zellen aus naiven Mäusen und immunisierten Mäusen ohne *In-vitro*-Stimulation und nach einer A20-Restimulation hinsichtlich ihrer CD4-, CD8- und IFN-γ-Expression miteinander verglichen.

Die FACS-Daten (Abb. 3.1.-2 und Tab. 3.1.-3) zeigen folgende Ergebnisse:

1. Die $CD4^+$ Population wuchs in beiden Ansätzen nach einer Restimulation stark an. Es zeigte sich, dass bei dem Ansatz mit Zellen aus Immunmäusen die $CD4^+$ Population um 68% anstieg, im Gegensatz dazu bei Naivmäusen nur um 39%. In ähnlicher Weise wuchs bei Naivmäusen auch die $CD8^+$ Fraktion um 37%. In der $CD8^+$ Population der Zellen aus Immunmäusen konnten man aber überraschenderweise eine Zunahme um 220% von 10% auf 32% erkennen. Die gefundenen Prozentzahlen können mit Hilfe eines Quotienten am besten miteinander verglichen werden:

Tabelle 3.1.-3: Verhältnis der $CD8^+/CD4^+$ Gesamtzellen vor und nach Stimulation

$CD8^+/CD4^+$	**naive Maus**	**immunisierte Maus**
ohne Stimulation	0,295	0,395
am Ende der 1. Rest.	0,290	0,755

Es sind keine großen Veränderungen im $CD8^+/CD4^+$ Verhältnis bei Zellen aus naiven Mäusen während einer Restimulation zu beobachten. Im Vergleich dazu sieht man bei Zellen aus Immunmäusen schon ohne Stimulation eine Verschiebung zu $CD8^+$ Zellen, die nach einer Restimulation noch deutlicher sichtbar wird.
Rest.: Restimulation

2. In den IFN-γ^+ Populationen konnte man in beiden Mausansätzen nach Restimulation eine Zunahme beobachten, bei Zellen aus Naivmäusen um 18%, bei Immunmäusen um 38%.

3. In beiden Ansätzen war dieser Anstieg der IFN-γ-produzierenden T-Zellen hauptsächlich in der $CD4^+$ Population zu sehen. Es war eine Steigerung nach einer Restimulation in der $CD4^+$IFN-γ^+ Population bei T-Zellen aus Naivmäusen auf 163% und bei Immunmäusen auf 280% zu beobachten.

Als Ergebnis lässt sich bei der Phänotypisierung der T-Zellen ohne und nach einer *In-vitro*-Stimulation aus Immunmäusen festhalten, dass sich die T-Zellen entgegen früherer Beobachtungen und im Gegensatz zu T-Zellen aus Naivmäusen stärker in Richtung von $CD8^+$ Zellen entwickelt haben, aber die IFN-γ-produzierenden T-Zellen trotzdem, wie bereits vermutet, in der $CD4^+$ Fraktion gewachsen sind.

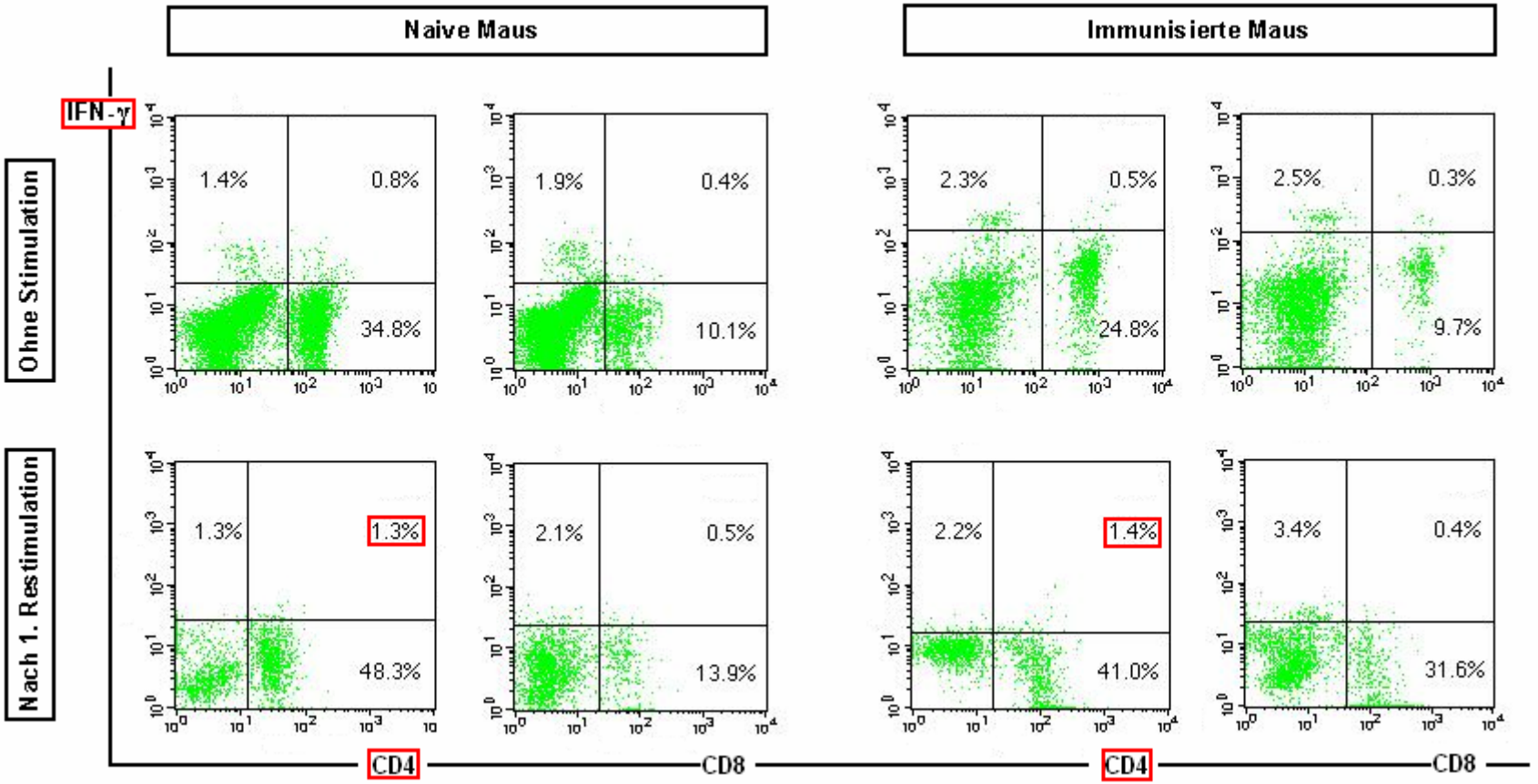


Abbildung 3.1.-2: Phänotypisierung der T-Zellen ohne und nach einer Restimulation (7d)

Es wurden die IFN-γ-produzierenden Zellen (PE) von Naiv- bzw. Immunmäusen ohne und nach einer *In-vitro*-Stimulation mit anti-CD4- und anti-CD8-Ak (FITC) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

3.1.3.2. TZR-Analyse angereicherter IFN-γ-produzierender T-Zellen

Bisher hatten sich Einschränkungen im TZR-Repertoire von T-Zellen aus Immunmäusen nur nach mindestens fünf *In-vitro*-Restimulationen gegen A20-Zellen gezeigt. Starke Einschränkungen auf zwei bis drei TZR-Banden waren sogar erst nach neun Restimulationen zu erreichen, diese T-Zellen erwiesen sich in adoptiven Transfers in naive BALB/c-Mäuse zu 100% als tumorprotektiv. Es wurde vermutet, dass diese tumorprotektiven T-Zellen mit eingeschränktem TZR-Repertoire in geringer Frequenz auch in jenen Zellpopulationen vorkommen, welche ohne *In-vitro*-Restimulationen aus immunisierten Mäusen gewonnen werden. Um dies zu überprüfen, wurde das TZR-Repertoire von T-Zellen untersucht, die aus Immunmäusen isoliert wurden, danach nur zweimal mit A20-Zellen restimuliert und schließlich mittels IFN-γ-Einfang angereichert wurden.

Wie sich herausstellte, gab es eine starke Einschränkung im Repertoire auf Vβ1, Vβ4 und Vβ13, wenn die Zellen aus immunisierten Mäusen kamen (Abb. 3.1.-3). Die restimulierten und angereicherten IFN-γ^+ T-Zellen aus Naivmäusen wiesen kein eingeschränktes TZR auf (Daten nicht gezeigt).

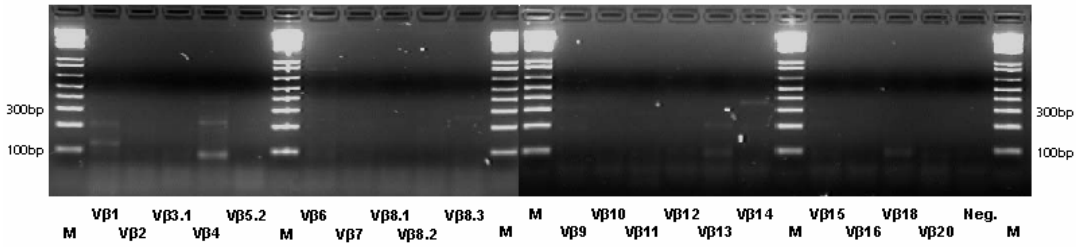


Abbildung 3.1.-3: TZR-Analyse der restimulierten und angereicherten T-Zellen

Die IFN-γ-angereicherten T-Zellen kamen aus immunisierten Mäusen und waren vor Anreicherung zweimal gegen A20-Zellen restimuliert worden.
Eine stärkere Bande ist bei Vβ4 zu erkennen, schwächere bei Vβ1 und Vβ13. Die Bande bei Vβ14 ist unspezifisch, da sie zu hoch liegt.
M: Marker, 1kb plus
Neg.: Negativkontrolle
bp: Basenpaare

Als Ergebnis lässt sich hier festhalten, dass es gelungen ist, ein stark eingeschränktes TZR-Repertoire schon nach 2 *In-vitro*-Restimulationen und IFN-γ-Anreicherung zu bekommen. Dieses Repertoire ähnelt sehr dem Repertoire,

welches auch nach neun *In-vitro*-Restimulationen erhalten wurde. Dort waren Vβ4- und Vβ6-Banden im Gel deutlich zu sehen, etwas schwächer war Vβ1 vertreten.
Diese hinsichtlich ihres TZR-Repertoires untersuchten IFN-γ-angereicherten T-Zellen wurden zusätzlich noch auf ihre *In-vivo*-Protektivität überprüft (s. Kap. 3.1.4., Abb. 3.1.4.).

3.1.4. *In-vivo*-Versuche mit IFN-γ-angereicherten T-Zellen

Um zu überprüfen, ob die IFN-γ-positiven T-Zellen aus den *In-vitro*-Restimulationsansätzen *in vivo* tumorprotektiv sind, wurden adoptive Transferversuche (s. Kap. 2.5.3.) mit diesen angereicherten, IFN-γ-produzierenden T-Zellen durchgeführt. Die T-Zellen wurden präventiv, zusammen mit einer letalen Dosis Tumorzellen verabreicht (Abb. 3.1.-4). Alle Mäuse aus den A20-Kontrollgruppen zeigten nach 40-60 Tagen klinische Auffälligkeiten und mussten eingeschläfert werden.

Wie in Abbildung 3.1.-4 zu erkennen ist, führten die IFN-γ-angereicherten T-Zellen zu einem teilweisen Tumorschutz. Allerdings mussten die ursprünglichen T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen stammen und mehr als einmal mit A20-Zellen restimuliert werden. Unstimulierte IFN-γ-positive T-Zellen aus zuvor immunisierten Mäusen zeigten keine Tumorabstoßung *in vivo*. Bei nur einmaliger Restimulation *in vitro* kam es bei 17% der Mäuse zu einem verlängerten Überleben, während es bei zweimaliger Restimulation bei 20% der Mäuse zu einem verlängerten Überleben und bei weiteren 20% zur dauerhaften Heilung kam. Dies war nicht möglich, wenn die T-Zellen aus naiven Mäusen stammten.
Es ist zu beachten, dass der Überlebensvorteil zustande kam, obwohl weniger T-Zellen transferiert wurden als im üblichen Protokoll ($2{,}5 \times 10^5$ gegenüber 5×10^5).

Das benutzte TZR-Repertoire der tumorprotektiven, IFN-γ-produzierenden T-Zellen nach der 2. Restimulation ist in Abbildung 3.1.-3 zu sehen.

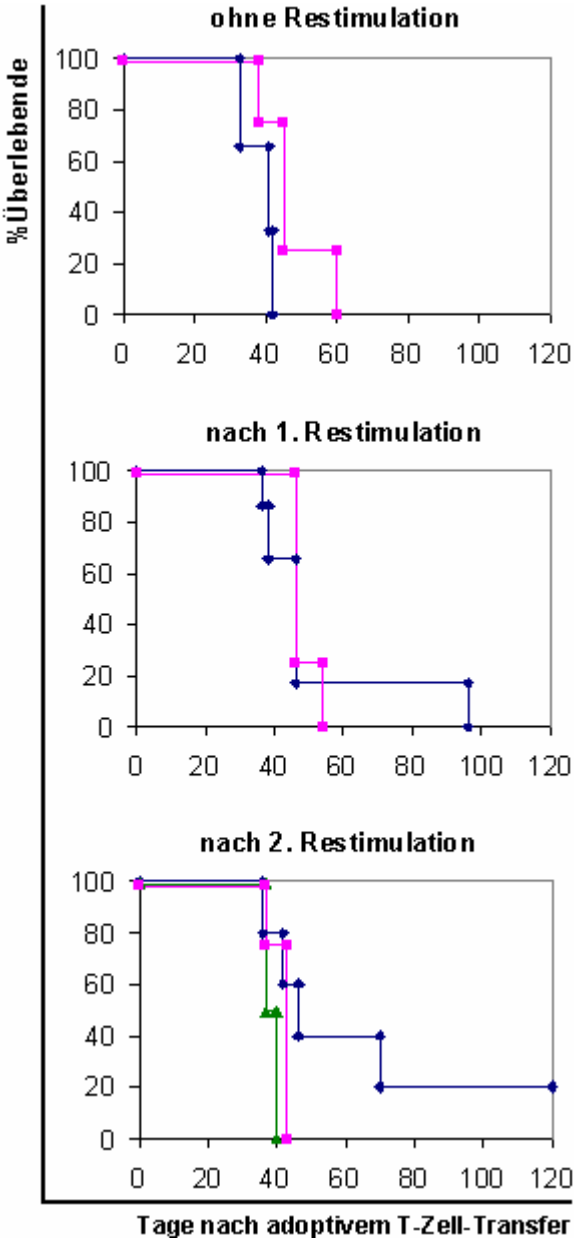


Abbildung 3.1.-4: Adoptive Transferversuche von IFN-γ-angereicherten T-Zellen als Tumorprävention

In verschiedenen adoptiven Transferversuchen wurden BALB/c-Mäusen IFN-γ-angereicherte T-Zellen gespritzt.
Obere Abbildung: aus Triom-immunisierten Mäusen wurden Milz- und Lymphknotenzellen gewonnen und IFN-γ-produzierende Zellen ohne Stimulation direkt angereichert und zusammen mit A20-Zellen i.p. gespritzt. (5 x 10^5 IFN-γ-produzierende Zellen + 8 x 10^5 A20-Zellen pro Maus)
Mittlere Abbildung: aus Triom-immunisierten Mäusen wurden Milz- und Lymphknotenzellen gewonnen und IFN-γ-produzierende Zellen nach einer Restimulation (7d) angereichert. Diese Zellen wurden unspezifisch 7 Tage expandiert (s. Kap. 2.2.6.2.) und dann zusammen mit A20-Zellen i.p. gespritzt. (2,5 x 10^5 IFN-γ-produzierende Zellen + 8 x 10^5 A20-Zellen pro Maus)
Untere Abbildung: aus Triom-immunisierten Mäusen wurden Milz- und Lymphknotenzellen gewonnen und IFN-γ-produzierende Zellen nach 2 Restimulationen angereichert und zusammen mit A20-Zellen i.p. gespritzt. (3 x 10^5 IFN-γ-produzierende Zellen + 8 x 10^5 A20-Zellen pro Maus)

Es wurde in diesem Kapitel gezeigt, dass die Frequenz der tumorspezifischen, IFN-γ-produzierenden T-Zellen in immunisierten Mäusen höher ist als in naiven Mäusen. Diese T-Zellpopulation lässt sich durch *In-vitro*-Langzeitstimulation expandieren. Die Charakterisierung der Zellpopulationen hat aufgezeigt, dass die *in vitro* expandierten IFN-γ^+ T-Zellen einen CD4-Phänotyp besitzen, unabhängig von der Herkunft der Zellen (Naiv- oder Immunmaus). Nach 2 Restimulationen und Anreicherung der IFN-γ-produzierenden Zellen aus Immunmäusen zeigte sich ein eingeschränktes TZR-Repertoire und zusätzlich teilweise Tumorprotektivität.

3.2. Zytokin-Expressionsprofil der T-Zellen

Als Erklärung für das differenzielle Verhalten von tumorspezifischen T-Zellen aus Immun- bzw. Naivmäusen wurde in Betracht gezogen, dass unterschiedliche Zytokine exprimiert werden. Die Messung der Zytokinproduktion bietet eine gute Möglichkeit, die spezifische Aktivierung der T-Zellen und immunologische Prozesse in der Maus *in vivo* zu verfolgen.

Zur Bestimmung verschiedener Zytokine und deren Konzentration im Mausserum und in *In-vitro*-Restimulationsansätzen zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das Luminex-System der Fa. Bio-Rad ausgewählt (s. Kap. 2.4.3.), da es gegenüber einem klassischen ELISA den Vorteil hat, dass man in nur 50µl Probenvolumen theoretisch bis zu 100 verschiedene Analyten sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmen kann. Interessant für diese Arbeit waren Zytokine, die eine Zuordnung zu einer Th1- oder Th2-Antwort ermöglichen. Deswegen wurden im Folgenden hauptsächlich IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12(p70), IFN-γ, GM-CSF und TNF-α untersucht.
Das Serum wurde 7 Tage nach der zweiten Vakzinierung mit Triom-Zellen gewonnen. Als Vergleich dazu wurde auch Serum von naiven BALB/c-Mäusen untersucht.
Für die Analyse der T-Zellen in Kultur wurde zu verschiedenen Zeitpunkten einer Restimulation ein Teil des Kulturüberstands abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Die Zellzahl pro Milliliter wurde bestimmt, um später die Ergebnisse aus unterschiedlichen Kulturüberständen quantitativ miteinander vergleichen zu können.

3.2.1. Untersuchungen zum Aktivierungszustand und der Zytokinproduktion spezifischer T-Zellen während mehrerer Restimulationen

Die Restimulation der T-Zellen aus immunisierten und naiven Mäusen lief jeweils parallel, die Zellen wurden alle zur gleichen Zeit mit denselben bestrahlten A20-Zellen und APZ (bestrahlte Milzzellen) sowie IL-2 versorgt. Auch die Kulturüberstände wurden parallel gewonnen.

Unabhängig davon, ob die Zellen aus naiven oder immunisierten Mäusen stammten, wurden vorrangig GM-CSF und IFN-γ produziert.
Dabei war zu sehen, dass die Zellen aus immunisierten Mäusen während der ersten Restimulationen mehr GM-CSF produzierten als T-Zellen aus naiven Mäusen, was sich mit den Daten aus Kronenberger et al., 2002, deckte. Weiterhin zeigte sich, dass sich Zellen aus immunisierten Mäusen *in vitro* schneller stimulieren ließen. Auch die IFN-γ-Produktion ließ sich bei T-Zellen aus immunisierten Mäusen schneller durch *In-vitro*-Restimulation induzieren als bei T-Zellen aus naiven Mäusen (s. Abb. 3.2.-1 A und B).
Zu den verschiedenen Zeitpunkten während der Restimulationen bestand der quantitativ auffälligste Unterschied in der Zytokinproduktion zwischen T-Zellen aus immunisierten und naiven Mäusen in der IL-5-Produktion. Nach direkter Entnahme der Milz und Lymphknoten zeigten weder die T-Zellen aus naiven noch aus immunisierten Mäusen Produktion von IL-5. T-Zellen, die aus immunisierten Mäusen stammten, produzierten dann aber schon während der ersten Restimulation dieses Th2-Zytokin. Am Ende der 1. Restimulation lag die Konzentration bei 1570pg/ml und damit fast 40 Mal höher als bei restimulierten T-Zellen aus Naivmäusen. Während der 2. Restimulation war die Konzentration mit 530pg/ml noch 30 Mal höher und am Ende der 2. Restimulation mit 1070pg/ml immerhin noch mehr als 11 Mal so hoch. Am Ende der 4. Restimulation produzierten dann auch die T-Zellen aus naiven BALB/c-Mäusen IL-5, allerdings war die Konzentration mit 3500pg/ml nur halb so hoch wie im Kulturüberstand über T-Zellen aus immunisierten Mäusen. Dort lag der Wert bei 7450pg/ml (s. Abb. 3.2.-1 C).

Die Konzentration der übrigen Zytokine ist in Abbildung 3.2.-2 gezeigt. Bis auf IL-10 bewegten sich die Konzentrationen in einem vernachlässigbaren Bereich. Die Konzentration dieses Th2-Zytokins lag in den Kulturüberständen des Immunmausansatzes am Ende der 1., 2. und 4. Restimulation mehr als doppelt so hoch wie bei der Kontrollgruppe. Trotzdem bewegten sich die gemessenen Konzentrationen mit weniger als 150pg/ml in einem sehr niedrigen Bereich.

Der gezeigte Versuch ist exemplarisch für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche mit identischem Ergebnis.

