

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der
Universität München
Vorstand: Prof. W. Hiddemann

**DNA-Vakzinierung mit Idiotyp Zytokin
Fusionskonstrukten gegen Lymphome im
Mausmodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

vorgelegt von

Dieter Edbauer

aus
München

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Hallek

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. J. P. Johnson, Ph.D.
Prof. Dr. med. B. Emmerich

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 5.12.2002

Meiner Familie

Der Kampf gegen Gipfel vermag ein Menschenherz auszufüllen. Wir müssen uns Sisyphos als einen glücklichen Menschen vorstellen.

Albert Camus

Danksagung

Prof. Michael Hallek möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und seine kontinuierliche Unterstützung danken. Besonders dankbar bin ich für den Freiraum den er mir dabei ermöglicht hat. Ich bin sicher, dass ich dabei viel für meine zukünftige wissenschaftliche Karriere gelernt habe, und profitiere bereits jetzt davon.

Prof. E.-L. Winnacker bin ich für die Schaffung der hervorragenden Arbeitsbedingungen am Genzentrum zu großem Dank verpflichtet.

Dr. Axel Doenecke möchte ich zunächst für seine exzellente Einführung in die Welt der Molekularbiologie danken.

Zu jeder Tages und Nachtzeit stand mir auch Dr. Heidi Feldmann mit wichtigen Tips und einem offenem Ohr für meinem Kummer zur Seite. Der eine oder andere richtungsweisende "Tritt" war bitter nötig. Material und vor allem viel Hilfe bei den Immunologischen Fragestellungen verdanke ich PD Dr. Ralph Mocikat. Ohne seine Hilfe wären die Tierversuche nicht möglich gewesen.

Für die exzellente Hilfe bei allen Tierarbeiten danke ich besonders Julika Jasny, Ingrid Renner-Müller, Petra Renner und allen Tierpflegern.

Sehr angenehm war auch die häufige Diskussion mit Markus Warmuth, Dr. Anne Girod, Bettina Meier, Dr. Susan King, Prof. Akis Zorbas und natürlich allen Mitgliedern des Hallek-Labors.

An dieser Stelle muss ich mich auch für die schier unendliche Geduld und Nachsicht von Siegi Kastenmüller bei allen meinen Nachlässigkeiten in Sachen Verwaltung bedanken (Hari-bo sei Dank !).

Diese Arbeit wäre nicht die selbe gewesen ohne den Spaß, den ich vor allem mit der immer kritischen Kristin Leike (Penne al arrabiata), der genussüchtigen Nadja Huttner ("Ich hab Lust auf was Süßes... oder was Saures !") und der dauergestressten Bettina Meier (heißer Amarretto mit Eis und Sahne) innerhalb und außerhalb des Labors hatte. Knut Hennecke danke ich für seinen Beistand in allen Lebenslagen, SWR3-Luna für die Musik in der Zellkultur. Bei meiner Familie und meinen Freunden außerhalb des Labors muss ich mich für die endlose Vernachlässigung entschuldigen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Arbeit durch ihre Unterstützung erst ermöglicht haben. Besonders muss ich mich für ihre unendliche Geduld beim Korrekturlesen bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lymphome	1
1.1.1	Non-Hodgkin-Lymphome	1
1.1.2	Neue Therapieansätze berücksichtigen die Tumorbiologie	3
1.2	Tumorantige	5
1.2.1	Der Idiotyp als Modell-Tumorantigen	5
1.2.2	Identifikation von Tumorantigenen	7
1.3	Genetische Vakzinierung	8
1.3.1	Zelluläre Mechanismen der genetischen Vakzinierung	9
1.3.2	immunstimulatorische DNA-Sequenzen (ISS)	10
1.3.3	Zytokine sind potente Immunmodulatoren	10
1.4	Ziel der Arbeit	15
2	Materialien	16
2.1	Zelllinien, Bakterienstämme und Versuchstiere	16
2.2	Plasmide	16
2.3	Antikörper	17
2.4	Enzyme	17
2.5	Chemikalien, Geräte und andere Materialien	18
3	Methoden	22
3.1	Klonierung und Vermehrung von DNA in <i>E. coli</i>	22
3.1.1	Bakterienhaltung	22
3.1.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	23
3.1.3	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E.coli</i>	23
3.2	DNA-Techniken	24
3.2.1	Agarose-Gel-Elektrophorese, Gelextraktion	24
3.2.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	24
3.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	25
3.2.4	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	25
3.2.5	Restriktions-Verdau	25
3.2.6	Glätten überhängender Enden	26
3.2.7	Dephosphorylierung	26
3.2.8	Phosphorylierung von Oligonukleotiden	26
3.2.9	Ligation	26
3.2.10	DNA-Sequenzierung	27
3.3	PCR-Methoden	27
3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA	27
3.3.2	Erststrang-Synthese von cDNA für RT-PCR	27
3.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27

3.3.4	5' RACE-PCR - rapid amplification of cDNA ends	28
3.3.5	PCR-Mutagenese	29
3.3.6	Klonierung von PCR-Produkten	29
3.4	Protein-Arbeiten	29
3.4.1	Zelllysate	29
3.4.2	Immunpräzipitation	30
3.4.3	SDS-PAGE Elektrophorese: Glycin-Gele	30
3.4.4	SDS-PAGE Elektrophorese: Tricin-Gele	31
3.4.5	Coomassiefärbung	32
3.4.6	Silberfärbung	32
3.4.7	Western-Blot, Immunodetektion	33
3.4.8	ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay)	34
3.4.9	35S Markierung von Proteinen, Autoradiographie	35
3.5	Zellkultur - Haltung eukaryontischer Zellen	36
3.5.1	Kultivierung von Zelllinien	36
3.5.2	Bestimmung der Zellzahl	36
3.5.3	Adhärente Zellen	36
3.5.4	Suspensionszellen	37
3.5.5	Einfrieren von Zellen	37
3.5.6	Calciumphosphat-Transfektion von adhärenen Zellen	37
3.5.7	Präzipitation von DNA auf Gold-Mikropartikel	38
3.5.8	Isolation von PBL über Ficoll-Gradienten	38
3.5.9	Generierung von PHA-Blasten	38
3.5.10	3H-Thymidineinbau zum Nachweis der Zellproliferation	39
3.6	Analyse der zellulären Immunantwort	39
3.6.1	Milzpräparation zur Lymphozytenkultur	39
3.6.2	Restimulation von Splenozyten <i>in vitro</i>	40
3.6.3	T-Zellproliferationsassay	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Idiotyp-Klonierung	41
4.1.1	Konsensus-Primer ermöglichen die Klonierung des BCL1 Idiotyps	41
4.1.2	5'-RACE-PCR zur Klonierung des A20 Idiotyps	42
4.1.3	Analyse der A20-VL CDR-Sequenz	43
4.1.4	Fusion der variablen Domänen zu single-chain Fragmenten	43
4.2	Klonierung von Fusionskonstrukten mit immunogenen Carriern und Zytokinen	44
4.2.1	Klonierungsstrategie	46
4.2.2	Auswahl und Klonierung der verwendeten Zytokine	47
4.2.3	Klonierung des Tetanus Toxin Fragment C aus <i>Clostridium tetani</i>	50
4.3	Analyse der Fusionskonstrukte <i>in vitro</i> in HEK293 Zellen	52
4.3.1	Idiotyp scFv ohne Zytokinanteil sind nur im Zelllysate nachweisbar	52
4.3.2	Klonierung einer stabilen sezernierten Negativkontrolle	53
4.3.3	Expressionsnachweis in ELISA und Western Blot	54
4.3.4	Die Zytokine sind als Fusionsprotein bioaktiv	56
4.3.5	Idiotyp scFv sind korrekt gefaltet	59
4.4	Optimierung des Vakzinierungsweges am Beispiel von HBsAg	60
4.5	Tiermodell	62

4.5.1	Minimale Tumordosis von A20 und BCL1	62
4.5.2	Protokoll zur protektiven Vakzinierung	63
4.5.3	Untersuchung der humoralen Immunantwort	64
4.5.4	Proliferationsassay aus Milzzellen geimpfter Tiere	65
4.5.5	HBsAg induziert eine starke zelluläre Immunantwort	68
4.5.6	Protektiver Effekt	68
5	Diskussion	70
5.1	Klonierung der Lymphom-Idiotypen, DNA-Vakzinierung	70
5.1.1	Klonierung von Lymphom scFv mit RACE-PCR	70
5.1.2	Mechanismen der DNA-Vakzinierung	71
5.2	Expression der Fusionskonstrukte in vitro	73
5.2.1	Zyktokine als Immunmodulatoren	73
5.2.2	Zytokine stabilisieren die Idiotyp-scFv	76
5.2.3	Molekulare Adjuvantien	77
5.3	Untersuchung des optimalen Vakzinierungsweges	78
5.4	Tiermodell	79
5.5	Untersuchung der Immunantwort	79
5.5.1	Humorale Immunantwort	79
5.5.2	Zelluläre Immunantwort	80
5.5.3	Kein protektiver Effekt im ersten Tierversuch	81
5.5.4	Andere moderne Vakzinierungs-Strategien	82
5.6	Klinische Studien	83
5.7	Perspektiven	84
6	Zusammenfassung	85
7	Literaturverzeichnis	86
8	Anhang	103
8.1	Verwendete Oligonukleotide	103
8.2	Abkürzungsverzeichnis	108
8.3	Lebenslauf	112
8.4	Schriftenverzeichnis:	113

1 Einleitung

1.1 Lymphome

Lymphome sind maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems. Man unterscheidet zwei Hauptgruppen, die Lymphogranulomatose (Morbus Hodgkin) und die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Ziel dieser Arbeit ist die Verbesserung bekannter Strategien zur Immuntherapie von Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe. Als Tumorantigen dient das Oberflächen-Immunglobulin, der sogenannte **Idiotyp**. Zunächst soll hier auf die pathologische Einteilung und die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten eingegangen werden. Entscheidend für alle immuntherapeutischen Überlegungen ist, dass der Tumor eng mit dem Immunsystem verwoben ist: Die Lymphomzellen stammen von Lymphozyten ab, die Lymphknoteninfiltration steht damit am Beginn der Tumorentwicklung, während sie bei anderen Tumoren Zeichen des Krankheitsfortschritts und der Generalisierung ist.

1.1.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome machen mit einer jährlichen Inzidenz von 10-15 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner etwa 70% der malignen Lymphome aus [140]. Als klonale Erkrankung können sich Lymphome aus den unterschiedlichen Entwicklungsstufen der B- bzw. T-Zell-Reihe entwickeln, und zwar in einem Verhältnis von etwa 80% zu 20%. Nach diesem Leitprinzip wurden die NHL nach LENNERT in der Kieler Klassifikation unterteilt (Abb. 1.1): Jedes Lymphom wird nach dem histologisch korrelierenden Stadium in der Lymphopoese benannt. Die REAL-Klassifikation [68] und die neue darauf basierende WHO-Klassifikation [67, 34] berücksichtigen zusätzlich verstärkt Tumor-Zytogenetik und klinische Symptomatik. Tumore aus frühen Entwicklungsstadien verlaufen unbehandelt meist akut, und führen unbehandelt in wenigen Monaten zum Tode. Höher differenzierte Tumore zeigen einen eher niedrigmalignen Verlauf über mehrere Jahre.

Aggressive Polychemotherapie führt meist zu einer zeitweisen Remission der hochmalignen NHL, Rezidive sind aber häufig. Hochdosis-Chemotherapie mit nachfolgender Stammzelltransplantation ermöglicht auch bei Rezidiven noch echte Heilungen. Das größte Problem machen hier die therapie-refraktären Rezidive aus. Die Chemotherapie ist durch hohe Toxizität kaum weiter steigerbar.

Die geringere Mitoserate bei den niedrigmalignen Lymphomen beeinträchtigt die Wirksamkeit der Chemotherapie. Häufig kommt es nach Jahren zum Übergang in eine aggressive

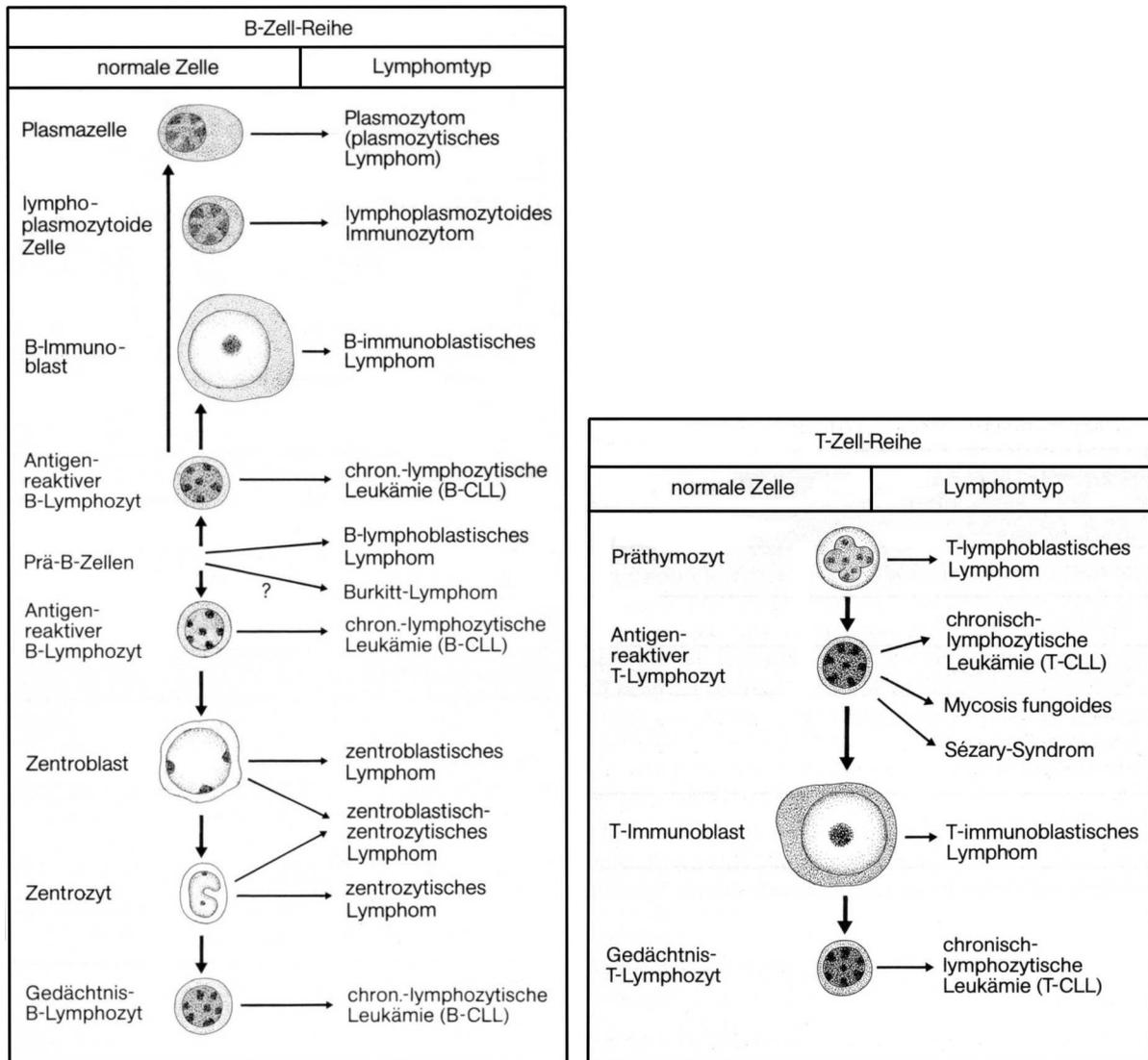


Abbildung 1.1: **Kiel-Klassifikation:** Zu jeder Reifungsstufe der B- und T-Zellreihe werden korrelierende Tumoren beobachtet. (aus [140]).

hochmaligne Form, die meist therapierefraktär ist. Langfristige Heilungen sind mit unter 20% deutlich seltener. Durch die anfangs nur geringe Symptomatik wird die Krankheit auch häufig erst spät erkannt. Das langsame Fortschreiten macht sie zu guten Kandidaten für eine Immuntherapie.

1.1.2 Neue Therapieansätze berücksichtigen die Tumorbiologie

Deswegen wird seit langem intensiv nach Ergänzungen bzw. Alternativen zur konventionellen Radiochemotherapie gesucht (Übersicht in [154]). Die ersten Ansätze zielten auf die direkte Zerstörung der Tumorzellen und konzentrierten sich auf Zytokintherapie, Lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK, z.B. in [186]), und monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene wie CD20 und den sogenannten **Idiotyp** [120]: Als klonale Erkrankung der B-Zellreihe exprimieren alle Tumorzellen eines B-Zell-Lymphoms einen identischen (oder durch wenige vereinzelte Punktmutationen nur gering polymorphen) Antikörper auf ihrer Oberfläche. Myelome sezernieren diesen Antikörper zusätzlich in großen Mengen ins Serum, wo er als klonale M-Bande in der Elektrophorese sichtbar wird.

Während der Reifung jeder B-Zelle entsteht durch die sogenannte VDJ-Rekombination ein einzigartiges Gen, das für den Idiotyp kodiert: Aus je einem von insgesamt ca. 250 V-Segmenten (Variable), 12 D-Segmenten (Diversity) und 6 J-Segmenten (Joining) entsteht durch somatische Rekombination am Genlocus der schweren Kette die variable Region des Antikörpers, die wiederum durch Rekombination mit der konstanten Region eines bestimmten Isotyps (Immunglobulin-Subklassen) kombiniert wird. Die leichte Kette wird ähnlich gebildet, allerdings fehlen die D-Segmente. Während der Rekombination treten an den Segmentgrenzen gehäuft "Fehler" auf, die Hypermutation im Rahmen der Affinitätsreifung in den Lymphfollikeln erhöhen die Vielfalt weiter. So entsteht ein einzigartiges Tumorantigen, das nur in den Zellen des malignen B-Zell-Klons exprimiert wird. Ein klarer Nachteil dieser hohen Tumorspezifität ist allerdings auch die Patientenspezifität: für jeden Patienten muss erneut die Idiotyp-Sequenz des malignen Klons ermittelt werden.

Infusion monoklonaler Anti-Idiotyp-Antikörper hat teilweise kurzzeitig dramatische Erfolge möglich gemacht [125]¹, nur kam es fast immer zu einem raschen Rezidiv einer leicht veränderten Tumorzellpopulation (meist Punktmutationen in den hypervariablen Idiotyp Bereichen=CDRs). Diese ersten Immuntherapieversuche belegen zwar die vielversprechenden Möglichkeiten des Idiotyps als Zielantigen, zeigen aber auch ihre Grenzen: Nur eine breite polyklonale Immunantwort nach aktiver Immunisierung kann längerfristig auch gegen leicht mutierte Tumorzellen wirken [29].

Optimale Antigenpräsentation relevanter Tumorantigene ist die Basis aller immuntherapeu-

¹Im Gegensatz zur Plasmapherese ist nach Antikörpertherapie auch nach 12 h eine sichtbare Reduktion der M-Bande beim Plasmozytom nachweisbar.

tischen Ansätze. B-Zell-Lymphome nehmen hier eine gewisse Sonderstellung ein: Im Unterschied zu soliden Tumoren haben B-Zell-Lymphome genau wie nicht-maligne B-Zellen die Eigenschaften Professionell Antigenpräsentierender Zellen (APC) und verfügen über alle molekularen Voraussetzungen: 1. MHC Klasse II Moleküle zusätzlich zu Klasse I, 2. kostimulatorische Moleküle (B7) und 3. Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, LFA-3). Neben exogenen Antigen präsentieren aktivierte B-Zellen auch eigene Antigene, darunter auch ihren Idiotyp [20, 187, 188]. Trotzdem findet man in der Regel keine spontane T-Zell-Antwort bei Lymphompatienten² Die strenge Trennung der B- und T-Zellkompartimente im Lymphknoten verhindert scheinbar *in vivo* eine Immunreaktion gegen die Lymphomzellen [152]. T-Zellen, die trotzdem in der Nähe der Lymphompakete gefunden werden, sind hochgradig abnorm. Sie reagieren *in vitro* nicht auf TCR-Signale durch Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28.

In der Vergangenheit sind viele Versuche gemacht worden, die Antigenität von Tumorzellen zu steigern. Durch GM-CSF Transfektion werden APC angelockt und aktiviert. Die Immunisierung mit bestrahlten Transfektanten führt in vielen Tumormodellen zu protektiver Immunität. Transfektion kostimulatorischer Moleküle (vor allem B7-1, das homologe B7-2 hat erstaunlicherweise keinen Effekt [58, 124]) ist in einigen Tumormodellen recht erfolgversprechend in anderen eher enttäuschend (z.B. A20 [111]). Die Wirkung beruht auf verstärktem cross-priming [78], ist aber stark von der inhärenten Immunogenität des Tumors abhängig [36]. Die meisten malignen B-Zellen exprimieren von sich aus so wenig B7, dass nicht einmal allogene T-Zellen darauf reagieren. Andererseits ist die Expression stark genug, dass Lymphomzellen auch keine spezifische Anergie induzieren [49].

Realitätsnäher als die Überexpression einzelner Komponenten ist die Aktivierung der endogenen APC-Funktion durch CD40-Ligand-Stimulation: alle für die APC-Funktion relevanten Moleküle werden durch diesen Stimulus verstärkt exprimiert [153, 23]. Mit CD40-Ligand aktivierte B-Zellen kann man durch mehrfache *in vitro* Stimulation tumorspezifische T-Zellen expandieren, die auch unstimulierte Lymphomzellen effektiv erkennen und lysieren [155]. Aus einer Lymphknoten-Biospie konnten auf diese Weise bis zu 10^9 T-Zellen expandiert werden, genug für einen adoptiven Transfer³. Die beteiligten Tumorantigene sind leider bisher nicht bekannt.

Verschiedene immunsuppressive Faktoren erschweren eine Immunisierung *in vivo* bei Lymphompatienten: Die Tumormasse hemmt durch große Mengen TGF- β [127] und IL-10 [6] eine spezifische T-Zell-Antwort, oder verhindert sie sogar ganz. Effektive Immunisierung *in vivo* ist wohl nur bei geringer Tumorlast möglich. Ein interessanter Ansatz, diesem Problem zu entgehen, ist den (tumorfreen) Knochenmarksspender vor der Transplantation *in vivo* zu immu-

²Ein Mechanismus könnte auch die klonale Deletion tumorspezifischer T-Zellen sein [18].

³Erstaunlicherweise steigert IL-4 Zugabe die CTL-Antwort, während sie von IL-12 gehemmt wird. Außerdem könnten T-Helferzellen die malignen B-Zellen *in vivo* sogar im Wachstum stimulieren. (vgl. Zytokindiskussion)

nisieren. Dieser Ansatz ist in Einzelfällen bereits erfolgreich mit Id-KLH praktiziert worden [103].

1.2 Tumorantige

1.2.1 Der Idiotyp als Modell-Tumorantigen

Idiotyp-Protein wurde in den verschiedensten Formulierungen erfolgreich zur Immunisierung in vielen Lymphom-Modellen und an Patienten verwendet (Tab. 1.2). Im Gegensatz zu Infektionskrankheiten wie Lepra und Leishmaniasis konnte bisher kein Effektormechanismus definiert werden, der gut mit Tumorprotektion/Überleben korreliert. Bei den verschiedenen Therapiestrategien wurden alle Arten der Immunantwort gegen den Idiotyp beobachtet: Antikörper [125, 24, 61], CD4 positive T-Zellen [24, 101, 76, 108] und CD8 positive zytotoxische T-Zellen [30, 31, 32, 27, 131]. Bei KLH-gekoppeltem Idiotyp (Id-KLH), dem langjährigen “Goldstandard”, spielen Antikörper (besonders der Subklasse IgG2a) die dominierende Rolle bei der Protektion. Kopplung mit *Keyhole limpet hemocyanin* ist ein bewährtes Mittel zur Steigerung der Immunogenität schwacher Antigene (z.B. Peptide). Bei anderen Immunisierungsmethoden war dagegen die T-Zell-Antwort entscheidend. Eine T-Zell-Antwort gegen Idiotyp ist sicher möglich [25, 19, 191, 93, 109], auch wenn teilweise klonale Deletion *in vivo* vermutet wurde [20]. Idiotyp-negative Tumorklone wurden wiederholt als Escape-Varianten beobachtet [60].

Erst vor kurzem wurden auch CTL-Epitope in Tumor-Idiotypen identifiziert: Wen *et al.* [190] generierten durch mehrfach-Stimulation *in vitro* CD4 und CD8 positive T-Zellen gegen ein 22 Aminosäuren langes Peptid aus der CDR-3 Region der schweren Kette, der am meisten variablen Region des Idiotyps. Trojan *et al.* [180] wählten dagegen einen bioinformatischen Ansatz: aus 192 Patienten mit B-Zelltumoren (überwiegend CLL, aber auch MM, FL, MCL) wurden insgesamt 795 CTL-Epitope (HLA-A2) mit teilweise hoher Affinität vorhergesagt. Überraschend viele Epitope lagen in den höher konservierten Framework-Regionen und wurden bei mehreren Patienten (bis zu 14) gefunden. Gegen einige dieser FR-Peptide ließen sich CTL expandieren⁴, die auch autologen Tumor lysierten.

Ein großer Nachteil bei allen Protein-Impfungen gegen Idiotyp ist, dass sie die Produktion und Aufreinigung großer Mengen patientenspezifischen Idiotyp-Proteins (häufig über Hybridome) erfordert. Dieser Schritt entfällt bei **DNA-Vakzinen** ganz: Geimpft wird mit der Antigen-cDNA, die als Plasmid mit eukaryontischer Expressionskassette direkt in Haut oder Muskel gespritzt wird. Das Antigen wird dann *in vivo* exprimiert. Nur die Idiotyp-Sequenz muss weiterhin für jeden Patienten bzw. für jedes Tumormodell kloniert werden. Die ersten Anti-Idiotyp-Antikörper generierten Watanabe *et al.* 1993 mit einer humanen Kappa-Kette in

⁴Als Stimulatorzellen wurden Peptid-gepulste CD40 aktivierte B-Zellen verwendet.

Anti-Id-Antikörper		
anti-Id-mAb	Patienten [125]	langfristige Reduktion der M-Bande
Hybridome/Patientenserum		
Id Id-KLH	BCL1 [59]	ohne KLH keine Antwort unterschiedlicher Effekt je nach Lymphom: [64] 50% für 38C13; [59] Protektion bis 1000 BCL1 Zellen, dann rasch schlechter; gegen A20 keine Protektion [15]
Id Liposomal	38C13 [102]	besser als Id-KLH, mit IL2 bis 85% Protektion
Id-KLH + GMCSF	Patienten [113]	Geschwister geimpft, anti-Id CTL, CD4
Id-KLH + GMCSF	38C13 [104]	durch GM-CSF Koinjektion verstärkte anti- Id Proliferation (50% Protektion)
Id-KLH + GMCSF	Patienten [12]	molekulare Remission von Patienten in CR
Id + GMCSF	Patienten(MM) [130]	klinisches Ansprechen nach Idiotyp i.d., reduzierte M-Bande, positiv im ELISPOT
rekombinante Proteine		
Id-huC-GMCSF	38C13 [174]	dimeres GM-CSF wirkt besser als monomeres, sehr schneller Ak-Anstieg mit GMCSF (40-70%), aber gleiches Plateau wie Id-KLH (30%)
Id-huC Id-huC-IL2	38C13 [37] 38C13 [37]	keine Antikörper-Antwort keine signifikanten Unterschiede zwischen Id-KLH und IL2, IL4, GMCSF-Fusionen
Id-huC-IL4	38C13 [37]	reduzierte Bioaktivität
scFv scFv-GMCSF	38C13 [64] 38C13 [64]	keine Protektion schwache Ak-Antwort, mehr IgG2a als Id-HuC-GMCSF, 20% Protektion, Antikörper gegen GM-CSF
scFv-IL1 β	38C13 [64]	schwache Ak-Antwort, keine Anti-IL1 β Antwort, 60% Protektion, ähnlich Id-KLH
scFv-IP10 scFv-MCP3	38C13,A20 [15] 38C13,A20 [15]	mit IP10 schwache Protektion gegen 38C13
Id-huC-CTLA4	38C13 [79]	DC-targeting über B7: Effekt identisch zu GM-CSF, da aber <i>keine</i> Bindung an DC, T-Zellproliferation \uparrow , 70% Protektion, auch niedrige Dosen (0.1 μ g) sehr effektiv

Tabelle 1.2: **Konventionelle Ansätze zur Idiotypvaksinierung:** Id Protein führte in verschiedenen Formulierungen im Tiermodell und am Patienten zur Immunantwort gegen Lymphome. Abkürzungen: KLH=keyhole limpet hemocyanin, huC=humaner Fc-Teil als xenogene Komponente, MM=Multiples Myelom.

der Maus [185], Hawkins *et al.* planten im gleichen Jahr eine Vakzine im BCL1-Modell [69].

1.2.2 Identifikation von Tumorantigenen

B-Zell-Lymphome waren schon früh ein Ziel immuntherapeutischer Strategien. Der Idiotyp war eines der ersten identifizierten tumorspezifischen Antigene überhaupt. Im Unterschied zu den meisten anderen bekannten Tumorantigenen, ist der Idiotyp allerdings auch absolut Patienten-spezifisch, was die breite klinische Erprobung deutlich erschwert. Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich entsprechend mit Methoden, Idiotypsequenzen zu klonieren.

Generell gibt es drei Klassen von Tumorantigenen, die einer Immunisierung zugänglich sind: Durch pathogenetisch relevante Mutationen entstehen relativ selten neue T-Zell-Epitope, sogenannte **Tumor-spezifische einzigartige Antigene** (z.B. CDK4, *mum-1*, Caspase 8). **Verbreitete Tumor-spezifische Antigene** sind z.B. die Gene der Melaninsynthese, wie Tyrosinase, *Mart* oder *gp100*. Die dritte Gruppe stellen **gewebespezifische Differenzierungsantigene** dar (z.B. *mage*, *gage*, *bage*, *rage*).

Die Identifikation von Tumorantigen ist allgemein äußerst mühsam (Übersicht in [184]): Früher wurden die MHC-gebunden Peptide von den Tumorzellen eluiert und sequenziert [169]. Mit cDNA-Banken aus Tumormaterial kann *in vitro* das Zielantigen Tumor-spezifischer CTL-Klone identifiziert werden (in Zelllinien oder bei unbekannter HLA-Restriktion in autologen Fibroblasten). Mit der SEREX-Methode (serological analysis of recombinantly expressed clones, z.B. [38]) wird in Patientenserum nach Tumor-spezifischen Antikörpern gesucht (die zugehörigen Antigene enthalten oft auch T-Zell-Epitope).

Craig Venter hat vorgeschlagen, das *Vaccinome* im High-Throughput-Verfahren nach starken Antigenen zu durchsuchen. Eine cDNA-Bibliothek aller Proteine des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* soll dafür systematisch im Tierversuch als DNA-Vakzine auf Kandidaten mit starker Immunreaktion untersucht werden [75].

Zunehmend erkannt wird die Bedeutung von CD4-Zellen für die Tumorabwehr [82]: Neben der wichtigen Rolle als Helferzellen für CD8 positive Zytotoxische T-Zellen (CTL) können CD4 Zellen auch direkt Eosinophile und Makrophagen zur Tumorlyse anregen.

Auch die Expressionsanalyse bekannter Antigene in anderer Tumorentitäten ist oft ergiebig: Die MAGE Antigene wurden in Melanomen entdeckt, und werden außer in Tumorzellen nur in HLA-negativen Zellen in Hoden und Plazenta exprimiert. Tatsächlich exprimieren auch Myelome unterschiedliche MAGE-Proteine und werden auch von MAGE-spezifischen T-Zell Klonen lysiert [7]. Die Reed-Sternbergzellen beim M. Hodgkin exprimieren MAGE-A4 [33]. MAGE Expression wurde auch in T-CLL, schwächer in B-CLL, und gar nicht in CML gefunden [158]. Das aus epithelialen Karzinomen bekannte MUC1 wird in NHL durch die Translokation $t(1;14)(q21;q32)$ aktiviert [53].

1.3 Genetische Vakzinierung

Die effiziente Genexpression *ex vivo* in primären Zellen oder gar *in vivo* in ganzen Geweben, ist schon lange Ziel vieler Forscher. Man erhofft sich damit Therapiemöglichkeiten für verschiedenste Krankheiten, wie primäre Gendefekte oder Autoimmunerkrankungen. Virale Vektorsysteme nehmen dabei die führende Rolle ein, auch wenn gerade in jüngster Zeit die damit verbundenen Risiken in die öffentliche Diskussion geraten sind. Überraschenderweise konnten Jon A. Wolff *et al.* 1990 erstmals zeigen [192], dass in Muskelgewebe bereits die Injektion von mRNA oder Plasmid-DNA (in Kochsalzlösung) mit überraschend hoher Effizienz zur Genexpression führt⁵.

Schon Wolff *et al.* vermuteten, dass die *in vivo* Expression eines körperfremden Proteins eine Immunantwort auslösen müsste, was schließlich 1992 von De-chu Tang *et al.* [173] bestätigt wurde: Die Antikörperantwort war mit konventionellen Proteinimpfungen vergleichbar. Mit Druckluft wurde Plasmid-DNA, auf Goldpartikel beschichtet, in die Haut geschossen. Dies setzte den Grundstein zur "genetischen Vakzinierung", oder kurz "DNA-Vakzinierung".

Seitdem wurden unzählige Varianten der Immunisierung mit Plasmid-DNA untersucht, und versucht, die beteiligten Effektormechanismen aufzuklären (Review in [175]). Entscheidend für das große Interesse an DNA-Vakzinen ist, dass man neben einer starken Antikörperantwort auch eine überraschend starke zellulär vermittelte Immunantwort (z.B. bei [181]) gegen das codierte Antigen beobachtet. Herkömmlichen Protein-in-Adjuvans Impfungen können das fast nie leisten, ihre Wirksamkeit beruht auf einem starkem neutralisierendem Antikörpertiter, der vor allem bei viralen Infektionen zu einem ausreichenden Schutz vor vielen Krankheiten führt. Viele (Infektions-) Krankheiten lassen sich nur mit einer effizienten zellulär vermittelter Abwehr bekämpfen. In solchen Fällen lässt sich manchmal ein abgeschwächter (attenuierter) Viren/Bakterienstamm herstellen, der nicht mehr pathogen, aber noch ausreichend immunogen ist.

Von der Generierung zytotoxischer T-Zellen verspricht man sich besonders für bisher nicht oder nur schwer beherrschbare Infektionskrankheiten wie HIV oder Malaria und in der Tumormunologie entscheidende Fortschritte. Genau hier liegen die Chancen der DNA-Vakzinierung, als Kompromiss zwischen risikoarmer Totvakzine und stärker immunogener aber risikobehafteter Lebendvakzine. Verschiedenste Experimente, größtenteils an Mäusen, aber auch an Primaten und inzwischen auch Menschen haben vielversprechende Ergebnisse geliefert: Die intensive Suche nach einer HIV-Vakzine war im Tiermodell schon recht erfolgreich: die Kombination mit IL2 führt zu einer beeindruckenden CTL-Antwort⁶ bei Rhesusaffen [9],

⁵Die Effizienz war dabei vergleichbar mit der *in vitro*-Transfektion von 3T3 Fibroblasten (ca. 5 pg Luciferase pro μ g Plasmid-DNA). Die Expression blieb über mehr als 2 Monate nachweisbar; andere Gewebe (Leber, Haut, ZNS) zeigten deutlich schwächere Genexpression.

⁶Nach Virus-Infektion zeigten die geimpften Tiere eine dramatische Expansion des SIV-spezifischen CTL-Pools auf 20-40% für dominante Epitope.

verhindert aber nicht die Infektion sondern nur den Ausbruch von AIDS. Die Verbindung von DNA-Vakzine und Boosterimmunisierung mit einem Vakziniavirus-Stamm (MVA) wird jetzt in Kenia am Menschen getestet. Die Tumorimmunologie versucht an diese Erfolge anzuknüpfen (Übersicht in [196]), für Idiotyp-DNA-Vakzinen sind noch keine klinischen Studien publiziert, aber viel versprechende Tierdaten (z.B. [171]).