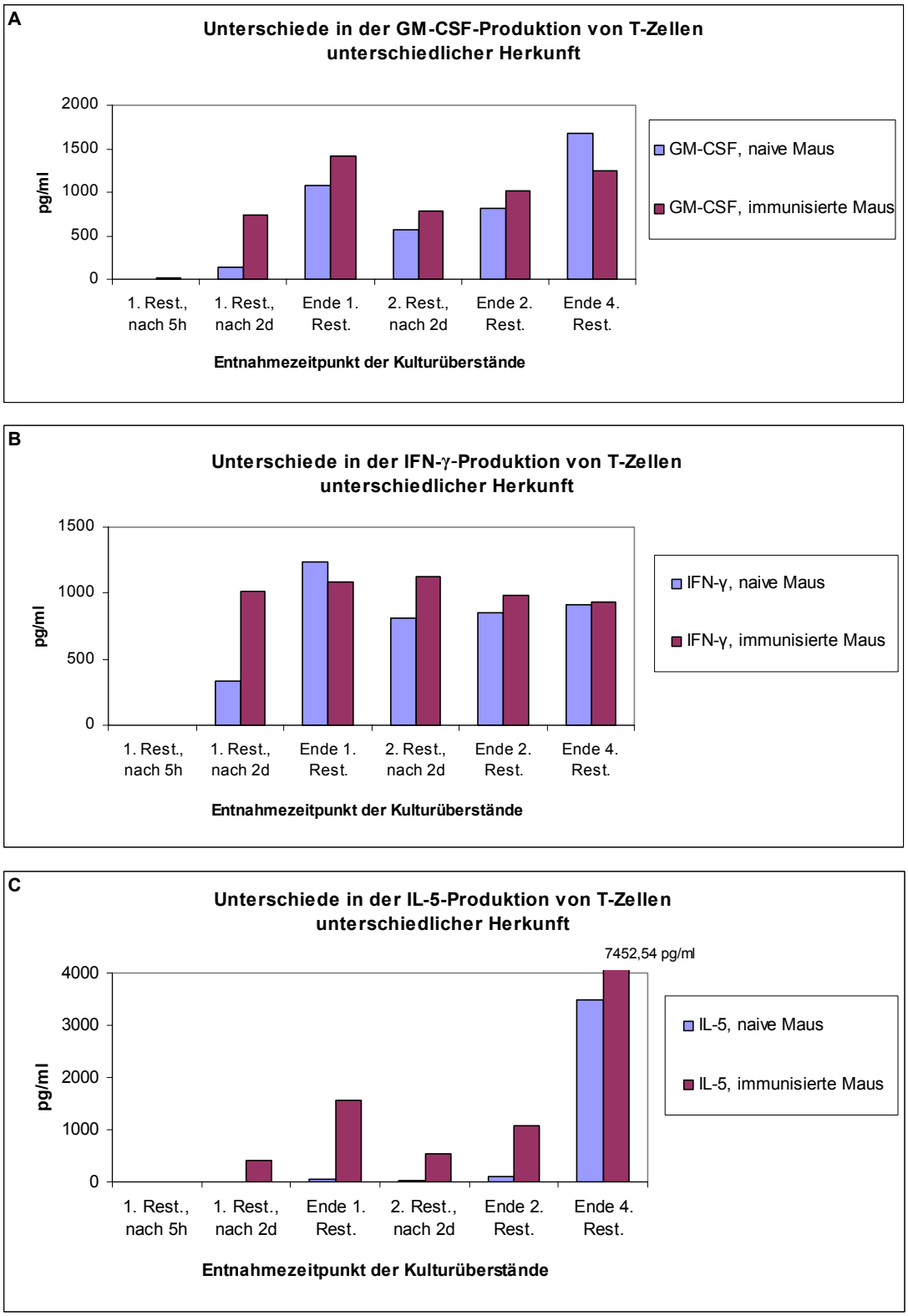


Abbildung 3.2.-1:
A: GM-CSF-Produktion
B: IFN-γ-Produktion
C: IL-5-Produktion
von T-Zellen unterschiedlicher Herkunft

Während die Produktion von GM-CSF und IFN-γ von T-Zellen aus immunisierten und naiven Mäusen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten ähnlich ist, zeigt sich ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der IL-5-Produktion. Dieses Zytokin wird bis zum Ende der 2. Restimulation nur von T-Zellen aus immunisierten Mäusen in größeren Mengen gebildet.

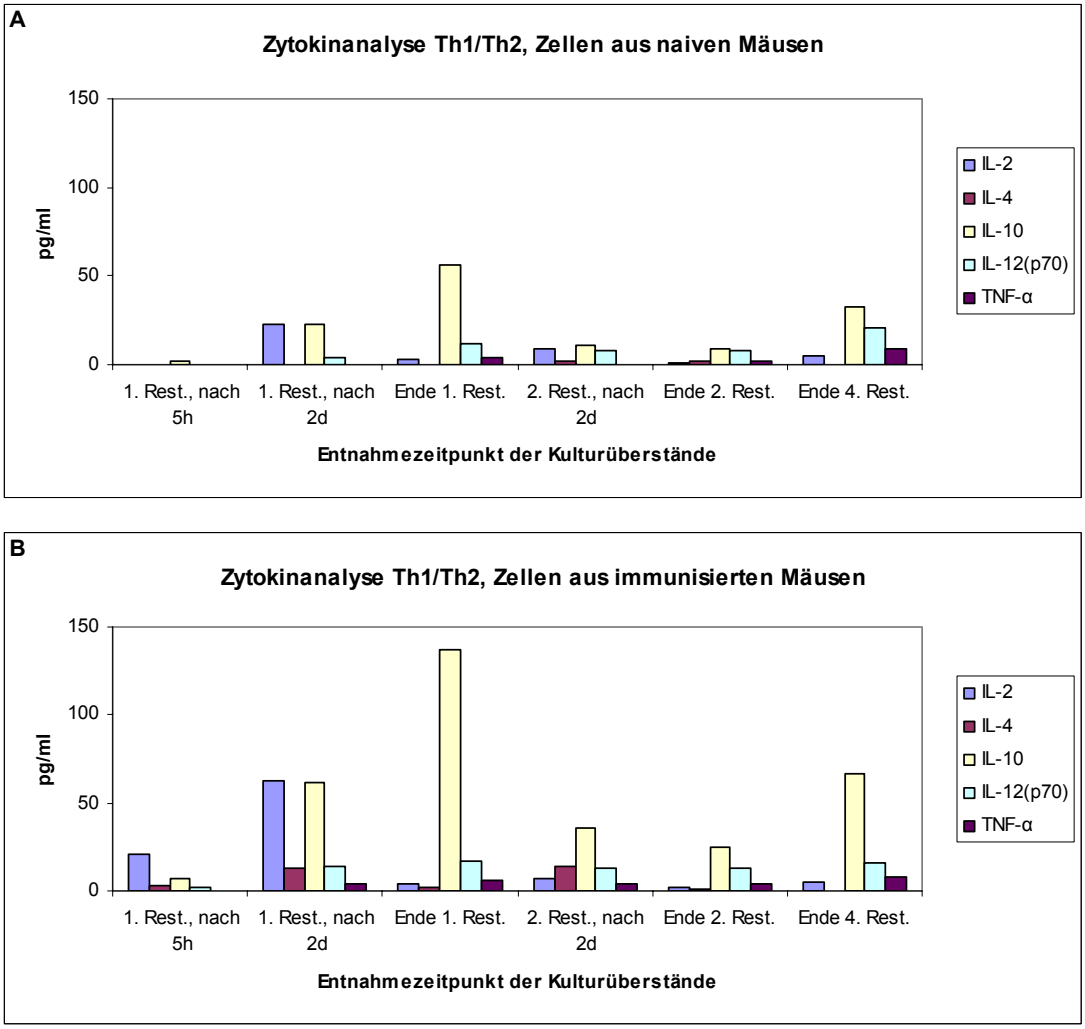


Abbildung 3.2.-2: Vergleich zwischen
A: naiven Mäusen und
B: immunisierten Mäusen hinsichtlich der Produktion verschiedener Zytokine während mehrerer Restimulationen

Die Kulturüberstände für die Zytokinmessungen wurden während der Restimulationen zu den in der Abbildung genannten Zeitpunkten gewonnen. Dabei wurden die Überstände aus allen Löchern der 24-Loch-Platten gemischt und daraus ein Aliquot für die Luminex-Analyse abgenommen.
Die Konzentrationen gleicher Entnahmezeitpunkte können miteinander verglichen werden, da die Zellzahlen/ml in beiden Ansätzen identisch waren.

3.2.2. Zytokinprofile in Mausseren

Es wurden Mausseren von naiven und Triom-immunisierten Mäusen hinsichtlich ihrer Zytokinprofile untersucht. Die Mausseren wurden aus Herzblut von Mäusen gewonnen, deren Milz- und Lymphknotenzellen außerdem für Restimulationen eingesetzt wurden.

Bei der Auswertung der Daten stellte sich ein sehr eindeutiges Bild dar. In Seren von naiven Mäusen fanden sich keine der untersuchten Zytokine in nennenswerter Konzentration, während in Seren von immunisierten Mäusen eine so hohe Konzentration von IL-12(p70) zu finden war, dass sogar bei einer 1:3-Verdünnung die Werte von einigen Mausseren außerhalb des Kalibrierungsbereiches lagen. Die durchschnittliche Konzentration von IL-12(p70) der drei ausgewerteten Mausseren betrug 25,6ng/ml. Außer diesem Zytokin war auch die Konzentration von IL-10, einem von Th2-Zellen produzierten Zytokin, mit 12ng/ml sehr hoch (s. Abb. 3.2.-3).
Die anderen Zytokine waren in wesentlich geringeren Konzentrationen zu finden. Die Konzentration von einem weiteren Th2-Zytokin, IL-4, betrug 390pg/ml. Das Zytokin IFN-γ lag in einer Konzentration von 210pg/ml im Serum immunisierter Mäuse vor, GM-CSF lag bei 160pg/ml.

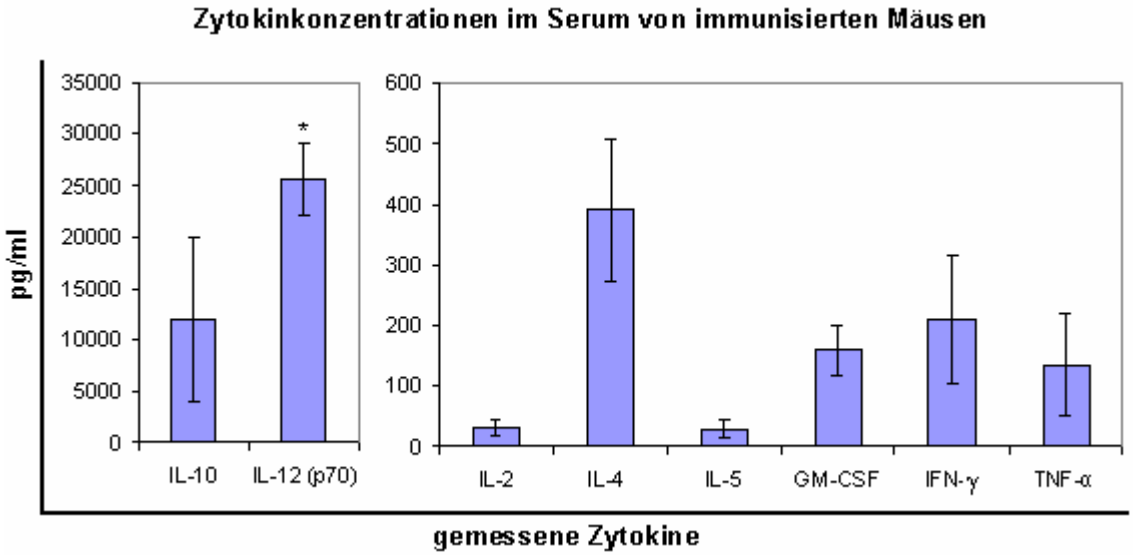


Abbildung 3.2.-3: Zytokinkonzentrationen im Mausserum von immunisierten Mäusen

Mittelwerte und Standardabweiungen wurden jeweils aus Seren von fünf immunisierten Mäusen berechnet.
* Mittelwert und Standardabweichung wurden nur aus Seren von drei immunisierten Mäusen gebildet, da die Werte von zwei Mäusen außerhalb des Kalibrierungsbereiches lagen.
Im Serum von Naivmäusen waren keine Zytokine zu detektieren. Nur zwei der fünf untersuchten Mäuse produzierten etwas IL-5 (unter 5pg/ml) und TNF-α (unter 20pg/ml).

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2. lassen sich dahingehend deuten, dass durch die Immunisierung eine starke Immunantwort in den Mäusen hervorgerufen wird. Es handelt sich dabei um eine gemischte Th-Antwort, die sich während der *In-vitro*-Restimulation in der Produktion von Th1-Zytokinen wie IFN-γ, aber auch von Th2-Zytokinen wie IL-5, widerspiegelt.

3.3. Anreicherung von T-Zellen mit spezifischem TZR

In früheren Arbeiten in unserem Labor wurde gezeigt, dass durch Immunisierung der Mäuse und mehrere *In-vitro*-Restimulationen der T-Zellen eine Einschränkung des TZR-Repertoires auf bestimmte Vβ-Ketten zu erreichen war. Diese Einschränkung konnte mit Zellen aus naiven Mäusen nie beobachtet werden. T-Zellen aus immunisierten Mäusen wiesen nach neun Restimulationen eine Einschränkung auf Vβ4- und Vβ6-Ketten auf und waren *in vivo* zu 100% tumorprotektiv (Kronenberger, pers. Mitteilung), während T-Zellen nur mit Vβ2-Kette nicht protektiv waren (Dieckmann, pers. Mitteilung). Bei Versuchen mit IFN-γ-angereicherten Zellen aus Immunmäusen nach zwei Restimulationen (s. Kap. 3.1.3.) hatte ich ebenfalls eine starke Einschränkung des TZR-Repertoires auf die Vβ4-, Vβ1- und Vβ13-Kette sehen können (s. Kap. 3.1.3.2.), wobei sich diese Zellen als teilweise tumorprotektiv erwiesen (s. Kap. 3.1.4.).

Im nächsten Schritt sollte versucht werden, T-Zellen mit spezifischem TZR anzureichern und hinsichtlich ihrer Tumorprotektivität zu testen, um die Frage zu beantworten, ob die *In-vivo*-Protektion durch einzelne TZR oder durch ein breiteres Spektrum vermittelt wird. Dabei habe ich mich auf T-Zellen mit Vβ4- und Vβ6-Kette konzentriert.

In ersten Versuchen wurden die T-Zellen mit anti-Vβ4- und anti-Vβ6-Antikörpern markiert und mit einem Zellsortiergerät (MoFlo) vom Rest der Zellen getrennt. Allerdings stellte sich dabei heraus, dass die Vitalität der T-Zellen nach dieser Sortierung beeinträchtigt war, so dass im Folgenden die Zellen durch immunmagnetische Separation gewonnen wurden. Hierzu wurde das System der Fa. Dynal verwendet, bei dem die T-Zellen mit anti-Vβ4- und anti-Vβ6-Antikörpern vorinkubiert wurden und in einem weiteren Schritt an einen Sekundärantikörper, der Spezifität gegen Ratte-IgG besaß und außerdem an einen magnetischen Partikel gekoppelt war, gebunden wurden. Die positiven Zellen konnten so durch einen Magneten vom Rest der Zellen isoliert werden.

3.3.1. *In-vitro*-Charakterisierung Vβ4- und Vβ6-positiver T-Zellen aus vakzinierten und naiven BALB/c-Mäusen

Zuerst wurde die Frequenz der Vβ4- und Vβ6-positiven T-Zellen in naiven und immunisierten Mäusen ohne und am Ende der 2. Restimulation bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

Dabei konnte man beobachten, dass die Frequenz sowohl der Vβ4- als auch der Vβ6-positiven T-Zellen nach der zweiten Restimulation schon über 30% zugenommen hatte (s. Abb. 3.3.-1), unabhängig von ihrer Herkunft aus naiven oder immunisierten Mäusen. Die Bedingungen der *In-vitro*-Restimulation ermöglichten also in beiden Fällen die Expansion dieser T-Zellen mit bestimmten Vβ-Ketten.

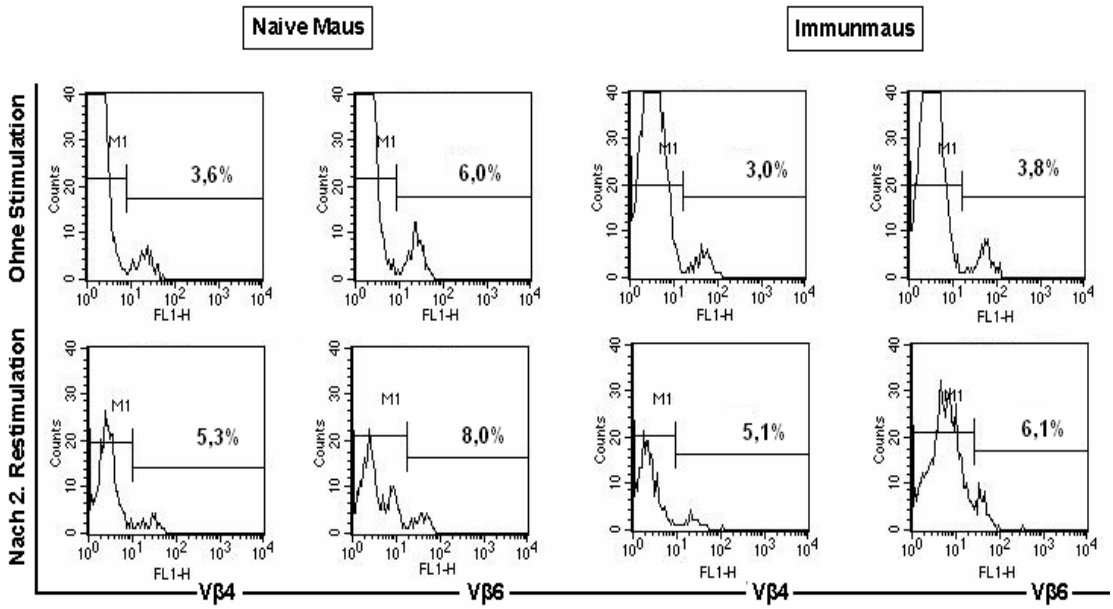


Abbildung 3.3.-1: Frequenzermittlung Vβ4- und Vβ6-positiver T-Zellen aus naiven und immunisierten Mäusen ohne und am Ende der 2. Restimulation

Sowohl der Vβ4- als auch der Vβ6-TZR wurde mit einem FITC-markierten Antikörper angefärbt (s. Kap. 2.1.6.).
Am Ende der 2. Restimulation mit A20-Zellen war die Frequenz der T-Zellen mit spezifischem TZR um über 30% gegenüber unstimulierten T-Zellen gestiegen. Dabei war es unerheblich, ob die Zellen ursprünglich aus naiven oder immunisierten Mäusen stammten.

3.3.2. Anreicherung dieser T-Zellen

Wie oben beschrieben, wurden die T-Zellen mit spezifischem TZR durch immunmagnetische Separation angereichert (s. auch Kap. 2.2.6.3.). Dabei wurden T-Zellen mit Vβ4- und Vβ6-Kette zusammen in einem Ansatz angereichert. Um zu überprüfen, ob die Anreicherung erfolgreich war und keine anderen T-Zellen in der isolierten Fraktion vorhanden waren, wurde mittels PCR das TZR-Repertoire bestimmt.

Abbildung 3.3.-2 zeigt das TZR-Repertoire der angereicherten Zellen. Man kann erkennen, dass diese Methode der Anreicherung funktioniert hat, denn es sind jeweils nur die Vβ4- und Vβ6-TZR Banden und keine weiteren spezifischen Banden zu erkennen. Die Vβ4-Bande bei angereicherten Zellen aus Immunmäusen ist nicht sehr ausgeprägt, was daran liegen kann, dass die Frequenz dieser T-Zellen eventuell in diesem Versuch nicht hoch genug war. Da diese Bande bei Zellen aus naiven Mäusen deutlich zu erkennen ist, liegt das Problem nicht an der Anreicherungsmethode.

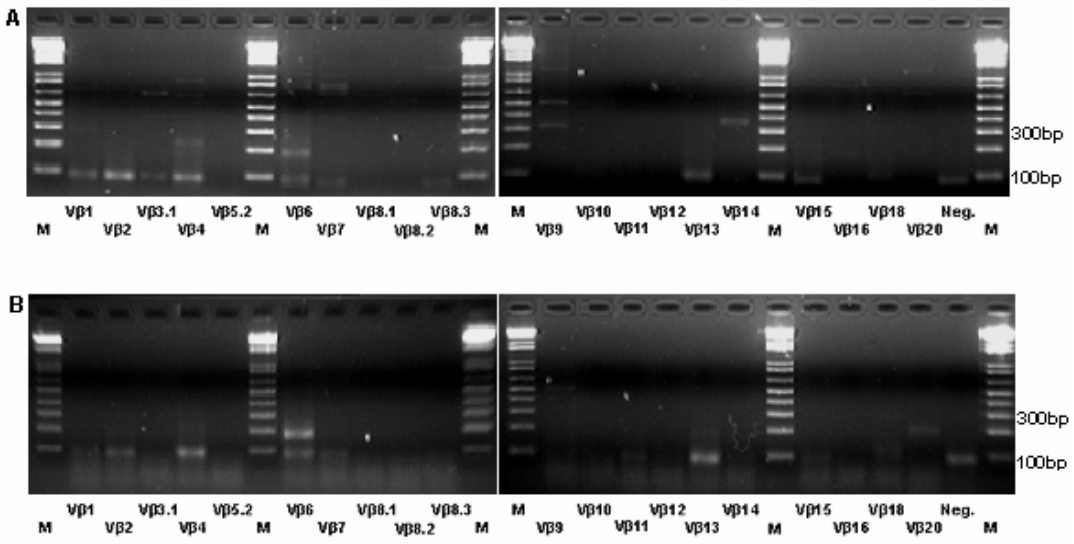


Abbildung 3.3.-2: TZR-Repertoire von angereicherten Vβ4- und Vβ6-T-Zellen aus naiven (A) und immunisierten (B) Mäusen am Ende der 2. Restimulation

A: Die Vβ4- und Vβ6-Banden sind auf der Höhe von ca. 200bp zu erkennen. Bei darunter liegenden Banden handelt es sich um Primerdimere, darüber liegende Banden sind unspezifisch.
B: Besonders deutlich ist die Vβ6-Bande zu erkennen, während die Bande von Vβ4 sehr schwach ausgeprägt ist.
M: Marker, 1kb plus
Neg.: Negativkontrolle
bp: Basenpaare

3.3.3. *In-vivo*-Versuche mit TZR-angereicherten T-Zellen

Da bekannt war, dass T-Zellen aus immunisierten Mäusen nach mehreren *In-vitro*-Restimulationen mit A20-Zellen Einschränkungen im TZR-Repertoire zeigten und diese spezifischen T-Zellen tumorprotektiv waren, wurde in dieser Arbeit versucht, A20-spezifische T-Zellen mit Vβ4- und Vβ6-Kette schneller zu generieren und die so gewonnen Zellen hinsichtlich ihrer Tumorprotektivität zu testen.
Da die Frequenzen der A20-spezifischen T-Zellen am Ende der 2. Restimulation um über 30% höher waren als in unstimuliertem Zustand (s. GM-CSF-Produktion Kap. 3.2.) und zusätzlich aus früheren Versuchen bekannt war, dass auch zu diesem Restimulationszeitpunkt die T-Zellen aus immunisierten Mäusen teilweise tumorprotektiv waren (Mocikat, pers. Mitteilung), wurden die T-Zellen für die *In-vivo*-Versuche nach dem Ende der 2. Restimulation angereichert.
Um die *in vitro* restimulierten und angereicherten T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden die Vβ4- und Vβ6-positiven T-Zellen adoptiv mit einer letalen Dosis A20-Zellen transferiert (s. Abb. 3.3.-3).

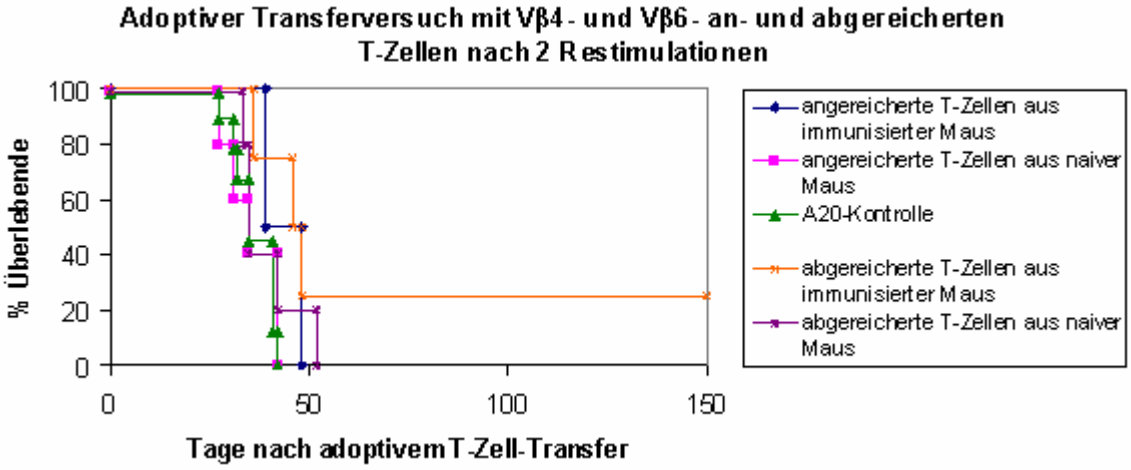


Abbildung 3.3.-3: Adoptiver Transferversuch mit Vβ4- und Vβ6- an- und abgereicherten T-Zellen aus immunisierten und naiven Mäusen nach 2 Restimulationen

Nach der Anreicherung wurden die Vβ4- und Vβ6-positiven T-Zellen noch eine Woche in Kultur gehalten: Der Kultur wurde anti-CD28-Ak zugesetzt, um den an die anti-Vβ4- und anti-Vβ6-Antikörper gebundenen T-Zellen ein kostimulatorisches Signal für die klonale Expansion zu geben. Nach 1-2 Tagen in Kultur lösten sich auch die magnetischen Partikel von den Zellen. Pro Maus wurden 5 x 10^5 T-Zellen mit jeweils 8 x 10^5 A20-Zellen i.v. gespritzt.
Die abgereicherten T-Zellen wurden analog behandelt.

Wie Abbildung 3.3.-3 zeigt, konnte keine Tumorprotektivität der restimulierten T-Zellen mit Vβ4- und Vβ6-Kette beobachtet werden.
Allerdings wurden im gleichen Versuch auch die Vβ4- und Vβ6-abgereicherten T-Zellen, die als negative Fraktion bei der magnetischen Separation anfielen, adoptiv mit einer letalen Dosis A20-Zellen transferiert. Bei diesem Versuch stellte sich heraus, dass 25% der Mäuse überlebten, die restimulierte T-Zellen ohne Vβ4- und Vβ6-Kette aus immunisierten Mäusen bekamen.

Da man nicht vorhersagen kann, wie vital die positiv angereicherten Zellen nach der Behandlung mit den Antikörpern sind, und ob sie nicht z.B. durch Überstimulation in Apoptose übergehen oder anders in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, wurde eine andere Möglichkeit gesucht, diese spezifischen T-Zellen zu generieren. Dies geschah durch Klonierungsversuche.

3.4. Klonierungen von T-Zellen aus vakzinierten Mäusen

Da die Zellzahlen der Vβ4- und Vβ6-positiven T-Zellen nach Anreicherung nicht sehr hoch lagen und die Zellen sich auch bei anschließender klonaler Expansion durch anti-CD28-Antikörper nicht im erhofften Maß vermehren ließen, wurde durch Klonierung von Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen versucht, A20-spezifische T-Zellen mit bestimmtem TZR-Repertoire zu generieren.

3.4.1. Herstellung von T-Zell-Klonen

Wie in Kapitel 2.2.7. beschrieben, wurden Milz- und Lymphknotenzellen aus immunisierten Mäusen zur Klonierung verwendet. Da bisher die Klonierung von murinen T-Zellen in unserem Labor noch nicht etabliert war, mussten verschiedene Methoden getestet werden. Es gab drei unterschiedliche Ansätze, die alle jeweils 3 Wochen mit A20-Zellen und APZ (bestrahlten Milzzellen) restimuliert wurden. Im ersten Ansatz wurden die Milz- und Lymphknotenzellen in limitierender Verdünnung in U96-Loch-Platten ausgesät. Für den zweiten Ansatz wurden die Zellen zuerst wie bei einer normalen Langzeitstimulation in 24-Loch-Platten 7 Tage mit A20-Zellen

restimuliert, bevor auch diese Zellen in U96-Loch-Platten kloniert wurden. Im letzten Ansatz wurden direkt aus Milz- und Lymphknoten immunmagnetisch angereicherte T-Zellen (s. Kap. 2.2.6.1.) in U96-Loch-Platten eingesetzt. Diese drei Ansätze wurden jeweils nochmal unterteilt in eine Gruppe, die IL-2 nach 48 Stunden bekam, so wie es bei der Langzeitstimulation bei uns im Labor etabliert war, und eine zweite Gruppe, der IL-2 nach 3 Stunden zugegeben wurde, wie es bei Klonierungen von humanen T-Zellen beschrieben ist (Nößner, pers. Mitteilung; Übersicht über Klonierungsansätze s. Abb. 2.2.-1). Durch die Zugabe von IL-2 nach 3 Stunden sollte sich laut Mitteilung die T-Zell-Population während der Klonierung hauptsächlich zu $CD4^+$ T-Zellen entwickeln. Von $CD4^+$ T-Zellen war schon bekannt, dass sie auch etablierte Tumoren nach adoptivem Transfer (Therapie) abstoßen können (Egeter et al., 2000).

Die ersten wachsenden Klone zeigten sich nach der 3. Restimulation im Ansatz mit angereicherten T-Zellen. Ebenso sah man proliferierende Zellen im Ansatz, in dem die Zellen vor Klonierung restimuliert wurden. Die wachsenden Zellen wurden ab einer bestimmten Zelldichte in Löcher von 24-Loch-Platten überführt und weiter mit A20-Zellen restimuliert, bis genügend Zellen für adoptive Mausversuche und TZR-Repertoire-Analysen vorhanden waren. Nach der 5. Restimulation konnten erste Mausversuche mit T-Zellen angesetzt werden. Bis zum Ende der 8. Restimulation konnten sieben „Klone“ gewonnen werden, die hinsichtlich ihrer Tumorprotektivität und ihres TZR-Repertoires untersucht wurden.

Andere „Klone“ stagnierten im Wachstum ab einer bestimmten Restimulierungsrunde und wurden nur hinsichtlich ihres TZR-Repertoires analysiert.

Fast alle T-Zell-„Klone“, die in Mausversuchen eingesetzt werden konnten, wurden im Klonierungsansatz mit angereicherten T-Zellen generiert, allein aus diesem Ansatz konnten sechs der sieben adoptiven Transferversuche angesetzt werden. Vier dieser „Klone“ wuchsen aus ursprünglich 20.000 ausgesäten T-Zellen, nur zwei aus ursprünglich 200.000 T-Zellen. Dabei war es unerheblich, wann die Zellen das IL-2 bekamen. Nur ein „Klon“ entstand aus dem Ansatz, bei dem vor der Klonierung die Milz- und Lymphknotenzellen restimuliert wurden. Direkt in U96-Loch-Platten eingebrachte Milz- und Lymphknotenzellen starben schon vor der 6. Restimulation, ohne zu proliferieren.

3.4.2. *In-vitro*-Charakterisierung der „Klone"

Für die *In-vitro*-Charakterisierung wurden mindestens 100.000 T-Zellen in TRI-Reagent™ aufgenommen und anschließend die RNS isoliert. Es wurden TZR-Analysen und teilweise Sequenzierungen der erhaltenen TZR-Banden durchgeführt und die erhaltenen Zellen so auf ihre Klonalität hin untersucht.

Bei einem Teil der Klonierungen wurden *In-vivo*- und *In-vitro*-Versuche durchgeführt (s. Tab. 3.4.-1), bei einem anderen Teil wurde nur das TZR-Repertoire bestimmt (s. Tab. 3.4.-2 und -3), weil sich die Zellen durch weitere Stimulationen nicht mehr expandieren ließen. Zum Zeitpunkt der adoptiven Transferversuche mit klonierten T-Zellen wurde auch das TZR-Repertoire bestimmt.

Bei der Betrachtung des TZR-Repertoires zeigte sich bei den entstandenen „Klonen" ein sehr unterschiedliches Bild. Bei der Klonierung von angereicherten T-Zellen sieht das Gesamtbild des TZR-Repertoires (s. Tab. 3.4.-3) der analysierten „Klone" eingeschränkter aus als bei Klonierung nach einer Restimulation (s. Tab. 3.4.-2). Insgesamt sind auch mehr „Klone" aus angereicherten T-Zellen so weit gewachsen, dass adoptive Transferversuche durchgeführt werden konnten (s. Tab. 3.4.-1). Nur einer dieser erhaltenen „Klone" war monoklonal (s. Abb. 3.4.-1). Wie erwartet, trat bei den meisten „Klonen" eine starke Einschränkung im TZR-Repertoire früher auf als bei der etablierten Langzeitstimulation ohne Klonierung. Dort war eine Einschränkung auf nur zwei bis drei Vβ-Ketten erst am Ende der 9. Restimulation aufgetreten (Kronenberger, pers. Mitteilung). Jetzt zeigte sich allerdings eine solche Einschränkung schon am Ende der 5. Restimulation.
Eine einzelne Vβ4-Bande wurde bei einem „Klon" detektiert (Abb. 3.4.-1 und Tab. 3.4.-1). In einem früheren Versuch konnte durch mehrere Restimulationen von T-Zellen aus immunisierten Mäusen ebenfalls eine T-Zell-Population generiert werden, die außer Vβ4-Jβ1.3 noch Vβ6-Jβ2.3 exprimierte und in Mäusen zu 100% protektiv war (s. auch Kap. 3.3.). Es wurde diskutiert, dass die Protektivität zumindest teilweise von dieser Vβ4-Kette vermittelt würde.

Tabelle 3.4.-1: *In-vitro*-Charakterisierung adoptiv transferierter „Klone" und *In-vivo*-Tumorprotektivität

Bezeichnung des „Klons"	Art der Klonierung	ursprüngliche Zellzahl	Zugabezeitpunkt von IL-2	Zeitpunkt des adoptiven Transfers	benutze(r) TZR	Jβ-Sequenz	Überleben in %
E4-1	nach T-Zell-Anreicherung	20.000	nach 48h	Ende 5. Rest.	Vβ4	Jβ1.3	0%
A7	nach T-Zell-Anreicherung	20.000	nach 3h	Ende 5. Rest.	Vβ8.2, Vβ8.3	Jβ2.6*, Jβ2.6*	17%
H11	nach T-Zell-Anreicherung	20.000	nach 3h	Ende 5. Rest.	polyklonal	n.d.	25%
E4-2	nach T-Zell-Anreicherung	200.000	nach 48h	Ende 6. Rest.	polyklonal	n.d.	25%
C2	nach T-Zell-Anreicherung	20.000	nach 3h	Ende 6. Rest.	polyklonal	n.d.	25%
B4	nach T-Zell-Anreicherung	200.000	nach 3h	Ende 7. Rest.	Vβ1, Vβ4 Vβ18**	Jβ2.1, Jβ1.6, n.d.	25%
G9	nach vorheriger Restimulation	200.000	nach 48h	Ende 8. Rest.	polyklonal	n.d.	0%

Wie man erkennen kann, ist nur ein wirklicher Klon entstanden (E4-1). Allerdings konnten diese T-Zellen keine Tumorprotektivität vermitteln.
Eine Sequenzierung der PCR-Produkte wurde bei einem polyklonalen Repertoire für nicht sinnvoll erachtet, da in T-Zellen mit kaum eingeschränktem Repertoire die Vβ- mit vielen Jβ-Gensegmenten rearrangieren und dies zu nicht auswertbaren Mischsequenzen führt (K. Kronenberger, 2002).

Rest.: Restimulation
n.d.: Bande wurde nicht sequenziert
Jβ2.6*: Mischsequenz bis Position 7
Vβ18**: schwach ausgeprägte Bande, keine Sequenzierung möglich

Tabelle 3.4.-2: Klonierung nach Restimulation (7d): TZR-Vβ-Repertoires von T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen

„Klon“	Ausgangs-zellzahl	TZR-Analyse	1	2	3.1	4	5.1	6	7	8.1	8.2	8.3	9	10	11	12	13	14	15	16	18	20
A11	200.000	Ende 9. Rest.	+++	-	-	+++	-	++	-	+++	++	+++	+	+	-	-	++	+++	+	++	-	-
H8	200.000	Ende 9. Rest.	+++	-	-	+	-	++	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-
H3	200.000	Ende 9. Rest.	+++	-	-	-	-	+++	+	++	+++	+++	+	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	-
F7	200.000	Ende 9. Rest.	++	++	-	+	-	++	++	+++	++	++	-	+	+	-	++	+++	+	-	+	+
G7	200.000	Ende 9. Rest.	+++	++	-	-	-	-	-	++	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
H10	2.000	Ende 9. Rest.	++	++	-	++	-	+	+	+++	+++	-	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	-	+
E12	2.000	Ende 9. Rest.	+++	+	-	-	-	+++	-	+++	+++	+++	+	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-

Tabelle 3.4.-3: Klonierung nach T-Zell-Anreicherung: TZR-Vβ-Repertoires von T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen

„Klon“	Ausgangs-zellzahl	TZR-Analyse	1	2	3.1	4	5.1	6	7	8.1	8.2	8.3	9	10	11	12	13	14	15	16	18	20
E12	20.000	Ende 8. Rest.	+	+++	-	-	-	-	+++	++	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	++	+++	+	-
B9	20.000	Ende 8. Rest.	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+	+
D2	2.000	Ende 8. Rest.	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4	2.000	Ende 8. Rest.	+	-	-	-	-	+++	+	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	2.000	Ende 8. Rest.	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

-: Keine Bande zu detektieren +: Schwache Bande ++: Mittelstarke Bande +++: Sehr starke Bande Rest.: Restimulation

Um zu überprüfen, ob bei dem gefundenen Klon ein bestimmtes J-Segment an Vβ4 umgelagert worden war oder ob sich noch Mischsequenzen im J-Segment finden ließen, wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert.

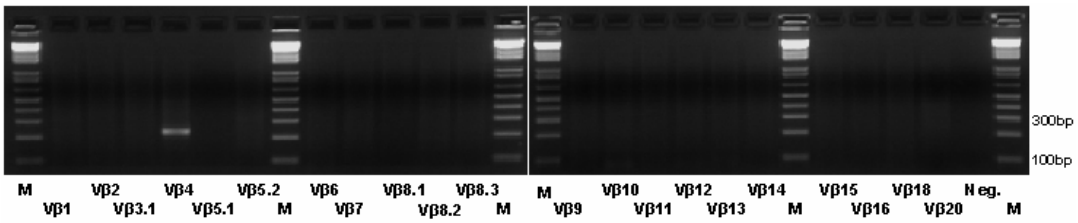


Abbildung 3.4.-1: TZR-Repertoire des T-Zell-Klons E4-1

Als einzige Bande ist Vβ4 zu erkennen. Diese wurde aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert, um den TZR auch hinsichtlich seines Jβ-Segmentes zu definieren.
M: Marker, 1kb plus
Neg.: Negativkontrolle
bp: Basenpaare

Nach Sequenzierung zeigte sich, dass es sich um einen wirklichen Klon (E4-1, Abb. 3.4.-1 und Tab. 3.4.-1) handelte, bei dem das Vβ4-Gen an Jβ1.3 umgelagert war (Abb. 3.4.-2).

Klonierung nach T-Zell-Anreicherung, Klon E4-1

Vβ4-Jβ1.3:

V-Segment: 5'-AGTTCAAAGAAAAACCATTTAGACCTTCAGATCACAGCTCTAAA
GCCTGATGACTCGGCCACATACTTCTGTGCCAGCAGCCA-

NDN-J-Segment: -AGATGGGGGACAAAAATACGCTCTATTTTGGAGAAGGAAGCCGG
CTCATTGTTGTAG-

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

Abbildung 3.4.-2: Basenabfolge der sequenzierten Vβ4-Bande des T-Zell-Klons E4-1

Die CDR3-Region ist unterstrichen: Sie erstreckt sich über die V-D-J-Verknüpfungsstellen der β-Kette und kodiert für die Antigenbindungstelle.

Auch die anderen Sequenzierungen zeigten, dass meist nur ein J-Segment an ein V-Segment rearrangiert war, und es kaum Mischsequenzen gab.

3.4.3. *In-vivo*-Versuche mit klonierten T-Zellen

Die anhand ihres TZR-Repertoires näher charakterisierten T-Zellen aus den Klonierungsversuchen wurden auch auf ihre tumorprotektive Wirkung hin untersucht. Dazu wurden in adoptiven Transfers Naivmäuse mit jeweils 5 x 10^5 klonierten Zellen behandelt. Diese T-Zellen wurden präventiv zusammen mit einer letalen Dosis A20-Zellen i.p. verabreicht.
Tabelle 3.4.-1 zeigt die Überleber in %, die nach 150 Tagen noch keinen Tumor entwickelt hatten. Wenn alle Mausversuche mit klonierten T-Zellen zusammengefasst werden, beträgt die Quote der Langzeitüberleber 17%.
Der Vβ4-T-Zell-Klon (s. Kap. 3.4.2.) war nicht tumorprotektiv. Damit war bewiesen, dass die Vβ4-Kette für den Tumorschutz allein nicht ausreicht.

Um zu überprüfen, ob die T-Zellen der überlebenden Mäuse die A20-Zellen bei erneutem Kontakt erkennen können und eventuell ein eingeschränktes TZR-Repertoire aufweisen, wurde den Mäusen erneut eine letale Dosis A20-Zellen i.p. gespritzt und nach vier Tagen Milz und Lymphknoten entnommen. Es konnte aber keine erhöhte IFN-γ-Produktion dieser T-Zellen im Vergleich zu Naivmäusen im Durchflusszytometer und auch kein eingeschränktes TZR-Repertoire dieser IFN-γ^+ Zellen festgestellt werden (s. Abb. 3.4.-3).

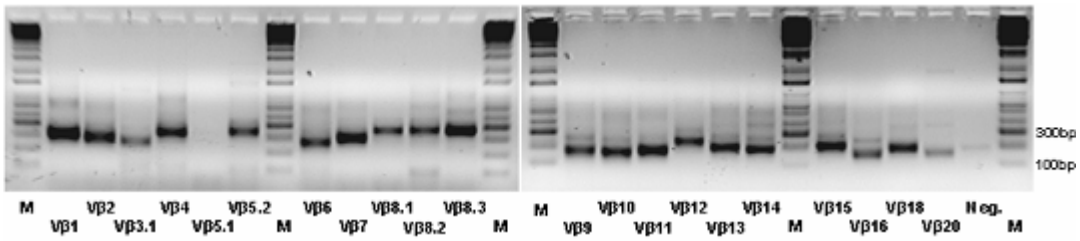


Abbildung 3.4.-3: TZR-Repertoire von IFN-γ-angereicherten Milz- und Lymphknotenzellen einer Überlebermaus, die Zellen des A7-Klons bekommen hatte, und der nach 150d erneut eine letale Dosis A20-Zellen i.p. gespritzt wurde

Exemplarisch wurde nur das TZR-Repertoire einer Überlebermaus gezeigt. Bei den anderen Mäusen ergab sich ein identisches Bild. Es ist das volle Repertoire der Vβ-Ketten vorhanden.
M: Marker, 1kb plus
Neg.: Negativkontrolle
bp: Basenpaare

Zusammenfassend für das Kapitel 3.4. kann festgehalten werden, dass tatsächlich ein T-Zell-Klon generiert werden konnte, der eine der früher beobachteten Vβ-Ketten

exprimierte und zusätzlich noch eine Umlagerung an das entsprechende Jβ-Segment aufwies. Allerdings zeigte sich, dass dieser Klon keine *In-vivo*-Protektion vermitteln konnte.

Die Vβ6-Kette konnte nicht weiter untersucht werden, da sich bei den Klonierungen keine entsprechende Population bildete.

Es konnten aber mehrere T-Zellpopulationen mit sehr eingeschränktem TZR-Repertoire, die durch Klonierung entstanden waren, weiter hinsichtlich ihrer Tumorprotektivität untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass diese Zellpopulationen teilweise *in vivo* vor einem Tumorwachstum schützen konnten, allerdings war dazu anscheinend eine Poly- oder wenigstens Oligoklonalität der T-Zellen wichtig. Damit ist gezeigt, dass die Abstoßung der A20-Zellen nicht von T-Zellen gegen ein spezifisches Abstoßungsantigen abhängig ist, sondern von verschiedenen T-Zellen mit Spezifitäten gegen verschiedene Tumorantigene.

3.5. Nachweis Idiotyp-spezifischer T-Zellen nach Restimulationen

Wie in der Einleitung erwähnt, spielt der Idiotyp (Id) *in vivo* als Abstoßungsantigen eine untergeordnete Rolle. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass Id-spezifische T-Zellen durch Immunisierung in geringer Frequenz entstehen und diese durch *In-vitro*-Restimulation expandiert werden können.