1.3.1 Zelluläre Mechanismen der genetischen Vakzinierung

Die Richtung der Immunantwort gegen das codierte Antigen wird von unterschiedlichen gleichzeitig wirkenden Mechanismen beeinflusst: Die *in vivo* Transfektion mit dem Plasmid führt zu Antigen-Produktion in Nanogramm-Mengen. Das scheint zwar gering im Vergleich zu den bei konventionellen Impfungen gespritzten Proteinmengen, dafür wird das Antigen bei DNA-Vakzinen aber **endogen** produziert und vor allem von der *tap*-Maschinerie auch prozessiert und auf MHC I und II präsentiert. Dazu kommt noch der adjuvante Effekt der Plasmid-DNA: die in *E. coli* hergestellten Plasmide werden vom angeborenen Immunsystem als fremd erkannt. Tatsächlich ist mykobakterielle DNA hauptverantwortlich für die Wirkung des klassischen Adjuvans CFA[159]. DNA in Form von Oligonukleotiden wird inzwischen sogar als Adjuvans bei anderen Immunisierungstechniken eingesetzt.

Die für die CTL-Antwort entscheidenden Zellen hat man durch Versuchen mit Knochenmarks-chimären Mäusen definieren können: Aus dem Knochenmark abstammende professionelle Antigenpräsentierende Zellen (APC) prozessieren das Antigen über die *tap*-Maschinerie und präsentieren es im Lymphknoten auf MHC I an naive T-Zellen im Lymphknoten. In der Haut sind diese Zellen als Langerhanszellen (LC) in relativ großer Zahl ortsständig und werden so direkt mit Plasmid-DNA transfiziert und wandern dann in den drainierenden Lymphknoten. Dort ist über mehrere Wochen das Antigen nachweisbar, direkt aufgenommenes Plasmid kann mit PCR ebenfalls lange nachgewiesen werden [3, 41, 134].

Im gesunden Muskel findet man kaum APC, hier werden ganz überwiegend Myozyten transfiziert, die aber nicht über die nötigen costimulatorischen Moleküle verfügen, um naive T-Zellen direkt zu aktivieren. Stattdessen geben sie das Antigen über einen nicht ganz geklärten Mechanismus an eingewanderte APC weiter. Diese APC präsentieren das aufgenommene Antigen erwartungsgemäß auf MHC II, aber auch wie ein endogenes Antigen über MHC I Molekülen. Dieser **“Crosspriming”** genannte Vorgang ist ebenfalls abhängig von der Anwesenheit von *tap* in den APC.

Im Unterschied zu direkt injizierten Proteinen bleibt das Plasmid-codierte Antigen in der Haut und im Lymphknoten mehrere Wochen bis Monate nachweisbar, weil es einerseits kontinuierlich von der extrachromosmalen Plasmid-DNA exprimiert wird und andererseits in ihrem intrazellulären Reservoir vor dem Abbau durch induzierte Antikörper geschützt ist.

1.3.2 immunstimulatorische DNA-Sequenzen (ISS)

Sato *et al.* [148] konnten zeigen, dass nur solche Plasmide eine Immunantwort auslösen, die die palindromische DNA-Sequenz 5'-Purin-Purin-CpG-Pyrimidin-Pyrimidin-3' (GACGTC, AGCGCT und AACGTT) enthalten. Diese Motive finden sich in bakterieller DNA entsprechend einer zufälligen Verteilung, in eukaryontischer DNA dagegen viermal seltener (CpG-Suppression), und dann fast immer am Cytosin methyliert ⁷.

Diese sogenannten Immunostimulatorischen Sequenzen (ISS) aktivieren direkt und indirekt Makrophagen, NK-Zellen, Dendritische Zellen (DC) und B-Zellen. Makrophagen sezernieren TNF- α , IL6, IL12, IL18 und induzieren damit IFN- γ Produktion in NK-Zellen. So entsteht für T-Zellen und DC das ideale Zytokine-Milieu für eine Th1-Antwort.

Der CpG-vermittelte Antigen-unabhängige IFN- γ -Ausstoß erklärt die Unterschiede zwischen Nadel-Injektion gelöster DNA und Immunisierung mit Gene Gun: Dank der hohen Effizienz der ballistischen Transfektion wird etwa um den Faktor 100 weniger DNA eingesetzt. Die geringe Menge IFN- γ reicht aber nicht aus, eine Th1-Antwort zu induzieren. Stattdessen kommt es zu einer stärker Th2-lastigen Antwort mit höheren Antikörpertitern. Alle bekannten CpG-Effekte werden durch den kürzlich identifizierten Rezeptor TLR9 (Toll like receptor⁸) vermittelt [71]. Allerdings werden beim Menschen deutlich schwächere adjuvante Effekte als in der Maus beobachtet, möglicherweise lässt sich eine optimale Sequenz beim Menschen identifizieren (evtl. AACGTT, [114]).

1.3.3 Zytokine sind potente Immunmodulatoren

Die Möglichkeit, mit Zytokin-codierenden Plasmiden lokale und sogar systemische Effekte auszulösen, wurde rasch erkannt und genutzt. Man verspricht sich damit eine genauere Steuerung der Immunantwort, als das mit konventionellen Adjuvantien bisher möglich ist. Die Haut eignet sich besonders als Zielorgan, weil sie als Barriere-Organ direkt an der Immunabwehr beteiligt ist. Verschiedenste Zytokine regulieren die Reifung der Langerhanszellen auf dem Weg zum regionalen Lymphknoten [117, 197]. Die Tabellen 1.3 und 1.4 versucht einen Überblick über die verschiedenen inzwischen bekannten immunologischen Effekte zu geben. Grundsätzlich sind für DNA-Vakzinen verschiedene Applikationsformen möglich: teils wird rekombinantes Protein koinjiziert oder die Zytokin-cDNA auf einem zweiten Plasmid gespritzt. Fusionsproteine auf Zytokin und Antigen verbessern vor allem die Immunantwort gegen schwache Antigene wie den Idiotyp (vgl. Tab. 1.2). Bei starken Antigenen kann damit die Plasmid-Dosis teilweise dramatisch gesenkt werden. Das gilt besonders für die neuen

⁷Die Bedeutung der CpG-Motive belegt ein Experiment mit Sss I CpG Methylase: Ein methyliertes Plasmid hat eine dramatisch reduzierte Wirkung [95].

⁸Zusammen mit den anderen Mitgliedern der TLR-Familie bildet der CpG-Rezeptor eine erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems: TLR4 erkennt bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), TLR2 Peptidoglykane.

Fusionskonstrukte zum Rezeptortargeting von APC [46]: Chemokinen (z.B. MCP3) oder Liganden für Membran-Rezeptoren auf APC (CTLA4) und B-Zellen (C3d) sollen die gezielte Antigenaufnahme verbessern. Dadurch ließ sich teilweise der Impferfolg gegen schwache Antigene erheblich steigern oder die Dosis deutlich (bis Faktor 100) reduzieren. Letzteres ist bei der Anwendung im Menschen sehr interessant, um die nötige DNA-Menge in praktikablen Grenzen halten zu können.

Trotzdem lassen sich die Effekte schwer vorhersagen: Es gibt deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Antigenen/Impfprotokollen. Der Vergleich der Studien untereinander wird durch die nicht einheitlichen Readout-Parameter erschwert. Nicht immer wurde der tatsächliche Nutzen in einem Krankheitsmodell gezeigt. Deswegen sind einige Zytokine mehrfach in der nebenstehenden Tabelle aufgeführt. Für diese Arbeit wurden IL1 β , IL4, IL12 und flt3-Ligand ausgewählt, was hier kurz erläutert werden soll: Das pleiotrope Zytokine **IL1** in seinen zwei Formen IL1 α und IL1 β (beide 17 kDa) wird vor allem von Monozyten und aktivierten Makrophagen produziert. Auch T-, B- und NK-Zellen wie auch viele andere Zellen können IL1 produzieren. Als Entzündungsmediator besteht die Hauptfunktion in der Induktion von IL2 und IL2-Rezeptor auf T-Zellen, aber auch B-Zellen und NK-Zellen werden stimuliert. IL1 kann genau wie GM-CSF die Langerhans-Zellen der Haut in potente APC verwandeln, wirkt chemotaktisch auf Leukozyten und stimuliert die Hämatopoese. Das Nonapeptid VQ-GEESNDK (Aminosäuren 163-171) zeigt alle immunstimulatorischen Eigenschaften (Review in [21]), ohne die gefährlichen toxischen Eigenschaften, die eine wichtige Rolle im septischen Schock spielen⁹. Dieses Nonapeptid wurde erfolgreich als Adjuvans bei Impfung gegen HBsAg [137] und Salmonella Flagellin eingesetzt [10].

⁹Als wichtiger Entzündungsmediator spielt IL1 eine wesentliche Rolle beim septischen Schock. IL1-Rezeptorantagonisten haben sich im Tiermodell als hilfreich im Schockgeschehen erwiesen

Zytokin	Zitat	Antigen	Kstr.	Route	CTL	Th1	Th2	Ak	Schutz	Bemerkung
TNF-Familie										
CD40L	[63]	β -Gal (in CT26)	D+D	i.m.	↑	↑	(↑)	↑		-
TNF- α	[89]	HIV gag/pol	D+D	i.m.	↑			↑	nd	
TNF- β	[89]	HIV gag/pol	D+D	i.m.	↑			(↑)	nd	Th ↑
hämatopoetische Zytokine/unklassifiziert										
IL-1 α	[89]	HIV gag/pol	D+D	i.m.	↔			↑	nd	+ Bupivacain, Th (↑)
IL-2	[89]	HIV gag/pol	D+D	i.m.	↑			↑	nd	Th ↑
IL-4	[89]	HIV gag/pol	D+D	i.m.	↓			↑	nd	Th ↑
IL-5	[89]	HIV gag/pol	D+D	i.m.	(↓)			↑	nd	Th (↑)
IL-10	[89]	HIV gag/pol	D+D	i.m.	↔			↑	nd	Th ↑
IL-12	[89]	HIV gag/pol	D+D	i.m.	↑↑			↓	nd	keine <i>in vitro</i> Restim. für CTL nötig, Th ↑↑
IL-15	[89]	HIV gag/pol	D+D	i.m.	↑			(↑)	nd	nicht sehr IL2 'ähnlich, induziert TNF- α , Th (↑)
IL-18	[89]	HIV gag/pol	D+D	i.m.	↑			↑	nd	eher wie IL10 als IL12, Th ↑-↑
IL-1 β	[64]	scFv-Id	F	i.m.					40%	VQGEESNDK-Peptid, Review in [21]
IL2	[39]	HBsAg	F	i.m.		↑	(↑)	↑		kann MHC-Restriktion durchbrechen
IL2/Ig	[9, 8]	SIV gag/env	D+D	i.m.	↑	↑		↑	↑	rasante CTL-Expansion nach Infektion
IL-4	[194]	Rabies gP		i.m.						i.m./i.d./i.t. + Ad
IL-5	[194]	Rabies gP								IL5-Dimer
IL-6	[107]	HA-Infl	D+D	g.g.	nd	nd	nd	↔	V-Titer ↓	mukosal IgG ↑, aber kein IgA
IL-7	[160]	HSV-2 gD	D+D	i.m.	↑	↓	↑	G1↑, G2a↓	40% (↓)	Th2 und CTL ! CTL für gag/env
IL-10	[160]	HSV-2 gD	D+D	i.m.	↔	↓	↓	↔	25% (↓)	
IL-12	[160]	HSV-2 gD	D+D	i.m.	↑	↑	↓	G1↓, G2a↑	100%	vgl. [161, 162]
IL-12	[110]	FIV gp140	D+D	gg	↑	↑	(↑)	↓		MIDGE
IL-16	[110]	FIV gp140	D+D	gg	↔	(↑)	↔	↔		Viruslast IL16>IL12>CpG (in Plasmid)
IL-18	[121]	Ovalbumin	F	i.m.		↑	↓			'überwindet bestehende bronchiale Hyperreaktivität'
IFN- γ	[122]	Ovalbumin	F	i.m.	(↓)			↑	nd	Zytokine-Effekt in der Anfangsphase
GM-CSF	[122]	Ovalbumin	F	i.m.	↓	↔	↑	↑	nd	
IL1 β	[122]	Ovalbumin	F	i.m.	↑	↑	↔	G1↓, G2a↑	nd	
IL2	[122]	Ovalbumin	F	i.m.	↔			↓	nd	
IL4	[122]	Ovalbumin	F	i.m.	↓			G1↑	nd	
IL12	[122]	Ovalbumin	F	i.m.	↑	↑	↓	G1↓, G2a↑	nd	p40 Fusion

Tabelle 1.3: Zytokine beeinflussen die Richtung der Immunantwort: Fortsetzung siehe nächste Seite.

hämatopoetische Zytokine/unklassifiziert - Fortsetzung										
IFN- γ	[193]	Rabbies gP	D+D	i.m.						
GM-CSF	[193]	Rabbies gP	D+D	i.m.						
GM-CSF	[100]	HIV gp160	D+D	i.m.						Zeiteffekt: pGMCSF -3d,0d,+3d: -3d: mucosale Immunität CTL \uparrow für GM-CSF+IL12
			-3d		\leftrightarrow	(\downarrow)	\uparrow	G1+A \uparrow		
			\pm 0d		\uparrow	(\uparrow)	\uparrow			
			+3d		\uparrow	\uparrow	\leftrightarrow - \downarrow	G2a \uparrow		
β 3L	[81]	HPV-16 E7	F	gg	\uparrow	0	0	0 Ak!	100%	auch therapeutischer Effekt, D+D wirkt nicht
Chemokine (CC und CXC)										
IL-8	[163]	HSV-2 gD	D+D	i.m.	nd	\uparrow	\leftrightarrow	G2a \uparrow	100%	(CXC) i.vag. Challenge, CD4 abhängig, Th1: vor allem IL2, gD allein:70% Protektion
IP-10	[163]	HSV-2 gD	D+D	i.m.	nd	\leftrightarrow	\leftrightarrow	G1 \uparrow , G2a \downarrow	50% \downarrow	(CXC) i.vag. Challenge
RANTES	[163]	HSV-2 gD	D+D	i.m.	nd	\uparrow	\leftrightarrow	G1 \downarrow , G2a \leftrightarrow	90%	(CC) i.vag. Challenge, CD4 abhängig, Th1: vor allem IFN γ
MCP-1	[163]	HSV-2 gD	D+D	i.m.	nd	\leftrightarrow	\leftrightarrow	G1 \uparrow	40% \downarrow	(CC) i.vag. Challenge
MIP-1 α	[163]	HSV-2 gD	D+D	i.m.	nd	\leftrightarrow	\leftrightarrow	G1 \uparrow , G2a \downarrow	50% \downarrow	(CC) i.vag. Challenge
MIP-2	[54]	HSV-1 gB	D+D	i.n.	\leftrightarrow	\uparrow	(\downarrow)		90%	(CXC) intravag. nach Viruschallenge deutlich erhöhte IFN γ (NK, später Th1), Adhäsion \uparrow
MIP-1 α	[54]	HSV-1 gB	D+D	i.n.	\leftrightarrow	\uparrow	(\downarrow)	G \uparrow , G2a \uparrow	65%	(CC) mucosal IgA \uparrow B7-1/B7-2 auf APC \uparrow
MIP-1 β	[54]	HSV-1 gB	D+D	i.n.	\leftrightarrow	(\downarrow)	\uparrow		\leftrightarrow	(CC) intranasale Impfung, HSV1 intravaginaler (gB allein schützt 50%) Ref: [116, 89]
MCP-1	[54]	HSV-1 gB	D+D	i.n.	\leftrightarrow	(\downarrow)	\uparrow	G \uparrow , G1 \uparrow	\leftrightarrow	(CC) mucosal IgA \uparrow
DC-Targeting/Costimulatorische Moleküle										
MCP3	[15]	scFv-Id	F	GG	nd	nd	nd	\uparrow	40%	Entzündungsinfiltrat, Fusion notwendig, CD4 und CD8 abhängig
IP-10	[15]	scFv-Id	F	GG	nd	nd	nd	\uparrow	0%	gleiche Ak, aber keine Protektion
CTLA4	[46]	HA-Influenza	F	i.m.	\leftrightarrow	nd	nd	G1 \uparrow	V-Titer \downarrow	IgG-Tag zur Dimerisierung
C3d	[143]	HA-Influenza	F	gg	\leftrightarrow	nd	nd	G1 \uparrow	V-Titer \downarrow	C3d=CD21L, sezerniert < Membran-gebunden < 3 mal C3d, schnellere Affinitätsreifung
B7.1	[88]	HIV1	D+D	i.m.	(\uparrow)	nd	nd	\leftrightarrow	nd	
B7.2	[88]	HIV1	D+D	i.m.	\uparrow	nd	nd	\leftrightarrow	nd	

Tabelle 1.4: **Zytokine beeinflussen die Richtung der Immunantwort:** DNA-Immunisierung gegen verschiedene (meist virale) Antigene. Zytokine cDNA wurde entweder auf einem zweiten Plasmid koinjiziert (D+D) oder mit der cDNA des Impfantigens fusioniert (F). Dargestellt ist der Einfluss auf die Effektorarme des Immunsystems und Schutzwirkung. (nd=nicht durchgeführt)

IL4 (20 kDa) ist das klassische Th2 Zytokin schlechthin: aktivierte CD4⁺ Th2-Zellen sezernieren IL4, knockout Tiere können keine wirksame Th2-Antwort entwickeln. IL4 ist ein Wachstums- und Differenzierungsfaktor für aktivierte B-Zellen, induziert MHC II Expression und verbessert so die Antigenpresentation. Es induziert Antikörper vom IgG1 und IgE Isotyp und hemmt die IFN- γ -vermittelte IgG2a-Induktion. IL4 hemmt die Entwicklung bestimmter Kolon- und Mamma-Karzinome im Tiermodell. Es scheint eine pathogenetische Rolle in der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) zu haben, indem es gleichzeitig Differenzierung und Apoptose (Aktivierung von *bcl-2*) der pathologischen B-Zellen hemmt [43].

IL12 ist ein klassisches Th1-Zytokin, das die Wirkung von IL2 auf T-Zellen potenziert und die Immunantwort in die Th1-Richtung lenkt. Zusammen mit IL2 wird es zur Generierung von LAK-Zellen (Lymphokin-aktivierten Killerzellen) klinisch eingesetzt. Der IL12 Rezeptor findet sich auf aktivierten T-Zellen (CD4 und CD8) und NK Zellen.

IL12 ist ein 70 kDa großes Glykoprotein, das aus den zwei Untereinheiten p40 und p35 besteht, die über Disulfidbrücken gekoppelt sind. Eine funktionell aktive Fusion beider Untereinheiten wurde erstmals von Lieschke *et al.* beschrieben [115]. Bei erhaltener Bioaktivität wurden wie beim Idiotyp scFv p40 und p35 über den Huston-Linker (Gly₄Ser)₃ gekoppelt.

GM-CSF ist das wohl best-untersuchte Zytokin in der Tumorummunologie. Die überragende Bedeutung bei zellulären Vakzinen wurde von Dranoff erstmals 1993 beschrieben [50]. In einer systematischen Studie mit retroviral transduzierten und dann bestrahlten murinen Tumor-Zelllinien war es aus 10 Molekülen¹⁰ in mehreren Tumormodellen (B16F10, CT-26, CMS-5, RENCA, WP4) am potentesten. Die Protektion war von CD4 und CD8 positiven T-Zellen abhängig.

In vivo sezernieren vor allem T-Zellen und Makrophagen nach Antigenkontakt GM-CSF. Rezeptoren finden sich auf myeloischen Zellen. GM-CSF ist der wesentliche Kolonie-stimulierende Faktor der Hämatopoese¹¹. Es ist verantwortlich für die Reifung der Langerhans-Zellen zu Antigen-präsentierenden Zellen.

Flt-3 Ligand wird von den Stromazellen im Knochenmark produziert [118] und wirkt dort synergistisch mit GM-CSF, G-CSF, M-CSF und IL3 auf die Myelopoese. Es wirkt auf verschiedene Progenitor Linien und wird zunehmend zu *in vitro* Generierung von dendritischen Zellen verwendet [183]. Flt-3 Ligand vorbehandelte Mäuse haben einen dramatischen Anstieg des IgG2a Isotyps und der Responderrate nach einer Proteinimmunisierung [135]. GM-CSF vorbehandelte Mäuse zeigten ebenfalls erhöhte Antikörper-Titer, aber mit einem Anstieg vor allem der IgG1 Fraktion.

¹⁰Neben GM-CSF wurden IL2, IL4, IL5, IL6, IFN- γ , IL-1RA, TNF- α , und die Oberflächenmolekülen ICAM und CD2 untersucht.

¹¹Und wird entsprechend klinisch in zur Rekonstitution eingesetzt und erlaubt die Steigerung der tolerablen Dosis verschiedener Zytostatika. Zellzyklus-Synchronisieren vor Therapie.

1.4 Ziel der Arbeit

B-Zell-Lymphome bieten mit ihrem Oberflächen-Immunglobulin, dem sog. Idiotyp, als Patientenspezifisches Tumorantigen einen interessanten Angriffspunkt zur Immuntherapie. Alleine induzieren Idiotyp-Moleküle gar keine oder eine nur sehr schwache Immunantwort. Mit den vielfältigen Mitteln der genetischen Vakzinierung sollten Wege untersucht werden, die Immunogenität des Idiotyps zu steigern.

Für die zwei Tiermodelle A20 und BCL1 sollten zunächst die variablen Regionen als antigene Determinate des Idiotyps kloniert werden und als single-chain-Fragmente (scFv) eukaryontisch exprimiert werden.

Zur Immunmodulation sollten verschiedene Zytokine und andere molekulare Adjuvantien verwendet werden. Es müsste zunächst ein einfaches System entwickelt werden, um eine Vielzahl von Fusionsproteinen leicht klonieren zu können. Die Expression und biologische Aktivität dieser Fusionskonstrukte sollte vor dem Einsatz im Tiermodell zunächst *in vitro* ausgiebig untersucht werden.

Im Tiermodell sollte zunächst eine praktikable Methode zur Immunisierung von Mäusen mit Plasmid-DNA gefunden werden und die minimale tumorigene Dosis für die beiden Modell-Tumoren A20 und BCL1 bestimmt werden.

In einem Pilotexperiment sollte dann *in vivo* eine Auswahl der Konstrukte auf ihre Immunantwort und ihre protektive Wirkung gegen einen Tumor-Challenge untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Zelllinien, Bakterienstämme und Versuchstiere

Die Bakterienstämme DH5 α und SCS110 (Stratagene) wurden aus der Stammsammlung der Abteilung von Prof. E.-L. Winnacker entnommen, der Stamm TOP10 wurde von Invitrogen, NV Leek, Niederlande, bezogen.

DH5 α : *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdRI7*(rk_k^- , m_k^+), *supE44*, *relA1*, Δ [*argF-lacZYA*]U169, ϕ 80 Δ *lacZ* Δ M15, λ^- , F $^-$

TOP10: *mcrA*, Δ *mmr-hsdRMS-mcrBC*, ϕ 80 Δ *lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara*, *leu*), 7697, *galU*, *galK*, λ^- , *rpsL*(streptomycin r), *endA1*, *nupG*

SCS110: *rpsL* (Str r), *thr*, *leu*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*) [F' *traD36*, *proAB*, *lacI^q*Z Δ M15]

Die Zelllinien A20 und BCL-1 wurden von der ATCC bezogen. OCI-AML5 Zellen stammen von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen, Braunschweig. FDCP1 Zellen [167] wurden freundlicherweise von Dr. Krämer (GSF, München) zur Verfügung gestellt. Die CTL44 Zellen stammen von Prof. Erb (Basel, Schweiz, [55]). HEK 293-EBNA Zellen wurden von Invitrogen, NV Leek, Niederlande bezogen. Hela-Zellen wurden der Stammsammlung des Arbeitskreises von Prof. E.-L. Winnacker entnommen, 5657 von Prof. E. Wolf.

Die Tierversuche wurden an BALB/c Weibchen durchgeführt, die von Bommice (Ry, Dänemark) bezogen wurden.

2.2 Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmide verwendet:

pTracerCMV	Invitrogen, NV Leek, Niederlande
pCRbluntII-TOPO	Invitrogen, NV Leek, Niederlande
pGFP	eigene Arbeitsgruppe
pCMV-pRc/CMV-HBs(S)	R. Whalen [45], kurz pCMV-S
IL12 cDNA	U. Guebler (Roche)

Um die SapI Schnittstelle in pTracer zu entfernen wurde der Vektor BsmI und SapI verdaut, und stumpf religiert. Die Funktion des Vektors bleibt davon unbeeinflusst.

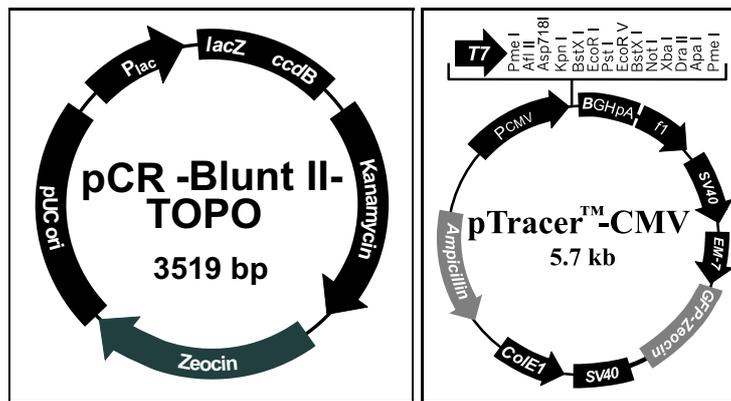


Abbildung 2.1: **Verwendete Vektoren:** pCR-Blunt II wurde mit dem TOPO-System zur problemlosen Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Als Expressionsvektor in Zellkultur und zur DNA-Immunsierung wurde pTracerCMV verwendet.

2.3 Antikörper

Alle Antikörper wurden von Pharmingen, Hamburg; Immunotech, Hamburg bzw. R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA bezogen.

anti-maus GM-CSF-Biotin	polyklonal	R&D, BAF415
anti-maus GM-CSF	Klon MP122E9	R&D, MAB415
anti-maus IL4-Biotin	polyklonal	R&D, BAF404
anti-maus IL4	Klon 30340.11	R&D, MAB404
anti-maus IL12-Biotin (gegen p35, p40 und p70)	polyklonal	R&D, BAF419
anti-maus IL12 (gegen p40)	Klon 48110.111	R&D, MAB419
anti-maus flt3L-Biotin	polyklonal	R&D, BAF308
anti A20-Id	Klon 6C10	E. Krämmer, GSF, München
anti BCL1-Id	Klon MC10	F.K. Stevenson, South Hampton
anti-myc	9E10	Immunotech

2.4 Enzyme

Gibco:

Superscript II Reverse Transkriptase; Restriktionsenzyme.

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Lysozym; RNase A; T4 DNA-Ligase; DNA-Polymerase 1 "large fragment" (Klenow-Polymerase); Restriktionsenzyme; Alkalische Phosphatase; *taq* DNA-Polymerase; *pwo* DNA-Polymerase; DNA-Längerstandards.

Biorad:

Protein-Assay, Biorad-System Mini-Protean II, Transferkammer, Helios-Gene-Gun.

Fermentas, Litauen:

T4 DNA-Ligase; Restriktionsenzyme; DNA-Längenstandards.

New England Biolabs, Schwalbach:

T4 DNA-Polymerase; T4 Polynukleotidkinase-, T4 DNA-Ligase; Restriktionsenzyme.

Stratagene, San Diego, CA. USA:

pfu DNA-Polymerase.

2.5 Chemikalien, Geräte und andere Materialien

Amersham Buchler GmbH, Braunschweig:

Methionin-Labeling Mix, Thymidin.

Beckman, München:

Spektrophotometer DU 50.

Biochrome KG, Berlin:

Fötale Kälberserum (FCS); RPMI 1640; DMEM.

Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg:

3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS).

Biorad Lab., Richmond, Kalifornien, USA:

Bio-Rad Proteinassay; Mini-Protean II Elektrophorese-Kammer; PrepCell^R-Elektrophorese-System, Helios-Gene-Gun, Tubing-Prepstation.

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Adenosin-5'-triphosphat (ATP); Chloramphenicol; Streptomycin; Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris).

Qiagen GmbH, Düsseldorf:

Qiagen Plasmid Kits; Gel-Extraktionskit.

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Trypton; Hefeextrakt; Agar.

Eppendorf Gerätebau, Hamburg:

Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml..

Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm:

Formaldehyd, Formamid; Nonidet^R-P40 (NP40).

Greiner GmbH, Nürtingen:

Plastik-Reagenzröhrchen 10 und 50 ml; Monolayer-Flaschen für Zellkultur; Plastik- Petri-schalen (92 mm und 140 mm); Impfnadeln und Impfösen.

Immunotech, Hamburg:

Antikörper.

Invitrogen, DeSchelp, NV Leek, Niederlande:

pTracerCMV; Zeocin; TOPO blunt Kloning Kit.

Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA:

Röntgenfilme XAR5, BioMax Filme.

Metabion, Martinsried:

synthetische Oligonukleotide.

E. Merck AG, Darmstadt:

Aceton; Ammoniumsulfat; Ammoniumperoxodisulfat (APS); Borsäure; Bromphenolblau (BPB); Calciumchlorid; Chloroform; Coomassie Brilliant Blau R250; Dimethylsulfoxid (DMSO); Dinatriumhydrogenphosphat; Dikaliunihydrogenphosphat; Essigsäure; Ethanol; Ethidiumbromid; Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Formaldehyd; Formamid; Glukose-Monohydrat; Isoamylalkohol; Isopropanol; Kaliumacetat; Kaliumchlorid; Kaliumdihydrogenphosphat; Kaliumhydroxid; Lithiumchlorid, Magnesiumacetat, Magnesiumchlorid; Magnesiumsulfat; Manganchlorid; Methanol; 2-Mercaptoethanol; Natriumacetat; Natriumazid; Natriumchlorid; Natriumcitrat; Natriumdihydrogenphosphat; Natriumdodecylsulfat (SDS); Natriumpyrophosphat; Polyethylenglycol 6000 (PEG); Salzsäure; D-Sorbitol; N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendianün (TEMED); Triton X-100; Tween 20; Xylencyanol.

Molecular Devices:

ELISA-Reader: Spectra MAX 250.

Nunc-GmbH, Wiesbaden:

Cryo-Tubes 2 ml; Zellkulturflaschen; Zellkulturschalen.

Perkin Elmer, Norwalk, USA:

PCR Thermal Cycler 480.

Pharmacia, Freiburg:

2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); Protein G Sepharose.

Pierce, Reckford, Illinois, USA:

SuperSignal Western Blotting Substrate.

R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA:

Antikörper, murines IL12, murines flt3 ligand.

C. Roth, Karlsruhe:

Dithiothreitol (DTT); Glycerin; N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES); Phenol/TE gesättigt.

Satorius Werke GmbH, Göttingen:

Mikrowaage 3705; Minisart NML Sterilfilter (0,2 und 0,45 gm Porengröße)..

Serva, Heidelberg:

Acrylamid.

Sigma Chemie, München:

Protease-Inhibitor-Mix.

Schleicher und Schüll, Dassel:

Nitrocellulosefilter BA85, Porengröße 0,45 μm .

TOPLAB, Martinsried:

DNA-Sequenzierungen.

Wallac, Turku, Finnland:

Zellharvester, Szintillationszähler.

Whatman Limited, Springfield Mill, Maidstone. Kentucky, USA:

3 MM-Papier.

Stragene:

Eagle-Eye Geldokumentationssystem.

Vectorlabs:

Biotin/Avidin Blocking Kit, VECTASTAIN ABC System.

3 Methoden

3.1 Klonierung und Vermehrung von DNA in *E. coli*

3.1.1 Bakterienhaltung

Die superhelikale Plasmid-DNA für Klonierungen und Tierversuche wurde in transformationskompetenten Bakterien der *E. coli* Stämme TOP10, DH5 α und SSC 110 vermehrt. Soweit nicht gesondert vermerkt wurden alle mikrobiologischen Arbeiten nach Standardprotokollen durchgeführt [147].

Zum Vereinzeln von Bakterienkolonien wurden die Bakterien mit einer ausgeglühten Impföse auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C invertiert bebrütet. Transformationsansätze wurden mit sterilen Glaskugeln ausplattiert. Der LB-Agar wurde nach dem Autoklavieren unter Rühren auf 50 °C abgekühlt und je nach Bedarf zur Selektion mit Ampicillin (50 mg/l) oder Kanamycin (50 mg/l) versetzt. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

Für Flüssigkulturen wurde LB-Medium nach dem Autoklavieren mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und im Schüttler bei 37 °C und ca. 200 U/min für 12-18 h bebrütet. Die Bakteriendichte wurde photometrisch bei 600 nm bestimmt ($1 \text{ OD}_{600} = 8 \cdot 10^8 \text{ Zellen/ml}$).

Zur dauerhaften Lagerung wurden 0.5 ml Übernachtskultur mit 0.5 ml LB-Glycerin (1:1 Gemisch aus LB-Medium und Glycerin) bei -80 °C eingefroren.

LB-Medium:	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l

LB-Agar:	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	Agar	15 g/l

Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O (sterilfiltriert)

Kanamycin-Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O (sterilfiltriert)

3.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Der verwendete Bakterienstamm (TOP10, DH5 α und SSC110) wurde aus einer Dauerkultur zunächst auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Ein Einzelklon wurde dann in 50 ml TYM Medium (bei TOP10 mit 50 μ g/ml Streptomycin) überimpft, und über Nacht bei 37°C und 180 rpm bebrütet. Diese Vorkultur wurde 1:100 bis 1:500 in TYM Medium (500 ml) ohne Antibiotikum überimpft und im Schüttler bebrütet. Bei einer OD₆₀₀ von 0.7 bis 0.8 wurde die Kultur rasch auf Eis abgekühlt.

Alle folgenden Schritte wurden zügig im Eiswasserbad erledigt, Zentrifuge und Puffer waren vorgekühlt: In 250 ml Corning-Zentrifugenbecher wurden die Bakterien für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 30 ml TfbI Puffer pro 100 ml Bakterienkultur resuspendiert, und erneut 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml TfbII pro 100ml Kultur aufgenommen und in gebrauchsfertigen Aliquots (50-400 μ l) in Eppendorf-Gefäßen bei -80°C eingefroren.

Die Transformationseffizienz wurde mit pUC18 Plasmid-DNA zu 0.7 bis 2.0*10⁸ Kolonien pro μ g DNA bestimmt (für ein 100 μ l Aliquot).

TYM Medium:	Bacto Trypton	2.0 %
	Bacto Yeast Extract	0.5 %
	NaCl	0.1 M
	MgCl ₂	10 mM

TfbI Puffer:	KOAc	30 mM
	CaCl ₂	100 mM
	Glycerin	15 %
	sterilfiltriert nach dem autoklavieren zugeben:	
	MnCl ₂	50 mM

TfbII Puffer:	NaMOPS (pH=7.0)	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	KCl	10 mM
	Glycerin	15 %

3.1.3 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E.coli

Plasmid-DNA oder Ligationsansatz wurden in 1.5 ml Gefäßen vorgelegt und für 30 min mit 50 μ l frisch aufgetauten, kompetenten Bakterien auf Eis inkubiert. Dann erfolgte für 60 s ein Hitzeschock bei 42°C, gefolgt von 2 min auf Eis. Dieser Ansatz wurde dann mit 500 μ l LB-Medium (ohne Antibiotikum) für 60 min im Thermoblock bei 37°C geschüttelt, auf LB-

Platten (mit Selektionsantibiotikum) ausplattiert und über Nacht bebrütet.

3.2 DNA-Techniken

3.2.1 Agarose-Gel-Elektrophorese, Gelextraktion

Zur Auftrennung von DNA wurden Agarose-Gele (0.6 - 2 %) verwendet. In TBE gelöste Agarose wurde der Mikrowelle kurz aufgekocht. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wurde Ethidiumbromid (EtBr, 0.5 µg/ml) zugegeben und das Gel in die Form gegossen. Die DNA wurde in Wasser oder Puffer gelöst mit 0.25 Volumen Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei ca. 5-10 V/cm Gellänge in TBE-Puffer.

Durch die Fluoreszenz des interkalierten EtBr wurde DNA im UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht. Als Längenmarker wurden die 1 kb Leiter und die 100 bp Leiter von Fermentas verwendet.

Die Dokumentation erfolgt mit einem Eagle-Eye II Still-Videosystem (Stratagene). Für Klonierungen wurden die entsprechenden Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem Gel-Extraction-Kit von Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers eluiert.