Für den Nachweis Id-spezifischer Zellen mussten Peptide gefunden werden, die vom Id abgeleitet sind. Zwei potenziell H-2K^d-bindende Peptide wurden aus einer Veröffentlichung (Armstrong et al., 2002) entnommen, deren Autoren diese Peptide mit einem von Parker et al., 1994, entwickelten Computerprogramm gefunden hatten. Eines der zwei Peptide aus der Veröffentlichung, hier MO1 genannt, wurde von *in vitro* stimulierten zytotoxischen T-Zellen aus BALB/c-Mäusen erkannt, die nach Immunisierung mit einem rekombinanten Adenovirus, das für den A20-Lymphom-Id kodiert, gewonnen wurden. Das zweite Peptid aus dieser Veröffentlichung, MO3 benannt, wurde nicht erkannt. Zusätzlich zu den Peptiden aus der Literatur wurde mittels Vorhersageprogrammen (Parker und SYFPEITHI zur Vorhersage der MHC-Bindung, PAProC zur Vorhersage der Proteasomen-Schnittstellen) eine weitere Sequenz aus dem Id-Protein ausgesucht (MO2). Die drei vom Id abgeleiteten Peptide sind jeweils neun AS lang.

3.5.1. Peptid-Abfrage-System

Zusätzlich zu den oben genannten Peptiden wurde als Negativkontrolle das Peptid TYQRTRALV, das aus dem Influenza-A-Virus stammt und als H-2K^d-restringiertes T-Zell-Epitop bekannt ist, genutzt. Als Überprüfung auf Kreuzpräsentation von Antigenen wurde das AH1-Peptid, ein H-2L^d-restringiertes T-Zell-Epitop, das vom MuLV-gp70-Hüllprotein stammt und von CT26-Tumorzellen exprimiert wird (Casares et al., 2001; Rice et al., 2002), getestet.
Die Präsentation der Peptide erfolgte durch bestrahlte Milzzellen, die 2 Stunden mit den entsprechenden Peptiden im Brutschrank inkubiert wurden. Danach wurden die *in vitro* sechs bis sieben Mal restimulierten T-Zellen aus immunisierten Mäusen zugegeben. Im Vergleich dazu wurden ebenso restimulierte T-Zellen aus naiven BALB/c-Mäusen getestet.

Für die Positivkontrolle der Peptidpräsentation wurden BALB/c-Mäuse mit dem stark immunogenen TCF1-Peptid, das zusätzlich noch an OVA gekoppelt war (TCF1-OVA; von E. Kremmer, GSF) immunisiert. Nach einer Woche wurden Milzzellen gewonnen und einmal *in vitro* mit TCF1 restimuliert. Bestrahlte Milzzellen, über die die Präsentation stattfinden sollte, wurden mit TCF1-Peptid 2 Stunden inkubiert und dann die zuvor beschriebenen TCF1-spezifischen T-Zellen dazugegeben (s. Abb. 3.5.-1 A und B).
Der Kulturüberstand aus diesen Ansätzen wurde im Hinblick auf GM-CSF-Produktion untersucht.

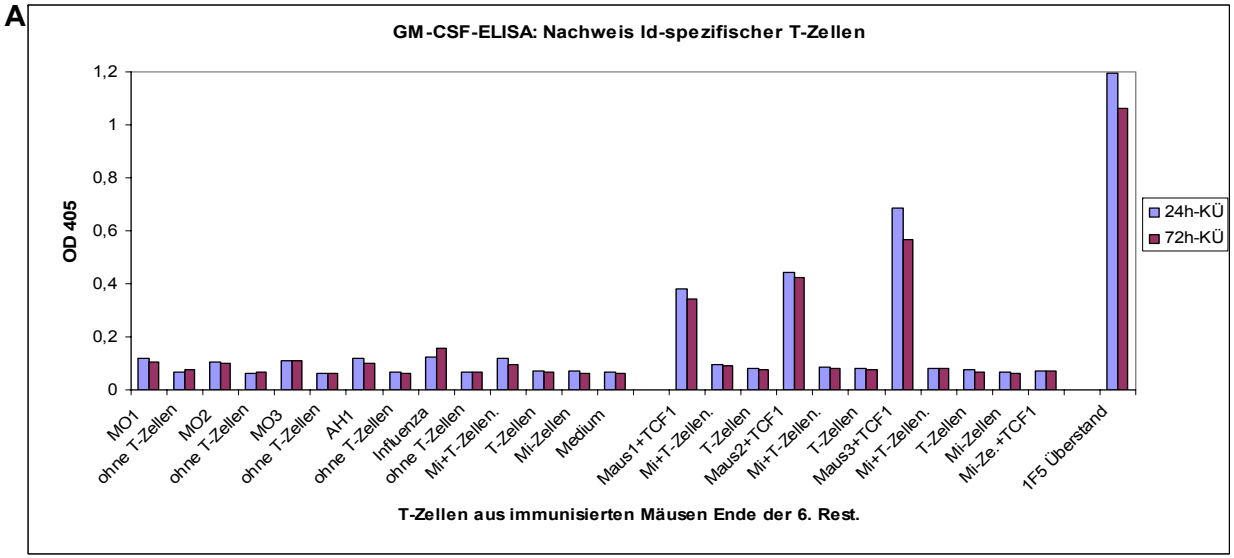
3.5.2. Qualitativer und semi-quantitativer *In-vitro*-Nachweis Idiotyp-spezifischer T-Zellen

Die Kulturüberstände aus den oben beschriebenen Ansätzen wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, nach 24 und 72 Stunden, entnommen.
Als Positivkontrolle für den ELISA wurde Kulturüberstand des 1F5-Klons, eine GM-CSF-produzierende Zelle, eingesetzt.

Wie man aus Abbildung 3.5.-1 A und B erkennen kann, funktioniert die Präsentation der Peptide durch bestahlte Milzzellen sehr gut (Maus 1-3 + TCF1). Der Hintergrund der Kontrollen in Abbildung 3.5.-1 A (*in vitro* restimulierte T-Zellen aus immunisierten Mäusen) liegt sehr niedrig bei 0,12 OD, allerdings bewegt sich auch die GM-CSF-Produktion der T-Zellen, die die Peptide präsentiert bekamen, nicht über diesen Hintergrund hinaus. In Abbildung 3.5.-1 B (*in vitro* restimulierte T-Zellen aus naiven Mäusen) kann man einen erhöhten Hintergrund des Kontrollgemisches aus bestrahlten Milzzellen und T-Zellen erkennen, der sich bei 0,34 bewegt. Auch hier kommt die GM-CSF-Konzentration in den Peptidansätzen MO1, MO2 und MO3 nicht über diesen Wert hinaus. Der gezeigte Versuch ist exemplarisch für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche mit identischem Ergebnis.

Es kann also festgehalten werden, dass keines der drei hier getesteten vom Id-abgeleiteten Peptide die A20-spezifischen T-Zellen zur GM-CSF-Produktion anregt, obwohl zumindest für MO1 in der Literatur Idiotyp-spezifische T-Zellen beschrieben sind, die dieses Peptid erkennen (Armstrong et al., 2002).

A



B

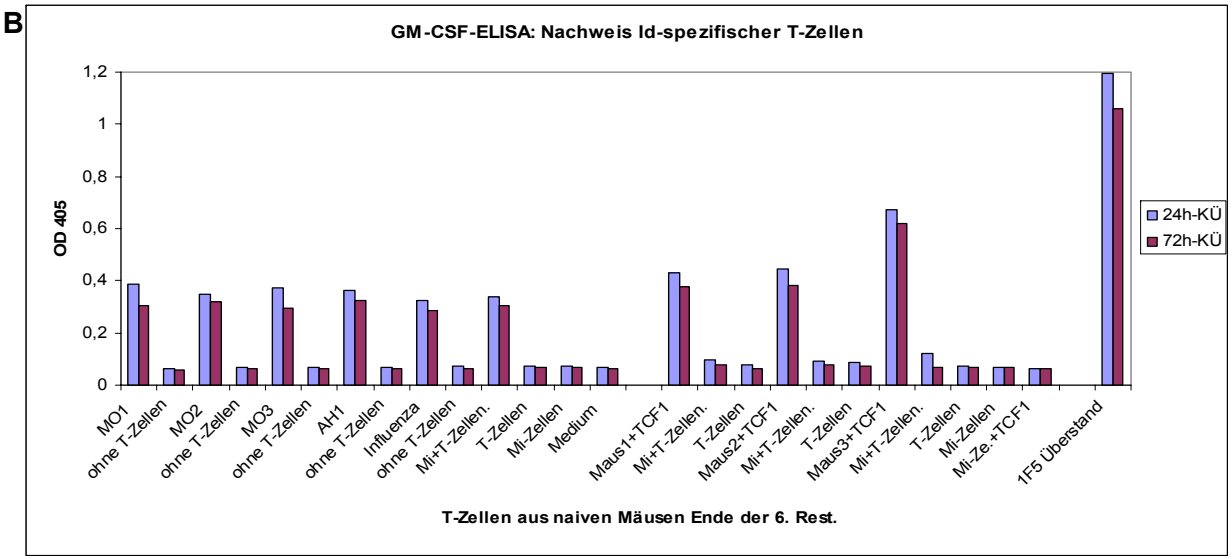


Abbildung 3.5.-1 A und B: Nachweis Id-spezifischer T-Zellen am Ende der 6. Restimulation aus
A: Triom-immunisierten Mäusen
B: naiven Mäusen

Die Präsentation der Peptide durch bestrahlte Milzzellen funktioniert gut, wie man an der GM-CSF-Produktion der T-Zellen aus OVA-TCF1-immunisierten Mäusen erkennen kann (A und B: Maus 1-3 + TCF1).
A: Der Hintergrund (bestrahlte Milzzellen und T-Zellen als Gemisch bzw. jeweils einzeln sowie Peptid-präsentierende Milzzellen allein) liegt sehr niedrig. Die GM-CSF-Produktion von restimulierten T-Zellen, die Id-Peptide präsentiert bekommen, liegt in diesem Hintergrund.
B: Auch hier ist die Produktion von GM-CSF von Milz- und T-Zellen *per se* sehr gering, allerdings wird bei der Mischung dieser beiden Zellsorten sehr viel GM-CSF ausgeschüttet. Die relativ hohen GM-CSF-Werte, die bei den Gemischen von T-Zellen mit Id-Peptid-präsentierenden Milzzellen auftreten, liegen im Hintergrund, sind also nicht auf Peptiderkennung zurückzuführen.

MO1: T-Zellen + MO1-präsentierende, bestrahlte Milzzellen
MO2: T-Zellen + MO2-präsentierende, bestrahlte Milzzellen
MO3: T-Zellen + MO3-präsentierende, bestrahlte Milzzellen
AH1: T-Zellen + AH1-präsentierende, bestrahlte Milzzellen
Influenza: T-Zellen + Influenza-Peptid-präsentierende, bestrahlte Milzzellen
ohne T-Zellen: das entsprechende Peptid präsentierende Milzzellen ohne T-Zellen

3.6. Suche nach weiteren Abstoßungsantigenen im A20-B-Zell-Lymphom

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass der Ig-Id des A20-Lymphoms kein potentes Abstoßungsantigen ist, wurde damit begonnen, nach anderen in A20-Zellen überexprimierten Antigenen zu suchen. Daher wurde in Datenbanken nach Äquivalenten bekannter menschlicher Abstoßungsantigene gesucht und diese Kandidatengene mittels quantitativer RT-PCR (Lightcycler-SYBR® Green I, s. Kap. 2.3.4.2.) auf ihre Expression hin untersucht.

Zuerst wurden Primer für die Abstoßungsantigene unter Zuhilfenahme von Computerprogrammen ausgewählt und anschließend auf ihre Einsetzbarkeit im Lightcycler ausgetestet. Die Ergebnisse wurden auf die Expression des Haushaltsgens β-Actin und die Expression in Milzzellen normiert (s. Kap. 2.3.4.2.).

Kandidaten-Antigene sind jene Proteine, die sowohl in A20-Zellen als auch BiV-Triomzellen überexprimiert werden. Dies wurde insbesondere bei TERT und Bax beobachtet (s. Abb. 3.6.-1).

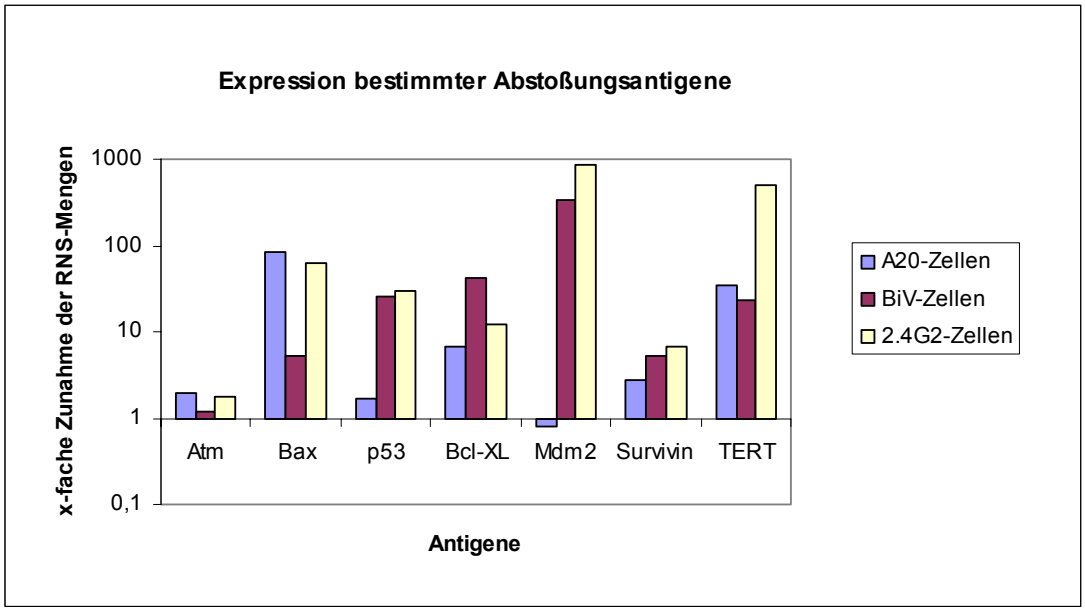


Abbildung 3.6.-1: Expression bestimmter Abstoßungsantigene in A20-Zellen, dem Fusionspartner 2.4G2 und den aus der Fusion entstandenen BiV-Zellen

Die Werte sind auf die Expression des Haushaltsgens β-Actin normiert. Die Expression der jeweiligen Antigene in Milzzellen wurde auf 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei Versuchen.

Wenn weitere Antigenkandidaten durch die quantitative RT-PCR ausgemacht wurden, kann dazu übergegangen werden, Einzelspezies-RNS dieser Antigene in APZ zu transfizieren (z.B. mittels Lipofektion oder Elektroporation). Die Reaktivität von *in vitro* restimulierten T-Zellen aus immunisierten Mäusen kann dann gegen die transfizierten APZ überprüft werden. Als Ablesesystem dieser Reaktivität würde die IFN-γ-Produktion, quantifiziert durch ELISA oder Elispot, herangezogen werden.

3.7. Morphologische Untersuchungen zur Kompartimentierung von Triom- und A20-Zellen

Es wurden bei verschiedenen Immunisierungs- und Therapieschemata unterschiedliche Effekte beobachtet. In der Präventionssituation können A20-Zellen s.c. oder i.p. gegeben werden, um anschließend erfolgreich abgestoßen zu werden. Da in der Therapiesituation die Triom-Zellen aber nur nach i.v.- und nicht nach i.p.-Gabe der A20-Zellen zur Abstoßung führen, scheint die Kompartimentierung der Triom- und A20-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen.
Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei i.p.-Gabe die Tumorzellen für das Immunsystem zu spät sichtbar werden, und das Tumorwachstum dann schon zu weit fortgeschritten ist, um von immunkompetenten Zellen unterbunden zu werden. Die A20-Zellen müssten also zu einem früheren Zeitpunkt in den Lymphknoten erscheinen, um noch erfolgreich vom Immunsystem bekämpft werden zu können.

Um die Wanderung der Triom- und A20-Zellen nach unterschiedlicher Applikation *in vivo* verfolgen zu können, mussten beide Zelllinien so markiert werden, dass sie nach einigen Stunden bzw. Tagen in den verschiedenen Kompartimenten der Maus wiederzufinden waren.
Die BiV-Triomzellen waren sehr einfach mit dem nicht-toxischen Fluorochrom CFSE markierbar und fluoreszierten auch noch nach einigen Tagen, während deren sie in Kultur gehalten wurden. Trotz der durch Zellteilung abnehmenden Fluoreszenzintensität der einzelnen Triomzellen waren alle Zellen im Fluoreszenzmikroskop gut sichtbar (s. Abb. 3.7.-1 A und B).

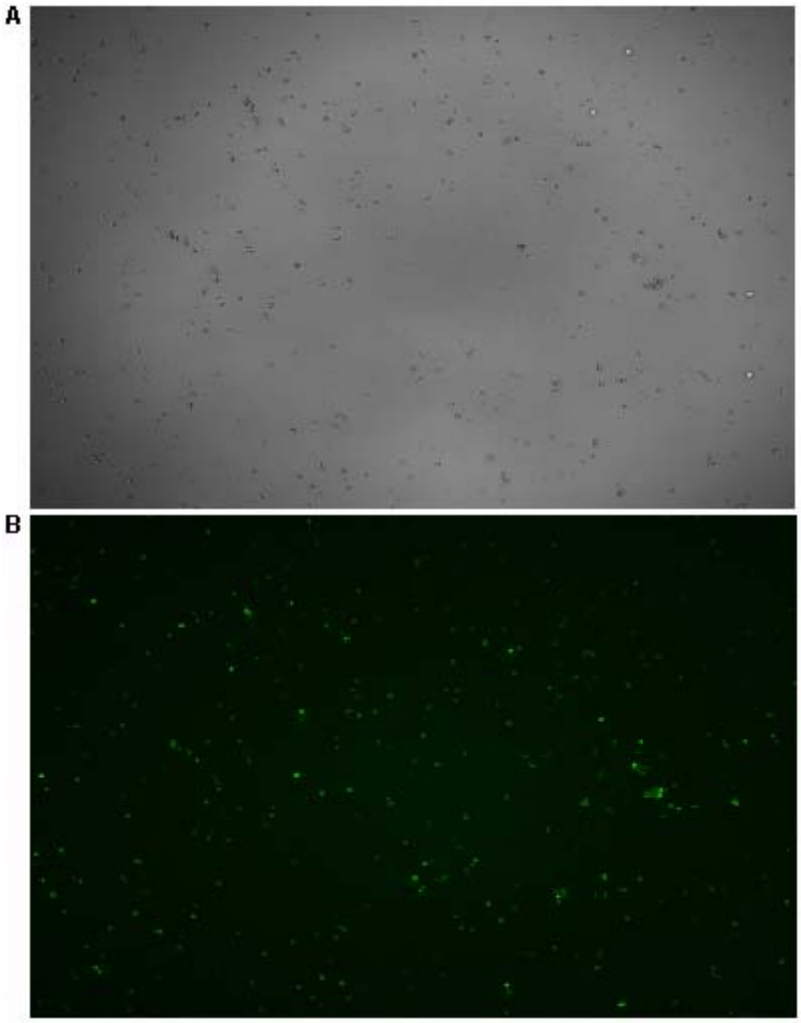


Abbildung 3.7.-1: BiV-Triomzellen nach CFSE-Markierung im Durchlichtmikroskop (A) und mit zugeschaltetem eGFP-Filter (B) in 50-facher Vergrößerung

Alle BiV-Zellen sind nach Markierung mit CFSE im Fluoreszenzmikroskop gut zu sehen. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen lässt nach einigen Zellteilungen durch Verteilung des CFSE auf die Tochterzellen nach, aber die Zellen sind dann immer noch gut zu detektieren.

Bei den Versuchen, A20-Zellen mit CFSE anzufärben, stellte sich jedoch heraus, dass diese Zellen durch die kurze Generationszeit der Lymphom-Zellen schnell an Fluoreszenzintensität verloren und nach 1-2 Tagen viele Zellen nicht mehr im Fluoreszenzmikroskop sichtbar waren. Daraufhin wurde ein eGFP-Vektor in die A20-Zellen transduziert. Nach einigen Tagen in Kultur wurden diese Zellen mit einem Zellsortierer anhand ihrer GFP-Produktion getrennt (s. Abb. 3.7.-2).

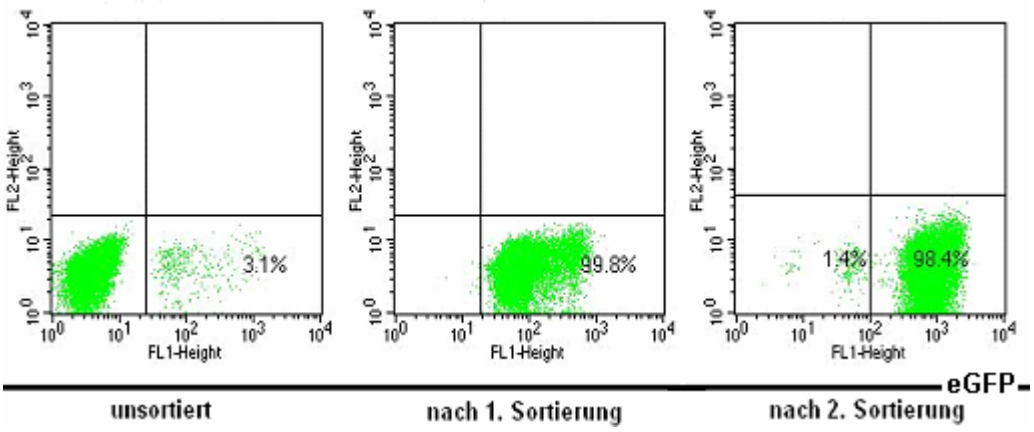


Abbildung 3.7.-2: Sortierung auf GFP-produzierende A20-Zellen nach Transduktion mit einem eGFP-Vektor; Quantifizierung der positiven Zellen durch Durchflusszytometrie

Zuerst wurde nur auf GFP-positive Zellen sortiert. Dabei fiel auf, dass es zwei Populationen gab, die unterschiedlich stark GFP produzierten. Da die stärker produzierende Fraktion im Fluoreszenzmikroskop wesentlich besser ausgemacht werden konnte, wurde in einer zweiten Sortierung diese Population angereichert.