10xTBE:	Tris·HCl	890 mM
	Borsäure	890 mM
	Na·EDTA	20 mM
5xAuftragspuffer	Glycerin	50 %
	Na·EDTA (pH=8.0)	50 mM
	Bromphenolblau	0.05 %

3.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die DNA-haltige wässrige Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol/Phenol (CIP, v/v/v=24/1/25) gemischt. Nach 2 Minuten Zentrifugation (14000 rpm) trennen sich wässrige und organische Phase. Die wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen, und eventuell erneut mit CIP gemischt, bis die Interphase klar ist. Die DNA in der dekantierten wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH=5.2) und 2.5 Volumen eiskaltem Ethanol (100%) 30 Minuten bei -80°C präzipitiert, dann abzentrifugiert und mit 70% Ethanol gewaschen.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren lässt sich photometrisch bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmen. Dabei entspricht 1 OD₂₆₀ 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml ssRNA.

3.2.4 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Um Klonierungsexperimente zu kontrollieren, wurde die alkalische Lyse als Standardverfahren verwendet (nach Birnboim *et al.*, [16]), wie es auch in kommerziellen Kits heute allgemein üblich ist - dort gefolgt von einer Anionenaustauschchromatographie. Für die meisten Restriktionsverdau kann auch das mit 0,7 Vol. Isopropanol präzipitierte Lysat problemlos eingesetzt werden: In 2 ml Eppendorfgefäßen wurde eine Übernachtskultur angelegt, kurz zentrifugiert (2 min, 14000 rpm). Das Bakterienpellet wurde in 300 µl kaltem Puffer P1 resuspendiert und für 5 min mit 300 µl Puffer P2 lysiert. Die Plasmid-DNA wurde danach mit 300 µl P3 renaturiert und nach Zugabe von 10 µl Chlorform und weiteren 10 min Inkubation bei 14000 rpm abzentrifugiert. 710 µl des klaren Überstands wurden mit 500 µl Isopropanol 15 min präzipitiert (14000 rpm, RT), das DNA-Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 14000 rpm), luftgetrocknet und dann in 15 µl Wasser gelöst. Die Pipettierschritte lassen sich mit einer Dispenser-Pipette beschleunigen.

Für die Vakzinierung der Mäuse wurde eine große Menge hoch aufgereinigter und Endotoxin-freier Plasmid-DNA benötigt. Die Isolierung erfolgte über Ionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Für 2.5 mg DNA wurden 1.5 l Bakterienkultur eingesetzt.

Puffer P1 (Resuspension):	Tris·HCl (pH=8.0)	50 mM
	EDTA9	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
Puffer P2 (Lyse):	NaOH	200 mM
	SDS	1 %
Puffer P3 (Neutralisation):	KOAc pH=5.5	3.0 M

3.2.5 Restriktions-Verdau

Die Aktivität der meisten Restriktions-Enzyme wird an Lambda DNA (48502 bp, GenBank Accession J02459) oder an Adenovirus-2 DNA (35937 bp, Genbank Accession J01917) definiert. 1 U Enzym schneidet 1 µg der Referenz-DNA in 1 h (meist bei 37 °C) im zugehörigen Puffer (entsprechend den Herstellerangaben) vollständig. Für Klonierungen wurde die nötige Enzymmenge für einen meist fünf bis zehnfachen Überverdau berechnet, um vollständigen Verdau zu gewährleisten und gleichzeitig die Endonuklease-Aktivität minimal zu halten. Für

einen Einfach-Verdau errechnet man für 1 μg Plasmid:

$$\frac{\text{Größe der Referenz-DNA in bp}}{\text{Größe des Plasmids in bp}} * \frac{\text{Anzahl Schnittstellen im Plasmid}}{\text{Schnittstellen in der Referenz-DNA}} * U/\mu\text{g}$$

3.2.6 Glätten überhängender Enden

T4 DNA Polymerase (NEB) hat zwei Enzym-Aktivitäten: die 5' \rightarrow 3' Polymerase-Aktivität wird verwendet, um bei 5'-Überhang den Gegenstrang aufzufüllen. Mit der 3' \rightarrow 5' Exonuklease-Aktivität lässt sich dagegen ein 3' Überhang abspalten. Unter Zugabe von jeweils 100 μM dNTP und 1-3 U/ μg Enzym wurde die Reaktion 20 min bei 12 °C direkt im Ansatz des Restriktionsverdaus durchgeführt (nach Hitze-Inaktivierung). T4 DNA Polymerase wurde danach und für 10 min bei 75 °C inaktiviert.

3.2.7 Dephosphorylierung

Die Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = calf intestine phosphatase, Böhlinger, Roche) spaltete freie 5'-Phosphatreste von Nukleinsäuren ab. Bei Ligationen wurde der linearisierte Vektor dephosphoryliert, um den intramolekularen Ringschluss zu verhindern und so die Ligations-Effizienz zu erhöhen. 1-5 μg linearisiertes Plasmid wurden in 1x CIP Puffer in einem 50 μl Ansatz oder nach Hitze-Inaktivierung direkt im Ansatz des Restriktionsverdaus mit ca. 2 U/ μg DNA für 1 h bei 37 °C inkubiert und danach Hitze-inaktiviert (10 min, 75 °C).

3.2.8 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Für die Klonierung sehr kurzer Fragmente wurden synthetische Oligonukleotide mit Polynukleotid-Kinase entsprechend den Herstellerangaben (NEB) phosphoryliert, äquimolar gemischt und 5 min bei 95 °C denaturiert und dann langsam abgekühlt, um die DNA-Doppelstränge auszubilden.

3.2.9 Ligation

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten und Vektoren wurde T4-DNA-Ligase verwendet (Fermentas). 200 ng dephosphorylierter Vektor wurden mit etwa dreifachen molaren Überschuss an Insert-Fragment in 20 μl Ansätzen mit 1 U T4-DNA-Ligase inkubiert. Für blunt-end Ligationen wurde zum Standardligase-Puffer noch PEG 4000 zugegeben. Die Reaktion erfolgte in 1 h bei Raumtemperatur. Als Kontrolle wurde immer die Religation des präparierten Vektorfragments verglichen.

10xLigase Puffer:	Tris·HCl, pH=7.8	400 mM
	MgCl ₂	100 mM
	DTT	100 mM
	ATP	5 mM
10xPEG-Puffer:	PEG 4000	50 %

3.2.10 DNA-Sequenzierung

Sequenz-Analysen der erzeugten Plasmide wurden von der Firma TopLab (Martinsried) oder unserem Haus-eigenen Sequenzierservice (Arbeitsgruppe Blum) nach dem Kettenabbruchverfahren mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden durchgeführt.

3.3 PCR-Methoden

3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Aus verschiedenen Zelllinien wurde Gesamt-RNA mit TRIzol (GibcoBRL) isoliert, danach in cDNA umgeschrieben und in eine RT-PCR eingesetzt. Bei allen Arbeiten mit RNA ist RNase freies Arbeiten entscheidend: es wurden nur sterile Lösungen, DEPC behandeltes Wasser und RNase-freie Pipettenspitzen benutzt. 5-10*10⁸ vitale Zellen wurden abzentrifugiert, das Pelett in 1 ml TRIzol lysiert. Entsprechend dem Hersteller-Protokoll wurde die RNA aus der wässrigen Phase mit Isopropanol gefällt, danach mit 70 % Ethanol gewaschen.

3.3.2 Erststrang-Synthese von cDNA für RT-PCR

Für die Synthese des ersten DNA-Strangs wurde die reverse Transkriptase SuperScript II (Gibco) bei 42 °C benutzt. Für einem Ansatz wurden etwa 3 µg Gesamt-RNA und entweder 100 pmol Oligo (dT)₁₈₋₂₄ oder 25 pmol spezifische Primer eingesetzt. Als Schutz vor RNasen wurden 20 U RNase Inhibitor (Böhringer) zugegeben. Ansonsten wurde das Herstellerprotokoll genau eingehalten. Von diesem Ansatz wurde etwa 0.05 Volumen in die nachfolgende PCR-Reaktion eingesetzt.

Besonders für den Einsatz in eine RACE-PCR war es erforderlich die cDNA vorher über Silika-Säulen (Qiagen Gel-Extraktion, oder Gibco GlasMax) aufzureinigen, weil die restlichen unverbrauchten Oligonukleotide die Spezifität der PCR stören. Gleiches Vorgehen hat sich auch für "schwierige" RT-PCRs bewährt.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Saiki *et al.* beschrieben 1985 erstmals die enzymatische Amplifikation von DNA-Abschnitten unter Verwendung spezifischer Polymerisationsstarter, sogenannter "Primer" [146]. Mit dem

Einsatz thermostabiler *taq*-Polymerase konnte die Methode deutlich vereinfacht und automatisiert werden. Die Entdeckung von hochgenauen, sogenannten proof-reading-Polymerasen (*pwo* und *pfu*), erweiterte die Anwendungsmöglichkeiten abermals.

Ein Standardansatz mit cDNA, Plasmid DNA oder genomischer DNA als Template sah folgendermaßen aus:

DNA-Template	je nach Anwendung Plasmid oder cDNA
10xPuffer des Herstellers	5 μ l
sense Primer	20 pmol
antisense Primer	20 pmol
dNTP 10 mM	1 μ l (200 μ M Endkonzentration pro Nukleotid)
<i>taq</i> , <i>pwo</i> oder <i>pfu</i>	2.5-5 U
H ₂ O	ad 50 μ l

Entscheidend ist die Wahl der beiden Primer: beide Schmelzpunkte sollten möglichst ähnlich sein, um nicht Sekundärstrukturen im höher schmelzenden Primer in Kauf nehmen zu müssen. Die besten Ergebnisse (Spezifität, Ausbeute) zeigen sich meist bei Hybridisierung 1-3 °C unter der Schmelztemperatur beider Primer. Verschiedene Zusätze (DMSO, Glycerin) und Variation der Mg²⁺-Konzentration im Puffer bieten Raum für Optimierungen. Die Reaktion wurde in verschiedenen PCR-Maschinen (PCR Thermal Cycler 480, Perkin Elmer) durchgeführt, ein typisches PCR-Protokoll war:

1 Zyklus	Denaturierung	94 °C	4 min
20-35 Zyklen	Denaturierung	94 °C	1 min
	Hybridisierung	48-70 °C	1 min
	Extension	72 °C	1 min pro 1000 bp
1 Zyklus	Extension	72 °C	10 min

3.3.4 5' RACE-PCR - rapid amplification of cDNA ends

Ist nur das 3' Ende eines Genes bzw. der mRNA bekannt, wird bei dieser Methode an das 5' Ende der cDNA eine bekannte Sequenz "angehängt" (tailing), die als zweite Primerbindungsstelle für die PCR gewählt werden kann. Um die Spezifität zu erhöhen, empfiehlt es sich, die cDNA mit einem Genspezifischen Primer (GSP1) herzustellen und für die PCR einen zweiten Genspezifischen Primer (GSP2) etwas 5' zu verwenden.

Für das Tailing der cDNA mit TdT (Terminale Didesoxy Transferase) wurde das 5' RACE-Kit von GibcoBRL (Gaithersburg) verwendet. Zunächst wurde die cDNA über Silikasäulen gereinigt (Qiagen Gel Extraktion Kit oder Gibco GlassMax) und in 50 μ l Wasser eluiert, weil Salzreste die empfindliche TdT-Reaktion stören.

Für eine Reaktion wurden 10 μl gereinigte cDNA, 5 μl Tailing-Puffer, 2.5 μl 2 mM dCTP und 6.5 μl H₂O eingesetzt. Nach 2-3 min Denaturieren bei 94 °C und nachfolgendem Abkühlen auf Eis, wurde die Reaktion mit 1 μl TdT für 10 min bei 37 °C durchgeführt. Nach Hitzeinaktivierung bei 65 °C, wurden 5 μl für jede PCR eingesetzt, der Rest eingefroren. Der Anchor-Primer von GibcoBRL enthält mehrere Inosin-Nukleotide, die Polymerasen mit Proofreading-Aktivität stören.

5xTailing Puffer:	Tris·HCl, pH=8.4	50 mM
	KCl	125 mM
	MgCl ₂	7.5 mM (N)

3.3.5 PCR-Mutagenese

Punktmutationen wurden in einer zweistufigen PCR eingeführt, bei der die beiden Fragmente aus der PCR-Runde genau an der zu mutierende Stelle überlappten (vgl. scFv-PCR). Wenn möglich wurde dabei durch eine stille Mutation eine Schnittstelle eingebaut, um den Erfolg der Mutagenese leicht kontrollieren zu können (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>).

3.3.6 Klonierung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte zu klonieren, wurden in die Primer Schnittstellen eingebaut, das PCR-Produkt mit den entsprechenden Enzymen verdaut und als Fragment in eine Ligation eingesetzt wurde. Entscheidend ist ein ausreichender Basen-Überhang (2-6 bp) zwischen Erkennungsstelle des Restriktionsenzym und DNA-Ende. PCR-Produkte mit geringer Ausbeute wurden unverdaut in pCR-Blunt II-TOPO kloniert, dessen Enden mit Topoisomerase gekoppelt sind. Das Protokoll des Herstellers wurde unverändert übernommen.

3.4 Protein-Arbeiten

3.4.1 Zelllysate

Für Immunpräzipitationen von zellulären Proteinen wurden die Zellen zunächst mit Detergenzien (NP-40) aufgeschlossen und die Proteine solubilisiert. Proteasehemmer verhindern dabei die Proteindegradation. Adhärente Zellen wurden in der Kulturschale einmal mit PBS gewaschen und dann mit 500 μl eiskaltem Lysispuffer pro 10 cm Platte direkt in der Schale lysiert. Das Lysat wurde in 1.5 ml Gefäße überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die unlösliche Fraktion abzentrifugiert (14000 rpm, 20 min, 4°C). Die Proteinkonzentration im klaren Überstand wurde im BioRad Protein-Assay photometrisch bei 595 nm bestimmt (200 μl BioRad-Reagenz, 800 μl Wasser, 2 μl Lysat).

Lysispuffer	Tris pH 8.0	20 mM
	NaCl	137 mM
	NP-40 (Nonidet P-40)	1 %
	EDTA	10 mM
	Complete Mini (Roche)	1 Tablette/10 ml

3.4.2 Immunpräzipitation

Mit spezifischen Antikörpern wurden aus Zell-Lysaten oder Kulturüberstand Protein angereichert. Um den Proteinabbau möglichst zu minimieren wurden Inkubationszeiten kurz gehalten und alle Schritte im Kühlraum durchgeführt (Überkopfschüttler). Zunächst wurde der Antikörper an Protein G Sepharose (Pharmacia) gekoppelt (1h Inkubation), ungebundener Antikörper danach mit PBS-T (PBS, 0.05 % Tween 20) gewegewaschen und dann für 2 h mit dem Lysat oder Kulturüberstand inkubiert. Für eine Gelspur wurden 1 μg Antikörper und 20 μl Protein G Sepharose (1:1 in PBS) eingesetzt. Danach wurden die IPs dreimal mit kaltem PBS-T gewaschen (2000* g) und in 8 μl 4xAuftragspuffer aufgenommen. Für Lysate wurden jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt.

3.4.3 SDS-PAGE Elektrophorese: Glycin-Gele

Nach Laemmli [105] wurden denaturierte Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts über SDS-Gele aufgetrennt. Verwendet wurde das Biorad-System Mini-Protean II, 8 cm x 7 cm, 0.75 mm dick). 3.5 ml Trenngellösung wurden zum Polymerisieren mit Isopropanol überschichtet, danach die Oberkante mit Wasser gewaschen und mit 2 ml Sammelgellösung überschichtet, in das ein Plastikamm gesteckt wurde. Vor dem Laden wurden die Taschen sorgfältig gespült, während die Proben in Auftragspuffer aufgeköcht wurden (10 min, 95 °C). Nach der Elektrophorese bei 80-120 V wurde das Gel entweder auf Nitrozellulose Membran gebloftet oder fixiert und zur Autoradiographie getrocknet.

4xTris/SDS, pH=6.8	Tris·HCl	0.5 M
	SDS	0.4 %
4xTris/SDS, pH=8.8	Tris·HCl	1.5 M
	SDS	0.4 %
10xLaufpuffer:	Tris·Cl	0.25 M
	Glycin	2 M
	SDS	1 %
2xAuftragspuffer:	Tris pH=6.8	125 mM

SDS	4 %
2-Mercaptoethanol	2 %
Bromphenolblau	1 mg%

Trenngellösung:	7.5 %	10 %	12 %	15 %
40 % Acrylamid (37:5)	4 ml	5 ml	6 ml	7.5 ml
4xTris/SDS pH=8.8	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
H ₂ O	11 ml	10 ml	9 ml	7.5 ml
jeweils erst direkt vor dem Gießen zugeben:				
10 % APS (bei -20°C)	70 µl			
TEMED (Biorad)	15 µl			

Sammelgellösung	
40 % Acrylamid (37:5)	1 ml
4xTris/SDS ph=6.8	2.5 ml
H ₂ O	6.4 ml
direkt vor dem Gießen:	
10 % APS	50 µl
TEMED	10 µl

3.4.4 SDS-PAGE Elektrophorese: Tricin-Gele

Nach der Methode von Schägger und v. Jagow [150] lassen sich mit einem dreischichtigen Gel besonders gut kleine Proteine und Peptide bis 1 kDa auftrennen. Die höhere Auflösung wird durch eine höhere Quervernetzung und den veränderten Laufpuffer erzielt. Durch das schwere Glycerin im 16.5% Gel können Trenngel und Sammelgel direkt nacheinander gegossen werden und gleichzeitig polymerisieren. Für Proteine im Bereich um 30 kDa wurde ein Variante mit einem Trenngel (10 %T, 3 %C) und Sammelgel (4 %T, 3 %C) gewählt.

3xGelpuffer:	Tris·Cl	3 M
	SDS	0.3 %
	mit 1 N HCl pH=8.45 einstellen	

Gel-Monomerlösung:	Acrylamid	48 g/100 ml
(49.5%T, 3%C)	N, N'-Methylene-bisarcylamid	1.5 g/100 ml
	filiert durch 0.45 µm Filter, bei 4 °C lagern	

2xAuftragspuffer:	Tris pH=6.8	100 mM
	Glycerin	24 ml/100 ml
	SDS	8 %

	2-Mercaptoethanol	4 %
	Bromphenolblau	1 mg%
5xAnodenpuffer:	Tris·Cl, pH=8.9	1 M
5xKathodenpuffer:	Tris·Cl	0.5 M
	Tricine	0.5 M
	SDS	0.5 M
	mit 1 N HCl pH=8.25 einstellen	

	16.5% Trenngel (10.5 ml)	10% Spacergel (7.5 ml)	4% Sammelgel (6.25ml)
Acrylamid (49.5% T, 3% C)	3.5 ml	1.5 ml	0.5 ml
Gelpuffer	3.5 ml	2.5 ml	1.55 ml
Wasser	–	3.5 ml	4.2 ml
32% Glycerin (v/v)	3.5 ml	–	–
zum Polymerisieren:			
10% APS	32.5 μ l	35 μ l	25 μ l
TEMED	3.25 μ l	4 μ l	5 μ l
für ein Gel (1.5mm):	5 ml	2.5 ml	\approx 2 ml

3.4.5 Coomassiefärbung

Große Proteinmengen (0.3-1 μ g) wurden in SDS-Gelen mit der einfachen Coomassiefärbung nachgewiesen. Das Gel wurde 10-20 min in Coomassiefärbelösung vollständig durchgefärbt, und dann in 10 % Essigsäure) solange inkubiert, bis der Hintergrund wieder farblos war.

Coomassielösung: 0.5 g Coomassie Brilliant Blau in 250 ml 90 % Methanol lösen, dann mit 20 % Essigsäure mischen und filtrieren.

3.4.6 Silberfärbung

Zum Nachweis geringer Proteinmengen (ab 5ng) wurde eine nicht-ammoniakalische Silberfärbung nach dem Protokoll nach Blum (1987, Current Protocols in Molecular Biology) verwendet.

Das SDS-Gel wurde zunächst für 10 min in 50 ml Fixierlösung schüttelnd inkubiert, dann zwei mal für je 5 min mit Wasser gewaschen. Danach wurde das Gel 1 min in 50 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0.2 g/l) getränkt, zwei mal mit Wasser gespült (je 20 s) und dann 10 min in 50 ml 0.1 g% AgNO_3 unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach kurzem Spülen mit Wasser und etwas Entwicklerlösung wurde das Gel in 50 ml frischer Entwicklerlösung bis zur gewünschten In-

tensität gefärbt (1-20 min). Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 2.5 ml Stopplösung beendet. Nach 10 min Einwirkzeit wurde das Gel zunächst für weitere 10 min in Wasser gewaschen, danach 10 min in Trockenlösung inkubiert, und dann zwischen zwei befeuchteten Zellophanfolien aufgespannt und getrocknet.

Fixierlösung:	Methanol	40 %
	37 % Formaldehyd	0.5 ml/l
Entwicklerlösung:	Na ₂ CO ₃	30 g/l
	Na ₂ S ₂ O ₃	0.2 g/l
	erst direkt vor Gebrauch zugeben:	
	37 % Formaldehyd	0.5 ml/l
Stopplösung:	Zitronensäure	2.3 M
Trockenlösung:	Ethanol	10 %
	Glycerin	4 %

3.4.7 Western-Blot, Immunodetektion

Um spezifische Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen mit Antikörpern nachweisen zu können, wurden die Gele nach der Elektrophorese zunächst auf Nitrozellulose-Membranen geblottet (1 h, 400 mA). Dort wurden die Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert und sichtbar gemacht: Das SDS-Gel wurde zunächst in Transferpuffer in ein Sandwich aus zwei Whatman-Papieren, Gel, Nitrozellulose-Membran (auf der Anodenseite) und einer zweiten Schicht Whatman-Papiere gelegt. Luftblasen wurden entfernt. Dieses Packet wurde zwischen zwei Schwämme in die Blot-Apparatur (Miniprotean II, Biorad) eingespannt und bei 400 mA in kaltem Transferpuffer für 1 h geblottet. Die Apparatur wurde mit einem Eisblock gekühlt.

Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst für 1 h mit 5 % Milchpulver in TBST geblockt. Alle Inkubationen erfolgten auf einem Schüttler oder in einem 50 ml Falconröhrchen auf einem Rollinkubator. Die Membran wurde dann 2 h mit dem Antikörper (0.1-1 µg/ml) in TBST inkubiert. Nach gründlichem Waschen in TBST (fünf mal je 5 min) wurde der primäre Antikörper entweder mit Hilfe eines Peroxidase-markiertem sekundären Antikörper markiert, oder bei biotiniertem Antikörpern mit einem Streptavidin-Peroxidase Konjugat (VectaStain). Letzteres erfordert nach dem Blocken mit Milchpulver zwei weitere Blockreaktionen mit Avidin- und Biotin-Lösung (10 min), jeweils mit drei Waschschritten, bevor der Antikörper inkubiert wird.

Das ungebundene Peroxidase wird gründlich mit TBST gewaschen (fünf mal 5 min), bevor der Blot in ECL-Reagenz entsprechend den Herstellerangaben (Pierce, Rockford) entwickelt wurde. Die Membran wurde zwischen zwei Whatman-Papieren kurz getrocknet. Vor der Exposition (BioMax, Kodak) wurde die Membran kurz zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet.

Transferpuffer	Tris·HCl	25 mM
	Glycin ₀ ₂	200 mM
10xTBST	Tris HCl pH 8.0	100 mM
	NaCl	1.5 M
	Tween 20	0.5 %
Block-Puffer	TBST	
	Milchpulver	2.5 %

3.4.8 ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay)

Die Expression der Fusionsproteine im Zellkulturüberstand wurde mit Immunbindungsassays semiquantitativ bestimmt. Dazu wurden Antikörper-Pärchen (Sandwich ELISA) gegen den Zytokinanteil (von R&D) und Antikörper gegen den Idiotypanteil (6C10 bzw. MC11) verwendet.

Für den ELISA wurden 96-Lochplatten (Immunosorb, Nunc) verwendet, die zunächst über Nacht bei 4°C mit Capture-Antikörper beschichtet wurden (50-200 ng Antikörper in 100 µl PBS pro Loch). Nach kurzem Waschen (zwei mal mit je 200 µl), wurden die Platten 1 h bei Raumtemperatur geblockt (300 µl/Loch Block-Puffer mit 0.05 % NaN₃) und erneut gewaschen. Die Proben wurden in Verdünnungsreihen aufgetragen und ca. 2-4 h inkubiert, vier mal gewaschen, und 2 h mit dem Detektions-Antikörper inkubiert (10-100 ng biotinierter Antikörper in 100 µl Block-Puffer pro Loch). Die Peroxidase wurde (nach viermaligem Waschen) über ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (100 µl, 1:1000 in Block-Puffer, Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove) oder Peroxidase-markierte Zweit-Antikörper (100 µl, 1:10000 bis 1:100000 in Block-Puffer) an den primären Antikörper gebunden. Nach erneutem Waschen wurde TMB als Peroxidase-Substrat verwendet. Die Farbreaktion wurde nach 5-30 min mit 1 M H₂SO₄ abgestoppt (50 µl) und die Farbintensität photometrisch bei 450 nm bestimmt. Soweit möglich, wurden rekombinante Standards mitgeführt und mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt.

Analog wurde versucht den Idiotyp-Spezifischen Antikörper-Titer im Mäuse-Serum zu be-

simmen: hier wurde Hybridom-aufgereinigter A20-Idiotyp gecoatet und das Mäuseserum als Detektionsantikörper verwendet. Für den Anti-HBsAg-Titer wurde ein Kit der Firma Enzygnost (Anti-HBs II) entsprechend der Anleitung benutzt.

Coating-Puffer:	PBS	
	Capture-Antikörper	0.5-2 $\mu\text{g/ml}$
Block-Puffer:	BSA	1 % in PBS
	Sacherose	5 %
Wasch-Puffer:	TWEEN 20	0.05 % in PBS
Substrat-Lösung:	Na-Acetatpuffer, pH=6.2	0.2 M
	TMB (in DMSO gelöst)	0.1 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$
	H ₂ O ₂	0.003 %
Stop-Lösung:	H ₂ SO ₄	0.5 M

3.4.9 35S Markierung von Proteinen, Autoradiographie

Durch den Einbau von ³⁵S Methionin und Cystein wurden die zellulären Proteine radioaktiv markiert: Die adhärenen Zellen wurden vorsichtig gewaschen, dann in Methion/Cystein-freiem Medium mit nur 1% FCS aufgenommen, das 100 μCi für eine 10 cm Kulturschale enthielt. Nach 6 Stunden Inkubation wurde der Überstand gesammelt und die Zellen in der Schale lysiert. Deutlich weniger Hintergrund-Signal erhält man, wenn Antikörper und Protein G Sepharose bei der Immunpräzipitation mit der fünffachen Proteinmenge an kaltem Lysat (aus nicht markierten untransfizierten Zellen) blockt. Danach wurde wie bei nichtradioaktiven IPs dreimal mit eiskaltem PBS-T gewaschen (2000*g).

Nach der Elektrophorese wurde das Gel fixiert (1 h in 10 % Essigsäure) und auf einem Whatman-Papier für 2 h bei 80 °C vakuumgetrocknet. Der Film wurde nach Bedarf 1-10 Tage aufgelegt.

3.5 Zellkultur - Haltung eukaryontischer Zellen

3.5.1 Kultivierung von Zelllinien

Für alle Zellkulturarbeiten wurden die Nährmedien der Firma Biochrome (Seromed Produktreihe) eingesetzt, angereichert mit foetalem Kälberserum (FCS), Glutamin 2 mM, Penicillin (50 µg/ml) und Streptomycin (50 µg/ml). Alle Arbeiten wurden in einer Sterilbank unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus) bei 37 °C und 5.0 % CO₂ inkubiert. Die empfohlenen Kulturbedingungen wurden eingehalten:

HeLa	DMEM	10 % FCS	
293 EBNA	DMEM	10 % FCS	200 ng/ml G418 (N)
A20	RPMI	10 % FCS	
Daudi	RPMI	20 % FCS	keine Antibiotika
BCL1	RPMI	10 % FCS	in vivo/in vitro (N)
WEHI	RPMI	10 % FCS	
FDCP-1	RPMI	10 % FCS	10 % WEHI Überstand
CTL44	RPMI	10 % FCS	5U/ml rekombinantes IL4
BALB 3T3	DMEM	10 % FCS	

3.5.2 Bestimmung der Zellzahl

50 µl der Zellsuspension wurde mit dem selben Volumen Trypanblau gemischt und ca. 10 µl davon in einer Neubauerzählkammer pipettiert. Aus dem Mittelwert der lebenden (nicht blau gefärbten) Zellen in den vier Großquadranten ergibt sich die Zellzahl pro ml durch Multiplikation mit 10⁴ und dem Verdünnungsfaktor.

3.5.3 Adhärenente Zellen

Adhäsionszellen wurden als Monolayer in Plastik-Kulturflaschen oder -Petrischalen kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen trypsiniert: Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen im Gefäß vorsichtig mit PBS gespült, und dann für 1-5 min bei 37 °C mit Trypsinlösung (Biochrom/Seromed) inkubiert, bis sich die Zellen leicht vom Boden ablösen ließen. Trypsin wurde 1:1 mit FCS inaktiviert und die Zellen abzentrifugiert (200*g). So wurden die Zellen bis 1:20 gesplittet. Das Medium wurde alle 4 Tage gewechselt.

Trypsin-Lösung 0.05 %:	Trypsin	0.05 %
	EDTA	0.02 %
	in PBS	

3.5.4 Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden unter analogen Bedingungen wie adhärenente Zellen kultiviert. Zum Splitten wurden die Zellen 10 min bei 200 rpm abzentrifugiert. Das resuspendierte Pellet wurde im Verhältnis bis zu 1:10 gesplittet.

3.5.5 Einfrieren von Zellen

Gut proliferierende Zellen wurden abzentrifugiert und gezählt. 10^7 Zellen wurden in 5 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen, zu 1 ml in Kryoröhrchen (Nunc) aliquotiert und langsam (in einer Styroporkiste) auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zur längeren Konservierung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Reaktivierung wurden die Zellen rasch im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad aufgetaut, in 10 ml frischem Medium aufgenommen und abzentrifugiert, um das toxische DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde je nach Größe in einer geringen Menge (3-10 ml) frischem Medium aufgenommen und in eine geeignete Kulturflasche überführt.

Einfriermedium: FCS 90 %
 DMSO 10 %

3.5.6 Calciumphosphat-Transfektion von adhärenenten Zellen

HeLa-Zellen und 293 EBNA lassen sich besonders einfach mit Calciumphosphat-Präzipitaten transfizieren (modifiziert nach [35]). Bei der Pufferherstellung ist die pH-Einstellung besonders kritisch. Um Messfehler gering zu halten, wurde der pH-Wert mit einer gut funktionierenden 2xBBS Referenzlösung verglichen.

Am Tag vor der Transfektion wurden in 10 cm Zellkultur-Petrischalen $1.4 \cdot 10^6$ (N) Zellen in 8.5 ml komplettem Medium ausgesät. Besonders gute Ergebnisse zeigten sich, wenn die Zellen am Vortag 1:3 gesplittet wurden, und beim aussäen durch ein Netz (N) vereinzelt wurden. Für jeden Ansatz wurden $12.4\text{ }\mu\text{g}$ Plasmid in $384\text{ }\mu\text{l}$ 2xBBS aufgenommen und dann 15 min bei RT mit $384\text{ }\mu\text{l}$ 260 mM CaCl_2 präzipitiert. Das ganze Volumen wurde tropfenweise über die Petrischale pipetiert. Bei HeLa und 293 war der Medienwechsel weder direkt vor der noch wie üblich 24 h nach der Transfektion erforderlich. Stattdessen wurde nach 48 bis 72 h direkt der Überstand analysiert, bzw. die Zellen lysiert.

2xBBS (pH=6.95) NaCl 260 mM
 BES 50 mM
 NaH_2PO_4 0.75 mM
 Na_2HPO_4 0.75 mM

3.5.7 Präzipitation von DNA auf Gold-Mikropartikel

Tierische Haut lässt sich durch Mikrobombardement mit Plasmid-beschichteten Goldpartikeln (1.0 μm Durchmesser) *in vivo* transfizieren. Dazu wurde das Helios Gene Gun System (Bio-Rad) eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet: Die Plasmid-DNA wurde zunächst mit CaCl_2 auf die Goldpartikel präzipitiert, um damit die Innenwand des Patronenschlauchs beschichten zu können. Die empfohlenen Standardwerte wurden beibehalten: 0.5 mg Gold pro Patrone, 2 μg DNA/mg Gold.

25 mg Goldpartikel wurden in 100 μl 50 mM Spermidin resuspendiert (5 Sekunden im Ultraschallbad) und dann mit 50 μg Plasmid gemischt. Unter Vortexen erfolgte die Zugabe von 100 μl 1 M CaCl_2 . Nach 10 min Inkubation bei RT wurde das Gold kurz in einer Tischzentrifuge pelletiert (14000* g , 15 s) und der Überstand dekantiert. Essentiell für die gleichmäßige Beschichtung der Patronen ist, die Goldpartikel im verbleibenden Überstand zu resuspendieren, bevor sie 3 mal mit je 1 ml 100 % Ethanol (wasserfrei aus frisch geöffnete Flasche) gewaschen wurden. Für die Beschichtung des Schlauchs wurde das Gold in 100 % Ethanol mit 0.015 mg/ml PVP in ein 15 ml Röhrchen überführt (Gesamtvolumen 3.0 ml).

Zunächst musste der 75 cm lange Patronen-Schlauch in der Beschichtungs-Vorrichtung mit hochreinem N_2 (mindestens Grad 4.8) für 15 min getrocknet. Dann wurde die gesamte Gold-Ethanol-Suspension in den Schlauch gesaugt und der Schlauch bei ausgeschaltetem N_2 -Strom wieder in die Vorrichtung eingebracht. Nachdem sich die Goldpartikel für 3-5 min absetzen konnten, wurde der Ethanolüberstand mit einer peristaltischen Pumpe gleichmäßig abgesaugt (in ca. 45 s). In der Vorrichtung wurde der Schlauch unter Rotation für 5 min mit N_2 (0.4 l/min) getrocknet, bevor er zu 0.5" langen Patronen zurechtgeschnitten wurde. Die Patronen wurden bei 4 °C trocken gelagert.

3.5.8 Isolation von PBL über Ficoll-Gradienten

Um aus frischem Vollblut (50 ml in heparinisierte Spritze steril abgenommen) die mononukleären Zellen (PBL) zu isolieren, wurden 15 ml Ficoll in 50 ml Falcons mit 25 ml Blut (1:1 mit PBS verdünnt) überschichtet. Nach 30 min Zentrifugation (900 g , ungebremst, RT) setzten sich die PBL in der Interphase ab, und konnten mit einer 10 ml Pipette vorsichtig abgenommen werden. Ficoll wurde mit dreifachen Volumen PBS gewaschen (10 min, 400* g , RT). Die Zellen wurden mehrfach mit PBS gewaschen, bis der Überstand klar und damit weitgehend Thrombozyten-frei war.

3.5.9 Generierung von PHA-Blasten

Mit dem mitogen Phytohemagglutinin (PHA) werden primäre PBLs in 4 Tagen zu Lymphblasten aktiviert, und damit für IL-12 empfindlich gemacht. Dazu wurden 1×10^7 Ficoll-gereinigte

PBL in 20 ml Medium (RPMI, 10 % FCS) in einer 80 cm² Kulturflasche mit 10 µg/ml PHA für 3 Tage liegend inkubiert. Danach werden die Zellen auf zwei Flaschen verteilt und mit gleichem Volumen frischen Mediums aufgefüllt und mit rekombinatem humanen IL-2 (Schering, Endkonzentration 50 U/ml) für 24 weitere Stunden inkubiert.

3.5.10 3H-Thymidineinbau zum Nachweis der Zellproliferation

Proliferationsassays zum Nachweis der Bioaktivität von Zytokin-haltigen Kulturüberständen wurden mit entsprechenden Faktor-abhängigen Zelllinien durchgeführt. Die Zellzahl und Messzeitpunkte sind stark von der verwendeten Zelllinie abhängig. Grundsätzlich wurden die Versuche in 96-Lochplatten (Flachboden) mit Verdünnungsreihen und Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Die Zellen wurden in 50 µl Medium ausgesät. Dazu wurden in Triplikaten 50 µl frische Kulturüberstände (48 h nach Transfektion) in einer seriellen Verdünnungsreihe pipettiert. Nach 24-48 h Inkubation wurden mit einer Dispenser-Pipette 1 µCi 3H-Thymidin in 10 µl frischem Medium pro Loch zugegeben. Nach weiteren ca. 16 h Inkubation wurden die (osmotisch aufgeschlossenen) Zellkerne im Harvester auf Filtermatten übertragen. Nicht in das Genom eingebaute Radioaktivität wurde dabei durch die Filtermatte weggespült. Die Filtermatte wurde danach in Szintillationswachs eingeschmolzen, und im Szintillationszähler gemessen.

3.6 Analyse der zellulären Immunantwort

3.6.1 Milzpräparation zur Lymphozytenkultur

Die Milz der frisch getöteten Maus (spinale Dislokation) wurde steril entfernt, und sofort in 3 ml Medium in 10 cm Schalen getaucht und dort mit einem Skalpell und einem Spritzenkolben zerkleinert, durch mehrmaliges Aufziehen der Suspension durch eine 19 G Injektionsnadel weiter homogenisiert und schließlich durch ein 200 µm Nylonnetz gesiebt. Nach dem Abzentrifugieren (200 x g) wurde das Zellpellet in 5 ml ACK-Lysispuffer resuspendiert und 5 min bei RT zur Erythrozytenlyse inkubiert, und schließlich nach Zugabe von 10 ml Medium erneut zentrifugiert. Aus einer Milz konnten so ca. 1-2*10⁸ Zellen isoliert werden.

ACK Lysispuffer	NH ₄ Cl	150 mM
	KHCO ₃	10 mM
	Na ₂ EDTA	0.1 mM
	pH mit 1 N HCl auf 7.4 einstellen	

3.6.2 Restimulation von Splenozyten *in vitro*

Um die tumorspezifische T-Zellpopulation erstens anzureichern und zweitens weiter zu stimulieren, wurden Splenozyten zusammen mit bestrahlten Targetzellen kultiviert. Die *in vitro*-Restimulation kann mehrfach wiederholt werden, wenn ab der zweiten Restimulation frische Antigen-präsentierende Zellen in Form von Splenozyten einer naiven syngenen Maus zugegeben werden.

Nach der Milzpräparation mit Erythrozytenlyse werden $4 * 10^6$ Zellen zusammen mit 10^5 bestrahlten A20 Zellen (10000 rad) in insgesamt 2 ml Medium (RPMI, 10% FCS, Pen/Strep) pro Loch einer 24 Loch-Platte ausgesät. Die Platten werden für 5 Tage ohne Medienwechsel bebrütet.

Für die 2. Restimulation am 6. Tag wurden die Zellen einer Milz wieder vereinigt, gewaschen, gezählt und mit Targetzellen und frischen Antigen-präsentierenden Zellen in 24 Loch Platten ausgesät: $2 * 10^6$ stimulierte Milzzellen, $1 * 10^6$ bestrahlte Splenozyten (3000 rad) einer naiven Maus und $1 * 10^5$ A20 Targetzellen (10000 rad) in 2 ml Medium. Am 8. Tag Zugabe von 60 U IL2 (human oder murin) in jedes Loch. Am Tag 16 wurde die Zellen geerntet und für eine weitere Restimulationen nach dem gleichem Schema mit frischen APC und bestrahlten Targetzellen eingesetzt. Je nach Proliferationsrate lassen sich die Zellen besonders gut am 3.-5. Tag nach IL2-Gabe einfrieren. Erfahrungsgemäß sterben bei der zweiten Restimulation sehr viele nicht-reaktive Zellen. Sorgfältiges Zählen der vitalen Zellen ist essentiell, um verschiedene Milzpräparation in nachfolgenden Versuchen sinnvoll vergleichen zu können.

3.6.3 T-Zellproliferationsassay

Um Lymphom-spezifische Proliferation nachzuweisen, wurden Splenozyten entweder frisch präpariert oder nach ein bis drei Restimulationen mit bestrahlten Lymphomzellen inkubiert. Die antigenspezifische Proliferation kann entweder direkt durch ³H-Thymidin-Einbau gemessen werden, oder über die antigenspezifische GM-CSF Sekretion (ELISA aus den Überständen am Tag 2). In 96-Loch-Rundbodenplatten wurden dazu 50000 bestrahlte Lymphomzellen (10000 rad) mit einer Verdünnungsreihe Responderzellen inkubiert (maximal 500000 Zellen, 1:2 Verdünnungen). Dabei wurden grundsätzlich Dreifachbestimmungen durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Idiotyp-Klonierung

Die meisten Tumorantigene wurden an Patienten entdeckt, die entweder spontan oder nach Immuntherapie eine starke Immunreaktion gegen ihren Tumor entwickelt haben. Sie werden von vielen Tumoren exprimiert. Jedes B-Zell Lymphom exprimiert dagegen einen Idiotypen mit einzigartiger Aminosäuresequenz. Deswegen wurde nach Methoden gesucht, effizient die Idiotypsequenz eines Tumor-Klons zu bestimmen.

4.1.1 Konsensus-Primer ermöglichen die Klonierung des BCL1 Idiotyps

Die Analyse vieler Antikörpersequenzen ermöglicht die Einteilung in Familien (vgl. die Kabat Datenbank <http://immuno.bme.nwu.edu/> bzw. [85]). Die (sekretorische) Signalsequenz und die sogenannten Frameworkregionen erweisen sich dabei innerhalb einer Familie als höher konserviert als die Antigen-bindenden CDR-Segmente (=complement determining regions). Darauf basiert eine Vielzahl publizierter Konsensus-Primer, die PCR-Amplifikation der Antigen-bindenden variablen Region ermöglichen sollen [129, 106, 87, 69, 70, 44, 48] Hierbei können natürlich in der Primerbindungsstelle Mutationen eingeführt werden, die Antigenbindung und auch Antigenität als Tumorantigen beeinflussen können.

	1	10	20	30	40	50	60
Genbank	QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFDDYAMHWVKQSHAKSLIEWIGVISTYNGNTSY						
BCL1 <i>in vivo</i>	QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFDDYAMHWVKQSHAKSLAWIGVISTYNGNTSY						
BCL1 <i>in vitro</i>	QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFDDYVMHWVKQTHAKSLIEWIGVISTYNGNTNY						
	61	70	80	90	100	117	
Genbank	NQKFKGKATMTVDKSSSTVHMEIARLTSEDSANLYCARYYGNYFDYWGQGTTLTVSS						
BCL1 <i>in vivo</i>	NQKFKGKATMTVDKSSSTAYMEIARLTSEDSAIYCARYYGNYFDYWGQGTTLTVSS						
BCL1 <i>in vitro</i>	NQKFKGKATMTVDKSSSTAYMEIARLTSEDSAIYCARYYGNYFDYWGQGTTLTVSS						

Abbildung 4.1: **Der BCL1 Idiotyp mutiert im Laufe der Passagierung:** Dargestellt ist ein Alignment der Aminosäuresequenz der schweren Kette von BCL1 (ohne Signalsequenz): oben die Genbank-Sequenz (Accession Nr. P01759), in der Mitte die Sequenz der *in vivo* passierten Zelllinie, unten die an *in vitro* Kultur angepasste Zelllinie. CDR1, CDR2 und CDR3 sind mit schwarzen Balken markiert (www.bioinf.org.uk/abs/).

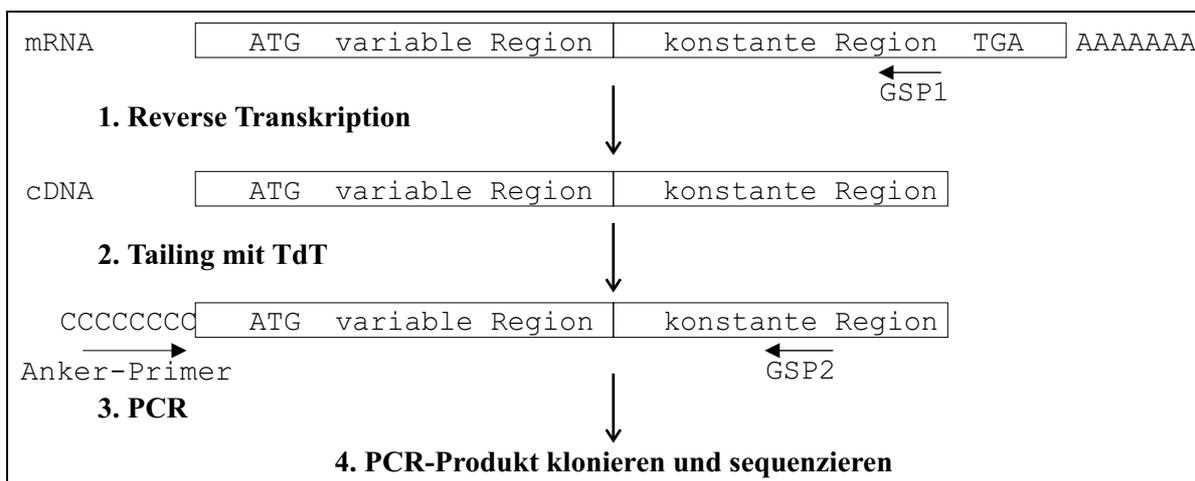


Abbildung 4.2: **5'-RACE-PCR zur Klonierung von Idiotypen:** Tailing am 5'-Ende schafft eine zweite Primerbindungsstelle.

Auch im Laufe der Passierung *in vivo* und *in vitro* mutiert die Sequenz weiter: schwere und leichte Kette wurden aus cDNA der *in vivo* passagierten Zelllinie und dem *in vitro* kultivierbaren Subklon mit RT-PCR kloniert und sequenziert. Die schwere Kette weicht in beiden Zelllinien deutlich von der publizierten Sequenz ab (4.1, und zwar sowohl in den Framework-Regionen als auch den CDRs. Die leichte Kette zeigte keine Mutationen (nicht gezeigt).

4.1.2 5'-RACE-PCR zur Klonierung des A20 Idiotyps

Für A20 war nur die Sequenz der schweren Kette bekannt[48], die leichte Kette ließ sich mit bekannten Konsensus-Primern nicht aus cDNA amplifizieren, so dass nach anderen Methoden gesucht wurde: Die Hypermutationen im Idiotyp bleiben überwiegend auf den Bereich der variablen Domänen in schwerer und leichter Kette beschränkt. Die konstante Region ist selten mutiert, so dass sich am 3' Ende der variablen Region für die verschiedenen Isotypen (IgG, IgM, IgD, IgA für die schwere Kette, bzw. kappa und lambda für leichte Kette) leicht passende Primer finden lassen. Mit 5'RACE-PCR (Abb. 4.2) kann so das 5' Ende der cDNA amplifiziert werden: Dazu werden mit Terminaldesoxytransferase (TdT) mehrere Cytosin-Nukleotide an das 5'-Ende aller cDNA-Stränge angehängt, die als zweite Primerbindungsstelle dienen. Mit einem G-reichen Primer, dem sogenannten "Anker-Primer" und dem genspezifischen Primer (GSP2) im konstanten 3' Bereich der variablen Region lässt sich so die unbekannte variable Region amplifizieren. Die Spezifität lässt sich erhöhen, indem zur cDNA-Synthese im ersten Schritt ebenfalls ein genspezifischer Primer (GSP1) anstelle der üblichen oligo-dT eingesetzt wird, so dass hauptsächlich die mRNA des interessanten Gens in cDNA übersetzt wird.

Für das Gelingen dieser Methode ist neben der Wahl der beiden Primer vor allem die Reinigung der cDNA mit Silikasäulen (GlasMax oder Quick-Spin) entscheidend: Die unverbrauch-

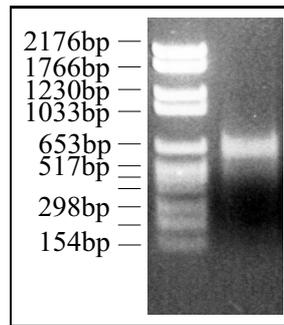


Abbildung 4.3: **5'-RACE-PCR für die A20 Leichtkette:** Oligo-dT geprimete cDNA wurde mit TdT getailt. Mit dem Anchor-Primer und mouseIgK2 ließ sich die Leichtkettensequenz in einer nested-PCR amplifizieren.

ten Oligonukleotide, RNA und Salz stören sonst die empfindliche Tailing-Reaktion.

Mit diesem Verfahren war es möglich, mit den beiden Primern mouseIgK1 und mouseIgK2 die variable Region der leichten Kette von A20 zu klonieren und schließlich zu sequenzieren (Abb. 4.3).

4.1.3 Analyse der A20-VL CDR-Sequenz

Nicht zuletzt um ein PCR-Artefakt auszuschließen, wurde die klonierte Sequenz genau analysiert. Die leichte Kette des A20-Idiotyps lässt sich wie auch die schon bekannte schwere Kette in keine der Kabat-Familien einteilen, entsprechend groß sind auch die Abweichungen zu den Konsensus-Primern. Trotzdem finden sich in der Aminosäure-Sequenz die typischen Motive der Framework-CDR Anordnung (Abb. 4.4). Die strukturellen Voraussetzungen für eine korrekte Faltung sollten damit gegeben sein. Es handelt sich eindeutig um ein Immunglobulingen, das allerdings stark mutiert ist.

4.1.4 Fusion der variablen Domänen zu single-chain Fragmenten

Allein die variablen Regionen eines Antikörpers vermitteln die Antigen-Erkennung. Auch für die Eigenschaften als Tumorantigen sind sie allein verantwortlich. Besonders wichtig scheint die hochvariable CDR3-Region der schweren Kette zu sein. Die kleinste (30 kDa) noch Antigen-bindende Struktur ist ein Fusionsprotein, single-chain Fragment (scFv) genannt, bei dem beide variablen Ketten durch ein flexibles Linkerpeptid verbunden sind (am häufigsten der 15 Aminosäuren lange Huston-Linker $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ [83]). Bei erhaltener Struktur sollte auch die Antigenität des Idiotypen erhalten bleiben.

scFv lassen sich über eine zweistufige PCR klonieren (Schema und DNA-Gel in Abb. 4.5): Zunächst wurden mittels spezifischer Primer jeweils die variable Region der schweren und der leichten Kette des Idiotypen aus Lymphom cDNA amplifiziert. Die ursprüngliche Leader-

5' -UTR																			
ctgatcagtcctcctcaggctgtctcctcaggttgccctcctcaaa																			
1/1 Signalsequenz																			
atg	aag	ttg	cct	gtt	agg	ctg	ttg	gtg	ctg	atg	ttc	tgg	ctt	cct	gtt	tcc	agt	agt	GAT
M	K	L	P	V	R	L	L	V	L	M	F	W	L	P	V	S	S	S	D
61/21																			
GTT	GTG	ATG	ACC	CAG	ACT	CCA	CTC	TCC	CTG	GCC	GTC	AGT	CTT	GGA	GAT	CAC	GTG	AAA	ATG
V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	A	V	S	L	G	D	H	V	K	M
121/41 CDR1																			
TCT	TGT	AGA	TGT	AAT	CAG	AGC	CTT	GTA	AAC	AGT	CAT	GGA	GAC	TCC	TTT	TTA	CAC	TGG	TTT
S	C	R	C	N	Q	S	L	V	N	S	H	G	D	S	F	L	H	W	F
181/61																			
													CDR2						
CTG	CAG	AAG	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AAG	CTC	CTG	ATC	TAC	AAG	GTT	TCC	AGC	CGA	TTT	TTT
L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	S	R	F	F
241/81																			
GGG	GTC	CCA	GAG	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGT	TCA	GGG	ACA	GAT	TTC	ACA	CTC	GAG	ATC	AGT
G	V	P	E	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	E	I	S
301/101																			
													CDR3						
CGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	CTG	GGA	GTT	TAT	TTC	TGT	TCT	CAA	GGT	GCA	CAT	GTT	CCG	TGG
R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	F	C	S	Q	G	A	H	V	P	W
361/121																			
ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	GTC	AAA	CGG	gct	gat	gct	gca	cca	act	gta	tcc
T	F	G	G	G	T	K	L	E	V	K	R	A	D	A	A	P	T	V	S

Abbildung 4.4: **Leichtketten-Sequenz des A20-Idiotyps**: Die strukturell wichtigen Aminosäuren sind konserviert (fett gedruckt, vgl. <http://www.bioinf.org.uk/abs/>), und ermöglichen eine Abgrenzung der 3 CDR Bereiche (fett umrahmt).

sequenz wurde beibehalten. Die dazu verwendeten Primer enthalten bereits die Schnittstellen bzw. einen Teil der Linkerregion (30 Nukleotide). Die Linkerprimer für schwere und leichte Kette überlappen dabei um 15 Nukleotide. Die PCR-Produkte wurden aus einem präparativen Gel eluiert und aufgereinigt. In einer zweiten PCR-Reaktion mit nur den äußeren Primern wurden beide Fragmente äquimolar eingesetzt und nach einem langen Annealingschritt im überlappenden Bereich hybridisiert, so dass die Polymerase beide Stränge zu einem Strang über die ganze Länge des Fusionsproteins verlängern kann. Die Sequenz des A20-scFv ist in Abb. 4.6 exemplarisch gezeigt. Genauso wurde als Kontrolle auch ein Id-scFv zur human B-Zelllinie Daudi kloniert (nicht gezeigt).

4.2 Klonierung von Fusionskonstrukten mit immunogenen Carriern und Zytokinen

Als körpereigenes Protein ist der Idiotyp ohne Adjuvantien nur ein sehr schwaches Antigen. Zytokine und körperfremde Trägerproteine sollten dazu verwendet werden, Antigen-präsentierende Zellen zu aktivieren und ein optimales Milieu für eine starke Immunantwort gegen den Idiotyp zu schaffen. Bei Proteinvakzinen erfüllen koinjizierte Adjuvantien wie Alum und MF59 diese Aufgabe. Gerade bei schwachen Antigenen hat sich bei Proteinvakzinen und bei

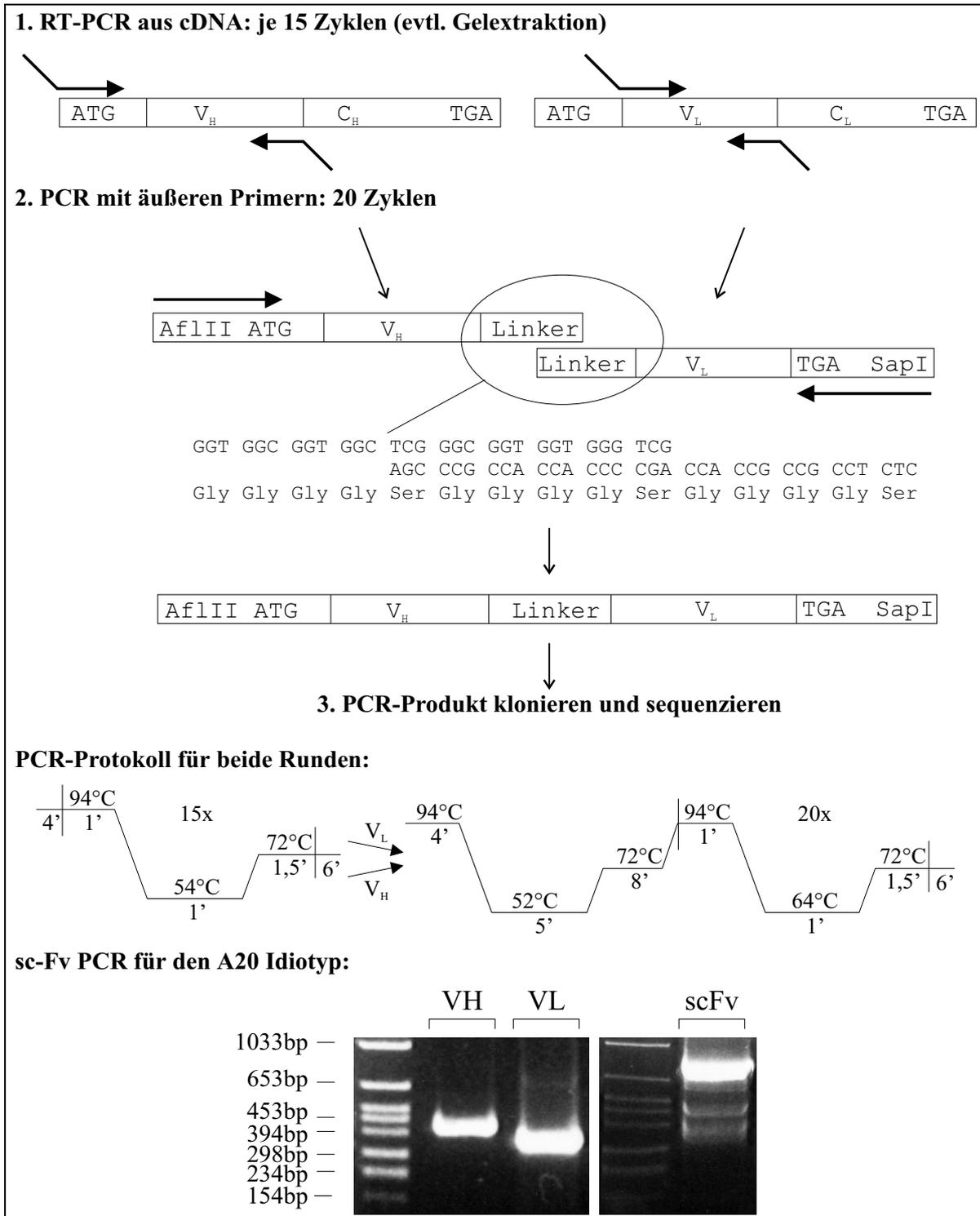


Abbildung 4.5: PCR-Klonierung von scFv: in ersten Schritt wird an die variablen Regionen von schwerer und leichter Kette (VH und VL) ein Teil der Linkersequenz angehängt. Durch einen Überlapp von 15 Nukleotiden werden beide Fragmente in der zweiten PCR-Runde hybridisiert. Unten: Aus A20 cDNA wurden zunächst VH und VL amplifiziert. Die in der Linkerregion überlappenden PCR-Produkte wurden für die nächste PCR-Runde eingesetzt, und mit den äußeren Primern der scFv amplifiziert.

1/1 Leader	
ATG GCA TCG AAC TTC ATC ATG GTC TTC TTG ACA ACA ACA GCT CCA GTT GTC CAC TCG	CCG
M A S N F I M V F L T T T A P V V H S	P
61/21	
GTC CAA TTG CAA CAG TCC GGG CCT GAC CTT GTG AAA CCT GGG ATG TCC GTG AAA CTG TCC	
V Q L Q Q S G P D L V K P G M S V K L S	
121/41	
TGT AAG ACT TTG GGT TAC AAT TTC TCC GAC AAG TGG ATT CAC TGG ATT AAA CAG AAG CCT	
C K T L G Y N F S D K W I H W I K Q K P	
161/61	
GGC CGA GGC CTT GAA TGG GTT GGA AGG ATT GAT CCT TCT AAC GGT GAT ACT GAC TAT AAT	
G R G L E W V G R I D P S N G D T D Y N	
241/81	
ACG GAC TTC AAG ACC CCG GCC ACA CTA ACT GTT GAC AGA CCC TCC AAC ACA GCC TAC TTA	
T D F K T P A T L T V D R P S N T A Y L	
301/101	
GAA CTC AGC AAC CTG ACA TCT GGG GAC TCT GCG GTC TAT TAT TGT TCA ATA TCG GGT GAT	
E L S N L T S A V Y Y C S I S G D	
361/121	
TAT TCC GCC TGC GAC TAT TGG GGC CAA GGC ACC GAA CTC ACA GTC TCC TCA	Linker
Y S A C D Y W G Q G T E L T V S S	GGT GGC GGT G G G
421/141	
GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT	GAT GTT GTG ATG ACC CAG ACT CCA
G S G G G S G G G S	D V V M T Q T P
481/161	
CTC TCC CTG GCC GTC AGT CTT GGA GAT CAC GTG AAA ATG TCT TGT AGA TGT AAT CAG AGC	
L S L A V S L G D H V K M S C R C N Q S	
541/181	
CTT GTA AAC AGT CAT GGA GAC TCC TTT TTA CAC TGG TTT CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT	
L V N S H G D S F L H W F L Q K P G Q S	
601/201	
CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAG GTT TCC AGC CGA TTT TTT GGG GTC CCA GAG AGG TTC AGT	
P K L L I Y K V S S R F F G V P E R F S	
661/221	
GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTC GAG ATC AGT CGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG	
G S G S G T D F T L E I S R V E A E D L	
721/241	
GGA GTT TAT TTC TGT TCT CAA GGT GCA CAT GTT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG	
G V Y F C S Q G A H V P W T F G G G T K	
781/261	
CTG GAA GTC AAA CGG TAG	
L E V K R *	

Abbildung 4.6: DNA-Sequenz des A20-scFv

DNA-Vakzinen eine Kopplung von Antigen und Adjuvans bewährt. Deswegen wurde eine Klonierungsstrategie entwickelt, um leicht Fusionsproteine aus bis zu drei Molekülen klonieren zu können: Dem Idiotyp (A20, BCL1, Daudi), einem Zytokin und einem Trägermolekül.

Allgegenwärtiges Adjuvans ist immer die Plasmid-DNA: Die bakterielle DNA wird mit ihren nichtmethylierten CpG-Motiven als fremd erkannt und verschiebt die Immunantwort in Richtung Th1.

4.2.1 Klonierungsstrategie

Für die genetische Immunisierung ist im Prinzip nur eine eukaryontische Expressionkassette nötig. Hier wurde der CMV-Promotor verwendet, der sich in den meisten Geweben (einschließlich Lymphozyten und APCs) durch eine konstant hohe Expressionsrate auszeichnet [195].

Für die ersten *in vivo* Experimente wurde pTracer-CMV als Vektor mit GFP als Reportergen verwendet, um in histologischen Schnitten das Expressionsmuster nach DNA-Applikation beobachten zu können. Durch die Fusion von GFP mit einer Zeocinresistenz können zusätzlich *in vitro* stabil exprimierende Zelllinien selektiert werden.

Die scFv wurden vom Startcodon und Signalsequenz (AflII-Schnittstelle) bis zum Stopcodon nach der leichten (SapI-Schnittstelle) amplifiziert und blunt in pCR-blunt-II-TOPO kloniert

und sequenziert. Dieser Baustein kann mit AflII und EcoRI in pTracer-CMV kloniert werden (Schema in Abb. 4.7). Die Zytokin cDNA-Fragmente sind (ohne Signalsequenz) ebenfalls in pCR-blunt-II-TOPO kloniert und wurden mit SapI/NotI mit dem Idiotyp fusioniert, dabei wird das Idiotyp-Stopcodon durch eine SacII-Schnittstelle und ein kurzes Linkerpeptid zwischen Idiotyp und Zytokin ersetzt, über die der dritte Fusionspartner kloniert werden kann. Aus den pCR-blunt-II-TOPO Plasmiden mit drei Idiotyp-scFv, fünf Zytokinen und zwei Träger-Antigenen (Tetanus Toxin Fragment C und HBsAg) können leicht alle möglichen Fusionskonstrukte kloniert werden.

Der letzte Schritt erwies sich als unerwartet schwierig, weil SacII das ungeschnittene Plasmid nicht effizient lineariert, das vorgeschchnittene Plasmid aber vollständig verdaut. Unmethylierte Plasmid-DNA aus *dam* negativen Bakterien (SCS 110), wird dagegen sehr gut linearisiert, obwohl es keinen entsprechenden Vermerk vom Hersteller gibt (vgl. 4.8).

Zusätzlich wurden auch Expressionsplasmide für unfusionierten Zytokine kloniert, um im Tierversuch eventuell antigenunspezifische Effekte durch den Zytokinpartner aufdecken zu können.

4.2.2 Auswahl und Klonierung der verwendeten Zytokine

Interleukin 1 β , Interleukin 4 und GM-CSF:

Die stark inflammatorischen und toxischen Effekte von **IL1 β** verbieten einen Einsatz als Adjuvans. Das Nonapeptid VQGEESNDK (Aminosäuren 163-171) zeigt dagegen nur die (gewünschten) immunstimulatorischen Eigenschaften [21]. Fusionsproteine wurden mit den beiden phosphorylierten und hybridisierten Oligonukleotiden IL1beta-TGA-NotI und IL1beta-SapI-sense kloniert. **IL4** wurde als klassisches Th2-Zytokin ausgewählt. **GM-CSF** wird nach Antigenkontakt von T-Zellen und Makrophagen sezerniert, und induziert die Reifung der Langerhanszellen. IL4 (20 kDa) und GM-CSF (mehrfach glykosiliert, 14-35 kDa) wurden von entsprechenden cDNA-Vektoren kloniert. Mit PCR wurden die Sap I und Not I Schnittstelle eingefügt, und die cDNA ohne Leadersequenz mit dem Idiotyp fusioniert.

Interleukin 12

Das Th1-Zytokin IL12 ist ein Heterodimer aus p40 und p35. Zur Expression müssten deswegen zwei Plasmide kotransfiziert werden, oder beide cDNAs mit einer IRES-Sequenz (Intra-ribosomal binding site) von einem Plasmid exprimiert werden. Für einen viralen Gentransfer wird außerdem leicht die Verpackungskapazität vieler Vektorsysteme überschritten. Deswegen sollte hier zunächst auch ein single-chain IL12 Molekül (wie bei [115]) kloniert und dann an die Idiotypen fusioniert werden. p40 sollte aminoterminal gefolgt durch das Linker-Peptid

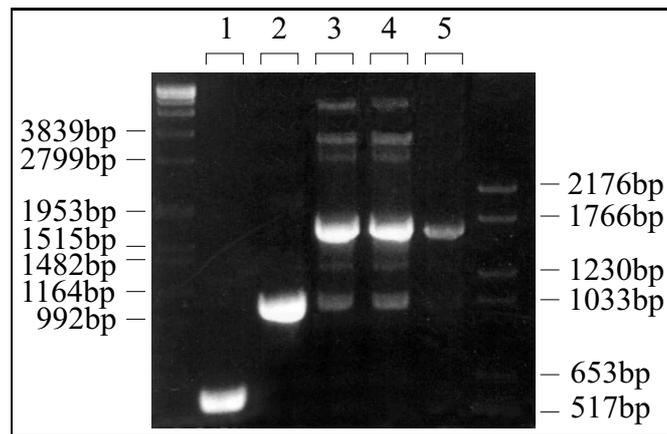


Abbildung 4.9: **Klonierung eines single chain IL12:** In Spur 1 und 2 Amplifikation der beiden IL12 Untereinheiten p35 bzw. p40 vom Plasmid (30 Zyklen). Für die Assemblyreaktion mit den äußeren Primern wurden verschiedene Mengen PCR-Produkt aus der 1. Runde (nach je 15 Zyklen) direkt eingesetzt. In Spur 3 jeweils 4 μ l p35 und p40, in Spur 4 jeweils 2 μ l. Spur 5: wie Spur 4, nur 1/5 aufgetragen. Daraus Gelextraktion und Klonieren des Fragments. 1. Runde: 94C/1', 56C/1', 72C/2.5' 2. Runde: 1x 94C/5', 56C/5', 72C/8', 20x 94C/1', 64C/1.5', 72C/3.5'

(Gly₄Ser)₃ und die um die ersten 22 Aminosäuren (Signalsequenz) gekürzte p35-Sequenz exprimiert werden. Für die PCR (Original cDNA von U. Guebler) wurde ein analoges Protokoll wie bei der Klonierung der scFv aus den Idiotypen eingesetzt, das auch für die wesentlich längeren DNA-Fragmente hervorragend funktioniert (siehe Abb. 4.9): Zunächst wurden p40 und p35 in der ersten PCR-Runde mit den entsprechenden Primern getrennt amplifiziert. Dabei wurden die Klonierungs-Schnittstellen und die überlappende Linkersequenz eingefügt. In der zweiten PCR-Runde wurden die beiden überlappenden Fragmente fusioniert (vgl. Abb. 4.5).

Flt3 Ligand

Flt-3 Ligand wirkt im Knochenmark auf verschiedene Vorläuferzellen und wird zunehmend zu *in vitro* Generierung von DC verwendet [183]. Genduplikationen und Tandem-Repeats des Rezeptors (flt3) tragen durch autokrine Stimulation zur Pathogenese verschiedener Tumoren bei, insbesondere bei Leukämien [51]. Deswegen wurden für die Klonierung des Liganden verschiedene B-Zelllinien auf Expression untersucht. Besonders interessant waren natürlich die beiden verwendeten Lymphome A20 und BCL1. Tatsächlich war in MPC11 und den Myelomen SP6 und MOPC 315 mRNA-Expression nachweisbar. Auch die an *in vitro* Kultivierung adaptierte BCL1-Zelllinie war positiv, nicht dagegen das nur *in vivo* passagierbare Ausgangslymphom. A20-Zellen zeigten keine Expression (Abb. 4.10). Flt-3 Ligand wird zunächst membrangebunden exprimiert, ist aber auch in löslicher Form bioaktiv [118]. Für die Expres-

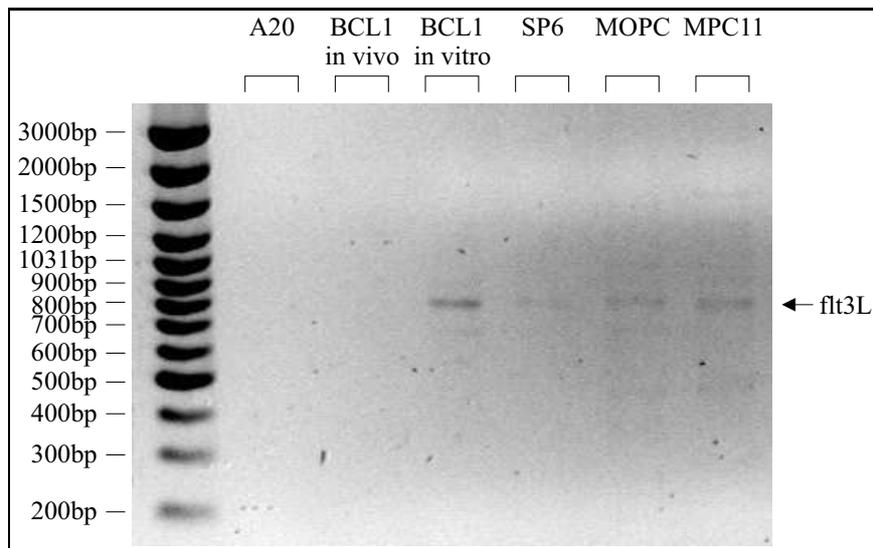


Abbildung 4.10: **Klonierung von murinem Flt3-Ligand:** Mit den Primern mFlt3l-for und mFlt3l-back konnte aus cDNA verschiedener Lymphom-Zelllinien muriner Flt3-Ligand per RT-PCR amplifiziert werden (30 Zyklen). Das Amplifikat aus dem BCL1 *in vitro*-Subklon wurde in pCR-BluntII-TOPO kloniert. (Alle cDNA-Präparationen waren für andere RT-PCRs erfolgreich verwendet worden.)

sion als lösliche Fusionsprotein wurde vor der Transmembrandomäne ein Stopcodon eingefügt (nach dem Leucin 169).

4.2.3 Klonierung des Tetanus Toxin Fragment C aus *Clostridium tetani*

Bakterien und Viren enthalten teilweise sehr stark immunogene Antigene. Durch Kopplung mit anderen Antigenen lässt sich die Immunogenität schwächerer Antigene erheblich steigern, weil durch das Träger-Antigen die Antigen-präsentierenden Zellen aktiviert werden. Das nicht-toxische Fragment C (FragC) des Tetanus Toxins enthält viele starke T-Helfer-Epitope in FragC für verschiedene Haplotypen [182, 132, 99], die Impfung verleiht einen wirksamen Schutz gegen die Komplikationen einer Tetanus-Infektion. Der Neurotropismus bleibt bei diesem Fragment erhalten (bindet das Gangliosid G(T1b)), die Toxizität geht aber verloren.

Die codierende DNA-Sequenz für die 451 Aminosäuren (KNLDC bis GWTND) wurde direkt aus einem toxintragenden Stamm *Clostridium tetani* kloniert. Nach Phenolextraktion wurde das 1400bp Fragment mit *pwo* aus genomischer DNA PCR-amplifiziert. Vermutlich ist der hohe AT-Gehalt (ca. 70%) und die grobe DNA-Präparation für die schlechte Amplifikation mit proof-reading Polymerasen im Vergleich zu *taq* verantwortlich (vgl. Abb. 4.11).