Die mit dem Vektor transduzierten A20-Zellen wurden i.p. und i.v. in BALB/c-Mäuse gespritzt. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass die A20-Zellen nicht mehr in den Mäusen anwuchsen. Auch bei wesentlich höherer Dosierung der A20-Zellen entwickelten sich keine Tumoren. Da GFP als starkes Immunogen bekannt ist, konnte in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass die Abstoßung der A20-Zellen über dieses Protein stattfand. Außerdem waren die Mäuse, die die GFP-transduzierten A20-Zellen bekommen hatten, nicht gegen den Wildtyp der A20-Zellen immun.

Aufgrund dieser Tatsachen wurden weitere Versuche mit den transduzierten A20-Zellen in SCID-Mäusen durchgeführt, da in diesen Mäusen keine über das GFP vermittelte T-Zell-Abstoßung der A20-Zellen stattfinden konnte. Diese Mäuse entwickelten erwartungsgemäß nach Gabe von 1 x 10^6 GFP-transduzierten A20-Zellen Lymphome.

Um die Migration der Zellen zu verfolgen, wurden *In-vivo*-Versuche durchgeführt. Dabei wurden BALB/c-Mäusen 2 x 10^6 bzw. 4 x 10^6 CFSE-markierte BiV-Zellen s.c. bzw. i.p. gespritzt. SCID-Mäuse bekamen 2 x 10^6 GFP-transduzierte A20-Zellen i.p. bzw. i.v. gespritzt. Axilläre, inguinale und mesenteriale Lymphknoten wie auch die Milz wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (1,5, 5 und 24 Std., z.T. 48 Std.) aus den Mäusen entnommen und getrennt weiter behandelt. Die Quantifizierung der BiV-

bzw. A20-Zellen erfolgte über limitierende Verdünnung (Tab. 3.7.-1). Bei Versuchen mit SCID-Mäusen wurde berücksichtigt, dass diese Mäuse keine T- und B-Zellen haben. Deswegen wurden nur 1 x 10^4 Zellen pro Loch eingesetzt, bei den Versuchen mit BALB/c-Mäusen waren es 1 x 10^5 Zellen.

3.7.1. Wanderung CFSE-markierter BiV-Zellen in BALB/c-Mäusen

Dass Triom-Zellen trotz ihres xenogenen Anteils in der Milz von BALB/c-Mäusen noch 79 Tage nach i.p.-Injektion eindeutig nachzuweisen waren, wurde schon von Graf et al., 2003, beschrieben. Dort wurde auch festgestellt, dass die in Mäusen überlebenden Vakzinezellen *in vitro* nur noch geringe Proliferation zeigten.

Es wurden 2 x 10^6 CFSE-markierte BiV-Zellen s.c. bzw. 4 x 10^6 i.p. gespritzt. Zu den oben genannten Zeitpunkten wurden die axillären und inguinalen Lymphknoten bei s.c. gespritzten Mäusen ipsilateral entnommen und getrennt weiter bearbeitet. Bei i.p. behandelten Mäusen wurde die mesenterialen Lymphknoten untersucht.

Auch hier konnte wie bei Graf et al., 2003, eine nur noch geringe Proliferation der BiV-Zellen, nachdem sie aus den Mäusen isoliert wurden, in Kultur gesehen werden. Tabelle 3.7.-1 zeigt die Wiederfindungsrate der Vakzinezellen in den verschiedenen Kompartimenten nach s.c.- oder i.p.-Gabe.

Tabelle 3.7.-1: Quantifizierung CFSE-markierter BiV-Zellen nach limitierender Verdünnung (1 x 10^5 Zellen pro Loch)

s.c.-Gabe	axilläre LK	inguinale LK		i.p.-Gabe	mesenteriale LK
1,5h	19,8%	31,2%		**1,5h**	52,6%
5h	17,2%	35,3%		**5h**	95,3%*
24h	21,1%	59,5%		**24h**	-
48h	n.d.	n.d.		**48h**	-

Die Prozentwerte beziehen sich jeweils auf die Anzahl der Löcher, in denen CFSE-markierte BiV-Zellen zu finden waren, im Verhältnis zu der Gesamtzahl der Löcher, die ausplattiert wurden.
Für die s.c.-Versuche wurden die Zellen aus jeweils fünf Mäusen gemischt.
Bei i.p.-Versuchen waren es zu jedem Zeitpunkt nur die mesenterialen Lymphknotenzellen aus einer Maus.
* : Es waren jeweils 3-5 CFSE-markierte BiV-Zellen pro Loch zu finden.
LK: Lymphknoten
n.d.: Versuch nicht durchgeführt

Wenn man die Daten der s.c.-applizierten BiV-Zellen betrachtet, kann man erkennen, dass sich die Vakzinezellen innerhalb der ersten Stunden nach Applikation sehr schnell in den Lymphknoten wiederfinden lassen.
Nach i.p.-Gabe der BiV-Zellen reichern sich diese innerhalb der ersten 5 Stunden in den mesenterialen Lymphknoten sehr stark an, aber nach 24 Stunden sind dort keine BiV-Zellen mehr zu detektieren.

3.7.2. Wanderung GFP-transduzierter A20-Zellen in SCID-Mäusen

Die Platten wurden direkt nach dem Ausplattieren im Mikroskop angesehen und die fluoreszierenden Zellen gezählt (s. Tab. 3.7.-2). Danach wurden die Platten in den Brutschrank gestellt und nach einigen Tagen wieder angesehen. Die anfangs gezählten, fluoreszierenden Zellen hatten sich geteilt und jede einzelne einen fluoreszierenden Zellhaufen gebildet (s. Abb. 3.7.-3).

Tabelle 3.7.-2: Quantifizierung GFP-transduzierter A20-Zellen nach limitierender Verdünnung (1 x 10^4 Zellen pro Loch)

i.p.-Gabe	Milz	axilläre LK	inguinale LK	mesenteriale LK
1,5h	100%*	-	96,9%*	6,25%
5h	100%*	-	-	3,3%
24h	35,4%	-	-	-

i.v.-Gabe	Milz	axilläre LK	inguinale LK	mesenteriale LK
1,5h	12,5%	-	-	2,1%
5h	3,1%	-	-	-
24h	-	-	-	-

Die Prozentwerte beziehen sich jeweils auf die Anzahl der Löcher, in denen GFP-transduzierte A20-Zellen zu finden waren, im Verhältnis zu der Gesamtzahl der Löcher, die ausplattiert wurden.
Die Zellen der einzelnen Organe wurden jeweils aus vier Mäusen gemischt.
* : Es waren unmittelbar nach dem Ausplattieren jeweils 3-5 GFP-transduzierte A20-Zellen pro Loch zu finden (s. Abb. 3.7.-3).
LK: Lymphknoten

Wie man aus der Tabelle 3.7.-2 entnehmen kann, fanden sich die meisten GFP-transduzierten A20-Zellen nach **i.p.-Gabe** schon sehr früh in der Milz, aber auch in den inguinalen und in wesentlich geringerer Frequenz in den mesenterialen Lymphknoten wieder. Nach 5 Stunden waren in der Milz immer noch A20-Zellen zu finden, allerdings waren sie in den inguinalen Lymphknoten nicht mehr nachzuweisen und nur noch in geringer Frequenz in den mesenterialen

Lymphknoten zu finden. Nach 24 Stunden wurde dann auch die Wiederfindungsrate in der Milz geringer. Bei **i.v.-Applikation** der GFP-transduzierten A20-Zellen konnte man nur zu den 1,5- und 5-Stunden-Zeitpunkten in geringer Frequenz in der Milz A20-Zellen sehen, nach 24 Stunden war auch dort nichts mehr zu finden. In den untersuchten Lymphknoten waren die A20-Zellen nur ganz früh in ganz geringer Prozentzahl zu detektieren.

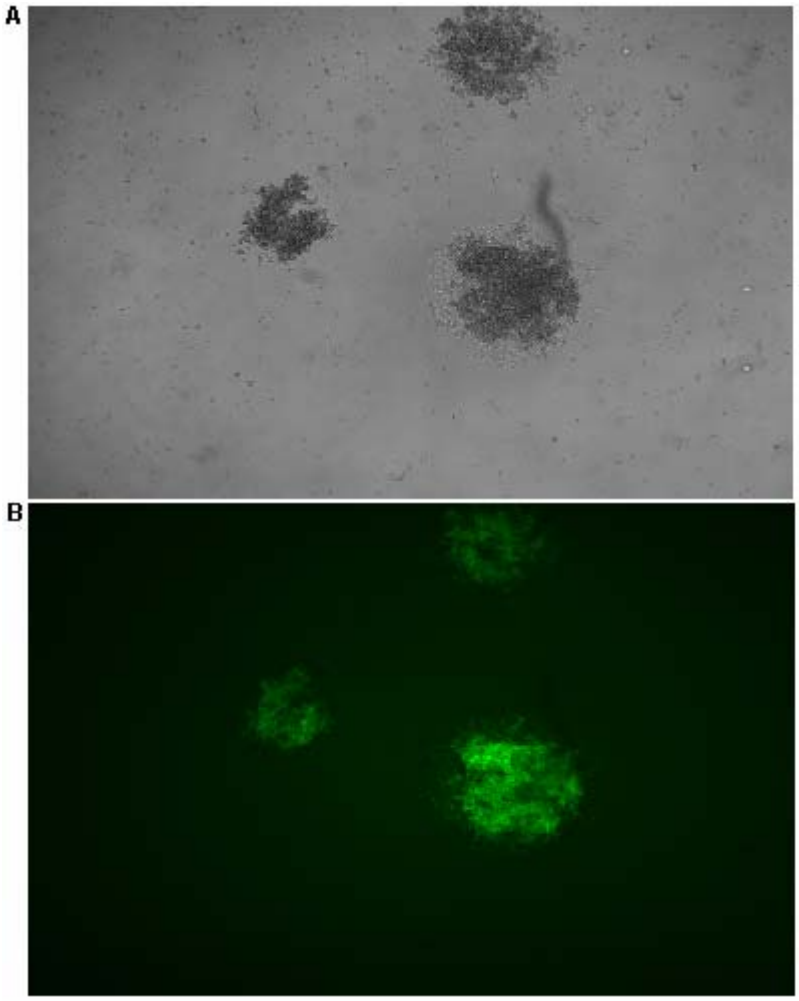


Abbildung 3.7.-3: GFP-transduzierte A20-Zellen, die 7d nach limitierender Verdünnung in einem Loch einer Flachboden-96-Loch-Platte gewachsen waren und im Durchlichtmikroskop (A) und mit zugeschaltetem eGFP-Filter (B) in 50-facher Vergrößerung angesehen wurden

Milzzellen einer SCID-Maus, die 1,5h nach i.p.-Gabe der GFP-transduzierten A20-Zellen mit einer Zellzahl von 1 x 10^4 Zellen pro Loch ausplattiert wurden.

Die Hypothese, dass i.p. verabreichte Tumorzellen dem Immunsystem zu spät präsentiert und nicht mehr erfolgreich abgestoßen werden, wird durch die oben gezeigten Daten nicht unterstützt. Deswegen wurden weitere *In-vivo*- und *In-vitro*-Versuche durchgeführt, die es ermöglichen sollten, die Wanderung und Kompartimentierung der Tumorzellen in der Maus zu verfolgen.

3.7.3. Wanderung ^{64}Cu-markierter A20-Zellen in BALB/c-Mäusen

Diese Versuche wurden in Kooperation mit der Universität Tübingen, Labor für Präklinische Bildgebung und Bildgebungstechnologie, durchgeführt.

Die mit ^{64}Cu inkubierten A20-Zellen wurden i.v. appliziert. 7 Stunden nach Gabe der Zellen wurde die Maus narkotisiert, die Aktivität mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) aufgenommen und Schichtaufnahmen aus diesen Daten erstellt (s. Abb. 3.7.-4).

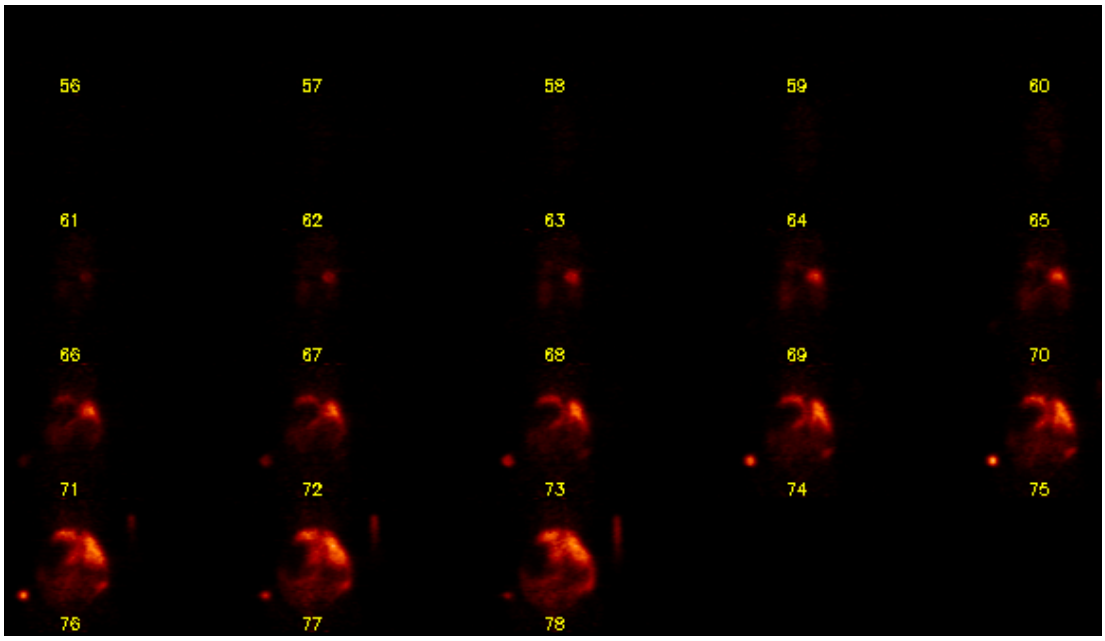


Abbildung 3.7.-4: Verteilung von ^{64}Cu-markierten A20-Zellen in einer BALB/c-Maus 7 Stunden nach i.v.-Gabe

Die Zahlen entsprechen den Schichtnummern. Die einzelnen Schichten sind 0,6mm dick.
Die Bilder zeigen in Aufsicht die auf dem Bauch liegende Maus, der Kopf liegt oben. Der rote Punkt links unten an den Aufnahmen dient zur Positionsbestimmung der Maus.

Die Schichtaufnahmen zeigen, dass sich die A20-Zellen nach 7 Stunden hauptsächlich in den Lungen aufhalten. Der dunkle Schatten auf dem linken Lungenflügel stellt das Herz dar, in dem sich keine markierten A20-Zellen befinden. Ab Schichtnummer 73 wird rechts unten die Aktivität in der Leber sichtbar, die sich in den nachfolgenden Schichten über die rechte untere Bildseite ausbreitet.

Um zu überprüfen, wie die Verteilung der Tumorzellen in der Maus zu einem späteren Zeitpunkt nach i.v.- bzw. i.p.-Gabe ^{64}Cu-markierter A20-Zellen aussieht, wurden 24 Stunden nach Applikation Organe aus den Mäusen entnommen und die darin enthaltene Aktivität quantifiziert (s. Abb. 3.7.-5).

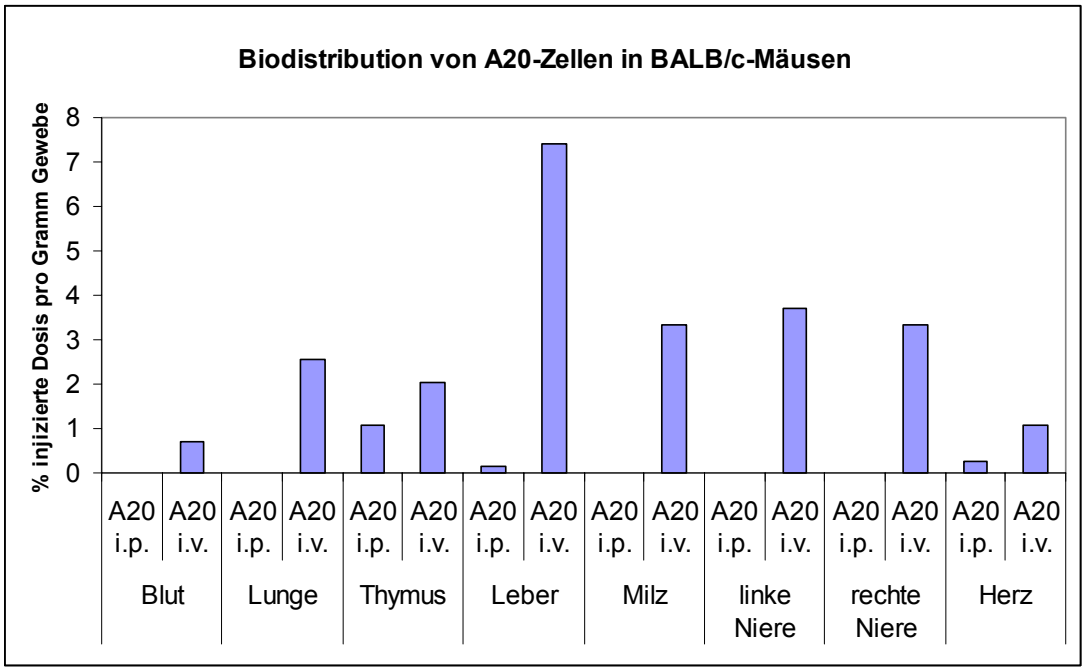


Abbildung 3.7.-5: Biodistribution von A20-Zellen in BALB/c-Mäusen 24 Stunden nach i.p.- oder i.v.-Gabe

Bei den hier verwendeten A20-Zellen handelt es sich um eine MHC-I-niedrig-Variante.

Die in Abbildung 3.7.-5 dargestellte Biodistribution der A20-Zellen zeigt, dass bei i.v.-Gabe der A20-Zellen nach 24 Stunden viel Aktivität in den Ausscheidungsorganen der Maus wiederfindet, weniger in der Lunge, wie es nach 7 Stunden (s. Abb. 3.7.-4) der Fall war. Bei der Vergleichsgruppe, der die ^{64}Cu-markierten A20-Zellen i.p. verabreicht wurden, ist in den untersuchten Organen nur sehr wenig Aktivität messbar. Weitere Versuche mit i.v. applizierten A20-Zellen, bei denen 24 Stunden

nach Gabe der Zellen noch weitere Organe auf Aktivität überprüft wurden, zeigten auch in anderen Ausscheidungsorganen eine hohe Akivität (s. Abb. 3.7.-6).

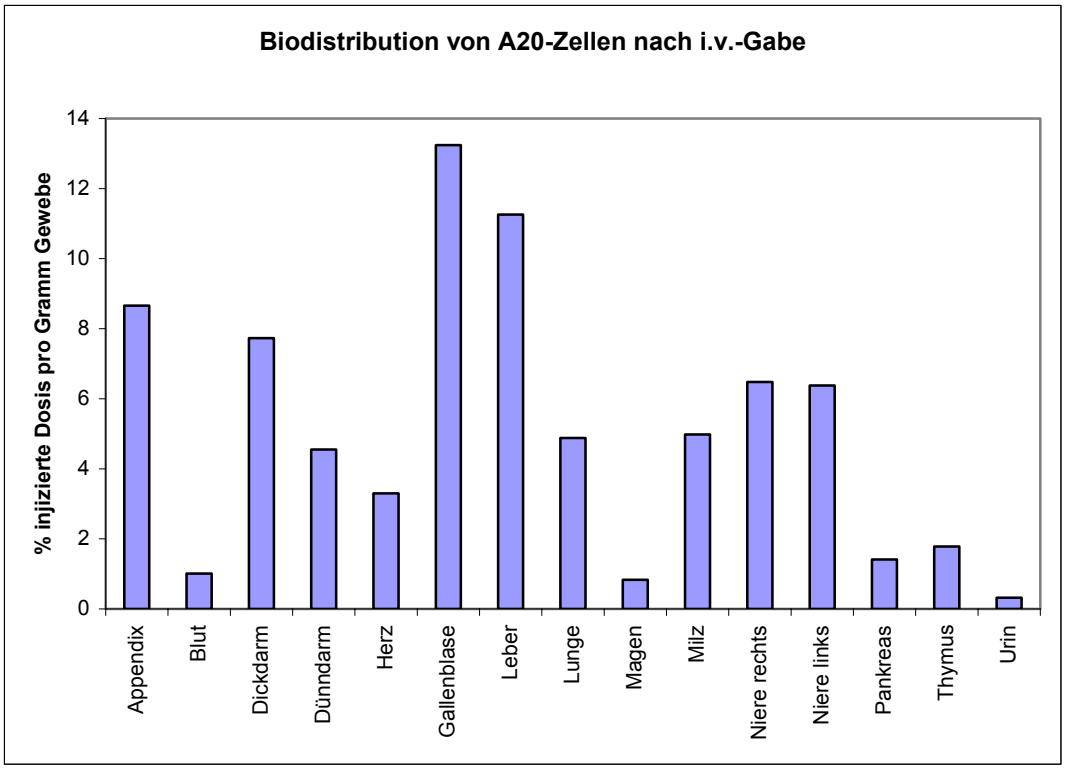


Abbildung 3.7.-6: Biodistribution von ^{64}Cu-markierten A20-Zellen 24 Stunden nach i.v.-Applikation

Zur Vergleichbarkeit mit Abbildung 3.7.-5 wurden in diesem Experiment ebenfalls die Ergebnisse der A20-MHC-I-niedrig-Variante gezeigt. Die parallel zu diesem Versuch generierten Daten für A20-Zellen zeigten gleiche Ergebnisse.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine neue Hypothese bezüglich der unterschiedlichen Effekte nach i.v.- bzw. i.p.-Gabe von A20-Zellen in der Therapiesituation aufgestellt: Die A20-Zellen werden nach i.v.-Gabe in größerem Umfang relativ schnell nach Applikation zerstört, die Folge der A20-Lyse wäre eine geringere Tumorlast in den Tieren. Damit ist ein Therapieerfolg im Gegensatz zu i.p. verabreichten Tumorzellen möglich.

Es kann aber ohne weitere Biodistributionsversuche einschließlich Mikro-autoradiographie keine abschließende Beurteilung über die beiden Hypothesen abgegeben werden. Die *In-vivo*-Verfolgung der A20-Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden könnte eventuell Aufschlüsse über den Zeitpunkt und den Ort der Tumorzelllyse liefern.

4. DISKUSSION

Die stetig wachsenden Erkenntnisse über Antigenpräsentation, T-Zell-Aktivierung und die Identifikation von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA), die spezifisch von Lymphozyten erkannt werden (Boon et al., 1997), haben zu neuen Immuntherapien gegen Krebs geführt. Trotz der Expression einer Vielzahl von TAA (Coulie, 1997; Boon und van der Bruggen, 1996) können maligne Zellen der Immunüberwachung durch verschiedene Mechanismen entkommen, z.B. durch ineffektive Präsentation der TAA (Tsioulias et al., 1993) oder durch fehlende kostimulatorische Signale für die T-Zell-Aktivierung (Chen et al., 1992; Schwartz, 1990). Es wurden bisher viele Ansätze zur Verbesserung der Präsentation von Tumor-abgeleiteten Peptiden durch APZ entwickelt. Ebenso wurde versucht, die Tumor-spezifischen T-Zellen direkt durch Zytokine zu aktivieren (Borden und Sondel, 1990; Schiller et al., 1993).

Der Immunglobulin-Idiotyp (Ig-Id), ein absolut spezifisches Zielantigen von B-Zell-Lymphomen, hat sich als attraktives Ziel aktiver Immuntherapie herausgestellt. Allerdings ist der Ig-Id ein schwaches Tumor-Antigen, so dass für eine erfolgreiche Immunisierung in Mausmodellen (Campbell et al., 1988; Campbell et al., 1990; George et al., 1988; Kaminski et al., 1987) als auch in Patienten (Hsu et al., 1993; Kwak et al., 1992; Nelson et al., 1996) eine Kopplung an Trägerproteine oder die Zugabe von Adjuvantien notwendig war. Alternativ konnte die anti-Id-Antwort auch durch Vakzinierung mit GM-CSF-transduzierten Tumorzellen (Levitsky et al., 1996) und durch ein von einer genetisch modifizierten Tumorzelle produziertes Fusionsprotein aus dem Id und GM-CSF (Selmayr et al., 1999) erhöht und Tumorprotektivität erreicht werden. Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen Determinanten des Idiotyps zeigten zwar Wirksamkeit (Miller et al., 1982; Maloney et al., 1992), aber durch somatische Mutationen im Bereich der variablen Gen-segmente des Ig kam es zu vielen Rückfällen.

Die geringe Anzahl von bekannten Abstoßungsantigenen, somatische Mutationen im Bereich der variablen Anteile des Ig und Antigenverlust, durch den es zu „Escape“-Varianten der Tumorzellen kommt, die nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden können, limitieren die Therapiemöglichkeiten gegen einzelne Abstoßungsantigene. Diese Einschränkungen könnten aber durch die Induktion einer polyklonalen Antwort gegen eine Vielzahl von Antigenen umgangen werden.

Der Triomzell-Ansatz greift diesen Gedanken auf und überwindet die ineffiziente Antigen-Präsentation von malignen B-Zellen durch Redirektion der Lymphomzellen

an APZ (Mocikat et al., 1997). Diese induzieren durch die Präsentation einer Vielzahl von Tumorantigenen eine polyklonale anti-Tumor-Antwort (Kronenberger et al., 2002). Im murinen A20-Lymphom-Modell haben sich die Triomzellen *in vivo* als präventiv und therapeutisch wirksam herausgestellt (Mocikat et al., 1997; Strehl et al., 1999).

Der Tumorschutz wird weniger über die humorale Immunabwehr als vielmehr über die zelluläre Abwehr vermittelt. Die Aspekte dieser zellulären Immunantwort wurden schon näher untersucht. Man hatte festgestellt, dass mehrfach *in vitro* mit A20-Zellen restimulierte T-Zellen einen $CD4^+$ Phänotyp besaßen. T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen zeigten nach zwei Restimulationen mit A20-Zellen Spezifität gegen diese Lymphomzellen und nach weiteren drei Restimulationen waren die T-Zellen tumorprotektiv. Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire (TZR-Repertoire) dieser mehrfach restimulierten Zellen wurde ebenfalls spezifiziert und zeigte nach neun Restimulationen eine Einschränkung auf drei TZR-Banden.

Interessant ist nun, wie die Immunantwort, die die Triomzellen *in vivo* induzieren, genau aussieht, und worin sich die T-Zellen aus immunisierten Mäusen von denen aus naiven Mäusen unterscheiden.

4.1. Untersuchung markierter und angereicherter tumorspezifischer T-Zellen

Nach Markierung von IFN-γ-produzierenden Zellen aus naiven und immunisierten Mäusen zeigte sich, dass die Frequenz tumorspezifischer T-Zellen aus Immunmäusen höher war als aus Naivmäusen. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch nach Langzeitstimulation und Anreicherung der IFN-γ^+ Zellen wider. Durch Kurzzeitstimulation ließen sich die IFN-γ^+ T-Zellen nicht expandieren.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch die Immunisierung von BALB/c-Mäusen *in vivo* eine Aktivierung von T-Zellen stattfindet, die daraufhin IFN-γ produzieren. Es kann sich dabei um $CD8^+$ oder $CD4^+$ T-Zellen handeln. Um näher zu untersuchen, welche Art der Immunantwort durch die Immunisierung mit Triom-zellen bevorzugt wird, wurden die IFN-γ^+ Zellen weiter auf ihren Phänotyp hin untersucht.

4.1.1 *In-vitro*-Charakterisierung der tumorspezifischen T-Zellen

Die FACS-Analysen zeigten, dass während einer 7d-Restimulation bei Zellen aus immunisierten Mäusen eine starke Entwicklung von $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen stattfand. Die IFN-γ^+ Zellen expandierten aber ausschließlich in der $CD4^+$ Fraktion. Bei Zellen aus naiven Mäusen expandierten hauptsächlich die $CD4^+$ T-Zellen, eine Zunahme von IFN-γ^+ Zellen war auch hier nur in der $CD4^+$ Fraktion zu beobachten.

$CD4^+$ Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der anti-Tumor-Immunantwort durch ihre *In-vivo*-Aktivität gegen MHC-II-positive und MHC-II-negative Tumoren. Diese Aktivität wird vermittelt durch CD40-CD40L-Interaktionen (Noelle et al., 1992; Grewal et al., 1998) und wirkt sich durch die Hilfe für $CD8^+$ T-Zellen (Toes et al., 1999), Induktion der IFN-γ-abhängigen Monozyten/Makrophagen-vermittelten Zytotoxizität (Egeter et al., 2000; Greenberg, 1991; Mumberg et al., 1999) oder durch Aktivierung der B-Zellen zur Antikörperproduktion (Hung et al., 1998) aus. Der therapeutische Effekt der A20-reaktiven Th1-Zellen konnte durch Zugabe eines anti-IFN-γ-Antikörpers komplett unterbunden werden (Egeter et al., 2000).

Des Weiteren kann man den FACS-Daten entnehmen, dass es IFN-γ^+ Zellen gibt, die weder einen $CD4^+$ noch einen $CD8^+$ Phänotyp besitzen. Bei Immunmäusen ist die Frequenz dieser Zellen doppelt so hoch (2,0%) wie bei Zellen aus Naivmäusen (1,0%), durch Immunisierung findet *in vivo* anscheinend eine Aktivierung dieser Zellen statt. Nach einer Restimulation nahm die Frequenz dieser Zellen wieder ab.
Es könnte sich bei diesen $CD3^-$IFN-γ^+ T-Zellen um NK-Zellen handeln, die bei adoptivem Transfer eine gewisse Rolle in der Tumorbekämpfung spielen könnten. Aus früheren Langzeitstimulationen und FACS-Analysen der Zellen ist schon bekannt, dass eine geringe Prozentzahl an NK-Zellen auch noch nach Ende der 9. *In-vitro*-Restimulation zu finden ist (K. Kronenberger, 2002). Allerdings wurde dabei noch nicht untersucht, ob diese NK-Zellen IFN-γ produzieren und welchen Anteil diese Zellen dann bei einem adoptiven Transfer haben. NK-Zell-Depletions-experimente hatten gezeigt, dass NK-Zellen für die direkte Abstoßung von Tumorzellen wichtig sein können (Adam et al., 2005; Mocikat et al., 2003). NK-Zellen sind außerdem für eine erfolgreiche Triom-Immunisierung wichtig. Unter NK-Zell-Depletion in der Präventionssituation funktionierte die Immunisierung nicht mehr (Mocikat, pers. Mitteilung).

Eine weitere Charakterisierung der IFN-γ-produzierenden Zellen fand auf molekularer Ebene statt. Das TZR-Repertoire am Ende der 2. Restimulation und nach Anreicherung der IFN-γ^+ T-Zellen aus naiven Mäusen wurde überprüft und zeigte keine Einschränkung. Das TZR-Repertoire aus Immunmäusen dagegen zeigte eine starke Einschränkung. Dies war sehr bemerkenswert, denn bisher hatte sich ein ähnliches Repertoire tumorprotektiver T-Zellen erst am Ende der 9. Restimulation gezeigt (K. Kronenberger, 2002). Anscheinend werden durch Triom-Immunisierung die IFN-γ-produzierenden T-Zellen nur von einigen wenigen Antigenen stimuliert, die auch schon in früheren Experimenten tumorprotektive T-Zellen erzeugt hatten.

4.1.2. Die tumorspezifischen Zellen im adoptiven Transfer

Wie schon aus vorhergegangenen Versuchen bekannt, konnte nach nur zweimaliger Restimulation von T-Zellen aus immunisierten Mäusen eine tumorprotektive Wirkung erzielt werden (Mocikat, pers. Mitteilung). Im Unterschied zu den früheren Versuchen wurden in dieser Arbeit nach zweimaliger Restimulation erst die IFN-γ-produzierenden T-Zellen angereichert und diese spezifischen T-Zellen in geringer Konzentration (3 x 10^5 anstatt 5 x 10^5 Zellen) adoptiv mit einer letalen Dosis Tumorzellen transferiert. Obwohl die T-Zell-Konzentration bei gleichbleibender Tumordosis erniedrigt wurde, konnte auch hier eine tumorprotektive Wirkung erzielt werden, da es sich um spezifisch A20-erkennende T-Zellen handelte. Diese tumorprotektive Wirkung wurde allerdings auch hier wie in früheren Versuchen nur erzielt, wenn die ursprünglichen T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen stammten.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Tumorabstoßung wenigstens zum Teil durch IFN-γ^+ T-Zellen vermittelt wird, die zuvor *in vivo* mit den Tumorantigenen in Kontakt getreten sein und aufgrund ihrer geringen Frequenz *in vivo* zusätzlich mehrfach *in vitro* mit den Tumorzellen restimuliert werden müssen.
Allerdings ist die Rolle der NK-Zellen noch näher zu untersuchen, denn wie diese und frühere Versuche gezeigt hatten, könnte ein Teil der Tumorabstoßung auch auf aktivierte, IFN-γ-sezernierende NK-Zellen zurückzuführen sein.

4.2. Untersuchungen zum Zytokin-Expressionsprofil

Eine mögliche Erklärung für das differenzielle *In-vivo*-Verhalten von T-Zellen aus naiven und immunisierten Mäusen mit identischer Tumorspezifität wäre die unterschiedliche Expression bestimmter Zytokine. Als interessant wurden hierbei Zytokine angesehen, die eine Zuordnung zu Th1- oder Th2-Zellen zuließen und damit einen Rückschluss auf die Immunantwort. Es wurden Kulturüberstände von T-Zellen vor, während und nach mehreren Restimulationen untersucht, um die Kinetik der Immunantwort zu ermitteln. Ebenso wurden die Zytokinkonzentrationen im Serum von naiven und immunisierten Mäusen miteinander verglichen, um die Immunantwort nach Triom-Immunisierung näher zu charakterisieren.

4.2.1. *In vitro* restimulierte T-Zellen

Zur Unterscheidung der Th-Antworten wurden IL-2, -4, -5, -10, -12, IFN-γ, GM-CSF und TNF-α gemessen. Vor *In-vitro*-Stimulierung zeigten die T-Zellen keine messbare Zytokinsekretion. Das ist insofern überraschend, als zumindest die T-Zellen der immunisierten Maus schon mit Tumorantigenen in Kontakt gekommen waren. Möglicherweise ist die Frequenz tumorspezifischer T-Zellen zu gering, um hier einen Effekt zu sehen. Allerdings ließen sich die T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen *in vitro* schneller aktivieren als T-Zellen aus naiven Mäusen. So war am 2. Tag der *In-vitro*-Restimulation eine deutliche Aktivierung der T-Zellen aus Immunmäusen, aber nicht der T-Zellen aus Naivmäusen, sichtbar. Erst am Ende der 1. Restimulation zeigte sich ein annähernd gleiches Expressionsmuster. Hauptsächlich wurden zu diesem Zeitpunkt GM-CSF und IFN-γ sezerniert. Die sich kaum unterscheidende IFN-γ-Produktion restimulierter T-Zellen aus naiven und immunisierten Mäusen legt den Schluss nahe, dass diese tumorspezifischen Th1-Zellen/ZTL für die Tumorprotektivität nicht allein verantwortlich sind (s. a. Kap. 4.1.2.). Ein entscheidender Unterschied war aber in der IL-5-Sekretion zu erkennen. Bis zum Ende der 4. Restimulation produzierten nur T-Zellen, die ursprünglich aus immunisierten Mäusen kamen, dieses Th2-Zytokin in erheblicher Menge. Auch ein weiteres Th2-Zytokin, IL-10, wird hauptsächlich von T-Zellen, die *in vivo* in Kontakt mit den Tumorantigenen getreten sind, sezerniert.

Durch vorangegangene Immunisierung mit Triomzellen scheinen *in vivo* Th2-Zellen entstanden zu sein, die unter den *In-vitro*-Bedingungen expandieren können. Die Th2-Zellen könnten durch die Induktion einer Th1-Antwort einen großen Einfluss auf die Tumorprotektivität haben (Schüler et al., 1999) und somit den entscheidenden Unterschied im Vergleich zu restimulierten T-Zellen aus naiven Mäusen ausmachen, die nicht tumorprotektiv waren. Die entscheidende Rolle der Th2-Antwort wurde durch IL-4$^{-/-}$-Mäuse untermauert, die nach Triom-Immunisierung nicht gegen A20-Zellen geschützt waren (Mocikat, pers. Mitteilung).

4.2.2. Mausseren

Auch die Untersuchung des Serums von immunisierten Mäusen lässt darauf schließen, dass Th2-Zellen durch die Immunantwort auf Triomzellen entstehen. Die beobachtete IL-4-Sekretion, wenn auch in geringer Konzentration, könnte für die Induktion einer Th1-Antwort wichtig sein, durch die es im Weiteren durch die IFN-γ- und IL-2-Sekretion zu einer Aktivierung von ZTL und damit zur Aufrechterhaltung einer Immunantwort kommt (Schüler et al., 1999). Es konnten IFN-γ und geringe Mengen von IL-2 im Serum detektiert werden.
Des Weiteren wurden im Serum immunisierter Mäuse sehr hohe IL-10- und IL-12-Konzentrationen gefunden. IL-10 wird außer von Th2-Zellen auch von maturen DC gebildet. Diese sind für die erfolgreiche Triom-Immunisierung sehr wichtig (s. Kap. 1.4.). IL-12 wird u.a. von aktivierten endogenen DC produziert, die ihrerseits durch IFN-γ aus aktivierten NK-Zellen stimuliert werden (Adam et al., 2005; Ferlazzo et al., 2002; Gerosa et al., 2002; Glas et al., 2000; Kelly et al., 2002, a und b; Piccioli et al., 2002). Die Existenz IFN-γ-produzierender NK-Zellen, die durch Triom-Immunisierung oder aktivierte DC induziert werden, wurde schon in Kap. 4.1.1. und 4.1.2. näher diskutiert. Die aktivierten endogenen DC könnten auch auf eine CD4-T-Zell-unabhängige Weise zytotoxische T-Zellen induzieren (Adam et al., 2005). Dagegen spricht jedoch der Befund, dass nach CD4-T-Zell-Depletion die Triom-Immunisierung keine Tumorprotektion mehr vermittelt (Mocikat et al., 1997).

Insgesamt scheint auf die Immunisierung mit Triomzellen in den Mäusen eine gemischte Th-Antwort zu erfolgen.

4.3. Angereicherte T-Zellen mit spezifischem TZR im adoptiven Transfer

Eine Einschränkung im TZR-Repertoire kann auf eine klonale Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung zurückgeführt werden.
Ergebnisse in Mausmodellen zeigten Kriterien auf, die entscheidend für die Antigen-getriebene Selektion von TZR im Verlauf einer spezifischen, zellvermittelten Immunantwort sind: Limitierter Gebrauch der V- und J-Gensegmente beider TZR-Ketten, Einschränkung der CDR3-Schleifenlänge und Konservierung bestimmter Aminosäuren in der CDR3-Region (McHeyzer-Williams und Davis, 1995; Maryanski et al., 1996). Andererseits zeigte eine Vielzahl von Studien, dass ein TZR-Repertoire, das eine Antigen-spezifische Immunantwort vermittelt, von stark eingeschränkt bis hin zu außerordentlich divers variieren kann (Casanova und Maryanski, 1993; Moss et al., 1995; Pantaleo et al., 1994; Steinle et al., 1995). Das Bild einer Antigen-getriebenen, monoklonalen T-Zell-Expansion *in vivo* steht in deutlichem Widerspruch zu den Studien von Maryanski et al., 1996, die auf Sequenzniveau belegen, dass mehrere TZR-β-Ketten zum Repertoire einer Antigen-spezifisch aktivierten T-Zell-Population *in vivo* beitragen. Zudem kann die biologische Signifikanz selbst von monoklonalen T-Zell-Expansionen ohne begleitende funktionelle Analysen nicht evaluiert werden. Bislang wurden molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen aber erst in wenigen Studien kombiniert (Caignard et al., 1996; Sensi et al., 1993). Sensi et al. fanden bei der Untersuchung von mehreren HLA-$A2^+$ Melanomen durch Isolierung von ZTL-Klonen bestimmte überexprimierte TZR-β-Sequenzen in den TIL, aber nicht in den PBL der Tumorpatienten.

Anhand der Analyse des TZR wurde schon in früheren Versuchen in unserem Labor die molekulare Natur der T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen A20-Tumorzellen untersucht. Zur besseren Charakterisierung dieser Immunantwort wurden *In-vivo*-Experimente mit den auf molekularer Ebene analysierten T-Zellen durchgeführt. Es fand sich eine starke Einschränkung im Vβ-TZR-Repertoire von mehrmals restimulierten T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen. Tumorprotektive T-Zellen zeigten eine Restriktion auf Vβ4 und Vβ6. Außerdem war eine schwache Vβ1-Bande zu sehen. Es sollte nun untersucht werden, in welcher Frequenz diese spezifischen

T-Zellen in der immunisierten Maus vorkommen, und ob sie auch nach wenigen Restimulationsrunden protektiv sind.

Für die Frequenzermittlung wurden Milz- und Lymphknotenzellen aus naiven und immunisierten Mäusen untersucht. Im Vergleich der Frequenzen stellte sich heraus, dass durch die Immunisierung keine Expansion dieser spezifischen T-Zellen *in vivo* in der Maus stattfand. Die Frequenzen der Vβ4- sowie der Vβ6-T-Zellen ließen sich durch die *In-vitro*-Bedingungen der Restimulation (z.B. IL-2-Gabe nach 48 Stunden) bei Zellen aus naiven und immunisierten Mäusen gleichermaßen erhöhen.
Im adoptiven Transferversuch zweimal restimulierter und immunmagnetisch angereicherter T-Zellen zeigte sich, dass ein auf diese Weise hergestelltes Gemisch aus Vβ4- und Vβ6-T-Zellen nicht protektiv war.

Die mangelnde Tumorprotektivität dieser Zellen könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen nach der immunmagnetischen Separation eventuell in ihrer Funktion durch Überstimulation durch gebundene Vβ4- und Vβ6-Ak und die ebenfalls noch anhaftenden magnetischen Partikel beeinträchtigt waren. Durch die Zugabe von anti-CD28-Ak als kostimulatorisches Signal für die T-Zellen sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die T-Zellen anergisch werden (Harding et al., 1992). Ebenso sollte das Überleben der angereicherten T-Zellen durch Zugabe von anti-CD28-Ak gesteigert werden (Noel et al., 1996).
Die nach Anreicherung der Vβ4- und Vβ6-positiven T-Zellen verbliebenen Zellen wurden ebenfalls eine Woche mit anti-CD28-Ak in Kultur gehalten und dann in Mäuse gespritzt. Bei diesem Versuch kam zu einer Überlebensrate von 25% der Mäuse, wenn die Ursprungszellen aus immunisierten Mäusen stammten. Da sich in diesem Gemisch von Zellen wahrscheinlich auch NK-Zellen befunden haben, könnte das Nichtanwachsen des Tumors teilweise auf die Anwesenheit von NK-Zellen zurückzuführen sein (s. auch Kap. 4.1.2.).
Um auszuschließen, dass die immunmagnetische Anreicherung und die Kostimulation mit anti-CD28-Ak die T-Zellen in ihrer Funktion verändert oder beeinträchtigt, wurde im nächsten Schritt versucht, T-Zellen mit spezifischem TZR durch Klonierung zu generieren und diese Klone im adoptiven Transfer auf ihre Tumorprotektivität zu testen.