Das hochimmunogene HBsAg aus dem Hepatitis B Virus (HBV, ayw Subtyp) wurde mit PCR aus pCMV-S (von R. Whalen) kloniert, die prä-S1 und prä-S2 Region sind nicht enthalten [45]. Das Protein hat vier Transmembrandomänen und bildet die Hülle der HBV-Partikel

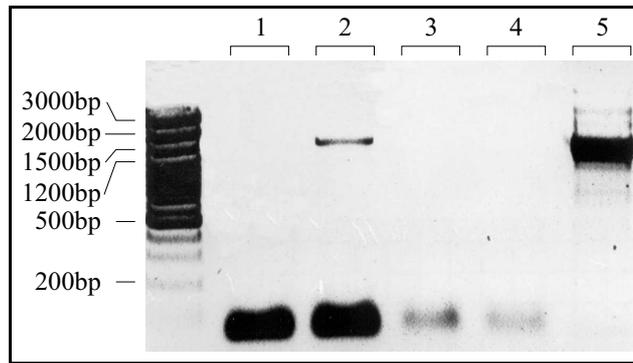


Abbildung 4.11: **Klonierung von Fragment C aus genomischer DNA von *C. tetani***: Aus phenolextrahierter Clostridien-DNA konnte mit *pwo*-Polymerase erst bei Erhöhung der MgSO_4 von 1.5 mM (Spur 1) auf 2.5 mM (Spur 2) Toxin-DNA amplifiziert werden, das dann kloniert wurde. Mit *pfu*-Polymerase (Spur 3) konnte auch nach Zugabe von DMSO kein Produkt amplifiziert werden (Spur 4). Das PCR-Produkt der *taq*-Polymerase wurde wegen der bekannt hohen Fehlerrate nur als Kontrolle verwendet.

(47 nm). In der Leber von Hepatitis B Patienten werden gleichzeitig große Mengen HBsAg Lipoproteinpartikel (22 nm) synthetisiert, die keine virale DNA enthalten [178].

4.3 Analyse der Fusionskonstrukte *in vitro* in HEK293 Zellen

Vor dem Einsatz im Tierversuch mussten die Konstrukte zunächst *in vitro* auf Funktion getestet werden. Trotz richtiger DNA-Sequenz könnten vor allem Faltungsprobleme oder proteolytischer Abbau eine ausreichende Antigenexpression verhindern. Zu prüfen waren die Protein-Expression, die biologische Aktivität der Zytokine und die korrekte Faltung des Idiotyps single-chains, die vor allem für die Antikörper-Antwort bedeutsam ist. Dazu wurden HEK 293 EBNA Zellen (Invitrogen) mit Calcium-Phosphat transient transfiziert und nach zwei Tagen die Kulturüberstände und Zelllysate gesammelt, um sie mit ELISA, Westernblot und in Bioassays zu analysieren.

4.3.1 Idiotyp scFv ohne Zytokinanteil sind nur im Zelllysate nachweisbar

Für die Zytokinfusionen war der Expressionsnachweis *in vitro* leicht zu erbringen (s.u.), da jeweils mehrere Antikörper für ELISA und Westernblot zur Verfügung standen. Gegen die unfusionierten Idiotyp-scFv A20 und BCL1 standen dagegen nur die entsprechenden Anti-Idiotyp (6C10 bzw. MC10) Antikörper zu Verfügung, die nicht für Western-blot geeignet waren. In zahlreichen Optimierungsversuchen mit Zelllysaten des Lymphoms als Positivkontrolle konnte mit verschiedenen Membranen (PVDF, Nitrozellulose), Blockierungstechniken (Milchpulver, FCS, I-Block), Antikörperkonzentrationen und Transferpuffern kein Anti-Idiotyp Western-Blot¹ etabliert werden. Vermutlich erkennen beide Antikörper nichtlineare Strukturepitope, die bei Denaturierung mit SDS zerstört werden. Als *capture*-Antikörper im ELISA und zur Immunpräzipitation waren beide Antikörper gut einsetzbar, wie bei den Zytokinfusionen gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 4.21). Auch mit einem C-terminalen Myc/His-tag markierte Idiotypen konnten im Western-blot im Kulturüberstand nicht nachgewiesen werden.

Deswegen wurden 35S-Methionin Einbaustudien in transfizierten 293 Zellen durchgeführt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden in Zellen für zunächst für 4-6 Stunden in Markierungsmedium inkubiert. Die Zelllysate und Kulturüberstände wurden dann mit 6C10 und MC10 immunpräzipitiert. Durch Blocken (Proteinverhältnis 5:1) mit kaltem Lysat untransfizierter 293 Zellen ließen sich sehr Hintergrund-arme Autoradiographien erstellen. In den Kulturüberständen ließen sich mit dieser Methode sehr gut Idiotyp-Zytokinfusionen nachweisen, während unfusionierte Idiotyp-Proteine nur im Zelllysate nachweisbar waren (Abb. 4.12). Idiotyp mit und ohne das *tag*-Peptid ließen sich gut nachweisen, die Größendifferenz durch das Peptid entsprach genau den Erwartungen, nur erschienen beide Proteine im SDS-Gel 4 kDa zu schwer. Hemmung der zellulären Glykosylierung mit Tunicamycin (5 µg), ergab Idiotyp-Protein der erwarteten Größe. Bei der Myc/His-tag Variante von A20 scheinen auch ohne

¹Sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen.

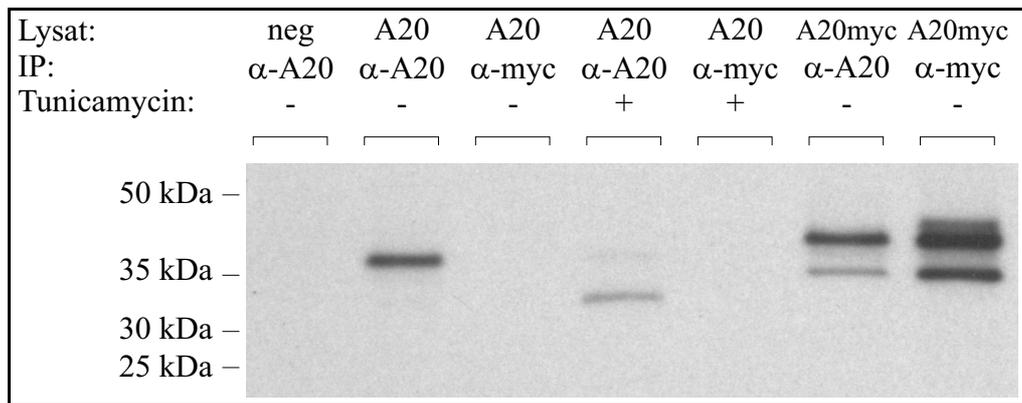


Abbildung 4.12: **Glykosilierter scFv-A20 ist im Zellysat nachweisbar:** HEK293 Zellen wurden transient mit scFv A20-cDNA (ohne *tag* oder mit *myc-tag*) transfiziert und für 6 h mit ^{35}S -Methionin markiert. Aus den Extrakten ließ sich mit Anti-A20 (6C10) oder Anti-Myc (9E10) A20-scFv immunpräzipitiert. Behandlung mit $5\ \mu\text{g/ml}$ Tunicamycin zeigt unglykosilierte single-chain-Fragmente mit dem erwarteten Molekulargewicht. Eine genaue Beschreibung findet sich im Text.

Behandlung glykosiliertes und nicht-glykosiliertes scFv vorzuliegen.

Idiotyp scFv werden also normal translatiert und in den Golgi-Apparat eingeschleust, wo sie höchstwahrscheinlich glykosiliert werden. Eine Sekretion ist damit wahrscheinlich. Vielleicht verhindert ein rascher extrazellulärer Abbau des scFv einen Nachweis *in vitro* mit den benutzen Methoden. Intrazellulärer Abbau durch das Proteasom konnte durch Behandlung mit dem Proteasomen-Hemmer LLnL ($100\ \mu\text{g/ml}$) ausgeschlossen werden, die keine Veränderung bewirkte.

4.3.2 Klonierung einer stabilen sezernierten Negativkontrolle

Neben der immunologischen Aktivität stabilisieren die Zytokine offensichtlich die sezernierten Idiotyp-scFv. Um beide Effekte auf die Immunogenität trennen zu können, eignet sich der unfusionierte Idiotyp nicht, nachdem eine stabile Sekretion hier nicht gezeigt werden konnte: Die durch Tunicamycin hemmbare Glykosilierung beweist die Einschleusung des Vorläuferproteins in das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat, was eine Sekretion erwarten lässt. Deswegen ist eine schnelle Degradierung zumindest unter Zellkulturbedingungen als wahrscheinlichste Erklärung anzunehmen.

In vivo könnte dieser Effekt die Aufnahme ausreichender Antigen-Mengen in die antigenpräsentierenden Zellen verhindern, was einen Wirkungsverlust bedeuten könnte. Tatsächlich konnte noch nie die Wirksamkeit von unfusionierten Idiotyp-scFv als Protein oder DNA-Vakzine gezeigt werde. Ein stabilisierender Fusionspartner ohne spezifische immunologische Funktion bietet sich als Lösung an. Zunächst wurde GFP verwendet, das sich aber auch nicht sezerniert im Kulturüberstand nachweisen ließ. Um mögliche Erkennungsstellen für Proteasen

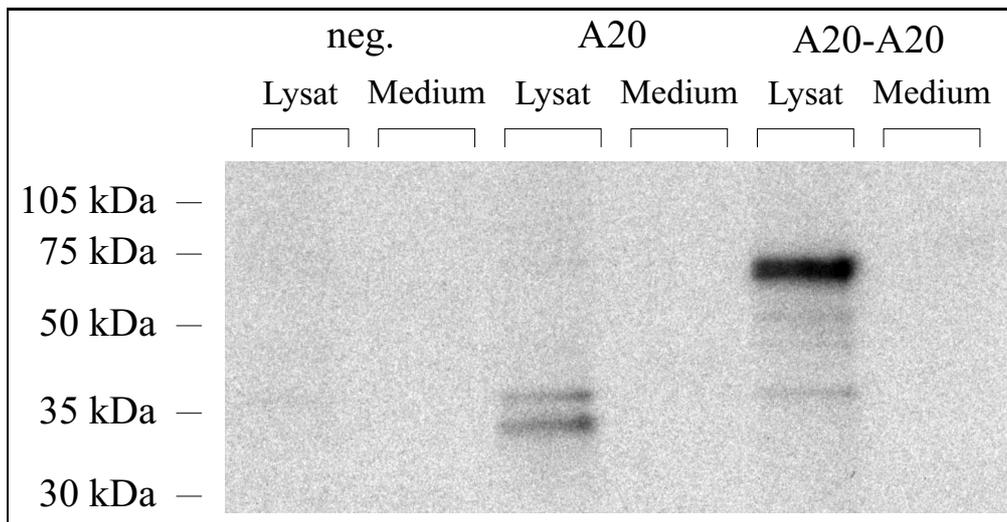


Abbildung 4.13: **scFv A20 Dimere werden nicht stabil sezerniert:** Aus dem Lysat transient transfizierter HEK293 lassen sich A20-scFv als Monomer und aus Dimer immunpräzipitieren (6C10). Im Überstand (IP von 6 ml) der 35S-Methionin markierten Zellen sind beide Konstrukte 48 h nach Transfektion nicht nachweisbar.

sterisch zu blockieren, wurden Dimere und Trimere aus A20-scFv kloniert. Diese Multimere werden gut exprimiert, eine stabile Sekretion ließ sich aber auch nicht zeigen (vgl. Abb. 4.13).

Aus Struktur-Funktionsanalysen [73] sind zahlreiche Mutanten von murinem GM-CSF mit teilweise 1000-fach schwächerer biologischer Aktivität und Rezeptor-Bindung bekannt. Durch PCR-Mutagenese wurden Fusionskonstrukte mit der inaktiven E21K Mutante hergestellt, deren effiziente und stabile Sekretion sich leicht nachweisen ließ (vgl. Abb. 4.14). Tatsächlich ließ sich mit FDCP1 Zellen keine Bioaktivität nachweisen (vgl. unten).

4.3.3 Expressionsnachweis in ELISA und Western Blot

Die Expression der Fusionskonstrukte wurde durch Immunpräzipitation aus dem Kulturüberstand und nachfolgenden Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen die verwendeten Zytokine (IL4, IL12, GMCSF) nachgewiesen (z.B. Abb. 4.16). Zum quantitativen Nachweis wurden die gleichen Antikörper-Paare für Sandwich-ELISAs verwendet.

Im Vergleich zur Transfektion der Zytokin cDNA (ohne Idiotyp scFv) zeigte sich deutlich schwächere Expression der Fusionskonstrukte (Faktor 50-200) mit den Idiotyp-scFv (vgl. Abb. 4.15). Andererseits stabilisiert aber der Zytokin-Anteil die Idiotyp-scFv (siehe oben). Fusionskonstrukte mit A20 wurden dabei durchweg schlechter exprimiert (Faktor 2-4) als die Fusionsproteine mit BCL1. Dies korrelierte gut mit der biologischen Aktivität der Fusionsproteine, die an Zytokin-abhängigen Zelllinien gemessen wurde (siehe unten). Durch eine optimierte Kozak-Sequenz und einen verlängerten scFv-Linker ((Gly₄Ser)₃GlySer wie bei [15]) wurde erfolglos versucht die A20-Expression zu steigern (nicht gezeigt).

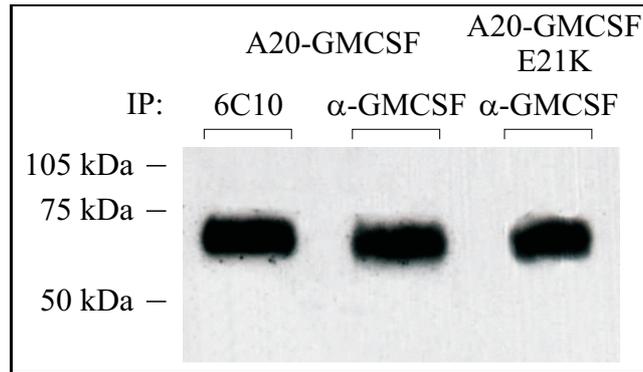


Abbildung 4.14: **Die inaktive GM-CSF Mutante E21K stabilisiert A20-scFv:** Aus 3 ml Überstand transient transfizierter HEK293 (Ernte nach 48 h) wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen A20 (6C10) und GM-CSF die Fusionsproteine immunpräzipitiert. Die Fusion mit der inaktiven Mutante ist genauso stabil wie mit Wildtyp-GMCSF. (Westernblot mit biotinyliertem Anti-GM-CSF)

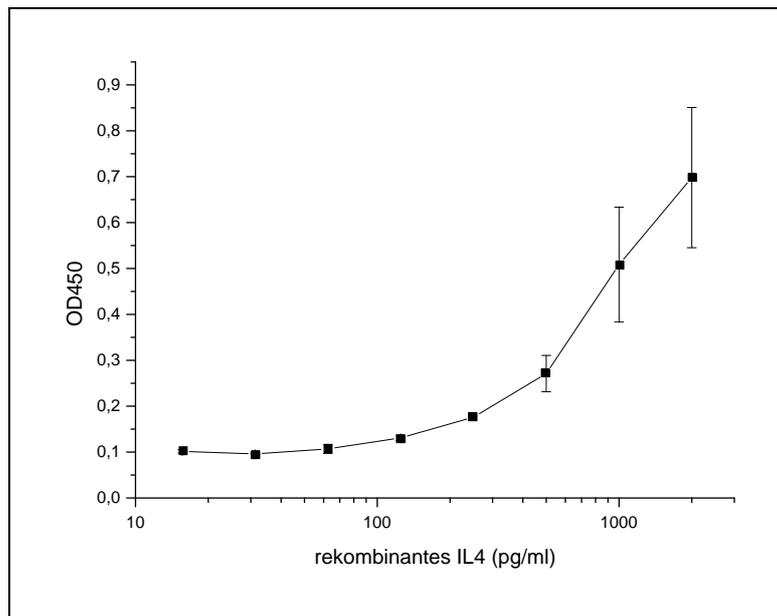


Abbildung 4.15: **Standardkurve für einen IL4 ELISA:** Mit selbst-beschichteten 96-well Platten konnten die Id-Zytokine-Fusionskonstrukte leicht nachgewiesen werden. Hier wurden 300 ng monoklonaler MAB404 pro Loch ge-coated. Die Detektion erfolgte mit dem biotinmarkierten polyklonalen Antikörper BAF404 (R&D).

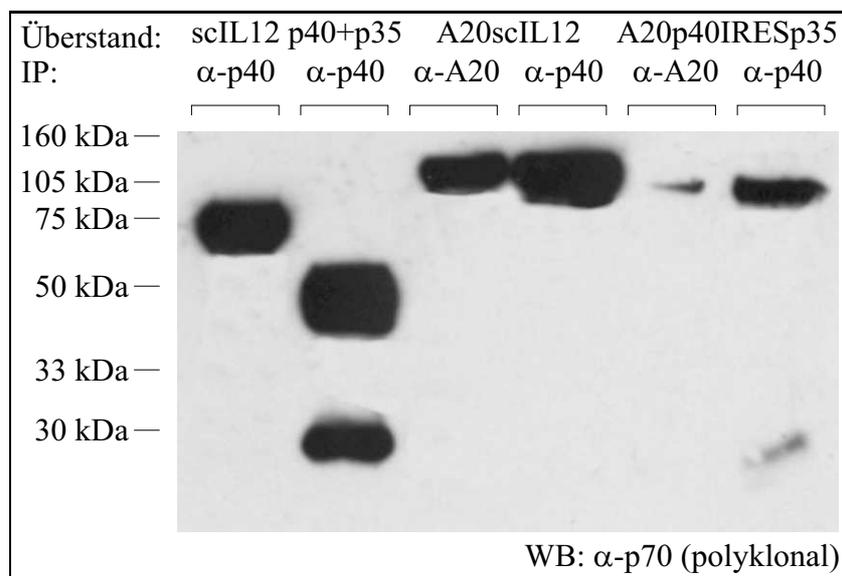


Abbildung 4.16: **Die Fusion von p40 und p35 erhöht die Expression des A20-IL12-Fusionskonstrukts:** IL12 ist ein Heterodimer aus p40 und p35. Das Fusionsprotein (scIL12, Spur 1) wird in HEK293 ähnlich gut sezerniert wie bei Transfektion mit zwei getrennten Plasmiden für p40 und p35 (Spur 2). Das Fusionsprotein von scIL12 mit dem A20-Id (Spur 3) ist dem Fusionskonstrukt mit IRES-Sequenz deutlich überlegen. Es wurden je 4 ml Kulturüberstand 48 h nach Transfektion mit den angegebenen Antikörpern immunpräzipitiert. Der Detektionsantikörper (BAF419) erkennt p40, p35 und single-chain IL12. p35 wird von anti-p40 Antikörper co-immunopräzipitiert (Spur 2 und Spur 6).

Überraschend stark wurden die Fusionsproteine mit dem single-chain IL12 exprimiert, obwohl hier sogar vier verschiedene cDNA-Fragmente fusioniert wurden. Ein Fusionskonstrukt, bei dem nur die p40 Untereinheit von IL12 mit dem A20 Idiotyp fusioniert wurde, während die p35 Untereinheit über eine IRES-Sequenz bicistronisch exprimiert wurde, zeigte deutlich schwächere Expression (Abb. 4.16).

4.3.4 Die Zytokine sind als Fusionsprotein bioaktiv

Der Nachweis von Idiotyp-Zytokin-Fusionsproteinen allein im Western-Blot und ELISA beweist noch nicht die biologische Aktivität des Zytokinanteils *in vivo*. Sterische Effekte könnten die Interaktion mit dem Rezeptor verhindern. Das Zytokin könnte auch in seiner natürlichen Faltung so gestört sein, dass es nicht mehr bioaktiv ist.

Deswegen wurden Proliferationsassays mit Zytokin-abhängigen Zelllinien (für IL4 und GM-CSF) bzw. humanen Primärzellen (für IL12) durchgeführt. Die Zell-Proliferation wurde über 3H-Thymidin Einbau in die genomische DNA nachgewiesen.

Murines Interleukin-12 aktiviert auch den humanen IL12-Rezeptor, so dass humane PHA-Blasten zum Nachweis benutzt wurden. Durch Vorstimulation mit Interleukin-2 werden PHA-

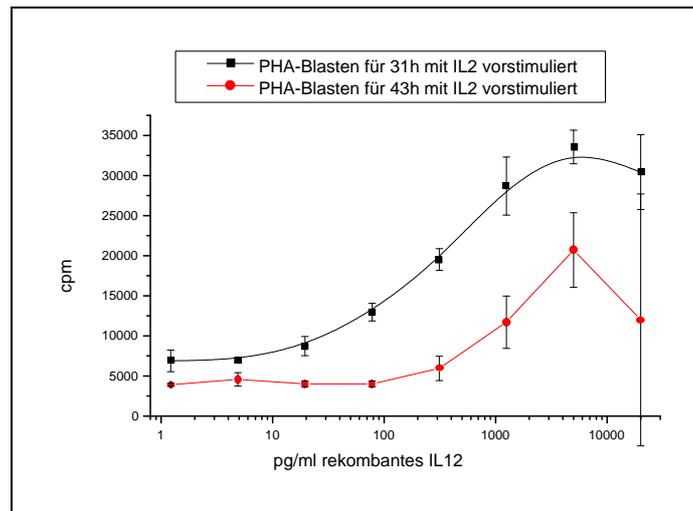


Abbildung 4.17: Durch IL2 Vorstimulation werden humane PHA-Blasten empfindlich für IL12: Für eine optimale IL12-Sensitivität muss die Dauer der IL2-Vorstimulation für jeden Spender neu bestimmt werden, weil nach zu langer Vorstimulation die IL12-Empfindlichkeit wieder deutlich sinkt. Messung: Die IL2-stimulierten PHA-Blasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen IL12 für weitere 48 h stimuliert (2×10^4 Zellen/well), und dann für 24 h mit $2 \mu\text{Ci/Loch}$ 3H-Thymidin markiert. Die Proliferationsrate wurde in Triplikaten durch den Einbau radioaktiven Thymidins in die genomische DNA bestimmt.

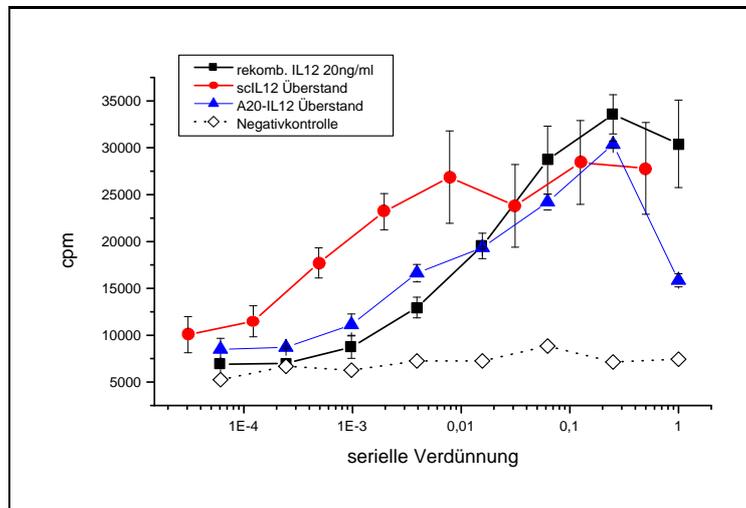


Abbildung 4.18: Das Fusionsprotein aus scFv A20-Id und scIL12 ist bioaktiv: IL2-vorstimulierte PHA-Blasten wurden in Triplikaten 48 h mit Kulturüberständen transfizierter HEK293 inkubiert (Ernte 48 h nach Transfektion). Danach wurden die Zellen für 24 h mit $2 \mu\text{Ci/Loch}$ 3H-Thymidin für weitere 24h inkubiert und dann der Einbau gemessen. Für A20-IL12 ergibt sich eine IL12-Aktivität von 20-40 ng/ml, für scIL12 40-320 ng/ml (wegen der unterschiedlichen Kinetik schwer abzuschätzen).

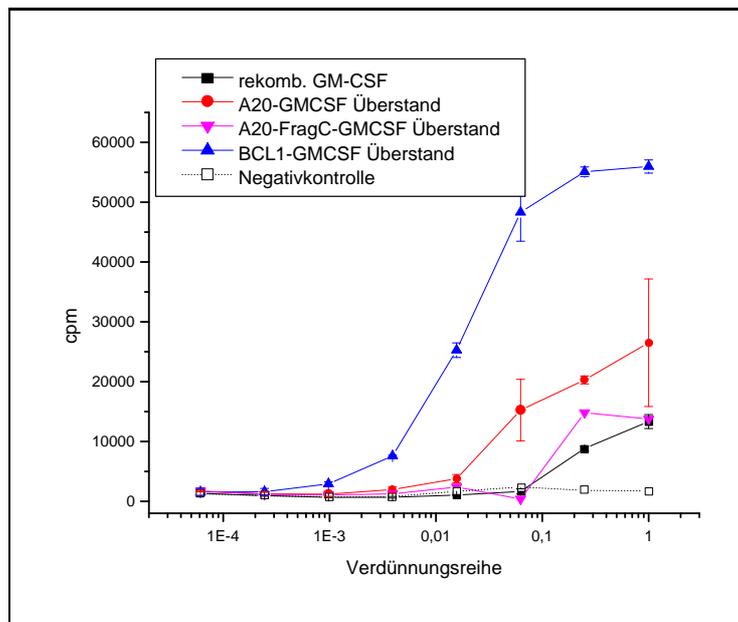


Abbildung 4.19: **GM-CSF Bioassay mit FDCEP-1-Zellen:** FDCEP-1 Zellen wurden 48 h mit den entsprechenden Kulturüberständen inkubiert (n=3). Die Medien wurden dazu jeweils 48 h nach transients Transfektion geerntet. Die Proliferation wurde durch 3H-Thymidin-Einbau bestimmt (24 h). GM-CSF ist in der Fusion mit BCL1 deutlich aktiver als bei Fusion mit A20. Aber sogar die Fusion aus A20-Id, Fragment C und GM-CSF ist noch bioaktiv.

Blasten sensibel für Interleukin-12, zu lange Vorstimulation reduziert die Sensitivität wieder. Es wurde zunächst für einen Donor eine optimale Stimulationsdauer von ca. 31 h bestimmt (Abb. 4.17) und dann (sterilfiltrierter) Kulturüberstand transient transfizierter HEK293 Zellen (Ernte nach 48 h) in seriellen Verdünnungsreihen zur Stimulation eingesetzt. Interleukin-12 zeigte als single-chain, wie erwartet, sehr gute Bioaktivität (40-320 ng/ml). Auch die Fusion mit dem A20 und BCL1-Idiotyp zeigt deutliche Aktivität (20-40 ng/ml), wie in Abbildung 4.18 zu sehen ist.

Für GM-CSF sind viele sensible Zelllinien (FDCEP-1, Da1, NFS-60) bekannt, die meist auch auf IL3 reagieren. Hier besteht keine Kreuzreaktion zwischen humanem und murinem GM-CSF. Beste Ergebnisse zeigten sich mit der Zelllinie FDCEP-1 [167], die am ehesten einer frühen Stammzelle der Hämatopoese entspricht (vgl. Abb. 4.19). Deutliche Aktivität zeigt sich hier auch exemplarisch für das Fusionsprotein aus A20-Id, Fragment C und GM-CSF, auch wenn die Expression wie schon im ELISA schwach ist. Für die Fusionskonstrukte aus Idiotyp, HBsAg und Zytokin konnte dagegen schon in ELISA und Western Blot keine Expression (im Kulturüberstand) nachgewiesen werden. Es scheinen sich keine stabilen Lipoprotein-Partikel zu bilden.

Für murines IL4 wurde CTL44, ein Derivat der humanen Zelllinie CTL/L, verwendet[55]. Im Gegensatz zur Ausgangszelllinie ist die Sensitivität für IL4 stark gesteigert, für IL2 dagegen

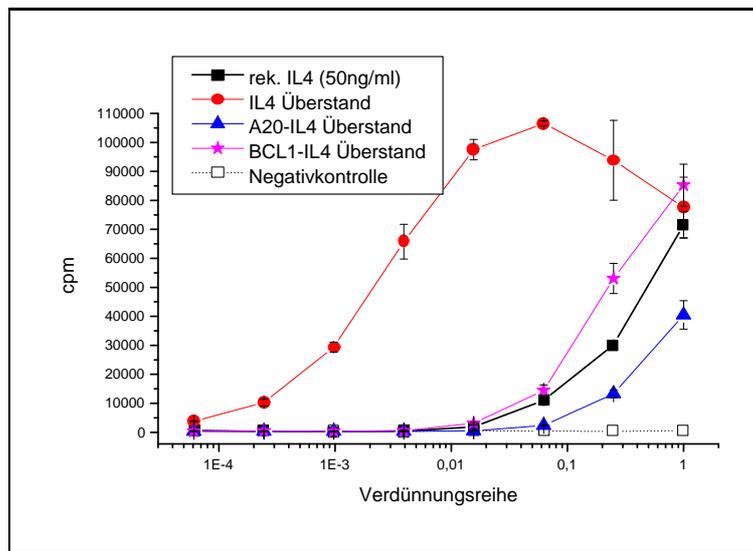


Abbildung 4.20: **IL4-Bioassay mit CTL44 Zellen:** Nach 48 h Inkubation mit den entsprechenden Kulturüberständen (Ernte 48 h nach Transfektion) wurde Proliferation durch 3H-Thymidin-Einbau (24 h) in Triplikaten gemessen. 1×10^4 Zellen, 24 h $1 \mu\text{Ci/well}$. Die IL4 transfizierten 293 Zellen produzieren etwa 10mg/ml aktives IL4. Für die Fusionskonstrukte ergibt sich mit A20 eine IL4-Aktivität entsprechend ca. 20 ng/ml und mit BCL1 100 ng/ml.

abgeschwächt (Abb. 4.20).

Bei allen Fusionsproteinen fällt die 2-8 mal schlechtere Bioaktivität der A20-Konstrukte im Vergleich zu BCL1 auf, was auch bei bakterieller Expression beobachtet wurde (T. Röhnisch).

4.3.5 Idiotyp scFv sind korrekt gefaltet

Idiotyp scFv sind Kunstprodukte. Auch bei eukaryontischer Expression kann nicht *a priori* davon ausgegangen werden, dass sich die Proteine "richtig" falten, d.h. analog zur variablen Domäne des Antikörpers, von dem sie abgeleitet sind. Für unzählige scFv ist die korrekte Faltung bestätigt worden: erhaltene Antigen-Bindung, in einzelnen Fällen sogar mit höherer Affinität, sogar erhaltene katalytische Aktivität bei katalytisch wirkenden Antikörpern konnte gezeigt werden [91]. Bei bakterieller Expression von Antikörpern und scFv kommt es fast regelhaft zur Bildung von Einschlußkörperchen aus ungefalteten scFv-Aggregaten.

Als Indiz für die korrekte Faltung können Anti-Idiotyp-Antikörper dienen. Die beiden Antikörper 6C10 und MC10 erkennen den nativen Idiotypen von A20 bzw. BCL1 sehr gut in ELISA und FACS, aber auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen nicht im Western-Blot. Sie binden vermutlich eine dreidimensionale Struktur im Idiotyp, und keine lineare Peptid-Sequenz. Die entsprechenden scFv erkennen beide Antikörper sowohl im ELISA als auch in einer Immunpräzipitation. Diese Reaktion ist spezifisch: Mit 6C10 als coating-Antikörper und einem Anti-GM-CSF ließen sich A20-GMCSF Fusionsproteine im Sandwich-ELISA gut

coating-Antikörper:	α -CSF	α -A20	α -BCL1
detection-Antikörper:	α -CSF*	α -CSF*	α -CSF*
A20-GMCSF Verdünnung 1/5	↓ 1,388	1,451	0,070
	1,231	0,995	0,059
	1,105	0,579	0,058
	↓ 0,619	0,168	0,058
BCL1-GMCSF Verdünnung 1/5	↓ 1,292	0,055	0,761
	1,202	0,045	0,243
	0,895	0,050	0,132
	↓ 0,444	0,052	0,076

Abbildung 4.21: **Die Anti-Idiotyp-Antikörper 6C10 und MC10 sind spezifisch:** Überstand von A20-GMCSF exprimierenden HEK293 Zellen (Ernte 48 h nach Transfektion) wird im Sandwich-ELISA mit capture-Antikörpern (je 100ng/well) gegen GM-CSF (MAB415, kurz α -CSF) und gegen A20 (6C10), nicht aber gegen BCL1 (MC10) erkannt, wenn mit biotiniertem Anti-GMCSF (BAF415) detektiert wird. Überstand nach BCL1-GMCSF Transfektion wird, wie erwartet, mit Anti-GMCSF und anti-BCL1 erkannt, nicht aber von Anti-6C10. Angegeben sind die Rohdaten der ELISA Enzymreaktion (OD450, n=1) als Maß für die gebundene Antigenmenge.

nachweisen, entsprechendes gilt für MC10 und BCL1-GMCSF. MC10 ergab dagegen mit A20-GMCSF kein Signal, genau wie 6C10 mit BCL1-GMCSF (siehe Abb. 4.21).

4.4 Optimierung des Vakzinierungsweges am Beispiel von HBsAg

Für die Immunisierung mit Plasmid DNA sind inzwischen eine Vielzahl von Immunisierungstechniken beschrieben. Die beiden gebräuchlichsten Methoden sollten zunächst verglichen und auf Praktikabilität untersucht werden: Die direkte Injektion gelöster DNA (in PBS oder 0,9% NaCl) unterscheidet sich vor allem aufgrund der wesentlich höheren DNA-Menge von den ballistischen Methoden, kurz "gene gun" genannt. Die DNA wird auf ca. 1 μ m große Goldkugeln beschichtet und dann mit Luftdruck direkt in die Zellen der Epidermis geschossen, womit man eine deutlich bessere Transfektionseffizienz erreicht und geringere DNA-Mengen benötigt (1 μ g im Vergleich zu 100 μ g). Andererseits ist die geringere DNA-Menge scheinbar nicht ausreichend für den starken adjuvanten Effekt der CpG-Motive, was die stärkere Th2 Gewichtung bei dieser Immunisierungstechnik erklärt.

Die Haut am Ohr der Maus soll eine höhere Dichte Antigen-präsentierender Zellen aufweisen [57] und wurde deswegen mit der meist zur Injektion verwendeten Bauchhaut verglichen.

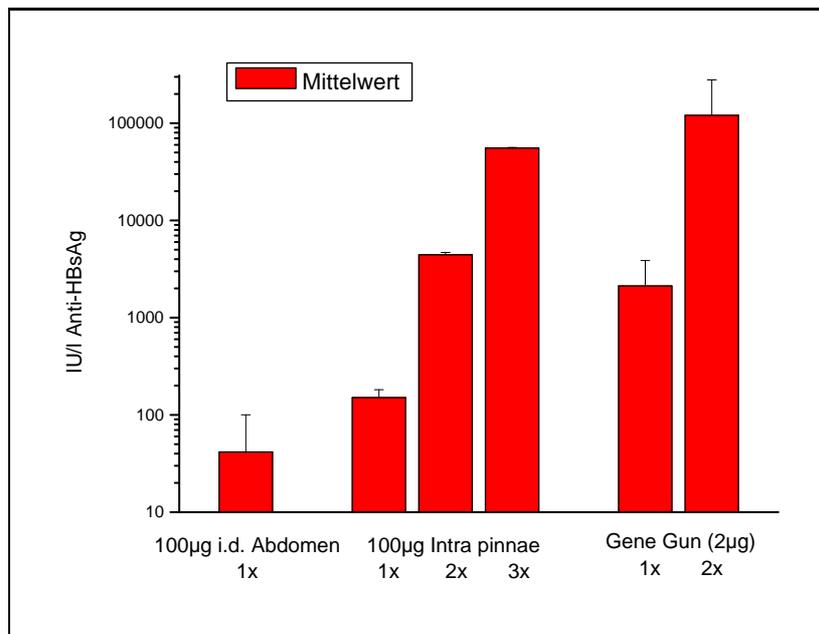


Abbildung 4.22: **Die Immunisierungstechnik beeinflusst den Anti-HBsAg-Titer dramatisch:** Links: intradermale Injektion in die Bauchhaut (zwei Injektionen zu je 50 μg). 3 Wochen nach Immunisierung 83 IU/l und kleiner 10 IU/l. (2 Tiere) Mitte: intra pinnae Injektion in die Ohrhaut (jedes Ohr 50 μg), Wiederholung nach 3 Wochen und erneut nach weiteren 4 Wochen. Es zeigt sich ein sehr gleichmäßiger Anstieg des Antikörper-Titers nach 3 Wochen, 10 Wochen und 15 Wochen (4 Tiere). Rechts: Ballistische Immunisierung mit Gene Gun (2 Schuss, je 1 μg), Wiederholung nach 3 Wochen. Der Antikörper-Titer schwankt bei der ballistischen Immunisierung nach 3 und nach 6 Wochen sehr stark: 106 IU/l bis 3280 IU/l, bzw. 7160 IU/l bis 342000 IU/l (4 Tiere).