4.4. Klonierte T-Zellen aus immunisierten Mäusen im adoptiven Transfer

Da in unserem Labor bislang noch keine Maus-T-Zellen kloniert wurden, musste zuerst ein System etabliert werden. Als effektivste Klonierungsstrategie erwies sich die immunmagnetische Anreicherung von T-Zellen direkt nach Entnahme der Milz- und Lymphknoten aus der Maus. 20.000 bis 200.000 T-Zellen wurden pro Loch in 96-Loch-Platten ausplattiert und alle drei Wochen mit 20.000 bis 200.000 A20-Zellen und 5.000 bis 50.000 APZ restimuliert. Außerdem wurden die Zellen mit 5 U IL-2 pro Loch versorgt.
Am Ende der 5., 6. und 7. Restimulation waren einige „Klone“ so weit expandiert worden, dass sie in adoptiven Transferversuchen eingesetzt und zusätzlich noch auf molekularer Ebene hinsichtlich ihres benutzten TZR-Repertoires untersucht werden konnten. Es zeigte sich ein sehr unterschiedliches Bild in der Einschränkung im TZR-Repertoire der entstandenen „Klone“. Es reichte von mono- bis polyklonal. Bei mono- oder oligoklonalen Zellen wurden die einzelnen TZR-Banden noch auf ihre Jβ-Sequenz untersucht. Bei der Sequenzierung fiel auf, dass Mischsequenzen selten auftraten. Bei der etablierten Langzeitstimulation von T-Zellen aus immunisierten Mäusen gab es nach fünf *In-vitro*-Restimulationen bisher immer Jβ-Mischsequenzen (K. Kronenberger, 2002).
Nach der Sequenzierung wurde deutlich, dass es gelungen war, einen echten Klon zu generieren. Die Zellen dieses Klons benutzen nur den Vβ4-TZR, wobei die Sequenz von Jβ1.3 daran umgelagert war. Allerdings zeigte der Klon *in vivo* keine protektive Wirkung gegen gleichzeitig verabreichte A20-Zellen. Bei den adoptiv transferierten oligo- und polyklonalen Zellpopulationen hingegen konnte Tumorprotektion beobachtet werden.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Oligo- oder Polyklonalität der T-Zellen und damit eine Antwort gegen verschiedene Antigene sehr wichtig ist. Das würde die Grundlage des Triomzell-Ansatzes unterstützen, bei dem viele Tumorantigene effektiv über APZ präsentiert werden und damit eine oligo- oder polyklonale Immunantwort hervorgerufen wird. Vβ4-Jβ1.3-positive Zellen allein vermittelten keinen Tumorschutz, auch wenn es sich bei diesem Klon um schon in früheren Versuchen aufgetretene T-Zellen mit einem bestimmten TZR handelte, die damals in Kombination mit Vβ6-Jβ2.3 und Vβ1 T-Zellen zu 100% tumorprotektiv waren

(K. Kronenberger, 2002). Dieses Ergebnis ist ein entscheidender Hinweis darauf, dass die Tumorabstoßung nicht auf ein einzelnes Antigen wie z. B. den Id zurückzuführen ist, sondern dass die T-Zell-Antwort gegen mehrere Antigene gerichtet sein muss, um eine Abstoßung von Tumorzellen zu ermöglichen.

4.5. Idiotyp-spezifische T-Zellen nach Restimulation

Für Immuntherapien wurde dem Ig-Id als tumorspezifischem Antigen in malignen B-Zellen in der Literatur schon immer ein hoher Stellenwert beigemessen (Bogen et al., 2000; Pardoll, 1993; Stevenson et al., 1990; Wen et al., 2001). Was jedoch die Art der induzierten anti-Id-Antwort betrifft, gibt es unterschiedliche Ergebnisse: Zum Beispiel konnten Syrengelas und Levy (1999) im 38C13-B-Zell-Lymphom zeigen, dass durch eine DNS-Vakzinierung nur eine humorale tumorprotektive Immunantwort induziert werden konnte, jedoch keine ZTL-Antwort. In anderen Studien konnten auch zelluläre Immunantworten nachgewiesen werden (Bogen et al., 1995; Chakrabarti und Ghosh, 1992).

Der Id des A20-B-Zell-Lymphoms ist bekannt. Die tumorspezifische Aktivität von *in vitro* mit Id-Protein stimulierten T-Zellen aus immunisierten Mäusen wurde getestet und nach adoptivem Transfer zeigte sich, dass diese T-Zellen nicht tumorprotektiv waren. Eine humorale anti-Id-Antwort nach Id-spezifischer Immunisierung war zwar detektierbar, diese spiegelte sich aber nicht im Grad der *In-vivo*-Protektivität wider (Kronenberger et al., 2002; Mocikat et al., 1997). Auch Armstrong erhielt im A20-Mausmodell nach Id-spezifischer Immunisierung humorale und zelluläre Antworten, aber die Immunisierung von Mäusen mit einem rekombinanten Adenovirus, das für den A20-Id kodiert, war nur z.T. erfolgreich (Armstrong et al., 2002).
In dieser Arbeit sollte das Ausmaß der durch Triom-Immunisierung induzierten Id-spezifischen T-Zellen ermittelt werden.

Für die Quantifizierung Id-spezifischer T-Zellen musste zuerst ein Nachweissystem entwickelt und etabliert werden. Drei potenziell immunogene Peptidbruchstücke des Ig-Id wurden aus der Literatur (Armstrong et al., 2002) bzw. mit Hilfe von Datenbanken und Vorhersageprogrammen ausgesucht. Für die Aufnahme und

Präsentation dieser Peptide erwiesen sich bestrahlte Milzzellen als geeignet. Überprüft wurde die Funktionalität dieses Systems durch T-Zellen, die aus OVA-TCF1-immunisierten Mäusen stammten und mit TCF1-Peptid restimuliert wurden. Bei Zugabe der TCF1-präsentierenden Milzzellen produzierten diese GM-CSF.
Nachdem die Peptidpräsentation der bestrahlten Milzzellen durch das Testsystem nachgewiesen werden konnte, wurden T-Zellen aus naiven und immunisierten Mäusen am Ende der 6. bzw. 7. Restimulation auf Id-spezifische T-Zellen getestet. Als Ergebnis ließ sich festhalten, dass durch die Immunisierung wenig Id-spezifische T-Zellen entstehen und diese sich auch durch mehrere *In-vitro*-Restimulationen anscheinend kaum expandieren lassen. Die Anzahl der Id-spezifischen T-Zellen lag unterhalb der Nachweisgrenze des Testsystems.

Dem Ig-Id als spezifisches Antigen für das A20-B-Zell-Lymphom kann bei der Tumorabstoßung im Triom-Modell also nur eine sehr untergeordnete Rolle zukommen, da sehr wenig Id-spezifische T-Zellen durch die Immunisierung entstehen. Hauptsächlich werden die Tumorzellen wohl durch andere Abstoßungsantigene auf ihrer Zelloberfläche erkannt.

4.6 Weitere Abstoßungsantigene auf A20-Tumorzellen

Bei der Suche nach weiteren Abstoßungsantigenen auf A20-Tumorzellen wurde in Datenbanken nach Äquivalenten bekannter menschlicher Abstoßungsantigene gesucht. Mittels RT-PCR wurde die Expression dieser Antigene auf A20-Zellen quantitativ ermittelt.
Es konnte eine Überexpression von Bax und TERT festgestellt werden. Bei den Versuchen stellte sind außerdem heraus, dass diese Antigene auch auf Triomzellen überexprimiert sind. Die erfolgreiche Abstoßung von A20-Zellen nach Triom-Immunisierung könnte also auf T-Zellen zurückzuführen sein, die diese Antigene erkennen. Um die Hypothese zu beweisen, müssen allerdings noch weiterführende Experimente durchgeführt werden. Eine Möglichkeit zur Überprüfung wäre, die Einzelspezies-RNS in APZ zu transferieren und die Reaktivität restimulierter T-Zellen aus immunisierten Mäusen dagegen zu testen.

4.7. Kompartimentierung von Triom- und A20-Zellen

Die Kompartimentierung der Vakzine- und Tumorzellen scheint eine wichtige Rolle bei der Tumorabstoßung zu spielen. Von den Triomzellen ist bekannt, dass sie trotz ihres xenogenen Anteils noch lange nach i.p.-Vakzinierung in der Milz nachweisbar sind (Graf et al., 2003) und somit als Antigenquelle zur Verfügung stehen. In der Therapiesituation hatte sich gezeigt, dass A20-Zellen nur nach i.v.-Gabe abgestoßen werden können. Es wurde vermutet, dass die A20-Zellen nach i.p.-Gabe dem Immunsystem zu spät präsentiert werden, um noch erfolgreich bekämpft zu werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Wanderung der beiden Zelllinien in Mäusen verfolgt. Dazu wurden die Triomzellen mit CFSE markiert und die A20-Zellen stabil mit einem eGFP-Vektor transduziert. Diese Zellen wurden den Mäusen gespritzt und zu verschiedenen Zeitpunkten Milzen und Lymphknoten entnommen. Mittels limitierender Verdünnung wurde die Frequenz der Triom- und A20-Zellen in den Organen bestimmt.
Die Versuche zeigten, dass sich die Triomzellen innerhalb der ersten 24 Stunden in den axillären, inguinalen und mesenterialen Lymphknoten stark anreichern. Dort können sie mit den DC und diese mit den T-Zellen in Kontakt treten, um eine Immunantwort zu induzieren.
Da sich 24 Stunden nach i.v.-Gabe der A20-Zellen in den Milzen und auch in den Lymphknoten der Mäuse sehr wenig A20-Zellen wiederfinden ließen, wurden weitere *In-vivo*- und *In-vitro*-Versuche mit ^{64}Cu-markierten A20-Zellen angeschlossen, um zu klären, wo sich die restlichen A20-Zellen befinden. Es zeigte sich, dass sich i.v. gespritzte A20-Zellen in den ersten Stunden hauptsächlich in den Lungen anreichern. Nach 24 Stunden dagegen ist viel ^{64}Cu-Aktivität in der Leber, Gallenblase und den Nieren der Tiere zu finden.

Die beobachteten Ergebnisse unterstützen die oben aufgestellte Hypothese nicht. Dass in der Therapiesituation nur bei i.v.-Gabe der A20-Zellen diese erfolgreich abgestoßen werden, könnte also daran liegen, dass eine schnellere Lyse der i.v.-verabreichten A20-Zellen *in vivo* stattfindet. Hinweis dafür ist die hohe Aktivität in den Ausscheidungsorganen. So verringert sich die Tumorlast in diesen Mäusen. Bei i.p.-Gabe werden die A20-Zellen zwar dem Immunsystem präsentiert, aber die Tumorlast ist zu groß für das Immunsystem.

4.8. Ausblick

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

- Welche Rolle spielen die aktivierten NK-Zellen bei der
  a) Tumorabstoßung?
  Dazu könnte man die NK-Zellen durch positive Selektion aus den restimulierten Zellen heraussortieren und danach die IFN-γ^+ T-Zellen anreichern und adoptiv transferieren.
  b) Immunisierung?
  Der Effekt der NK-Zellen könnte durch *In-vivo*-NK-Zell-Depletion vor Gabe der Triomzellen getestet werden. Änderungen im Zytokinexpressionsmuster im Serum dieser Tiere könnten Rückschlüsse auf die Rolle der NK-Zellen auf die Immunantwort zulassen.

- Welche Antigene sind für die Abstoßung der A20-Zellen zuständig?
  Dazu müsste noch die Expression weiterer Abstoßungsantigene auf A20-Zellen getestet werden. Die Einzelspezies-RNS dieser Abstoßungsantigene könnte in DC transfiziert und die Reaktivität restimulierter T-Zellen aus immunisierten Mäusen gegen diese Antigene getestet werden.

- Welchen Einfluss hat die Kompartimentierung von restimulierten T-Zellen aus naiven und immunisierten Mäusen auf die Tumorprotektivität?
  Mittels der an der Universität Tübingen etablierten Methode der ^{64}Cu-Markierung und Visualisierung durch PET könnten restimulierte T-Zellen aus naiven und immunisierten Mäusen *in vivo* verfolgt und eventuelle Unterschiede in der Wanderung/Kompartimentierung der Zellen sichtbar gemacht werden.

- Welchen Einfluss hat die Umgebung der Einspritzstelle auf die T-, Vakzine- und Tumorzellen?
  Durch immunhistologische Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Vakzinezellen und den sie umgebenden Gewebestrukturen könnte das Geschehen um die Einspritzstelle durch konfokale Mikroskopie sichtbar gemacht werden.

LITERATURVERZEICHNIS

ABBAS A.K., Lichtman A.H., Pober J.S., 1997
Cellular and molecular immunology, 3rd ed.
Saunders, Philadelphia

ADAM C., King S., Allgeier T., Braumüller H., Lüking C., Mysliwietz J., Kriegeskorte A., Busch D.H., Röcken M. and Mocikat R., 2005
DC-NK cell cross talk as a novel $CD4^+$ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction.
Blood 106: 338-344

ARDEN B., Clark S.P., Kabelitz D., Mak T.W., 1995.
Mouse T cell receptor variable gene segments families.
Immunogenetics 42: 501-530

ARMSTRONG A.C., Dermine S., Allinson C.G., Bhattacharyya T., Mulryan K., Gonzalez K.R., Stern P.L., Hawkins R.E., 2002.
Immunization with a recombinant adenovirus encoding a lymphoma idiotype: Induction of tumor-protective immunity and identification of an idiotype-specific T cell epitope.
J. Immunol. 168: 3983-3991

ASHLEY D.M., Faiola B., Nair S., Hale L.P., Bigner D.D., Gilboa E., 1997
Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors.
J. Exp. Med. 186: 1177-1182

BARTH R.J., Mule J.J., Spiess J., Rosenberg S.A., 1991
Interferon-γ and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by $CD8^+$ tumor-infiltrating lymphocytes.
J. Exp. Med. 176: 647-652

BASKAR S., Clements V.K., Glimcher L.H., Nabavi N., Ostrand-Rosenberg S., 1996
Rejection of MHC class II-transfected tumor cells requires induction of tumor-encoded B7-1 and/or B7-2 costimulatory molecules.
J. Immunol. 156: 3821-3827

BASOMBRIO M., 1970
Search for common antigenicity among twenty-five sarcomas induced by methylcholanthrene.
Cancer Res. 30: 2458-2462

BECKER C., Pohla H., Frankenberger B., Schüler T., Assenmacher M., Schendel D. J., Blankenstein T., 2001
Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-γ capture assay.
Nature Med. 7: 1159-1162

BENJAMINI E. und Leskowitz S., 1991
Immunology: a short course.
Wiley and Sons Inc, New York

BICKNELL D.C., Rowan A. and Bodmer W.F., 1994
Beta-2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4751-4756

BLANCHET O., Bourge .F., Zinszner H., Israel A., Kourilsky P., Dausset J., Degos L., Paul P., 1992
Altered binding of regulatory factors to HLA class I enhancer sequence in human tumor cell lines lacking class I antigen expression.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3488-3492

BOGEN B., Munthe L., Sollien A., Hofgaard P., Omholt H., Dagnaes F., Dembic Z., Lauritzsen G.F., 1995
Naive $CD4^+$ T cells confer idiotype-specific tumor resistance in the absence of antibodies.
Eur. J. Immunol. 25: 3079-3086

BOGEN B., Schenck K., Munthe L.A., Dembic Z., 2000
Deletion of idiotype (Id)-specific T cells in multiple myeloma.
Acta Oncol. 39: 783-788

BONNOTTE B., Larmonier N., Favre N., Fromentin A., Moutet M., Martin M., Gurbuxani S., Solary E., Chauffert B., Martin F., 2001
Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system.
J. Immunol. 167: 5077-5083

BOON T., Coulie P.G., van der Eynde B., 1997
Tumor antigens recognized by T cells.
Immunol. Today 18: 267-268

BOON T., Old L., 1992
Immune response to tumors, in: Enceclopedia of immunology.
Roitt I.M., Delives P.J., (Hrsg.)
Academic Press, 1557-1589

BOON T. und van der Bruggen P., 1996
Human tumor antigens recognized by T lymphocytes.
J. Exp. Med. 183: 725-729

BORDEN E.C. und Sondel P.M., 1990
Lymphokines and cytokines as cancer treatment. Immunotherapy realized.
Cancer 65: 800-814

BOSSHART H. and Jarrett R.F., 1998
Deficient major histocompatibility complex class II antigen presentation in a subset of Hodgkin´s disease tumor cells.
Blood 92: 2252-2259

BURMESTER G.-R. und Pezzutto A., 1998
Taschenatlas der Immunologie
Thieme Verlag, Stuttgart

BURNET F.M., 1970, a
A certain symmetry: histocompatibility antigens compared with immunocyte receptors.
Nature 226: 123-126

BURNET F.M., 1970, b
The concept of immunological surveillance.
Prog. Exp. Tumor Res. 13: 1-27

CAIGNARD A., Guillard M., Cai Z., Asselin-Paturel C., Carayol G., Chouaib S., 1996
The renal cell carcinoma lysis by a specific cytotoxic T cell clone is independent of the Fas/Fas-L cytotoxic pathway.
Tissue Antigens 48: 295-300

CAMPBELL M.J., Esserman L., Byars N.E., Allison A.C., Levy R., 1990
Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Humoral and cellular requirements for the full expression of antitumor immunity.
J. Immunol. 145: 1029-1036

CAMPBELL M.J., Esserman L., Levy R., 1988
Immunotherapy of established murine B cell lymphoma. Combination of idiotype immunization and cyclophosphamide.
J. Immunol. 141: 3227-3233

CASANOVA J.L. und Maryanski J.L., 1993
Antigen-selected T-cell receptor diversity and self-nonself homology.
Immunol. Today 14: 391-394

CASARES N., Lasarte J. J., de Cerio A. L., Sarobe P., Ruiz M., Melero I., Prieto J., Borras-Cuesta F., 2001
Immunization with a tumor-associated CTL epitope plus a tumor-related or unrelated Th1 helper peptide elicts protective CTL immunity.
Eur. J. Immunol. 31: 1780-1789

CHAKRABARTI D und Ghosh S.K., 1992
Induction of syngeneic cytotoxic T lymphocytes against a B cell tumor. Characterization of anti-idiotypic CTL lines and clones.
Cell Immunol. 144: 443-454

CHEN L., 1998
Immunological ignorance of silent antigens as an explanation of tumor evasion.
Immunol. Today 19: 27-30

CHEN L., Ashe S., Brady W.A., Hellström I., Hellström K.E., Ledbetter J.A., McGrowan P., Linsley P.S., 1992
Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4.
Cell 71: 1093-1102

CHEN L., Linsley P.S., Hellström K.E., 1993
Costimulation of T cells for tumor immunity.
Immunol. Today 14: 483-486

COHEN P.J., Lotze M.T., Roberts J.R., Rosenberg S.A., Jaffee E.S., 1987
The immunopathology of sequential tumor biopsis in patients treated with interleukin-2. Correlation of response with T-cell infiltration and HLA-DR expression.
Am. J. Path. 129: 208-216

COULIE P.G., 1997
Human tumour antigens recognized by T cells: new perspectives for anti-cancer vaccines?
Mol. Med. Today 3: 261-268

CROMME F.V., Airey J., Heemels M.T., Ploegh H.L., Keating P.J., Sterm P.L., Meijer C.J., Walboomers J.M., 1994
Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with the loss of HLA expression in cervical carcinomas.
J. Exp. Med. 179: 335-340

DAVIS M.M. und Bjorkman P.J., 1988
T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.
Nature 334: 395-402

DI CARLO E., Forni G., Lollini P., Colombo M.P., Modesti A., Musiani P., 2001
The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions.
Blood 97: 339-345

DRANOFF G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V., Hamada H., Pardoll D., Mulligan R.C., 1993
Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent specific and long-lasting anti-tumor immunity.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 3539-3543

EGETER O., Mocikat R., Ghoreschi K., Dieckmann A., Rocken M., 2000.
Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice.
Cancer Res. 60: 1515-1520

FERLAZZO G., Tsang M.L., Moretta L., Melioli G., Steinmann R.M., Münz C., 2002
Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells.
J. Exp. Med. 195: 343-351

FUCHS E.J. und Matzinger P., 1996
Is cancer dangerous to the immune system?
Semin. Immunol. 8: 271-280

GARRIDO F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Perez-Villar J.J., Lopez-Botet M., Duggan-Keen M., Stern P.L., 1997
Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours.
Immunol. Today 18: 89-95

GASCOIGNE N.R., Chien Y., Becker D.M., Kavaler J., Davis M.M., 1984.
Genomic organization and sequence of T cell receptor beta chain constant- and joining-region genes.
Nature 310: 387-391

GEORGE A.J., Folkard S.G., Hamblin T.J., Stevenson F.K., 1988
Idiotypic vaccination as a treatment for B cell lymphoma.
J. Immunol. 141: 2168-2174

GEROSA F., Baldani-Guerra B., Nisii C., Marchesini V., Carra G., Trinchieri G., 2002
Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells.
J. Exp. Med. 195: 327-333

GLAS R., Franksson L., Une C., et al., 2000
Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype: an adaptive component of NK cell-mediated responses.
J. Exp. Med. 191: 129-138

GORELIK L. und Flavell R.A., 2001
Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signalling in T cells.
Nature Med. 7: 1118-1122

GRAF N., Adam C., Mocikat R., 2003.
Persistence of xenogenized vaccine cells *in vivo.*
Int. J. Cancer 105: 217-220

GREENBERG P.D., 1991
Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells.
Adv. Immunol. 49: 281-355

GREWAL I.S., Flavell R.A., 1998
CD40 and CD154 in cell-mediated immunity.
Annu. Rev. Immunol. 16: 111-135

GROSS L., 1943
Intradermal immunisation of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line.
Cancer Res. 3: 326-333

GROUX H., Bigler M., de Vries J.E., Roncarolo M.G., 1998
Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human $CD8^+$ T cells.
J. Immunol. 160: 3188-3193

HAGANI A.B., Riviere I., Tan C., Krause A., Sadelain M., 1999
Activation conditions determine susceptibility of murine primary T-lymphocytes to retroviral infection.
J. Gene. Med. 1: 341-351

HARADA M., Okamoto T., Omoto K., Tamada K., Takenoyama M., Hirashima C., Ito O., Kimura G., Nomoto K., 1996
Specific immunotherapy with tumour-draining lymph node cells cultured with both anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies.
Immunol. 87: 447-453

HARDING F.A., McArthur J.G., Gross J.A:, Raulet D.H., Allison J.P., 1992
CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones.
Nature 356: 607-609

HAWKINS R.E., Zhu D., Ovecka M., Winter G., Hamblin T.J., Long A., Stevenson F.K., 1994
Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma. Rescue of variable region gene sequences from biopsy material for assembly as single-chain Fv personal vaccines.
Blood 83: 3279-3288

HEISER A., Maurice M.A., Yancey D.R., Wu N.Z., Dahm P., Pruitt S.K., Boczkowski D., Nair S.K., Ballo M.S., Gilboa E., Vieweg J., 2001, a
Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA.
J. Immunol. 166: 2953-2960

HEISER A., Maurice M.A., Yancey D.R., Coleman D.M., Dahm P., Vieweg J., 2001,b
Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors.
Cancer Res. 61: 3388-3393