Immunisiert wurde mit insgesamt 100 μg Plasmid auf zwei parallele Injektionen verteilt. Für die Versuche mit *gene gun* wurden insgesamt 2 μg Plasmid auf zwei Patronen verteilt geimpft. Nach 3 Wochen wurde die Impfung nach der selben Methode wiederholt.

Als Kontroll-Plasmid wurde pCMV-S von R. Whalen [45] verwendet, das schon in vielen Versuchen an Mäusen, Primaten und Menschen erfolgreich getestet wurde und deshalb hier als Positivkontrolle diente. Es codiert für HBsAg, das hochimmunogene Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus.

Der Impferfolg wurde mit einem standardisierten ELISA (Enzygnost AntiHBs II, Dade-Behring) verglichen (vgl. Abb. 4.22). Wie erwartet war der Anti-HBsAg-Titer in der eher Th2-lastigen *gene gun* Immunisierung im Durchschnitt deutlich höher als bei der intradermalen Injektion. Sehr auffällig waren aber die starken Schwankungsbreiten bei den vier Tieren: Die Titer der vier Tiere unterscheiden sich 3 Wochen nach der ersten Immunisierung um den Faktor 31, drei Wochen nach der 2. Immunisierung sogar um den Faktor 48. Dieses Ergebnis war sehr überraschend, obwohl bekannt ist, dass die Beschichtung der Patronen mit der DNA-Gold-Suspension nicht sehr gleichmäßig ist. Für die Immunisierungen wurden deswe-

gen ohnehin nur dem makroskopischen Anschein nach gut beschichtete Patronen verwendet, außerdem wurden immer zwei Schuss abgegeben. Für kleine Gruppengrößen bei den Immunisierungen ist dieses Verfahren wegen der großen Streuung also leider gänzlich ungeeignet.

Wesentlich gleichmäßigere Antikörpertiter zeigten sich bei *intra pinnae* Injektion in die Ohrhaut, obwohl die Injektion technisch deutlich anspruchsvoller ist: drei Wochen nach der 1. Impfung 108 bis 182 IU/ml bei 4 Tieren.

Durch die nötige Haarentfernung an der Bauchhaut ist die konventionelle *intradermale* Injektion zeitaufwendiger, wenn auch technisch weniger anspruchsvoll. Tatsächlich zeigt sich hier aber eine schwächere und dazu noch stärker schwankende Antikörperantwort.

In den weiteren Versuchen sollten die Mäuse deswegen intradermal ins Ohr immunisiert werden, um eine gleichmäßige und vergleichbare Antwort zu erzielen.

4.5 Tiermodell

Im Tiermodell sollte die Immunantwort nach Vakzinierung und die Wirkung auf das Tumorstadium untersucht werden. Mit den Ergebnissen aus dem Vorversuch mit HBsAg wurde ein Impfprotokoll festgelegt, und die serologische und zelluläre Antwort gegen den Idiotyp untersucht. Der wichtigste Parameter bleibt aber die Verhinderung oder Verlangsamung des Tumorstadiums. Zunächst sollte eine Auswahl der Konstrukte in einem protektiven Modell getestet werden. Zuvor musste die natürliche Wachstumskinetik der verwendeten Zelllinien untersucht werden.

4.5.1 Minimale Tumordosis von A20 und BCL1

Die Tumoren wurden durch intraperitoneale Injektion induziert: Die Vitalität der Zellen wurde mit Trypanblau-Färbung bestimmt. A20 Zellen wurden in Kultur gehalten und in der exponentiellen Wachstumsphase injiziert. BCL1-Zellen sind nur *in vivo* passagierbar: die Milz von präfinalen Tieren wurde zerkleinert, die Erythrozyten lysiert und die Tumorzellen vereinzelt und eingefroren. Für die Tumor-Injektionen wurden die Zellen frisch aufgetaut, gewaschen und mit Trypanblau analysiert. Den balb/c Weibchen (Bommice, Ry, Dänemark) wurden in Gruppen von 5 Tieren unterschiedliche Tumormengen in PBS intraperitoneal injiziert.

Nach der nicht-orthotopen Tumordinjektion ins Peritoneum entwickelten sich im A20-Modell lokale Tumoren entlang des Stichkanals und häufig bevorzugt peritoneales Wachstum mit Aszites. Im BCL1-Modell wurde vor allem Hepatosplenomegalie ohne lokales Wachstum beobachtet. Die Tiere wurden mindestens zweimal pro Woche auf Tumorstadium untersucht. Präfinale Tiere, mit einer Tumorstadiumgröße ab 2 cm oder in schlechtem Allgemeinzustand, wurde euthanasiert und sezziert. Im A20-Modell zeigte sich rasch ein eher gleichmäßiges Absterben, im Gegensatz zum BCL1-Modell, wo nur bei der höchsten Tumordosis alle der 5 Mäuse ei-

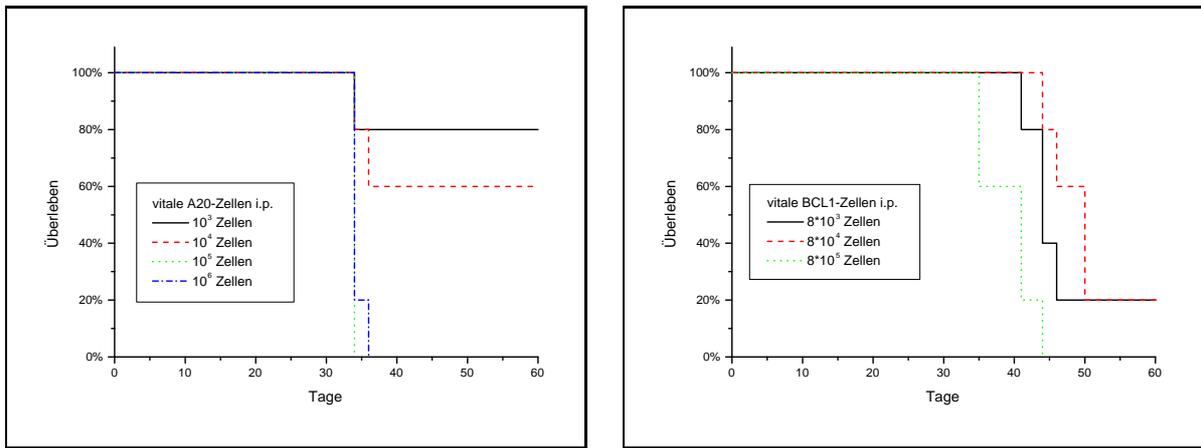


Abbildung 4.23: **Bestimmung der minimalen Tumordosis für A20 und BCL1:** In einem Vorversuch wurden Gruppen von je 5 Mäusen mit einer unterschiedlichen Tumordosis (vitale A20 bzw. BCL1 Zellen) intraperitoneal injiziert und dann zwei mal wöchentlich die Tumorentwicklung beobachtet. Präfinale Tiere (Tumorgöße über 2 cm) wurden euthanasiert. Ab 100000 A20-Zellen beobachtet man ein sehr gleichmäßiges Absterben.

ner Gruppe einen Tumor entwickelten (Abb. 4.23). Ein Grund könnte die höhere Vitalität der proliferierenden A20-Zellen im Vergleich zu den frisch aufgetauten BCL1-Zellen sein.

4.5.2 Protokoll zur protektiven Vakzinierung

Zunächst sollte nur eine kleine repräsentative Auswahl der verschiedenen Fusionskonstrukte im Tierversuch getestet werden: Dafür wurde die Idiotypfusionskonstrukte mit GM-CSF und single-chain-IL12 ausgewählt. Um einen Einfluss der Zytokin-Fusion beurteilen zu können, wurde als Kontrolle biologisch inaktives GM-CSF (Mutation E21K) als Fusionspartner eingesetzt. HBsAg diente erneut als Positivkontrolle für die korrekte Immunisierung, und später als Kontrolle für die Letalität der Tumordosis. Der Versuch wurde mit Gruppen zu je 8 Tieren durchgeführt. Als Lymphommodell wurde intraperitoneale Injektion von 200000 vitalen A20-Zellen verwendet (Ablauf wie in Abb. 4.24).

Die Impfung erfolgte zweimal im Abstand von 3 Wochen in Anästhesie mit Ketanest und Rompun: In beide Ohren wurden intradermal je 50 μg endotoxinfreie Plasmidpräparation in PBS (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) injiziert. Vor jeder Immunisierung wurde Blut entnommen. Knapp vier Wochen nach der zweiten DNA-Injektion wurde die Tumor-Immunität *in vivo* durch intraperitoneale Lymphom-Applikation getestet (200000 vitale proliferierende A20-Zellen in 300 μl PBS in logarithmischen Wachstum) und die Mäuse regelmäßig auf Anzeichen der Tumorentwicklung untersucht. Zwei Mäuse aus den jeder Gruppe wurden anstelle der Tumorgabe euthanasiert und splenektomiert. Die so gewonnenen Splenozyten (ca 10^8 aus einer Milz) wurden *in vitro* auf ihre spezifische Reaktivität gegen A20 hin untersucht.

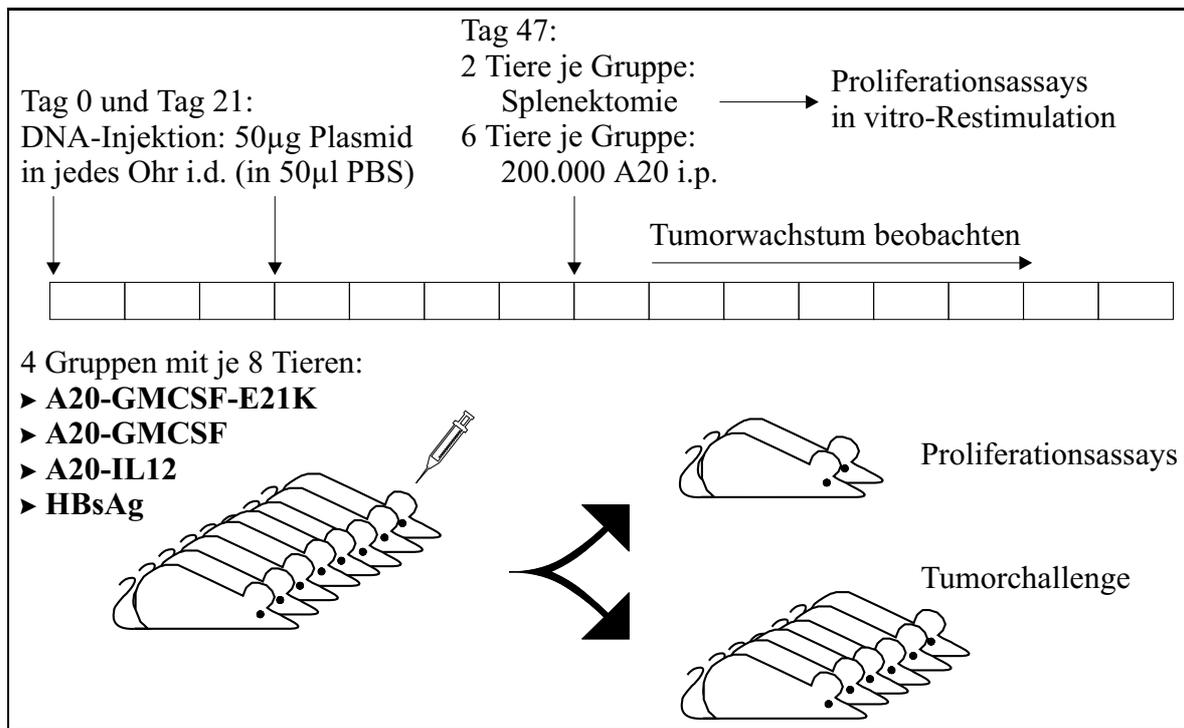


Abbildung 4.24: **Tierversuchsplan:** Vier Gruppen zu je 8 Tieren wurden zweimal *intra pinnae* immunisiert. 2 Tiere je Gruppe wurde am Tag 47 für Proliferationsassays splenektomiert, den anderen 6 Tieren wurden 200000 vitale A20-Zellen *i.p.* injiziert, um den Impfschutz zu beobachten.

4.5.3 Untersuchung der humoralen Immunantwort

Um die humorale Anti-Idiotyp-Antwort zu untersuchen, wurde jeder Maus vor jeder Immunisierung und der Tumorgabe Blut entnommen. Mit Hybridom-aufgereinigtem A20-Idiotyp (Ag20, R. Mocikat) sollten im Serum in einem ELISA die Anti-Idiotyp-Antikörper nachgewiesen werden. Die meisten gebräuchlichen Lymphom-Modelle tragen einen Idiotyp aus der IgM-Klasse auf der Oberfläche. Mit einem Detektionsantikörper gegen Maus-IgG kann so leicht die IgG-Antwort gegen den IgM Idiotyp gemessen werden. Das ist für A20 nicht möglich, weil der Idiotyp selbst ein Maus-IgG2a Molekül ist. Der Detektionsantikörper (Anti-Maus-IgG) wurde deswegen gegen murines IgG2a (gereinigter UPC 10 Idiotyp, Sigma) präadsorbiert, um die Kreuzreaktion mit A20-Idiotyp zu verhindern. Damit kann aber die IgG2a-Antwort als der dominierende Isotyp bei DNA-Vakzinierungen nicht gemessen werden. Nach Präadsorption konnte im ELISA mit Hybridom-gereinigtem Idiotyp bei relativ hohem Hintergrund in gepooltem Serum keine eindeutige spezifische Anti-Idiotyp-Reaktion nachgewiesen werden. Auch wenn die ELISA-Platten mit A20-Zellen (fixiert oder unfixiert) statt gereinigtem Idiotyp beschichtet wurden, ergab sich keine Besserung. Auch eine IgM-Antwort konnte bei hohem Hintergrund trotz IgG-präadsorbiertem Detektionsantikörper nicht nachgewiesen

werden.

Leider gelang es trotz mehrfacher Versuche nicht, Idiotyp-Fab-Fragmente durch Papain-Verdau herzustellen (ImmunoPuro Fab Preparation Kit, Pierce). Damit würde die Kreuzreaktion mit dem Idiotyp-Fc Teil verhindert, so dass alle Subklassen der Anti-Idiotyp-Antwort, insbesondere auch IgG2a gemessen werden könnten. Der leider nur in geringer Konzentration und Menge verfügbare gereinigte A20-Idiotyp blieb auch bei vorheriger ausgiebiger Dialyse gegen Reaktionspuffer unverdaut.

4.5.4 Proliferationsassay aus Milzzellen geimpfter Tiere

Um eine möglichst umfassende Aussage über die zelluläre Immunität nach der Impfung treffen zu können, wurde ein Auslesesystem verwendet, das sowohl die CD4 als auch die CD8 vermittelte T-Zellantwort erfasst ([98], Schema in Abb. 4.25). Splenozyten wurden nach Erythrozytenlyse in ein Proliferationsassay gegen bestrahlte A20 und das syngene Lymphom MPC11 eingesetzt. Als Marker für spezifische Antigen-Erkennung diente die GM-CSF Sekretion, die im ELISA gemessen wurde und sehr gut mit ³H-Thymidin-Einbaustudien korreliert (umfassende Untersuchungen von K. Kronenberger und R. Mocikat, GSF). Um Idiotyp-spezifische Zell-Population anzureichern und weiter zu stimulieren, wurden die Splenozyten *in vitro* insgesamt dreimal mit bestrahlten A20-Zellen restimuliert (Effektor/Target-Verhältnis von 40/1 für die erste Restimulation, 20/1 für die folgenden Restimulationen). Ab der zweiten Restimulation mussten frische Antigen-präsentierende Zellen einer naiven Maus zugegeben (bestrahlt mit 3000 rad) werden.

So wurden aus jeder Versuchsgruppe zwei Mäuse untersucht: Die A20-spezifische GM-CSF-Sekretion steigt für die Maus 2 aus der A20-GMCSF-E21K Gruppe mit jeder *in vitro* Restimulation an (Abb. 4.26), während mit den unstimulierten Splenozyten dieser Maus noch kein Effekt sichtbar war. Nach drei A20-Restimulationen reagieren auch die Kontrollzellen der HBsAg immunisierten Maus spezifisch auf A20. Nach ca. 9 Restimulationen ist in Proliferationsassays kein Unterschied zwischen Splenozyten naiver Mäuse und denen *in vivo* immunisierter Mäuse mehr zu sehen (Untersuchung K. Kronenberg/R. Mocikat). Daten ab der dritten Restimulation sind kritisch zu bewerten. Es muss also davon ausgegangen werden, dass von den untersuchten Mäusen nur Maus 2 aus der A20-GMCSF-E21K Gruppe *in vivo* eine effektive zelluläre Antwort durch die Impfung entwickelt hat.

In Abbildung 4.27 sind die Rohdaten der GM-CSF-ELISA nach den Proliferationsassays für diese Maus nach 1. und 3. Restimulation dargestellt: Die stimulierten Splenozyten reagieren auf MPC11 nicht mehr als auf Medium, die relative Antwort gegen A20 steigt deutlich an (vgl. Abb. 4.26). Die anderen untersuchten Mäuse zeigten keine vergleichbare Antwort.

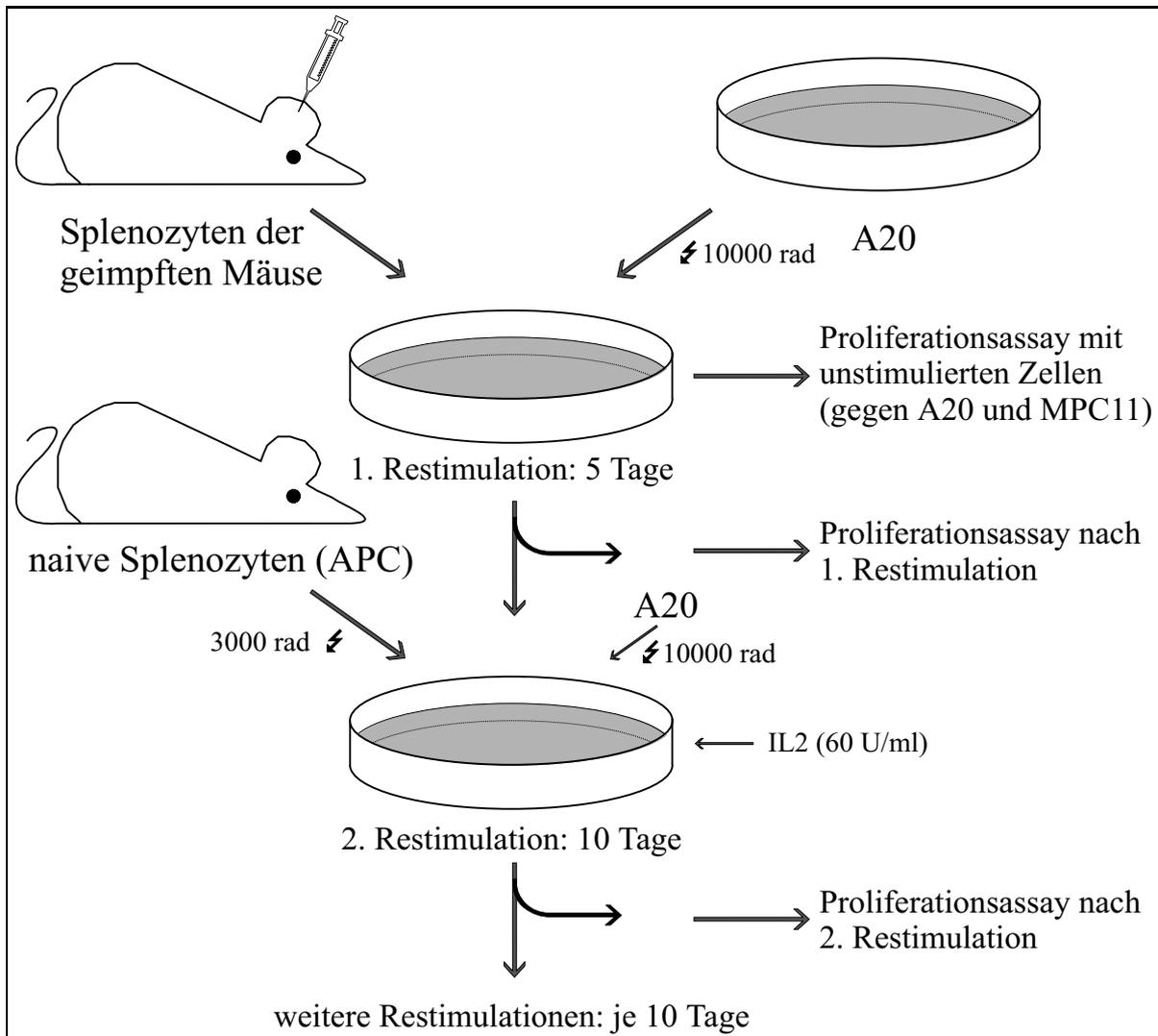


Abbildung 4.25: **Restimulations-Schema:** Splenozyten wurden bis zu dreimal mit frischen bestrahlten A20-Zellen inkubiert, um die A20-spezifischen T-Zellen anzureichern. Die erste Restimulation erfolgte für fünf Tage mit einem Effektor-Target-Verhältnis von 40/1, alle weiteren im Verhältnis 20/1 mit zusätzlicher IL2-Gabe. Ab der 2. Restimulation müssen frische Antigen-präsentierende Zellen einer naiven Maus zugegeben werden. Danach wurde die spezifische Proliferation der restimulierten Zellen gegen A20- und MPC11-Zellen analysiert. Gemessen wurde dabei die GM-CSF-Sekretion als Maß für die Antigen-Erkennung. Eine genaue Beschreibung findet sich im Methodenteil.

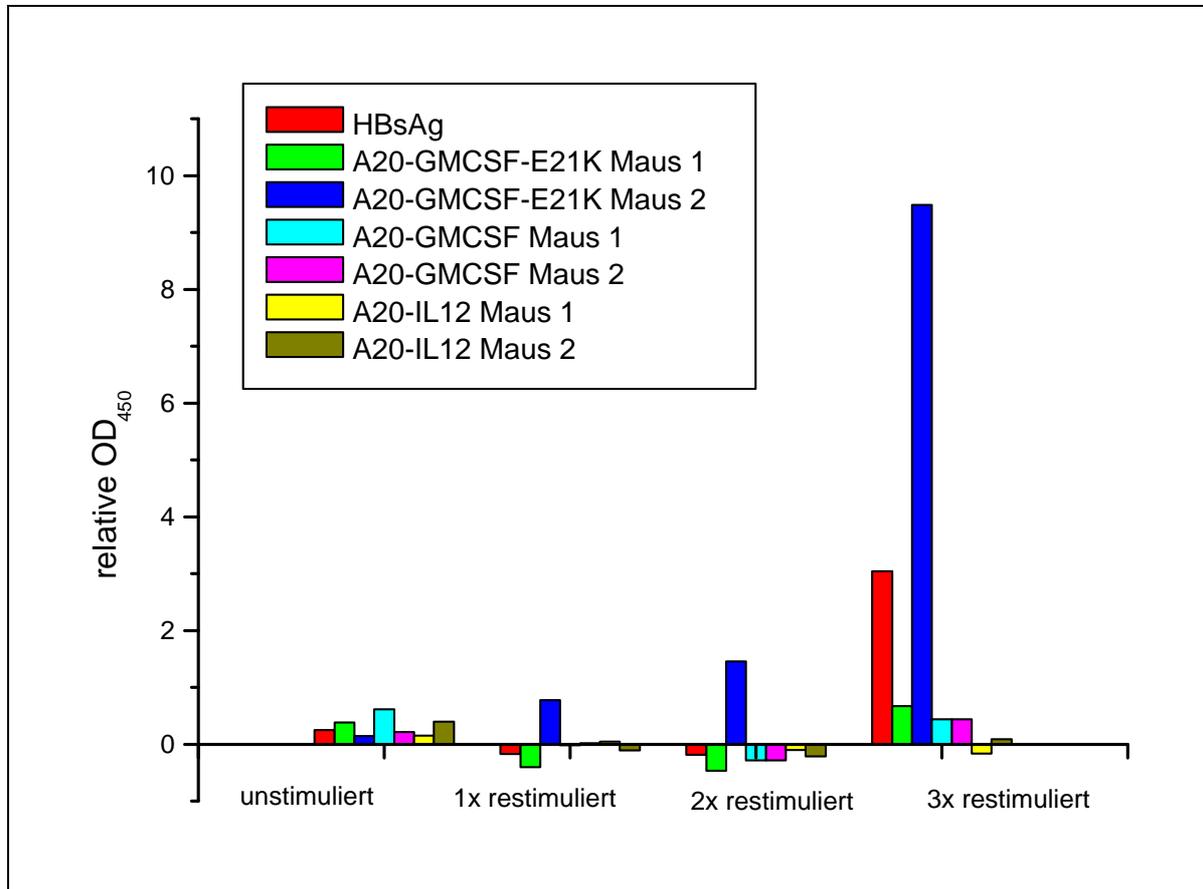


Abbildung 4.26: **Übersicht über den Effekt der *in vitro* Restimulationen:** Als Maß für die A20-spezifische Proliferation, ist das Verhältnis der relativen OD-Zunahme im GM-CSF-ELISA bei Proliferation gegen A20 im Vergleich zum syngenem Lymphom MPC11 dargestellt: $(OD_{450}(A20) - OD_{450}(MPC11)) / OD_{450}(MPC11)$ für 100000 Effektorzellen und 50000 Targetzellen. Maus 2 aus der A20-GMCSF-E21K Gruppe zeigt deutliche spezifische Proliferation gegen A20, die durch *in vitro*-Restimulation mit A20 ansteigt. Nach drei Restimulationen mit A20 zeigt allerdings auch die HBsAg immunisierte Maus eine Antwort gegen A20.

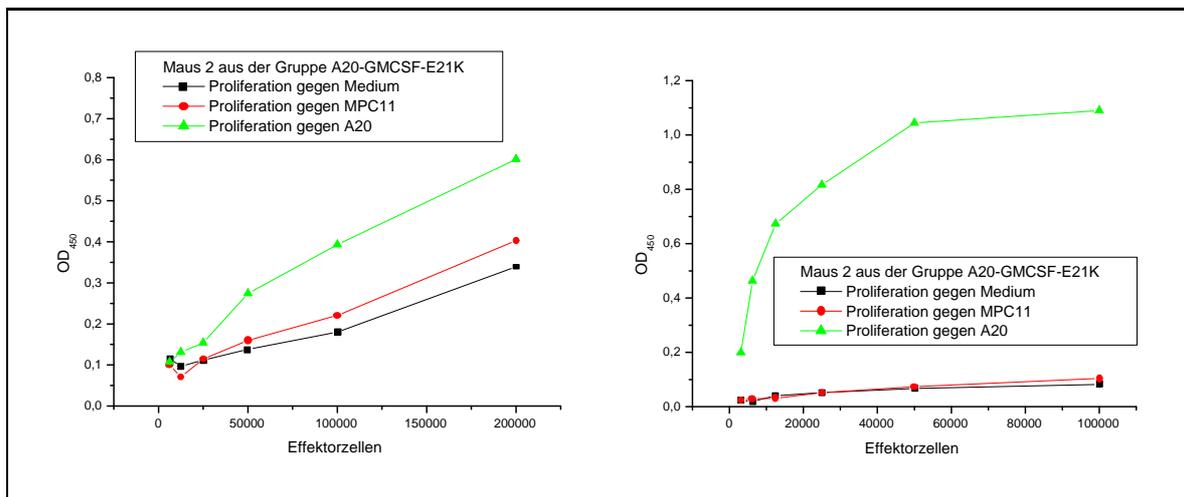


Abbildung 4.27: **Rohdaten des Proliferationsassays nach Restimulation mit A20:** OD₄₅₀ des unverdünnten Kulturüberstandes der Proliferationsassays im GM-CSF Sandwich-ELISA. Mittelung über drei Parallelansätze. Nach einer Restimulation (links) zeigt sich schon eine deutliche Antwort gegen A20 im Vergleich zu MPC11. Die Antigen-spezifische GM-CSF Sekretion wird nach der dritten Restimulation deutlich stärker (rechts). Um unterschiedliche Experimente vergleichen zu können, wurde das OD-Verhältnis A20 zu MPC11 als Maß für die A20-spezifische Antwort bestimmt (vgl. Abb. 4.26).

4.5.5 HBsAg induziert eine starke zelluläre Immunantwort

Die Splenozyten der HBsAg immunisierten Mäuse wurden in Proliferationsassays untersucht. Als Targetzellen wurden 3T3 Fibroblasten verwendet, die transient mit HBsAg transfiziert waren. Bereits die unstimulierten Splenozyten einer dreimal geimpften Maus zeigen starke GM-CSF Sekretion bei Kontakt mit HBsAg transfizierten Targetzellen (vgl. Abb. 4.28). Durch Restimulation *in vitro* konnte die Antwort noch gesteigert werden.

Hier zeigt sich eine dramatische Antwort schon mit unstimulierten Splenozyten. Das Impfschema hat hier sehr gut funktioniert.

4.5.6 Protektiver Effekt

Sechs Tieren aus jeder Gruppe wurden knapp 4 Wochen nach der 2. Impfung je 200000 vitale A20-Zellen in der Wachstumsphase intraperitoneal gespritzt. Das Tumorwachstum wurde alle zwei Tage untersucht, präfinale Tiere wurden euthanasiert. Leider konnte in den Sechsergruppen keine Lebensverlängerung der geimpften Tiere nachgewiesen werden. Gerade die A20-GM-CSF-E21K geimpfte Gruppe mit der besten Antwort in den Proliferationsassays zeigte das rascheste Absterben (vgl. Abb. 4.29).

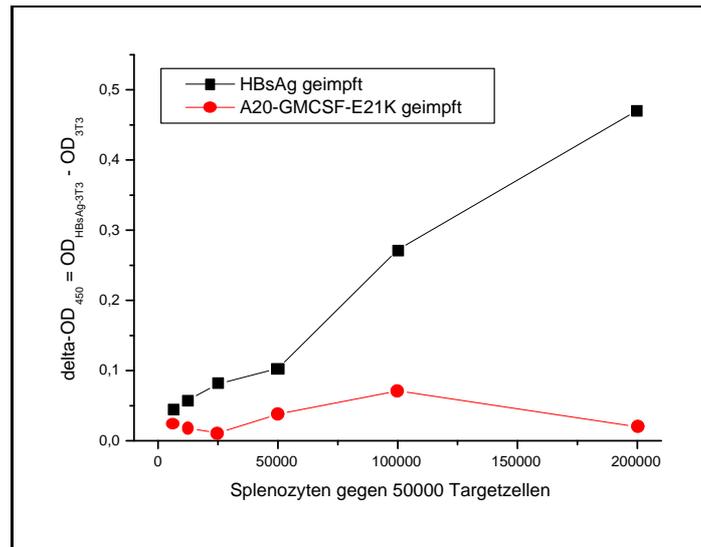


Abbildung 4.28: **HBsAg-Impfung führt zu einer starken zellulären Immunantwort:** Nach dreimaliger Impfung (i.d.) mit pCMV-S zeigen Splenozyten eine deutlich spezifische Antwort gegen HBsAg transfizierte balb/c 3T3 Fibroblasten. Dargestellt ist die HBsAg-spezifische GM-CSF-Sekretion im Vergleich zu untransfizierten Fibroblasten als Differenz der beiden OD-Werte. Auch ohne *in vitro* Restimulation zeigt sich bereits eine starke Antwort.

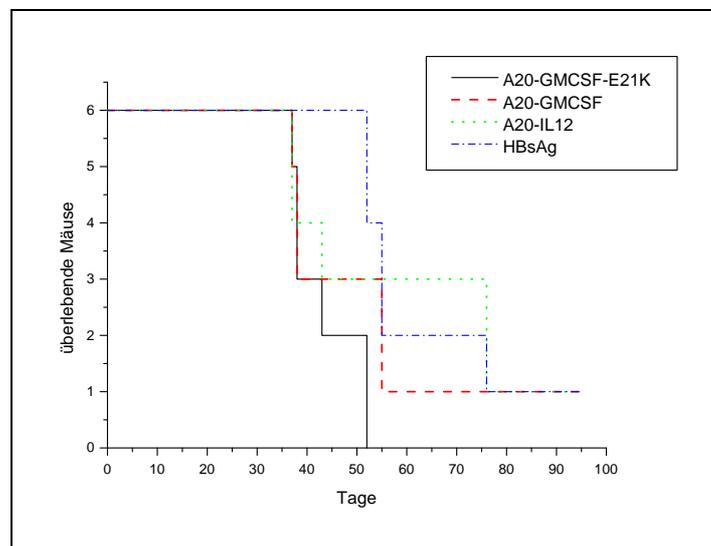


Abbildung 4.29: **Überlebenskurven für den 1. Tierversuch:** Nach zweimaliger DNA-Immunisierung wurden die Tiere mit einer tumorigenen Dosis von 200000 vitalen A20-Zellen i.p. inokuliert (Protokoll vgl. Abb. 4.24). Die Tiere wurden täglich auf Tumorstadium untersucht, und im präfinalen Stadium euthanasiert. Leider zeigte sich keine signifikante Lebensverlängerung in einer der Therapiegruppen.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die Immunogenität des Idiotyps von B-Zelllymphomen zu steigern. Das Oberflächenimmunglobulin des Tumorklons zeichnet sich durch eine hohe Tumor- und Patienten-Spezifität aus, ist aber nur sehr schwach immunogen. Fusionskonstrukte mit Zytokinen und starken Antigenen sollten die Immunogenität steigern und gezielt modulieren. DNA-Vakzinen bieten die Möglichkeit, technisch relativ einfach verschiedenste Fusionsproteine *in vivo* zu testen. Entsprechend gliedert sich diese Arbeit in drei große Teile: Zunächst wurden die Tumorantigene und Fusionskonstrukte aus den beiden Lymphommodellen BCL1 und A20 kloniert. Im zweiten Teil wurden die Konstrukte ausgiebig *in vitro* getestet, bevor sie im letzten Teil im Tierversuch erprobt wurden.

5.1 Klonierung der Lymphom-Idiotypen, DNA-Vakzinierung

5.1.1 Klonierung von Lymphom scFv mit RACE-PCR

Der Patienten- und Tumor-spezifische Teil des Idiotyps ist die variable Region von schwerer und leichter Kette (VH bzw. VL). Die konstante Kette enthält (im autologen System) keine weiteren immunologisch relevanten Epitope. Ein Fusionprotein (scFv) aus den beiden variablen Regionen und einem kurzen Linkerpeptid behält die antigenbindende Eigenschaft bei [165, 83]. Als Monomere sind scFv leichter herzustellen als dimere Antikörper, weil nur eine Expressionskassette benötigt wird. Deswegen wurden VH und VL cDNA mit einer zweistufigen PCR zu einem single-chain Fragment (scFv) mit einem flexiblen Glycin-Serin-Linker fusioniert [83]. Entscheidend bei dieser PCR-Methode war der Einsatz HPLC-gereinigter Primer: Nichtaufgereinigte Primer führten fast immer zu Sequenzfehlern in der GC-reichen Linkerregion. Nach HPLC-Reinigung waren mehr als 50% der klonierten PCR-Produkte korrekt (mit proofreading-polymerase). Nach dem gleichen Prinzip wurde aus dem heterodimeren Interleukin 12 ein biologisch aktives single-chain IL12 kloniert (siehe unten).

Obwohl die meisten Anti-Idiotyp-Antikörper gegen die schwere Kette gerichtet sind, vermittelt VH-Immunisierung im BCL1-Modell keine Protektion [13]. Ein Grund dürfte die schlechte Expression der VH-Domänen sein, die ohne leichte Kette nicht stabil sind. Humane VH-Regionen rufen in Mäusen dagegen als DNA-Vakzine (dreimal 20 μ g DNA i.d.) auch für sich alleine eine Antikörperreaktion und CTL-Reaktion hervor [1].

Die PCR erlaubt in vielen Fällen die einfache Klonierung der rearrangierten variablen Regionen von Immunglobulinen. Beim Standardverfahren werden Primer in den relativ konser-

vierten Framework-Regionen [87, 70, 129, 44, 48] oder der Signalsequenz [106] gewählt, die jeweils verschiedene Familien (Kabat Datenbank <http://immuno.bme.nwu.edu/> bzw. [85]) von Immunglobulinen binden können. Die Erfolgsrate liegt bei etwa 80%. Während der Progression von B-Zelltumoren kommt es ähnlich der Affinitätsreifung häufig zu Hypermutationen in den variablen Bereichen [112], was die Bindung der PCR-Primer und damit die Amplifikation verhindern kann. Der BCL1-Sequenz ließ sich mit bereits beschriebenen Primern aus cDNA amplifizieren [69], es zeigten sich aber deutliche Unterschiede in der schweren Kette (in den Framework-Regionen und den CDRs) zwischen dem *in vivo* passagierten Klon, der an *in vitro* Bedingungen adaptierten Zelllinie und der publizierten Sequenz. Das zeigt, wie wichtig es ist, den Idiotyp des verwendeten Zellklons vor einer Vakzinierung erneut zu sequenzieren. Bereits geringe Mutationen in der Aminosäure-Sequenz können die Immunantwort verhindern [29].

Der stark hypermutierte A20-Idiotyp ließ sich nicht mit bekannten Familienprimern amplifizieren. Die schwere Kette wurde von Doenecke *et al.*[48] erfolgreich mit 5'-RACE-PCR kloniert. Mit einem adaptierten Verfahren konnte hier nun auch die leichte Kette kloniert werden: Durch Wahl des 3'-Primers in der konservierten konstanten Kette ließ sich das 5'-Ende der cDNA amplifizieren, indem mit TdT ein Poly-Cytosin-Anker an das 5'-Ende angehängt wurde, der als zweite Primerbindungsstelle dient. Wie erwartet lassen sich weder die schwere noch die leichte Kette in eine der bekannten Familien (<http://immuno.bme.nwu.edu/>) einteilen, obwohl beide eindeutig die konservierte CDR-Struktur der Immunglobuline aufweisen.

Mit dieser technisch deutlich anspruchsvolleren Methode ließen sich bei [48] tatsächlich alle untersuchten VH-Regionen amplifizieren. Außerdem werden keine Mutationen durch die Primer in die Framework-Regionen eingeführt. Deren Sequenz beeinflusst nämlich die Antigenbindung und damit die Struktur [87]. Die Bedeutung dieser Regionen wird durch die Identifikation von gehäuften CTL-Epitopen in Framework-Regionen unterstrichen [180]. Ein Nachteil ist, dass die Methode nicht auf genomische DNA angewendet werden kann, so dass fixiertes Biopsiematerial und Knochenmarksabstriche als Template nicht in Frage kommen.

5.1.2 Mechanismen der DNA-Vakzinierung

Um rational eine optimale Immunisierungsstrategie entwickeln zu können, ist es erstens nötig zu verstehen, welche Effektorarme des Immunsystems alleine oder in Kombination den besten Schutz vermitteln, und zweitens mit welchem Immunisierungsverfahren genau diese Antwort erzeugt wird. Beides ist für DNA-Immunisierungen und andere potentiell hochwirksame moderne Immunisierungsmethoden zur Lymphomtherapie zur Zeit nur begrenzt möglich:

In unzähligen Veröffentlichungen wurde in zahllosen Krankheitsmodellen in verschiedenen Tierspezies und auch in ersten klinischen Studien belegt, dass durch intramuskuläre und intradermale Injektion von Plasmid-DNA sowohl humorale als auch CD4 und CD8 vermittelte zelluläre Antworten ausgelöst werden. Die *in vivo* transfizierten Zellen im Muskelgewebe

oder der Haut exprimieren das Plasmid-codierte Antigen. B-Zellen erkennen wie bei Proteinimpfung das Antigen und bilden Antikörper. Überraschend ist die geringe Menge nötigen Antigens: Wenige Nanogram exprimiertes Protein ersetzen Mikrogramm-Mengen injiziertes Antigen. Der entscheidende Unterschied (besonders für die zelluläre Antwort) ist die endogene Expression des codierten Antigens: es unterliegt damit wie alle körpereigenen oder viralen Proteine der MHC-Präsentation auf Klasse I bzw. Klasse II Molekülen.

Den meisten transfizierten Zellen (Myozyten bzw. Keratinozyten) fehlen allerdings kostimulatorische Moleküle, so dass theoretisch sogar Antigen-spezifische Toleranz resultieren könnte. Aus Knochenmarks-chimären Mäusen [42, 47, 84] weiß man, dass APC mit Ursprung im Knochenmark und nicht die Myozyten/Keratinozyten für die CTL-Induktion verantwortlich sind, obwohl nur etwa 0.4% der transfizierten Zellen dendritische Zellen sind [28]. Tatsächlich kann schon 10 Minuten nach DNA-Injektion in den Muskel die Injektionsstelle rezeziert werden, ohne dass die Immunantwort dadurch wesentlich abgeschwächt wird [179]¹. Bei intradermaler Injektion muss die Haut dagegen mindestens 24 Stunden *in situ* verbleiben, sonst sinkt die Antwort bzw. die Responder-Rate dramatisch. Die volle Antwort entwickelt sich erst nach 72 Stunden *in situ*. Umgekehrt kann bis 24 Stunden nach epidermaler Impfung mit Gene Gun die Haut mit voller Impfwirkung auf ein anderes Tier übertragen werden [94].

Gerade in den kleinen Muskelbündeln der Maus scheinen hydrostatische Effekte eine bedeutende Rolle zu spielen, wie man aus Experimente mit Rhodamine-markierter DNA weiß [52]: Wird die gleiche Menge DNA statt in 50 μl in nur 5 μl Volumen in den M. tibialis anterior gespritzt, sinkt die Expression um 80% und der Antikörper-Titer auf ein 1/70. Der hydrostatische Druck presst die DNA in Lymphgefäße². Nach 24 Stunden findet man das markierte Plasmid in Lysosomen mononukleärer Zellen, nicht aber im Kern. Anscheinend wird nur ein kleiner Teil der APC direkt transfiziert, die meisten werden nur durch die CpG-Motive aktiviert und empfänglich für das sogenannte **cross-priming**.

Darin besteht die rationale Basis der Untersuchung von Zytokinen als Adjuvantien: Die Transfektion von APC lässt sich am besten durch methodische Verfeinerung und vor allem durch virale Vektorsysteme beeinflussen. Das Phänomen Crosspriming ist sicher abhängig vom lokalen Zytokinmilieu. Die Langerhans Zellen haben einen Anteil von 5% und stehen in einem engen Wechselspiel zu den Keratinozyten (GM-CSF, IL1, TNF- α). Deswegen wurde in dieser Arbeit die Haut als Injektionsort untersucht.

¹Umgekehrt erzeugen auch *ex vivo* stabil mit einem Antigen transfi zierte Muskelzellen Immunität (vgl. [40]).

²Das dürfte auch der Grund sein, warum i.m. DNA-Impfung bei größeren Tieren und Menschen weniger effizient ist. Elektroporation *in vivo* verbessert die Genexpression durch Elektropermeabilisation und Elektrotansfer um den Faktor 18, den Antikörper Titer um den Faktor 6, und reduziert auch die sonst recht großen inter-individuellen Schwankungen [126]

5.2 Expression der Fusionskonstrukte in vitro

5.2.1 Zytokine als Immunmodulatoren

Adjuvantien sollen die Immunantwort gegen das eigentliche Impfantigen steigern und in eine günstige Richtung lenken. Im Vergleich zu den teilweise seit Jahrzehnten benutzten Adjuvansformulierungen versprechen Zytokine eine feinere Regulation und stärkere Effekte. Lokale [72] und systemische [138] Effekte nach Injektion von Zytokin cDNA sind beschrieben. Für Immunisierungen wurde meist Antigen und Zytokin getrennt exprimiert (systematischer Vergleich bei [89]), Fusion mit dem Antigen [122] ist gerade bei schwachen Antigenen wirkungsentscheidend. In beiden Studien wurde allerdings nur die Immunantwort charakterisiert, ohne den Effekt auf die Protektion in einem Infektions- oder Tumormodell zu vergleichen. Außerdem wurden starke körperfremde Antigene benutzt (gag/pol bzw. Ovalbumin): Bellone *et al.* [11] konnten gegen ein endogenes Melanom-Antigen nur mit gepulsten DC erfolgreich impfen, während im gleichen Ansatz für Ovalbumin auch andere Strategien zur Tumor-Protektion führten. Auch für Idiotyp-Vakzinen gibt es Studien, wo jeweils einzelne Zytokine zur DNA-Vakzinierung untersucht worden sind (Tabelle 5.2).

Mit der hier verwendeten Klonierungsstrategie können nun die verschiedensten Zytokine systematisch zu Idiotyp-Vakzinierung gegen die beiden Tumoren A20 und BCL1 getestet werden. Die Ergebnisse sollten auch auf andere schwache Tumorantigene übertragbar sein. Der optimale Effektormechanismus gegen B-Zell-Lymphome ist aber immer noch umstritten. In verschiedenen Ansätzen waren Antikörper [125, 24, 61], CD4 positive T-Zellen [24, 101, 76, 108] oder CD8 positive zytotoxische T-Zellen [30, 31, 32, 27, 131] entscheidend. Deswegen wurden für die Fusionsproteine Zytokine ausgewählt, um für jeden Effektorarm zumindest eine gute Stimulationsmöglichkeit untersuchen zu können.

Als klassisches Th1-Zytokin hatte **IL12** in verschiedenen Tumormodellen dramatische Effekte auf die CTL-Antwort [89]. Zur Idiotyp-Vakzinierung wurde IL12 bisher gar nicht untersucht. Für andere Antigene sind bicistronisch exprimierte Fusionskonstrukte mit IL12 beschrieben (z.B. [122]), das hier verwendete single-chain IL12 wird aber deutlich höher exprimiert: Die beiden Untereinheiten p40 und p35 des Heterodimers IL12 wurden wie bei den Id-scFv mit einer (Gly₄Ser)₃-Linkersequenz zu einem funktionellen Protein fusioniert [115]. Dieses Fusionskonstrukt war der bicistronischen Expression deutlich überlegen.

Gegenpol ist **IL4** als stärkstes Th2-Zytokin, das für Proteinvakzine als Fusionsprotein mit dem Idiotyp ähnlich effektiv war wie GM-CSF [36]. Die IL4-Bioaktivität sank durch die Fusion allerdings deutlich (Faktor 100 für BCL1, noch 5 mal schlechter für A20).

GM-CSF dominiert seit dem Vergleich von Dranoff *et al.* [50] die zellulären Tumorstoffe. Es führt zu einer Stimulation der APC und wird auch *in vivo* genau wie Flt3-Ligand zur Generierung von DC verwendet. GM-CSF erhöht bei Koinjektion die Wirksamkeit von Id-

KLH deutlich [104]. GM-CSF verstärkt vor allem die zelluläre Antwort gegen den Idiotyp (überwiegend Th2). Gekoppelt an die schwere Kette des Idiotyps (38C13) übertrifft GM-CSF die protektive Wirkung von KLH [174] und beschleunigt die Antikörperantwort³. Fusionsproteine aus scFv und GM-CSF waren im 38C13-Modell nur als Proteinvakzine erfolgreich, als DNA-Vakzine dagegen wirkungslos [64]. Diese überraschende Diskrepanz könnte durch gestörte Faltung bedingt sein: Die bakteriell exprimierten Fusionsproteine wurden über eine anti-GM-CSF Affinitätssäule aufgereinigt und sind damit biologisch aktiv [64]. Die biologische Aktivität der Fusionskonstrukte mit A20-Id und BCL-Id konnte hier aber nachgewiesen werden, und korrelierte mit den Ergebnissen in ELISA und Western Blot. Tatsächlich zeigt sogar das Fusionsprotein aus A20-Id, Tetanus Fragment C und GM-CSF biologische Aktivität auf FDCP-1 Zellen.

Der hämatopoetische Wachstumsfaktor **Flt-3 Ligand** [118] führt über eine dramatische DC-Expansion *in vivo* teilweise sogar zur Regression von etablierten Fibrosarkomen [119]. Flt-3 erhöht die Th1-assoziierte IgG2a-Fraktion bei Proteinimmunisierung, während GM-CSF vor allem die Th2-abhängige IgG1 Fraktion erhöht [135]. Vor kurzem publiziert wurde ein Fusionskonstrukt mit E7 aus HPV-16 [81]: alle Tiere stießen den Tumor nach protektiver Immunisierung ab, im therapeutischen Modell kam es CD8-abhängig zu einer deutlichen Reduktion der pulmonalen Metastasen⁴. Muriner Flt3-Ligand konnte aus dem *in vitro* passagierbaren Subklon von BCL1 mit Hilfe von RT-PCR kloniert werden. Für die Fusionskonstrukte wurde die Transmembran-Domäne entfernt. Die Bioaktivität des Id-Fusionskonstrukts konnte nicht nachgewiesen werden, weil keine Zytokin-abhängige Zelllinie zur Verfügung stand.

Das **IL1 β** Nonapeptid (VQGEESNDK) war fusioniert mit dem 38C13 Idiotyp als Protein- und DNA-Vakzine erfolgreich [64]. Dabei war kein weiteres Adjuvans (etwa ein humaner Fc-Teil nötig). Für IL1 β stand weder ein Bioassay noch Antikörper für ELISA oder Western blot zur Verfügung. Die Expression konnte nur durch ³⁵S-Labeling nachgewiesen werden, von einer korrekten Faltung/Aktivität kann aber bei nur neun Aminosäuren wohl ausgegangen werden.

Alle Zytokine-Effekte zeigen sich am stärksten kurz nach der Immunisierung, und verlieren sich mit der Zeit teilweise (vgl. [122]). Gerade diese Anfangsphase ist sicher für therapeutische Vakzinierung entscheidend, um den Krankheitsprozess rasch einzudämmen und die eventuell bestehende Toleranz zu durchbrechen.

³So entsteht ein Dimer, das höhere biologische Aktivität als das physiologische Monomer aufweist

⁴Erstaunlicherweise wurde trotz Immunisierung mit Gene-Gun keine humorale Antwort beobachtet. Die Autoren nehmen deutlich gesteigertes Cross-priming als Ursache an, das sonst bei Gene Gun eher untergeordnete Bedeutung hat [134, 3].

scFv	BCL1 [69]	Antikörper gegen Id
scFv scFv + pGMCSF	xenogen [168] xenogen [168]	erhöhter Ak-Titer, Anti-Id-Proliferation, Protektion in Mausmodell nicht gezeigt
scFv + pIL2	xenogen [168]	
Id-HuC Id-HuC-GMCSF	38C13,BCL1 [171] 38C13 [171]	
scFv scFv-FragC	A31,5T33 [92] A31,5T33 [92]	nach 3. Immunisierung Anti-5T33 Titer 3x i.m.; CTL nur gegen FragC, Th2 ↑, 90% Protektion gegen A31 und 70% gegen Oberflächen-Id-negatives 5T33
scFv-FragC	Patienten [166]	deutliche Ak Induktion in 3 von 3 Patienten
scFv scFv-GMCSF scFv-IL1 β	38C13 [64] 38C13 [64] 38C13 [64]	schwache Ak, keine Protektion nach 3 Injektion keine Ak, keine Protektion bei 80% schwache Ak, 40% Protektion
scFv-IP10 scFv-MCP3	38C13,A20 [15] 38C13,A20 [15]	keine Protektion nach dreimal Gene Gun, für A20 deutlich besser als Id-KLH, für 38C13 ähnlicher Ak-Titer wie bei IP10, trotzdem hier 40% Protektion
VH-CH3 scFv-CH3	BCL1[13] BCL1[13]	keine Protektion 70% Protektion bei hoher Tumordosis (10^6), 4 mal $100\mu\text{g}$ i.d. alle 2 Wochen
scFv-CH3+pGMCSF	BCL1[13]	100% Protektion bei Koinjektion
VH	xenogen [1]	$3 \times 20\mu\text{g}$ i.d. induziert T-Zellantwort
VL +/- pIL2	xenogen [185]	IL2 steigert Ak-Antwort gegen humane leichte Ketten

Tabelle 5.2: **DNA-Vakzinen gegen Idiotyp in der Literatur:** Abkürzungen: HuC=humaner Fc-Teil, CH3=Fusion mit einer einzelnen CH3 Domäne eines humanen Fc-Teils

5.2.2 Zytokine stabilisieren die Idiotyp-scFv

Die beschriebenen Konstrukte wurden transient in HEK 293 Zellen exprimiert und mit ELISA, Western-Blot und Bioassays analysiert. Für die drei Zytokine GM-CSF, IL4 und IL12 standen gute Antikörper zur Verfügung, die Fusionsproteine mit A20 und BCL1 waren sehr gut nachweisbar. Allerdings war die Expression erheblich schwächer als die unfusionierter Zytokine (vgl. [36]). Andererseits stabilisieren die Zytokine die Id-scFv deutlich. Die Fusionsproteine mit dem BCL1-Idiotyp wurden etwa um den Faktor 2-4 besser exprimiert als mit A20, ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei bakterieller Expression (T. Röhnisch). Optimierungsversuche in der Kozak-Sequenz und mit einem verlängerten Linkpeptid blieben erfolglos. Für die Antikörper-Antwort gegen den Idiotyp ist dessen korrekte Faltung entscheidend [151]: als guter Hinweis kann die Bindung der Anti-Idiotyp-Antikörper im ELISA gewertet werden, die anscheinend nur natives Protein erkennen.

Der Expressionsnachweis der unfusionierten Idiotyp scFv gestaltete sich deutlich schwieriger: Mit beiden Idiotyp-Antikörpern 6C10 (für A20) und MC10 (für BCL1) konnte kein Anti-Idiotyp-Westernblot etabliert werden, obwohl verschiedene Blot-Membranen, Transferpuffer und Blocking-Bedingungen systematisch getestet wurden. Auch mit einem C-terminalen *myc*/His-Tag gelang der Expressionsnachweis im Kulturüberstand nicht. Für scFv-A20 konnte auch kein kompetitiver ELISA mit gereinigtem A20-Idiotyp (aus Hybridomüberstand) etabliert werden. Erst mit *in vivo* Einbau von S35-markiertem Methionin/Cystein konnte über Autoradiographie scFv im Zelllysatsat nachgewiesen werden, nicht dagegen die Sekretion in den Überstand. Tunicamycin-Behandlung belegte die Glykosylierung des scFv, ein Indiz für korrekte Protein-Prozessierung auf dem Weg zur Sekretion. Vermutlich kommt es zumindest *in vitro* zu raschem extrazellulären Abbau. Der Proteasomenhemmer LLnL hatte keinen Effekt.

Um den rein stabilisierenden Effekt und die immunologische Zytokin-Aktivität getrennt untersuchen zu können, wurden Fusionsproteine mit funktionell inaktivem GM-CSF (E21K Mutante, vgl. [73]) kloniert. Das inaktive Protein war stabil im Zellkulturüberstand nachweisbar. Hakim *et al.* benutzten als Kontrolle das nicht-kreuzreagierende humane GM-CSF, Benvenuti *et al.* [13] zeigten die Sekretion des scFv fusioniert mit einer einzelnen CH3-Domäne. Ein besserer Impfschutz allein durch Stabilisierung des Idiotyp-scFv würde für die überwiegende Bedeutung des cross-priming sprechen. Andererseits wurde bei verschiedenen Antigenen schon erfolgreich die Fusion mit Ubiquitin ausgenutzt, um den proteasomalen Abbau des Antigen zu steigern, so dass es vermehrt über MHC I präsentiert wird [141].

In vitro Labeling erlaubte auch den Expressionsnachweis der IL1 β Fusionsproteine und der A20-FragC Fusion. Die Fusion aus A20, GM-CSF und Fragment C zeigte hier im Vergleich zu den ELISA-Daten eine überraschend gute Expression (wenn auch mit vielen Nebenbanden).

5.2.3 Molekulare Adjuvantien

Adjuvantien sind fester Bestandteil von Impfstoffen (Übersicht in [164]). Mit einer Vielzahl bekannter Formulierungen kann die Richtung der Immunantwort gezielt beeinflusst werden (humoral, oder zellulär, Richtung Th1, Th2 oder CTL). Für den Routineeinsatz am Menschen sind von der FDA aber nur Alum (Mineralsalz) und MF59 (Lipidpartikel) zugelassen. In klinischen Studien haben sich inzwischen auch SAF und QS21⁵ bewährt [62]. Für die Immuntherapie werden sicher zunehmend auch hochpotente aber nebenwirkungsreichere Adjuvantien zugelassen werden, die für Reihenimpfungen nicht vertretbar sind.

Durch Fusion mit einem schwachen Antigen wirkt ein starkes Immunogen als Haptencarrier, indem es APC anlockt und aktiviert, wie es z.B. für Tetanus-Toxin [74] und HBsAg schon gezeigt wurde (HIV-V3-Peptide wurden in der präS2-Region von HBsAg präsentiert [22]). Ähnlich wirkt die kovalente Kopplung von Idiotyp an KLH⁶. Hier wurde neben dem Zytokin das nicht-toxische Fragment C des Tetanus Toxins bzw. HBsAg an den Idiotyp fusioniert. Für FragC sind viele starke T-Helfer-Epitope bekannt [182, 132, 99]. Die cDNA wurde direkt aus einem toxintragenden *Clostridium tetani* Stamm kloniert. Nach Phenolextraktion konnte das 1400bp Fragment aus genomischer DNA amplifiziert werden.

Die Expression der Drei-Protein-Fusionskonstrukte war für Fragment C im Zytokin-ELISA deutlich schwächer als für die Fusionsproteine von Idiotyp und Zytokin alleine. Der Grund liegt wahrscheinlich in der AT-reichen cDNA-Sequenz, die zum vorzeitigen Abbruch der Transkription führt [142]. Außerdem enthält die bakterielle cDNA viele in Vertebraten unübliche Codons [170]. Aufgrund der schwachen Expression wurden die FragC-Fusionskonstrukte bisher noch nicht *in vivo* getestet, sondern nur das Prinzip bestätigt, dass drei unabhängige Moleküle als Fusion exprimiert werden können und bioaktiv sind. King *et al.* [92] konnten bei guter Expression deutliche Erfolge im A31 und 5T33-Modell mit Idiotyp und FragC ohne weiteren Zytokine-Anteil erzielen⁷. Auch wenn es nicht explizit erwähnt wurde, haben King *et al.* allerdings ein codonoptimiertes synthetisches Gen verwendet [170], wie aus der angegebenen Primersequenz hervorgeht⁸. Unklar blieb auch der Effektormechanismus: Für 5T33 lässt sich die Protektion eigentlich nicht durch einen nur geringen Antikörpertiter nach der dritten Impfung erklären, weil die Plasmazytomzellen keinen Idiotyp auf ihrer Oberfläche tragen - alleinige Ak-Antwort nach Id-CFA wirkt nicht protektiv. *In vitro* zeigte sich keine T-Zell-Proliferation gegen 5T33, eine CTL-Antwort konnte nur gegen FragC gezeigt werden⁹.

⁵Ein sogenanntes Sponin, das in Membranen interkaliert und Poren bildet. Dadurch könnten Antigene in APC transportiert werden.

⁶KLH ist ein Sauerstofftransportprotein aus der Schneckenart *Megathura crenulata*.

⁷Im A20 Modell konnten das Armstrong *et al.* jüngst nicht bestätigen [5]

⁸Diese Strategie zur Expressionssteigerung hat sich auch bei HIV gp120 bewährt [4].

⁹Andererseits können sogar MHC II negative Plasmazytome von VL-spezifischen CD4-Zellen kontrolliert werden [17].

Viele Adjuvantien ahmen durch ihre Partikelgröße natürliche Pathogene nach, weil das Immunsystem in diesem Größenbereich am besten (unspezifisch) aktiviert wird. Deswegen erschien das hochimmunogene HBsAg, das 22 nm Lipoproteine-Komplexe (ohne Virus DNA) und die Hülle der kompletten Hepatitis B Viren formt, ein idealer Fusionspartner zu sein: Idiotyp-scFv und Zytokin wurden direkt an den N- bzw. C-Terminus gekoppelt, die beide auf der Außenseite liegen. Proteinexpression ließ sich mit diesen Konstrukten allerdings nicht nachweisen. Als Ursache kommen strukturelle Gründe in Betracht. Eine verlängerte Linkersequenz (z.B. die präS2-Region) könnte hier eventuell Abhilfe schaffen. Eine ähnliche Rationale hat die Fusion mit einem Strukturprotein eines Pflanzenvirus als DNA-Vakzine [149]: Die scFv aggregieren zu größeren Partikeln und induzieren so CD4-abhängige protektive Immunität gegen Lymphome und Myelome. Ein ähnliches Ziel verfolgten Kwak *et al.*[102]: verpackt in Liposomen ist Idiotyp-Protein sogar effektiver als an KLH gekoppelt (zusammen mit IL2 85% Protektion gegen 38C13 bei nur einer Immunisierung).

5.3 Untersuchung des optimalen Vakzinierungsweges

Das Prinzip aller DNA-Vakzinen ist identisch: das Antigen wird im lebenden Tier endogen produziert, indem meist Muskelgewebe oder Haut *in vivo* mit einem cDNA-Expressionsvektor transfiziert werden. Trotzdem sind inzwischen unzählige Varianten beschrieben, insbesondere zur Verbesserung der Transfektionseffizienz und zur Modulation der Immunantwort. Trotz aller Unterschiede lassen sich zwei Hauptgruppen klar abgrenzen: einerseits die direkte Injektion des gelösten Plasmids meist in Muskel oder Haut, andererseits die ballistische Transfektion mit Plasmid-beschichteten Goldpartikeln ("Gene Gun"). Die Injektionsmethode führt zu einer Antwort vom Th1 Typ, Gene Gun zu einer deutlichen Th2-Präferenz (z.B. im Influenzamodelle bei [56]).

Beide Methoden wurden hier untersucht: Die Haut erscheint durch ihre natürliche Funktion in der Infektionsabwehr leichter beeinflussbar durch Zytokine als Muskelgewebe (vgl. [72]). Deswegen sollte intradermale DNA-Injektion in PBS mit Gene-Gun-Immunisierung verglichen werden. Als starkes Modell-Antigen diente das virale HBsAg, das schon mehrfach an verschiedenen Tieren getestet wurde [45]. Immunisiert wurde zweimal im Abstand von drei Wochen mit je zwei Injektionen bzw. Schuss. Tatsächlich war im Pilotversuch die technisch anspruchsvollere Injektion in die Ohr-Pinna einer Injektion in die Bauchhaut deutlich überlegen [57]: die Mäuse zeigten etwas höhere und weniger schwankende Titer. Eine Erklärung soll in der erhöhten Dichte von Langerhanszellen in der Pinna-Region der Maus liegen. Wie erwartet, zeigte die Th2-lastige Gene-Gun-Impfung deutlich höhere Titer, die aber nach einer Impfung um den Faktor 40 schwankten. Eine solch hohe Variabilität würde die Aussagekraft der Überlebensstatistiken in kleinen Gruppen sicher zu stark beeinträchtigen.

5.4 Tiermodell

Für das erste Tierexperiment wurde die prophylaktische Vakzinierung im A20-Modell gewählt. Sogar bei starken Antigenen sind Erfolge bei bereits etablierten Tumoren eine Seltenheit in der Immuntherapie. Eine interessante Alternative ist die Immuntherapie kurz nach der Tumoringokulation zusammen mit einmaliger Chemotherapie (z.B. mit CTX bei [26]).

Für zukünftige Experimente wurden auch Fusionsproteine mit dem BCL1-Idiotyp kloniert und die minimale Tumordosis bestimmt, weil die Ergebnisse in einem einzigen Tumormodell kaum auf die sehr heterogene Situation im Patienten übertragbar sind. Zwischen verschiedenen Tiermodellen bestehen teilweise erhebliche Unterschiede: Der Goldstandard Id-KLH wurde zunächst an 38C13 [25] und BCL1 [59] entwickelt. Schon bei etwas höherer BCL1-Tumordosis (ab 10000 Zellen) lässt die Wirksamkeit von Id-KLH aber deutlich nach. Im A20 Modell führt Id-KLH-Impfung sogar bestenfalls zu einer Lebensverlängerung [15], obwohl andere Idiotyp-Strategien oder zelluläre Vakzinen [157] gute Erfolge zeigen.

A20 ist ein spontan entstandenes [90] B-Zell-Lymphom. Die Zellen exprimieren Idiotyp der IgG2a Subklasse. Die Generationszeit *in vitro* beträgt ungefähr 18 Stunden. Tumorzellen finden sich in Milz, Leber, Lymphknoten und im Aszites. BCL1 [96, 97, 123] wurde zunächst mit der humanen CLL verglichen [96], entspricht aber eher einer chronische prolymphozytischen Leukämie. Die Zellen tragen den IgM-Idiotyp auf der Oberfläche, sezernieren aber kaum Idiotyp. Nach i.v. Injektion beobachtet man Splenomegalie und Leukämie, später auch Befall von Lunge und Leber ohne Lymphknotenbefall.

Bei der Bestimmung der minimalen Tumordosis für intraperitoneale Injektion zeigte sich im BCL1-Modell deutlich heterogenes Absterbeverhalten im Vergleich zu A20, wo die meisten Mäuse spätestens 35 Tage nach i.p. Injektion von 10000 vitalen Tumorzellen euthanasiert werden mussten. Für A20 ist auch i.v. Applikation des Tumors möglich, die Tumorverteilung ist überraschenderweise gleich. Trotzdem wurden z.T. bessere Erfolge der Immuntherapie bei i.v. Injektion beobachtet (R. Mocikat).

5.5 Untersuchung der Immunantwort

5.5.1 Humorale Immunantwort

Für HBsAg als starkes Modell-Antigen konnte bei allen untersuchten Vakzinierungstechniken leicht eine deutliche Antikörper-Antwort nachgewiesen werden. Bei den Vakzinierung mit A20-Fusionskonstrukten gelang es trotz erheblicher Anstrengungen nicht eine humorale Anti-Idiotypantwort nachzuweisen: Das methodische Hauptproblem liegt darin, dass das Impfantigen "Idiotyp" selbst ein (muriner) Antikörper ist. Besonders ungünstig ist hier der A20-Isotyp: IgG2a. Um den Anti-Idiotyp-Titer zu messen, muss (bei fast allen Methoden) der

Detektions-Antikörper gegen Maus-IgG2a präadsorbiert werden, weil es sonst zur Kreuzreaktion mit dem Antigen A20-Idiotyp kommt. Gerade die nach DNA-Vakzinierung dominierende IgG2a-Antwort (z.B. [133]), kann also nicht gemessen werden, obwohl IgG2a zugleich der wichtigste Isotyp für die Lymphom-Protektion ist [172]: IgG2a vermittelt die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), und ist 100-fach effektiver in der Lymphomprotektion als IgG1 [86].

Präadsorption des Detektionsantikörpers gegen IgG2a ergab sehr hohe Hintergrundsignale im ELISA. Alternativ könnten Idiotyp-Fab-Fragmente als Capture-Antigen im ELISA die Kreuzreaktion mit dem Detektionsantikörper verhindern. Leider konnten aber aus den verfügbaren Mengen A20-Idiotyp trotz intensiver Versuche keine Fab-Fragmente hergestellt werden: der Idiotyp ließ sich nicht mit Papain verdauen. Die unterschiedliche Sensitivität verschiedener Antikörper gegen über Papain ist bekannt [2, 144, 145], möglich wäre noch der Verdau mit Pepsin.

Damit blieb unklar, ob die Impfung mit den verwendeten A20-Fusionskonstrukten Anti-Idiotyp-Antikörper hervorgerufen hat, insbesondere weil keine Positivkontrolle verfügbar war. Bei Idiotyp-Vakzinen wird zwar immer wieder die Bedeutung der humoralen Immunantwort betont (z.B. [172]), ein Zusammenhang zwischen dem Überleben eines Tiers und seinem Antikörper-Titer konnte aber nie gezeigt werden (z.B. [26]). Eine Korrelation existiert allenfalls zum gemittelten Antikörper-Titer einer Versuchsgruppe.

5.5.2 Zelluläre Immunantwort

Eine verlässliche Untersuchung zytotoxischer T-Zellen ist grundsätzlich schwierig: Goldstandard ist der direkte Lyse-Nachweis durch Chrom-Release der Targetzellen. Die ELISPOT-Technik erlaubt die Differenzierung in Th1 und Th2 Antwort. Bei bekannten CTL-Epitopen erlaubt Tetramer-Staining den schnellen und hochsensitiven Nachweis auch kleiner Precursor-Populationen (vgl. [9]) ohne vorherige *in vitro* Restimulation (wie beim Chrom-Release Assay nötig). Sehr aufwendig ist die *in vivo*-Depletion der CD4 bzw. CD8-Population. Entsprechend könnten auch CTL-defiziente β 2-Mikroglobulin Knockout-Mäuse verwendet werden.

Um möglichst umfassend (CD4 und CD8) und einfach eine zelluläre Anti-Idiotyp-Antwort initial nachzuweisen, wurden Proliferationsassays durchgeführt, nachdem die Splenozyten *in vitro* mit bestrahlten Tumorzellen restimuliert wurden. Die Antigen-abhängige GM-CSF-Sekretion wurde als Surrogatmarker für die Antigen-Erkennung und Proliferation verwendet ([98], vgl. auch [12, 113]). Als Verfeinerung wäre die FACS-Analyse der restimulierten Splenozyten-Population möglich, oder MACS-Sortierung in CD4 und CD8 Zellen. Bei HBsAg-vakzinierten Mäusen war so bereits ohne Restimulation eine deutliche antigen-spezifische Reaktion (mit HBsAg-transfizierten BALB 3T3 als Targetzellen) messbar.

Aus jeder Therapiegruppe (A20-GMCSF, A20-GMCSF-E21K, A20-IL12) wurden 2 Tie-

re untersucht: Eine A20-GMCSF-E21K vakzinierte Maus zeigte nach der 2. Restimulation *in vitro* eine deutliche Proliferation gegen A20, nicht aber gegen das syngene MPC11. Unspezifische Aktivierung (durch die Restimulation) gegen A20 ist erst nach drei bis vier Restimulationen beobachtet (R. Mocikat). Prinzipiell kann also durch DNA-Vakzinierung eine zelluläre Antwort gegen A20-Idiotyp ausgelöst werden.

5.5.3 Kein protektiver Effekt im ersten Tierversuch

Im A20-Modell konnte bei den drei zunächst getesteten Id-Fusionskonstrukten mit GM-CSF, single-chain IL12, und der inaktiven GM-CSF-Mutante kein signifikanter Überlebensvorteil im Vergleich zu HBsAg-immunisierten Mäusen beobachtet werden. Die Tumorgabe erfolgte dabei vier Wochen nach der zweiten intradermalen Vakzinierung.

Als Ursachen kommen technische Fehler oder schwache Antigenität der Konstrukte in Betracht: Die starke humorale und zelluläre Antwort gegen das Kontroll-Antigen HBsAg schließt eine falsche Immunisierungstechnik nahezu aus. Die schwache Antigenität des Idiotyps könnte aber häufigere Immunisierungen erforderlich machen, als für das starke Antigen HBsAg nötig sind: Stevenson *et al.* [168] konnten nach vier DNA-Impfung (i.m.) mit xenogenen scFv bei Koinjektion eines GM-CSF oder IL2-Plasmids eine humorale und zelluläre Anti-Idiotypantwort nachweisen, konnte aber bei murinen Tumoren keine Protektion zeigen. Für BCL1 konnten Benvenuti *et al.* [13] nach viermaliger i.d. Immunisierung mit scFv-DNA sogar bei einer sehr hohen Tumordosis 100% Protektion induzieren. GM-CSF wurde dabei als zweites Plasmid koinjiziert, der scFv-Idiotyp wurde mit einem humanen Fc-Teil (CH3 Domäne) stabilisiert. Die hohe Zahl der nötigen Immunisierungen stellt allerdings den Nutzen für die Anwendung an Lymphom-Patienten in Frage.