HEWITT H.B., Blake E.R., Walder A.S., 1976
A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin.
Br. J. Cancer 33: 637-643

HICKLIN D.J., Marincola F.M., Ferrone S., 1999
HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story.
Mol. Med. Today 5: 178-186

HOUGHTON A.N., Gold J.S., Blachere N.E., 2001
Immunity against cancer: lessons learned from melanoma.
Curr. Opin. Immunol. 13: 134-140

HSU F.J., Kwak L., Campbell M., Liles T., Czerwinski D., Hart S., Syrengelas A., Miller R., Levy R., 1993
Clinical trials of idiotype-specific vaccine in B-cell lymphomas.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 690: 385-387

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: 2357-2368

IGNEY F.H. und Krammer P.H., 2002
Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.
Nature Rev. Cancer 2: 277-288

IRVINE K.R., Rao J.B., Rosenberg S.A., Restifo N.P., 1996
Cytokine enhancement of DNA immunization leads to effective treatment of established pulmonary metastases.
J. Immunol. 156: 238-245

ISHIDO S., Choi J.K., Lee B.S., Wang C., DeMaria M., Johnson R.P., Cohen G.B., Jung J.U., 2000
Inhibition of natural killer cell-mediated cytotoxicity by Kaposi´s sarcoma-associated herpesvirus K5 protein.
Immunity 13: 365-374

JANEWAY Ch.A. und Travers P., 1997
Immunologie, 2. Auflage
Spektrum Verlag, Heidelberg

JOHNSEN A.K., Templeton D.J., Sy M., Harding C.V., 1999
Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis.
J. Immunol. 163: 4224-4231

KAMINSKI M.S., Kitamura K., Maloney D.G., Levy R., 1987
Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Inhibition of tumor immunity by free idiotype protein.
J. Immunol. 138: 1289-1296

KAMINSKI M.S., Tuck M., Estes J., Kolstad A., Ross C.W., Zasadny K., Regan D., Kison P., Fisher S., Kroll S., Wahl R.L., 2005
131I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma.
N. Engl. J. Med. 352(5): 441-449

KEDAR E., Schwartzbach M., Raanan Z., Hefetz S., 1977
In vitro induction of cell-mediated immunity to murine leukemia cells. Cytotoxic activity in vitro and tumor-neutralizing capacity *in vivo* of anti-leukemia cytotoxic lymphocytes generated in macrocultures.
J. Immunol. Methods 16: 39-58

KELLY J.M., Darcy P.K., Markby J.L., Godfrey D.I., Takeda K., Yagita H., Smyth M.J., 2002, a
Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection.
Nat. Immunol. 3: 83-90

KELLY J.M., Takeda K., Darcy P.K., Yagita H., Smyth M.J., 2002, b
A role for IFN-γ in primary and secondary immunity generated by NK cell-sensitive tumor-expressing CD80 *in vivo.*
J. Immunol. 168: 4472-4479

KIM K.J., Kanellopoulos-Langvin C., Merwin R.M., Sachs D.H., Asofsky R., 1979
Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties.
J. Immunol. 122: 549-554

KIM U., Baumler A., Carruthers C., Bielat K., 1975
Immunological escape mechanism in spontaneously metastasizing mammary tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1012-1016

KLEIN G., Sjörgen H.O., Klein E., 1960
Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in primary autochthonous host.
Cancer Res. 20: 1561-1572

K. KRONENBERGER, 2002
Studien zur Spezifität und Klonalität von tumorreaktiven T-Zellen aus Triom-immunisierten Mäusen
Dissertation der Fakultät für Biologie der LMU München

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

KWAK L.W., Campbell M.J., Czerwinski D.K., Hart S., Miller R.A., Levy R., 1992
Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors.
N. Engl. J. Med. 327: 1209-1215

LASKOV R. und Scharf M.D., 1970.
Synthesis, assembly, and secretion of gamma globulin by mouse myeloma cells. I. Adaptation of the Merwin plasma cell tumor-11 to culture, cloning, and characterization of gamma globulin subunits.
J. Exp. Med. 131: 515-541

LEE S.H., Shin M.S., Kim H.S., Lee H.K., Park W.S., Kim S. Y., Lee J.H., Han S.Y. Park J.Y., Oh R.R., Jang J.J., Han J.Y., Lee J.Y., Yoo N.J., 1999
Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers.
Cancer Res. 59: 5683-5686

LEVITSKY H.I., Montgomery J., Ahmadzadeh M., Staveley-O´Carroll K., Guarnieri F., Longo D.L., Kwak L.W., 1996
Immunization with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced, but not B7-1-transduced, lymphoma cells primes idiotype-specific T cells and generates potent systemic antitumor immunity.
J. Immunol. 156: 3858-3865

LI Y.-S., Hayakawa K., Hardy R.R., 1993
The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver.
J. Exp. Med. 178: 951-960

LINDHOFER H., Mocikat R., Steipe B., Thierfelder S., 1995
Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies.
J. Immunol. 155: 219-225

LOLLINI P.L. und Forni G., 1999
Specific and non-specific immunity in the prevention of spontaneous tumours.
Immunol. Today 20: 347-350

MAEURER M.J., Gollin S.M., Martin D., Swaney W., Bryant J., Castelli C., Robbins P., Parmiani G., Storkus W.J., Lotze M.T., 1996
Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen.
J. Clin. Invest. 98: 1633-1641

MALISSEN M., Minard K., Mjolsness S., Kronenberg M., Goverman J., Hunkapiller T., Prystowsky M.B., Yoshikai Y., Fitch F., Mak T.W., 1984.
Mouse T cell antigen receptor: structure and organization of constant and joining gene segments encoding the beta polypeptide.
Cell 37: 1101-1110

MALONEY D.G., Brown S., Czerwinski D.K., Liles T.M., Hart S.M., Miller R.A., Levy R., 1992
Monoclonal anti-idiotype antibody therapy of B-cell lymphoma: the addition of a short course of chemotherapy does not interfere with the antitumor effect nor prevent the emergence of idiotype-negative variant cells.
Blood 80: 1502-1510

MARYANSKI J.L., Jongeneel C.V., Bucher P., Casanova J.L., Walker P.R., 1996
Single-cell PCR analysis of TCR repertoires selected by antigen *in vivo*: a high magnitude CD8 response is comprised of very few clones.
Immunity 4: 47-55

MATSUDA M., Salazar F., Petersson M., Masucci G., Hansson J., Pisa P., Zhang Q.J., Masucci M.G., Kiessling R., 1994
Interleukin 10 pretreatments protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic t cells and downregulates HLA class I expression.
J Exp. Med. 180: 2371-2376

MATSUI S., Ahlers J.D., Vortmeyer A.O., Terabe M., Tsukui T., Carbone D.P., Liotta L.A., Berzofsky J.A., 1999
A model for $CD8^+$ CTL tumor immunosurveillance and regulation of tumor escape by CD4 T cells through an effect on quality of CTL.
J. Immunol. 163: 184-193

McHEYZER-WILLIAMS M.G. und Davis M.M., 1995
Antigen-specific development of primary and memory T cells *in vivo*.
Science 268: 106-111

MILLER R.A., Maloney D.G., Warnke R., Levy R., 1982
Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody.
N. Engl. J. Med. 306: 517-522

MOCIKAT R., Braumüller H., Gumy A., Egeter O., Ziegler H., Reusch U., Bubeck A., Louis J., Mailhammer R., Riethmüller G., Koszinowski U., Röcken M., 2003
Natural killer cells activated by MHC class I^{low} targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses.
Immunity 19: 561-569

MOCIKAT R., Selmayr M., Thierfelder S., Lindhofer H., 1997.
Trioma-based vaccination against B-cell lymphoma confers long-lasting tumor-immunity.
Cancer Res. 57:2346-2349

MOSS P.A., Rowland-Jones S.L., Frodsham P.M., McAdam S., Giangrande P., McMichael A.J., Bell J.I., 1995
Persistent high frequency of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T cells in peripheral blood of infected donors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5773-5777

MÜHLHARDT C., 1999
Der Experimentator: Molekularbiologie.
G. Fischer Verlag, Stuttgart

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-γ.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8633-8638

NATALI P.G., Nicotra M.R., Bigotti A., Venturo I., Marcenaro L., Giacomini P., Russo C., 1989
Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6719-6723

NELSON E.L., Li X., Hsu F.J., Kwak L.W., Levy R., Clayberger C., Krensky A.M., 1996
Tumor-specific, cytotoxic T-lymphocyte resonse after idiotype vaccination for B-cell, non-Hodgkin´s lymphoma.
Blood 88: 580-589

NOEL P.J., Boise L.H., Green J.M., Thompson C.B., 1996
CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation.
J. Immunol. 157: 636-642

NOELLE R.J., Roy M., Shepherd D.M., Stamenkovic I., Ledbetter J.A., Aruffo A., 1992
A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6550-6554

OCHSENBEIN A.F., Klenerman P., Karrer U., Ludewig B., Pericin M., Hengartner H., Zinkernagel R.M., 1999
Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2233-2238

OCHSENBEIN A.F., Sierro S., Odermatt B., Pericin M., Karrer U., Hermans J., Hemmi S., Hengartner H., Zinkernagel R.M., 2001
Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction.
Nature 411: 1058-1064

ONRUST S.V., Hartl P.M., Rosen S.D., Hanahan D., 1996
Modulation of L-selectin ligand expression during an immune response accompanying tumorigenesis in transgenic mice.
J. Clin. Invest. 97: 54-64

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: 4319-4323

PANTALEO G., Demarest J.F., Soudeyns H., Graziosi C., Denis F., Adelsberger J.W., Borrow P., Saag M.S., Shaw G.M., Sekaly R.P., 1994
Major expansion of $CD8^+$ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response in HIV.
Nature 370: 463-467

PARDOLL D.M., 1993
New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors.
Curr. Opin. Immunol. 5: 719-725

PARDOLL D.M., 2001
Immunology. Stress, NK receptors, and immune surveillance.
Science 294: 534-536

PARKER K. C., Bednarek M. A., Colignan J. E., 1994
Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side chains.
J. Immunol. 152: 163

PIALI L., Fichtel A., Terpe H.J., Imhof B.A., Gisler R.H., 1995
Endothelial vascular cell adhesion molecule 1 expression is suppressed by melanoma and carcinoma.
J. Exp. Med. 181: 811-816

PICCIOLI D., Sbrana S., Melandri E., Valiante N.M., 2002
Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells.
J. Exp. Med. 195: 335-341

PLAUTZ G.E., Yang Z.Y., Wu B.Y., Gao X., Huang L., Nabel G.J., 1993
Immunotherapy of malignancy by *in vivo* gene transfer into tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 4645-4649

PREHN R.T., Main J.M., 1957
Immunity of methylcholanthrene-induced sarcomas.
J. Natl. Cancer Inst. 18: 769-778

QIN Z., Blankenstein T., 2000
$CD4^+$ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis which is dependent on IFN-γ receptor expression by non-hematopoietic cells.
Immunity 12: 677-686

RESTIFO N.P., Esquivel F., Kawakami Y., Yewdell J.W., Mule J.J., Rosenberg S.A. Bennink J.R., 1993
Identification of human cancers deficient in antigen processing.
J. Exp. Med. 177: 265-272

RIBAS A., Butterfield L.H., McBride W.H., Dissette V.B., Koh A., Vollmer C.M., Hu B., Chen A.Y., Glaspy J.A., Economou J.S., 1999
Characterization of antitumor immunization to a defined melanoma antigen using genetically engineered murine dendritic cells.
Cancer Gene Ther. 6: 523-536

RICE J., Buchan S., Stevenson F.K., 2002.
Critical components of a DNA fusion vaccine able to induce protective cytotoxic T cells against a single epitope of a tumor antigen.
J. Immunol. 169: 3908-3913

ROCHA G., Deschenes J., Rowsey J.J., 1998
The immunology of corneal graft rejection.
Crit. Rev. Immunol. 18:305-325

ROSENBERG S.A., 2001
Progress in human tumour immunology and immunotherapy.
Nature 411: 380-384

ROSENBERG S.A., Packard B.S., Aebersold P.M., Solomon D., Topalian S.L. Toy S.T., Simon P., Lotze M.T., Yang J.C., Seipp C.A., 1988
Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report.
N. Engl. J. Med. 319: 1676-1680

ROSENBERG S.A., Spiess P., Lafreniere R., 1986
A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes.
Science 233: 1318-1321

ROSENBERG S.A., Yannelli J.R., Yang J.C., Topalian S.L., Schwartzentruber D.J., Weber J.S., Parkinson D.R., Seipp C.A., Einhorn J.H., White D.E., 1994
Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2.
J. Natl. Cancer Inst. 86: 1159-1166

ROTEM-YEHUDAR R., Groettrup M., Soza A., Kloetzel P.M., Ehrlich R., 1996
LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class 1 MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12.
J. Exp. Med. 183: 499-514

SAKAGUCHI S., 2000
Regulatory T cells: key controllers of immunogenic self-tolerance.
Cell 101: 455-458

SCHILLER J.H., Hank J., Storer B., Borchert A.A., Moore K.H., Albertini M., Bechhofer R., Wesley O, Brown R.R., Bastin A.M., 1993
A direct comparison of immunological and clinical side effects of interleukin-2 with and without interferon-α in humans.
Cancer Res. 53: 1286-1292

SCHÜLER T., Qin Z., Ibe S., Noben-Trauth N., Blankenstein T., 1999
T helper cell type 1-associated and cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunity is impaired in interleukin 4-deficient mice.
J. Exp. Med. 189: 803-810

SCHÜTT C., 2004
Grundlagen der Immunologie für den praktischen Arzt
Hans Marseille Verlag GmbH München

SCHWARTZ R.H., 1990
A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy.
Science 248: 1349-1356

SELIGER B., Maeurer M.J., Ferrone S., 1997
TAP off – tumors on.
Immunol. Today 18: 292-299

SELMAYR M., Strehl J., Kremer J.-P., Kremmer E., Doenecke A., Hallek M., Menzel H., Thielemans K., Thierfelder S., Mocikat R., 1999
Induction of tumor immunity by autologous B lymphoma cells expressing a genetically engineered idiotype.
Gene Therapy 6: 778-784

SENSI M., Salvi S., Castelli C., Maccalli C., Mazzocchi A., Mortarini R., Nicolini G., Herlyn M., Parmiani G., Anichini A., 1993
T cell receptor (TCR) structure of autologous melanoma-reactive cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones: tumor-infiltrating lymphocytes overexpress *in vivo* the TCR beta chain sequence used by an HLA-A2-restricted and melanocyte-lineage-specific CTL clone.
J. Exp. Med. 178: 1231-1246

SEUNG S., Urban J.L., Schreiber H., 1993
A tumor escape variant that has lost one major histocompatibility complex class I restriction element induces specific $CD8^+$ T cells to an antigen that no longer serves as a target.
J. Exp. Med. 178: 933-940

SINGH S., Ross S.R., Acena M., Rowley D.A:, Schreiber H., 1992
Stroma is critical for preventing or permitting immunological destruction of antigenic cancer cells.
J. Exp. Med. 175: 139-146

SMYTH M.J., Godfrey D.I., Trapani J.A., 2001
A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy.
Nat. Immunol. 2: 293-299

SOGN J.A., 1998
Tumor immunology: the glass is half full.
Immunity 9: 757-763

STEINLE A., Reinhardt C., Jantzer P., Schendel D.J., 1995
In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominanted allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex.
J. Immunol. 162: 4790-4795

STEVENSON F.K., George A.J., Glennie M.J., 1990
Anti-idiotypic therapy of leukemias and lymphomas.
Chem. Immunol. 48: 126-166

STREHL J., Selmayr M., Kremer J.P., Hultner L., Lindhofer H., Mocikat R., 1999
Anti-idiotypic therapy of B-cell lymphoma with cytokine gene-modified trioma cells.
Int. J. Cancer 83: 113-120

SYRENGELAS A.D. und Levy R., 1999
DNA vaccination against the idiotype of a murine B cell lymphoma: mechanism of tumor protection.
J. Immunol. 162: 4790-4795

TAKAHASHI K., Ono K., Hirabayashi Y., Taniguchi M., 1988
Escape mechanisms of melanoma from immune system by soluble melanoma antigen.
J. Immunol. 140: 3244-3248

TEPPER R.I. und Mule J.J., 1994
Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells.
Hum. Gene Ther. 5: 153-164

TOES R.E.M., Ossendorp F., Offringa R., Melief C.J.M., 1999
CD4 T cells and their role in antitumor immune responses.
J. Exp. Med. 189: 753-756

TSIOULIAS G.J. et al., 1993
Expression of HLA class I antigens in sporadic adenomas and histologically normal mucosa of the colon.
Cancer Res. 53: 2374-2378

UNKELESS J.C., 1979.
Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors.
J. Exp. Med. 150: 580-596

VAN DEN EYNDE B.J. und van der Bruggen P., 1997
T cell defined tumor antigens.
Curr. Opin. Immunol. 9: 684-693

VASMEL W.L., Sijts E.J., Leupers C.J., Matthews E.A., Melief C.J., 1989
Primary virus-induced lymphomas evade T cell immunity by failure to express viral antigens.
J. Exp. Med. 169: 1233-1254

WEN Y.J., Barlogie B., Yi Q., 2001
Idiotype-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: evidence for their capacity to lyse autologous primary tumor cells.
Blood 97: 1750-1755

WITZIG T.E., Gordon L.I., Cabanillas F., Czuczman M.S., Emmanouilides C., Joyce R., Pohlman B.L., Bartlett N.L., Wiseman G.A., Padre N., Grillo-Lopez A.J., Multani P., White C.A., 2002, a
Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or tranformed B-cell non-Hodgkin´s lymphoma.
J. Clin. Oncol. 20: 2453-2463

WITZIG T.E., Flinn I.W., Gordon L.I., Emmanouilides C., Czuczman M.S., Saleh M.N., Cripe L., Wiseman G., Olejnik T., Multani P.S., White C.A., 2002, b
Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin´s lymphoma.
J. Clin. Oncol. 20: 3262-3269

WORTZEL R.D., Philipps C., Schreiber H., 1983
Multiple tumour-specific antigens expressed on a single tumour cell.
Nature 304: 165-167

ZINKERNAGEL R.M., Doherty P.C., 1975
H-2 compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus.
J. Exp. Med. 141: 1427-1436

Veröffentlichungen

Adam C., King S., Allgeier T., Braumüller H., Lüking C., Mysliwietz J., Kriegeskorte A., Busch D.H., Röcken M. und Mocikat R., 2005
DC-NK cell cross talk as a novel $CD4^+$ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction.
Blood 106: 338-344

Publizierte Abstrakts und Kongressbeiträge:

C. Lüking, K. Kronenberger, B. Frankenberger and R. Mocikat, 2004
Characterisation of tumour-specific T-cells generated by trioma immunization.
12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montréal, Canada, 18.-23. July 2004
Abstrakt in *Clinical and Investigative Medicine* 27(4)

S. King, C. Adam, T. Allgeier, C. Lüking, R. Mocikat, 2005
The DC-NK cell axis in CTL stimulation: an investigation into the cytokines involved.
36th Annual Meeting of the DGfI (German Society of Immunology) and 36th Annual Meeting of the SSI (Scandinavian Society for Immunology), Kiel, Germany, 21.-24. September 2005

S. King, C. Adam, C. Lüking, T. Allgeier, R. Mocikat, 2005
The cytokine requirements for CTL induction through reciprocal DC-NK activation.
Annual Congress of the BSI (British Society for Immunology), Harrogate International Centre, UK, 06.-09. December 2005

DANK

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Mocikat. Unter seiner optimalen wissenschaftlichen Leitung durfte ich in den letzten drei Jahren meine Doktorarbeit bei der GSF anfertigen. Während dieser Zeit hatte ich stets seine vollste Unterstützung.
Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München danke ich dafür, dass sie die Betreuung meiner Doktorarbeit übernommen hat.
Vielen Dank an Frau Prof. Dr. D. J. Schendel, die mir die Durchführung dieser Arbeit am Institut für Molekulare Immunologie der GSF ermöglicht hat.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Arbeitskollegen/innen aus der AG Mocikat, Konrad, Susan, Julika, Nicola, Babsi, Christian und Thomas: Vielen, vielen Dank für die Hilfe und Unterstützung nicht nur wissenschaftlicher Art, die ihr mir während dieser drei Jahre gegeben habt! Es hat sehr viel Freude gemacht, mit Euch zusammen zu arbeiten, und ich hoffe, dass wir auch noch eine ganze Weile weiter in so netter Atmosphäre zusammen arbeiten werden!
Ein weiterer großer Dank geht an das Tierstallpersonal für die tolle und unkomplizierte Zusammenarbeit.
Auch den anderen Kollegen/innen des IMI danke ich für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsklima, das die vergangenen drei Jahre zu etwas ganz Besonderem gemacht hat!

Ein riesengroßes Dankeschön geht auch an meine Freunde/innen, die stets ein offenes Ohr für mich hatten und mich immer wieder aufgebaut haben, wenn es mal nicht so gut gelaufen ist. Ela, Dir ein besonderes Dankeschön für Deine Freundschaft, die mir sehr viel wert ist und so einige Tage in Magdeburg und München gerettet hat! Andrea, vielen, vielen Dank für die vielen netten Gespräche beim Mittagessen, die wir aus Tradition von unserer Hexal-Zeit übernommen haben! So mancher Arbeitstag wurde danach doch noch gut.

Und zu guter Letzt danke ich ganz besonders meiner Familie, die mich immer und bei allem unterstützt, mich aufbaut, wenn es meiner Meinung nach schlecht läuft und immer für mich da ist, wenn ich sie brauche. Danke, danke, danke!

LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name:	Carolin Lüking
Geburtstag/-ort:	14. Juni 1976, Bielefeld
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

08/1982 – 07/1986	Grundschule Kachtenhausen
08/1986 – 06/1995	Städtisches Gymnasium Lage

Studium

09/1995 – 09/1996	Medizinstudium an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
09/1996 – 04/2001	Pharmaziestudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
08/1998	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04/2001	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
05/2001 – 10/2001	Praktikum bei der Hexal AG, Holzkirchen
11/2001 – 04/2002	Praktikum in der Klösterl Apotheke, München
07/2002	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
08/2002	Approbation als Apothekerin

Promotion

09/2002 – 09/2005	Promotion an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München Durchführung der Arbeit am Institut für Molekulare Immunologie der GSF in München, Großhadern