Für das erste Tierexperiment wurde außer dem Zytokinanteil bewusst auf andere Adjuvantien verzichtet: Tetanus Fragment C wurde bisher wegen der schwachen Expression nicht eingesetzt. Ein Codonoptimiertes synthetisches Gen steigert die Expression in Eukaryonten beträchtlich, wäre also sicher überlegen [170]. In der Literatur wird zwar häufig ein humaner Fc-Teil als xenogenes Adjuvans¹⁰ benutzt, ist aber für die Anwendung am Patienten nicht wünschenswert. Erfolgreiche Idiotyp-Vakzinierung ohne xenogene Komponente ist möglich: DNA-Fusionskonstrukte aus scFv und dem IL1 β -Nonapeptid (bei [64] im 38C13 Modell mit Id-KLH vergleichbare Protektion) und mit dem Chemokin MCP3 ([15], 38C13 und A20) induzierten nach drei Impfungen teilweise Tumorprotektion. Immunisierung mit scFv-GMCSF wirkte im 38C13-Modell¹¹ nur als Protein-Impfung, nicht als DNA-Impfung [64]. Hakim *et al.* machten dafür die gestörte Faltung des GM-CSF-Anteils in den Fusionsprotein verantwort-

¹⁰Die genaue Wirkung des humanen Fc-Teils abgesehen von der Stabilisierung ist unklar, teils wurde auch der Isotyp dafür verantwortlich gemacht (vgl. [139] und [14]).

¹¹Gerade dieses Lymphommodell ist besonders abhängig von einer Antikörperantwort, sogar wenn Id-gepulste DC verwendet werden [177].

lich. Für die Proteinimpfung wurde durch die anti-GMCSF-Affinitätsaufreinigung nur korrekt gefaltetes Fusionsprotein verwendet. Andererseits zeigte die Expression des A20-GMCSF-Konstrukts in HEK293-Zellen aber keine übermäßig reduzierte Bioaktivität im Vergleich zu den ELISA-Daten. Als möglicher Grund kommt auch die Induktion von anti-GM-CSF Antikörpern in Betracht, die gegen IL1 β nicht beobachtet wurde [64].

5.5.4 Andere moderne Vakzinierungs-Strategien

Auch die relativ starke humorale und zelluläre Immunantwort durch DNA-Vakzinierung kann bei vielen Krankheiten, insbesondere HIV, keinen ausreichenden Impfschutz bieten. Neben den zahlreichen Versuchen, durch Zytokine die Protektion zu verbessern [89, 9], wird intensiv nach weiteren Optimierungsmöglichkeiten gesucht: Eine perlschnurartige Aneinanderreihung verschiedener starker CTL-Epitope (sog. Multiepitop-Vakzine) und die Boosterimmunisierung mit einem Vaccinia-Stamm (MVA) werden nach vielversprechenden Tierexperimenten im SIV-Modell gerade in einer klinischen Studie in Kenia getestet [66, 65]. Rekombinante Viren (z.B. Vaccina, Adenoviren) ermöglichen (im Vergleich zu nackter DNA) eine höhere Antigen-Expression im Muskelgewebe und vor allem auch in dendritischen Zellen, die teilweise mit hoher Effizienz infiziert werden [136]. DNA-Vakzine scheinen auf den ersten Blick das ideale Screening-Verfahren zu sein, solche Kandidatenvakzine rasch zu testen. Eine vollständige Korrelation besteht aber nicht. So induziert der unkonjugierte scFv-Idiotyp als DNA-Vakzin allenfalls eine schwache Antikörperantwort, als Adenovakzine dagegen schon nach einmaliger Injektion eine deutlich stärkere Antikörper-Antwort mit starkem Th1-Bias (mit xenogenem Idiotyp bei [29]). Im 38C13 und BCL1-Modell ist einmalige Adenovirus-Injektion mit Idiotyp mit humanem¹² Fc-Teil einer zweimaligen Id-KLH-Impfung mindestens ebenbürtig [176]. Sogar bei frisch etablierten Tumoren konnten im Cyclophosphamidmodell 20% Protektion erreicht werden. Erstaunlicherweise beeinflusste weder CD4 noch CD8-Depletion die Schutzwirkung, obwohl die zelluläre Antwort bei Versuchen an Patienten entscheidend war (vgl. Tabelle 5.4).

Jüngst (April 2002) wurde die erfolgreiche Adeno-Vakzinierung im A20-Modell gezeigt [5]: A20-scFv gekoppelt mit humanem Fc-Teil induzierte sowohl Anti-Id Antikörper also auch CTL-Antwort gegen Idiotyp und bewirkte 40% Protektion. Ungekoppelter A20-scFv induzierte bei deutlich schlechterer Protektion eine vergleichbare T-Zellantwort, aber keine Antikörper-Antwort. Tatsächlich konnte sogar ein dominantes CTL-Epitop in der schweren Kette des Idiotyps identifiziert werden (DYWGQGTEL). DNA-Vakzinierung mit einem Fusionskonstrukt mit Tetanus Fragment C hatte erstaunlicher Weise keine protektive Wirkung im A20-Modell.

Alle Impfstrategien zielen auf eine maximale Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zel-

¹²Fusion mit muriner konstante Kette zeigte keine Immunantwort.

Id gepulste DC		
Id	Patienten [76]	rein zelluläre Antwort, klinisches Ansprechen
Id	Patienten [189]	CD4 und CD8 Antwort
Id-Fab	Patienten [131]	<i>in vitro</i> CTL-Expansion mit Fab gepulsten oder transfizierten DC
Id	38C13 [177]	alle Effekte T-Zell-unabhängig:
Id-huC	38C13 [177]	keine Ak-Antwort, keine Protektion
Id-huC-GMCSF	38C13 [177]	deutliche Antwort
Id-KLH	38C13 [177]	höchste Ak-Titer, 2. beste Protektion, Fusion notwendig für GM-CSF Effekt
Id-KLH	38C13 [177]	Protektion besser als bei Id-KLH-Protein
Adenoviren		
Id-scFv	xenogen [29]	starke CTL-Antwort nach einer Injektion
Id-HuC	38C13, BCL1 [176]	70-80% Protektion (besser als Id-KLH), reiner Ak-Effekt

Tabelle 5.4: **Neue Strategien zur Idiotypvaksinierung:** Bemerkenswert ist reine Antikörperantwort im 38C13 Modell trotz Überwiegen der zellulären Immunantwort in klinischen Studien. (huC = humaner Fc-Teil)

len (APC) als Initiatoren der Immunantwort. Auch die *ex vivo* Beladung dendritischer Zellen zeigt vielversprechende Ergebnisse [76]: bei vier polychemotherapierten Lymphom-Patienten wurde nach mehrfacher Impfung mit Id-gepulsten DC eine zelluläre Immunantwort vom Th1-Typ und klinisches Ansprechen beobachtet (darunter sogar eine Vollremission). Im Chrom-Release-Assay wurde autologer Tumor lysiert. Osterroth *et al.* [131] haben ein Protokoll entwickelt um mit Fab-gepulsten DC *in vitro* Id-spezifische CTL zu generieren. Im 38C13-Modell war dagegen nur Idiotyp mit xenogenem Fc-Teil (oder Id-KLH) zum Pulsen von DC effektiv, und alle Effekte waren ausschließlich Antikörper-vermittelt[177].

5.6 Klinische Studien

Schon in den 80er Jahren wurden in Einzelfällen nachhaltige Effekte nach Idiotyp-Vaksinierung beschrieben [125]. Neben der kleinen Fallzahl war vor allem problematisch, dass meist “aus-therapierte” Patienten mit großer Tumorlast eingeschlossen wurden - sicher eine ungünstige Voraussetzung für Immuntherapie. Trotzdem konnte teilweise Tumorregression beobachtet werden. In anderen Studien waren Patienten in kompletter Remission (CR) untersucht worden [77, 101], so dass die humorale Anti-Idiotyp-Antwort oft das einzige Erfolgskriterium war. Tatsächlich konnte im Tierversuch aber noch nie eine Korrelation zwischen Antikörpertiter und Überleben eines einzelnen Tiers beobachtet werden (z.B. [26]).

Die verbesserten molekularbiologischen Methoden ermöglichen jetzt systematische Studien mit höherer Aussagekraft. Neue Maßstäbe setzten Bendandi *et al.* [12] mit ihrer klinischen Studie zur Impfung mit Idiotyp-KLH kombiniert mit GM-CSF (zunächst im 38C13-Modell in [104]) : Als sensitiver Marker einer residuellen Tumor-Erkrankung dient der PCR-Nachweis der Translokation t(14,18) (Bcl-2,IgH) im peripheren Blut. Von 20 Patienten mit Follikulärem Lymphom war die Translokation bei allen 11 initial PCR-positiven Patienten auch in Vollremission noch nachweisbar. Nach viermaliger Idiotyp-KLH Vakzinierung lag die restliche Tumormasse bei 8 dieser 11 Patienten aber unter der Nachweisgrenze der PCR.

Zur Vakzinierung wurde dabei Hybridom-gereinigter und an KLH gekoppelter Idiotyp verwendet: Nach mindestens sechs Monaten in Vollremission erfolgten vier monatliche Impfungen mit Idiotyp-KLH plus GM-CSF. In Proliferationsassays mit autologem Lymphom konnte spezifische TNF- α , GM-CSF und IFN- γ Sekretion bereits ohne *in vitro*-Restimulation gezeigt werden. Die GM-CSF-Gabe war dabei entscheidend für die Induktion der CTL-Antwort (vgl. [128]). Vermutlich verstärkt GM-CSF das Cross-Priming durch Aktivierung der Dendritischen Zellen. Die unvollständige Korrelation von T-Zellantwort und PCR-Remission lässt allerdings weitere Effektormechanismen vermuten (vgl. [104]).

Eine andere interessante Strategie, die Toleranz gegen einen etablierten Tumor zu überwinden, ist die Idiotypvakzinierung des HLA-kompatiblen Knochenmarks-Donors ([113], vgl. [103]): Stammzell-Spender wurden mit Myelom-Id-KLH und GM-CSF immunisiert, sie zeigten eine MHC I und MHC II abhängige Antwort gegen das Myelom. In einem rein autologen Ansatz konnten *ex vivo* mit Id-gepulsten DC auch CD8+ cytotoxische T-Zellen generiert werden [131].

5.7 Perspektiven

Gerade DNA-Vakzinen bieten unzählige Möglichkeiten zur Optimierung: Neben häufigerer Immunisierung (vier statt zweimal) erscheint der Einsatz eines xenogenen (humanen) Fc-Teils als bewährtes Adjuvans sinnvoll. Tetanus Fragment C wurde auch noch nicht im Tierversuch getestet. Zur besseren Expression wäre das Codon-optimierte Gen sinnvoll. Neue Daten zeigen die hohe Potenz von Flt3-Ligand als Adjuvans [81]. Für zukünftige Vakzinformulierungen wäre auch ein molekulares Targeting von APC denkbar, indem Liganden für APC-Rezeptoren als dritter Fusionspartner benutzt werden (z.B. CTLA-4). Auch eine Verbesserung des cross-primings erscheint möglich: Moleküle wie VP22 (aus HSV) und *tat* (ein HIV-Protein) transportieren andere Proteine sehr effektiv durch die Zellmembran [156, 80]. Interessant wäre sicher eine Verpackung der Fusionskonstrukte in AAV oder Adenovirus, weil hier bereits nach einmaliger Immunisierung mit (xenogenem) scFv deutliche CTL-Antworten nachweisbar sind [29]. Die verwendeten Zytokine sollten eine weitere Verbesserung bewirken.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit neuen Ansätzen zur Immuntherapie von B-Zell-Lymphomen. Als Mausmodell wurden das Lymphom A20 und der eher leukämisch wachsende BCL1-Tumor verwendet. Alle Zellen eines B-Zell-Lymphoms produzieren einen identischen Antikörper, den sogenannten Idiotyp, der als tumorspezifisches Antigen benutzt werden kann: Die antigenbindenden variablen Regionen von schwerer und leichter Kette sind für die Tumorzellen jedes Patienten spezifisch. Die variablen Regionen lassen sich mit einem flexiblen Linker-Peptid zu single-chain Fragmenten (scFv) fusionieren. Die Antigenbindung und die Struktur als Tumorantigen bleiben dabei erhalten. Die BCL1-Sequenz war bereits bekannt, sie ließ sich mit Hilfe familienspezifischer Primer mit PCR amplifizieren und klonieren. Bei der stark hypermutierten Sequenz des A20-Idiotyps versagte das Standardverfahren der Konsensus-Primer, erst eine 5'-RACE-PCR war erfolgreich.

Der optimale Effektormechanismus (humoral, CD4 oder CD8 vermittelt) zur Immuntherapie von Lymphomen ist nicht bekannt. Bei DNA-Vakzinen lässt sich die Immunantwort besonders effektiv modulieren. Hier wurde ein System entwickelt, um rasch die Wirksamkeit verschiedener Kombinationen *in vivo* untersuchen zu können: Der scFv-Idiotyp wurde mit einem Zytokin (IL1 β , IL4, IL12, GM-CSF oder Flt3 ligand) und/oder einem Adjuvans (Tetanus Toxin Fragment C oder HBsAg) gekoppelt. *In vitro* wurde die Expression, die Faltung des scFv und die biologische Aktivität bestätigt. Neben der spezifischen Zytokinwirkung stabilisieren die Fusionspartner die scFv-Proteine deutlich.

Zunächst wurde mit dem Modellantigen HBsAg die Immunisierungstechnik optimiert: Intradermale Plasmid-Injektion in die Ohr *Pinna* ergab konsistent hohe Antikörper-Titer. Bereits ohne *in vitro*-Restimulation konnte eine starke zelluläre Antwort nachgewiesen werden. Weiterhin wurde für die beiden Tumormodelle A20 und BCL1 die Wachstumskinetik *in vivo* bestimmt und ein Pilotversuch (32 Tiere) mit drei ausgewählten Konstrukten durchgeführt: Von sechs splenektomierten Mäusen zeigte nur eine nach zwei Immunisierungen eine spezifische zelluläre Antwort gegen A20. In keiner Versuchsgruppe zeigte sich eine signifikante Lebensverlängerung nach Lymphomchallenge.

Zusammenfassend ist erstmalig ein System entwickelt worden, das es auf einfache Weise ermöglicht, die Wirksamkeit von verschiedenen Zytokinen und Adjuvantien zur Idiotyp-Vakzinierung zu untersuchen. Dieses System bietet viel Raum für Optimierungen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] ABE, A., N. EMI, H. TAJI, M. KASAI, A. KOHNO und H. SAITO: *Induction of humoral and cellular anti-idiotypic immunity by intradermal injection of naked DNA encoding a human variable region gene sequence of an immunoglobulin heavy chain in a B cell malignancy*. Gene Ther, 3(11):988–93, 1996.
- [2] ADAMCZYK, M., J. C. GEBLER und J. WU: *Papain digestion of different mouse IgG subclasses as studied by electrospray mass spectrometry*. J Immunol Methods, 237(1-2):95–104, 2000.
- [3] AKBARI, O., N. PANJWANI, S. GARCIA, R. TASCONE, D. LOWRIE und B. STOCKINGER: *DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity*. J Exp Med, 189(1):169–78, 1999.
- [4] ANDRE, S., B. SEED, J. EBERLE, W. SCHRAUT, A. BULTMANN und J. HAAS: *Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage*. J Virol, 72(2):1497–503, 1998.
- [5] ARMSTRONG, A. C., S. DERMIME, C. G. ALLINSON, T. BHATTACHARYYA, K. MULRYAN, K. R. GONZALEZ, P. L. STERN und R. E. HAWKINS: *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(8):3983–91, 2002.
- [6] BAIOCCHI, R. A., M. E. ROSS, J. C. TAN, C. C. CHOU, L. SULLIVAN, S. HALDAR, M. MONNE, M. V. SEIDEN, S. K. NARULA, J. SKLAR und ET AL.: *Lymphomagenesis in the SCID-hu mouse involves abundant production of human interleukin-10*. Blood, 85(4):1063–74, 1995.
- [7] BAREN, N. VAN, F. BRASSEUR, D. GODELAINE, G. HAMES, A. FERRANT, F. LEHMANN, M. ANDRE, C. RAVOET, C. DOYEN, G. C. SPAGNOLI, M. BAKKUS, K. THIELEMANS und T. BOON: *Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells*. Blood, 94(4):1156–64, 1999.
- [8] BAROUCH, D. H., A. CRAIU, M. J. KURODA, J. E. SCHMITZ, X. X. ZHENG, S. SANTRA, J. D. FROST, G. R. KRIVULKA, M. A. LIFTON, C. L. CRABBS, G. HEIDECKER, H. C. PERRY, M.-E. DAVIES, H. XIE, C. E. NICKERSON, T. D. STEENBEKE, C. I. LORD, D. C. MONTEFIORI, T. B. STROM, J. W. SHIVER, M. G. LEWIS und N. L. LETVIN: *Augmentation of immune responses to HIV-1 and simian immunodeficiency virus DNA vaccines by IL-2/Ig plasmid administration in rhesus monkeys*. PNAS, 97(8):4192–4197, 2000.
- [9] BAROUCH, D. H., S. SANTRA, J. E. SCHMITZ, M. J. KURODA, T.-M. FU, W. WAGNER, M. BILSKA, A. CRAIU, X. X. ZHENG, G. R. KRIVULKA, K. BEAUDRY, M. A. LIFTON, C. E. NICKERSON, W. L. TRIGONA, K. PUNT, D. C. FREED, L. GUAN,

- S. DUBEY, D. CASIMIRO, A. SIMON, M.-E. DAVIES, M. CHASTAIN, T. B. STROM, R. S. GELMAN, D. C. MONTEFIORI, M. G. LEWIS, E. A. EMINI, J. W. SHIVER und N. L. LETVIN: *Control of Viremia and Prevention of Clinical AIDS in Rhesus Monkeys by Cytokine-Augmented DNA Vaccination*. *Science*, 290(5491):486–492, 2000.
- [10] BECKERS, W., L. VILLA, S. GONFLONI, L. CASTAGNOLI, S. M. NEWTON, G. CESARENI und P. GHIARA: *Increasing the immunogenicity of protein antigens through the genetic insertion of VQGEESNDK sequence of human IL-1 beta into their sequence*. *J Immunol*, 151(4):1757–64, 1993.
- [11] BELLONE, M., D. CANTARELLA, P. CASTIGLIONI, M. C. CROSTI, A. RONCHETTI, M. MORO, M. P. GARANCINI, G. CASORATI und P. DELLABONA: *Relevance of the Tumor Antigen in the Validation of Three Vaccination Strategies for Melanoma*. *J Immunol*, 165(5):2651–2656, 2000.
- [12] BENDANDI, M., C. D. GOCKE, C. B. KOBRIN, F. A. BENKO, L. A. STERNAS, R. PENNINGTON, T. M. WATSON, C. W. REYNOLDS, B. L. GAUSE, P. L. DUFFEY, E. S. JAFFE, S. P. CREEKMORE, D. L. LONGO und L. W. KWAK: *Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma*. *Nat Med*, 5(10):1171–7, 1999.
- [13] BENVENUTI, F., O. R. BURRONE und D. G. EFREMOV: *Anti-idiotypic DNA vaccines for lymphoma immunotherapy require the presence of both variable region genes for tumor protection*. *Gene Ther*, 7(7):605–11, 2000.
- [14] BIRAGYN, A. und L. W. KWAK: *B-cell malignancies as a model for cancer vaccines: from prototype protein to next generation genetic chemokine fusions*. *Immunol Rev*, 170:115–26, 1999.
- [15] BIRAGYN, A., K. TANI, M. C. GRIMM, S. WEEKS und L. W. KWAK: *Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity*. *Nat Biotechnol*, 17(3):253–8, 1999.
- [16] BIRNBOIM, H. C. und J. DOLY: *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. *Nucleic Acids Res*, 7(6):1513–23, 1979.
- [17] BOGEN, B.: *Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma*. *Eur J Immunol*, 26(11):2671–9, 1996.
- [18] BOGEN, B., Z. DEMBIC und S. WEISS: *Clonal deletion of specific thymocytes by an immunoglobulin idiotype*. *Embo J*, 12(1):357–63, 1993.
- [19] BOGEN, B., L. MUNTHE, A. SOLLIEN, P. HOFGAARD, H. OMHOLT, F. DAGNAES, Z. DEMBIC und G. F. LAURITZSEN: *Naive CD4+ T cells confer idiotype-specific tumor resistance in the absence of antibodies*. *Eur J Immunol*, 25(11):3079–86, 1995.
- [20] BOGEN, B. und S. WEISS: *Processing and presentation of idiotypes to MHC-restricted T cells*. *Int Rev Immunol*, 10(4):337–55, 1993.

- [21] BORASCHI, D. und A. TAGLIABUE: *Interleukin-1 and interleukin-1 fragments as vaccine adjuvants*. *Methods*, 19(1):108–13, 1999.
- [22] BRYDER, K., H. SBAL, H. V. NIELSEN, S. CORBET, C. NIELSEN, R. G. WHALEN und A. FOMSGAARD: *Improved immunogenicity of HIV-1 epitopes in HBsAg chimeric DNA vaccine plasmids by structural mutations of HBsAg*. *DNA Cell Biol*, 18(3):219–25, 1999.
- [23] BUHMANN, R., A. NOLTE, D. WESTHAUS, B. EMMERICH und M. HALLEK: *CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells*. *Blood*, 93(6):1992–2002, 1999.
- [24] CAMPBELL, M. J., W. CARROLL, S. KON, K. THIELEMANS, J. B. ROTHBARD, S. LEVY und R. LEVY: *Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Humoral and cellular responses elicited by tumor-derived immunoglobulin M and its molecular subunits*. *J Immunol*, 139(8):2825–33, 1987.
- [25] CAMPBELL, M. J., L. ESSERMAN, N. E. BYARS, A. C. ALLISON und R. LEVY: *Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Humoral and cellular requirements for the full expression of antitumor immunity*. *J Immunol*, 145(3):1029–36, 1990.
- [26] CAMPBELL, M. J., L. ESSERMAN und R. LEVY: *Immunotherapy of established murine B cell lymphoma. Combination of idiotype immunization and cyclophosphamide*. *J Immunol*, 141(9):3227–33, 1988.
- [27] CAO, W., B. A. MYERS-POWELL und T. J. BRACIALE: *Recognition of an immunoglobulin VH epitope by influenza virus-specific class I major histocompatibility complex-restricted cytolytic T lymphocytes*. *J Exp Med*, 179(1):195–202, 1994.
- [28] CASARES, S., K. INABA, T. D. BRUMEANU, R. M. STEINMAN und C. A. BONA: *Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope*. *J Exp Med*, 186(9):1481–6, 1997.
- [29] CASPAR, C. B., S. LEVY und R. LEVY: *Idiotype vaccines for non-Hodgkin's lymphoma induce polyclonal immune responses that cover mutated tumor idiotypes: comparison of different vaccine formulations*. *Blood*, 90(9):3699–706, 1997.
- [30] CHAKRABARTI, D. und S. K. GHOSH: *Induction of syngeneic cytotoxic T lymphocytes against a B cell tumor. I. Role of idiotypic immunoglobulin*. *Cell Immunol*, 142(1):54–66, 1992.
- [31] CHAKRABARTI, D. und S. K. GHOSH: *Induction of syngeneic cytotoxic T lymphocytes against a B cell tumor. II. Characterization of anti-idiotypic CTL lines and clones*. *Cell Immunol*, 144(2):443–54, 1992.
- [32] CHAKRABARTI, D. und S. K. GHOSH: *Induction of syngeneic cytotoxic T lymphocytes against a B cell tumor. III. MHC class I-restricted CTL recognizes the processed form(s) of idiotype*. *Cell Immunol*, 144(2):455–64, 1992.

- [33] CHAMBOST, H., N. VAN BAREN, F. BRASSEUR, D. GODELAINE, L. XERRI, S. J. LANDI, I. THEATE, J. PLUMAS, G. C. SPAGNOLI, G. MICHEL, P. G. COULIE und D. OLIVE: *Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells*. Blood, 95(11):3530–3, 2000.
- [34] CHAN, J. K.: *The new World Health Organization classification of lymphomas: the past, the present and the future*. Hematol Oncol, 19(4):129–50, 2001.
- [35] CHEN, C. und H. OKAYAMA: *High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA*. Mol Cell Biol, 7(8):2745–52, 1987.
- [36] CHEN, L., P. MCGOWAN, S. ASHE, J. JOHNSTON, Y. LI, I. HELLSTROM und K. E. HELLSTROM: *Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity*. J Exp Med, 179(2):523–32, 1994.
- [37] CHEN, T. T., M. H. TAO und R. LEVY: *Idiotypic-cytokine fusion proteins as cancer vaccines. Relative efficacy of IL-2, IL-4, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. J Immunol, 153(10):4775–87, 1994.
- [38] CHEN, Y. T., M. J. SCANLAN, U. SAHIN, O. TURECI, A. O. GURE, S. TSANG, B. WILLIAMSON, E. STOCKERT, M. PFREUNDSCHUH und L. J. OLD: *A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening*. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(5):1914–8, 1997.
- [39] CHOW, Y. H., W. L. HUANG, W. K. CHI, Y. D. CHU und M. H. TAO: *Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2*. J Virol, 71(1):169–78, 1997.
- [40] COHEN, A. D., J. D. BOYER und D. B. WEINER: *Modulating the immune response to genetic immunization*. Faseb J, 12(15):1611–26, 1998.
- [41] CONDON, C., S. C. WATKINS, C. M. CELLUZZI, K. THOMPSON und J. FALO, L. D.: *DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells*. Nat Med, 2(10):1122–8, 1996.
- [42] CORR, M., D. J. LEE, D. A. CARSON und H. TIGHE: *Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming*. J Exp Med, 184(4):1555–60, 1996.
- [43] DANCESCU, M., M. RUBIO-TRUJILLO, G. BIRON, D. BRON, G. DELESPESE und M. SARFATI: *Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression*. J Exp Med, 176(5):1319–26, 1992.
- [44] DATTAMAJUMDAR, A. K., D. P. JACOBSON, L. E. HOOD und G. E. OSMAN: *Rapid cloning of any rearranged mouse immunoglobulin variable genes*. Immunogenetics, 43(3):141–51, 1996.
- [45] DAVIS, H. L., M. L. MICHEL und R. G. WHALEN: *DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody*. Hum Mol Genet, 2(11):1847–51, 1993.

- [46] DELIYANNIS, G., J. S. BOYLE, J. L. BRADY, L. E. BROWN und A. M. LEW: *A fusion DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge*. PNAS, 97(12):6676–6680, 2000.
- [47] DOE, B., M. SELBY, S. BARNETT, J. BAENZIGER und C. M. WALKER: *Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(16):8578–83, 1996.
- [48] DOENECKE, A., E. L. WINNACKER und M. HALLEK: *Rapid amplification of cDNA ends (RACE) improves the PCR-based isolation of immunoglobulin variable region genes from murine and human lymphoma cells and cell lines*. Leukemia, 11(10):1787–92, 1997.
- [49] DORFMAN, D. M., J. L. SCHULTZE, A. SHAHSAFAEI, S. MICHALAK, J. G. GRIBBEN, G. J. FREEMAN, G. S. PINKUS und L. M. NADLER: *In vivo expression of B7-1 and B7-2 by follicular lymphoma cells can prevent induction of T-cell anergy but is insufficient to induce significant T-cell proliferation*. Blood, 90(11):4297–306, 1997.
- [50] DRANOFF, G., E. JAFFEE, A. LAZENBY, P. GOLUMBEK, H. LEVITSKY, K. BROSE, V. JACKSON, H. HAMADA, D. PARDOLL und R. C. MULLIGAN: *Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 90(8):3539–43, 1993.
- [51] DREXLER, H. G.: *Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells*. Leukemia, 10(4):588–99, 1996.
- [52] DUPUIS, M., K. DENIS-MIZE, C. WOO, C. GOLDBECK, M. J. SELBY, M. CHEN, G. R. OTTEN, J. B. ULMER, J. J. DONNELLY, G. OTT und D. M. McDONALD: *Distribution of DNA Vaccines Determines Their Immunogenicity After Intramuscular Injection in Mice*. J Immunol, 165(5):2850–2858, 2000.
- [53] DYOMIN, V. G., N. PALANISAMY, K. O. LLOYD, K. DYOMINA, S. C. JHANWAR, J. HOULDSWORTH und R. S. CHAGANTI: *MUC1 is activated in a B-cell lymphoma by the t(1;14)(q21;q32) translocation and is rearranged and amplified in B-cell lymphoma subsets*. Blood, 95(8):2666–71, 2000.
- [54] EO, S. K., S. LEE, S. CHUN und B. T. ROUSE: *Modulation of Immunity against Herpes Simplex Virus Infection via Mucosal Genetic Transfer of Plasmid DNA Encoding Chemokines*. J. Virol., 75(2):569–578, 2001.
- [55] FAVRE, N. und P. ERB: *Use of the CTL44 cell line, a derivative of CTL/L cells, to identify and quantify mouse interleukin-4 by bioassay*. J Immunol Methods, 164(2):213–20, 1993.
- [56] FELTQUATE, D. M., S. HEANEY, R. G. WEBSTER und H. L. ROBINSON: *Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization*. J Immunol, 158(5):2278–84, 1997.

- [57] FORG, P., P. VON HOEGEN, W. DALEMANS und V. SCHIRRMACHER: *Superiority of the ear pinna over muscle tissue as site for DNA vaccination*. *Gene Ther*, 5(6):789–97, 1998.
- [58] GAJEWSKI, T. F., F. FALLARINO, C. UYTENHOVE und T. BOON: *Tumor rejection requires a CTLA4 ligand provided by the host or expressed on the tumor: superiority of B7-1 over B7-2 for active tumor immunization*. *J Immunol*, 156(8):2909–17, 1996.
- [59] GEORGE, A. J., S. G. FOLKARD, T. J. HAMBLIN und F. K. STEVENSON: *Idiotypic vaccination as a treatment for a B cell lymphoma*. *J Immunol*, 141(6):2168–74, 1988.
- [60] GEORGE, A. J., M. B. SPELLERBERG und F. K. STEVENSON: *Idiotypic vaccination leads to the emergence of a stable surface Ig- negative variant of the mouse lymphoma BCL1, with different growth characteristics*. *J Immunol*, 140(5):1695–701, 1988.
- [61] GEORGE, A. J., A. L. TUTT und F. K. STEVENSON: *Anti-idiotypic mechanisms involved in suppression of a mouse B cell lymphoma, BCL1*. *J Immunol*, 138(2):628–34, 1987.
- [62] GERARD, C. M., N. BAUDSON, K. KRAEMER, C. BRUCK, N. GARCON, Y. PATERSON, Z. K. PAN und D. PARDOLL: *Therapeutic potential of protein and adjuvant vaccinations on tumour growth*. *Vaccine*, 19(17-19):2583–9, 2001.
- [63] GURUNATHAN, S., K. R. IRVINE, C.-Y. WU, J. I. COHEN, E. THOMAS, C. PRUSSIN, N. P. RESTIFO und R. A. SEDER: *CD40 Ligand/Trimer DNA Enhances Both Humoral and Cellular Immune Responses and Induces Protective Immunity to Infectious and Tumor Challenge*. *J Immunol*, 161(9):4563–4571, 1998.
- [64] HAKIM, I., S. LEVY und R. LEVY: *A nine-amino acid peptide from IL-1beta augments antitumor immune responses induced by protein and DNA vaccines*. *J Immunol*, 157(12):5503–11, 1996.
- [65] HANKE, T. und A. MCMICHAEL: *Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS*. *Immunol Lett*, 66(1-3):177–81, 1999.
- [66] HANKE, T., R. V. SAMUEL, T. J. BLANCHARD, V. C. NEUMANN, T. M. ALLEN, J. E. BOYSON, S. A. SHARPE, N. COOK, G. L. SMITH, D. I. WATKINS, M. P. CRANAGE und A. J. MCMICHAEL: *Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen*. *J Virol*, 73(9):7524–32, 1999.
- [67] HARRIS, N. L., E. S. JAFFE, J. DIEBOLD, G. FLANDRIN, H. K. MULLER-HERMELINK, J. VARDIMAN, T. A. LISTER und C. D. BLOOMFIELD: *World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997*. *J Clin Oncol*, 17(12):3835–49, 1999.
- [68] HARRIS, N. L., E. S. JAFFE, H. STEIN, P. M. BANKS, J. K. CHAN, M. L. CLEARY, G. DELSOL, C. DE WOLF-PEETERS, B. FALINI und K. C. GATTER: *A revised*

- European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group.* Blood, 84(5):1361–92, 1994.
- [69] HAWKINS, R. E., G. WINTER, T. J. HAMBLIN, F. K. STEVENSON und S. J. RUSSELL: *A genetic approach to idiotypic vaccination.* J Immunother, 14(4):273–8, 1993.
- [70] HAWKINS, R. E., D. ZHU, M. OVECKA, G. WINTER, T. J. HAMBLIN, A. LONG und F. K. STEVENSON: *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(11):3279–88, 1994.
- [71] HEMMI, H., O. TAKEUCHI, T. KAWAI, T. KAISHO, S. SATO, H. SANJO, M. MATSUMOTO, K. HOSHINO, H. WAGNER, K. TAKEDA und S. AKIRA: *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.* Nature, 408(6813):740–5, 2000.
- [72] HENGGE, U. R., E. F. CHAN, R. A. FOSTER, P. S. WALKER und J. C. VOGEL: *Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA.* Nat Genet, 10(2):161–6, 1995.
- [73] HERCUS, T. R., C. J. BAGLEY, B. CAMBARERI, M. DOTTORE, J. M. WOODCOCK, M. A. VADAS, M. F. SHANNON und A. F. LOPEZ: *Specific human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor antagonists.* Proc Natl Acad Sci U S A, 91(13):5838–42, 1994.
- [74] HERRINGTON, D. A., D. F. CLYDE, G. LOSONSKY, M. CORTESIA, J. R. MURPHY, J. DAVIS, S. BAQAR, A. M. FELIX, E. P. HEIMER, D. GILLESSEN und ET AL.: *Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against Plasmodium falciparum sporozoites.* Nature, 328(6127):257–9, 1987.
- [75] HOFFMAN, S. L., W. O. ROGERS, D. J. CARUCCI und J. C. VENTER: *From genomics to vaccines: malaria as a model system.* Nat Med, 4(12):1351–3, 1998.
- [76] HSU, F. J., C. BENIKE, F. FAGNONI, T. M. LILES, D. CZERWINSKI, B. TAIDI, E. G. ENGLEMAN und R. LEVY: *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells.* Nat Med, 2(1):52–8, 1996.
- [77] HSU, F. J., C. B. CASPAR, D. CZERWINSKI, L. W. KWAK, T. M. LILES, A. SYRENGELAS, B. TAIDI-LASKOWSKI und R. LEVY: *Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma—long-term results of a clinical trial.* Blood, 89(9):3129–35, 1997.
- [78] HUANG, A. Y., P. GOLUMBEEK, M. AHMADZADEH, E. JAFFEE, D. PARDOLL und H. LEVITSKY: *Bone marrow-derived cells present MHC class I-restricted tumour antigens in priming of antitumour immune responses.* Ciba Found Symp, 187:229–40, 1994.
- [79] HUANG, T. H., P. Y. WU, C. N. LEE, H. I. HUANG, S. L. HSIEH, J. KUNG und M. H. TAO: *Enhanced antitumor immunity by fusion of CTLA-4 to a self tumor antigen.* Blood, 96(12):3663–70, 2000.

- [80] HUNG, C. F., W. F. CHENG, C. Y. CHAI, K. F. HSU, L. HE, M. LING und T. C. WU: *Improving vaccine potency through intercellular spreading and enhanced MHC class I presentation of antigen*. J Immunol, 166(9):5733–40, 2001.
- [81] HUNG, C. F., K. F. HSU, W. F. CHENG, C. Y. CHAI, L. HE, M. LING und T. C. WU: *Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to a gene encoding the extracellular domain of Fms-like tyrosine kinase 3-ligand*. Cancer Res, 61(3):1080–8, 2001.
- [82] HUNG, K., R. HAYASHI, A. LAFOND-WALKER, C. LOWENSTEIN, D. PARDOLL und H. LEVITSKY: *The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response*. J Exp Med, 188(12):2357–68, 1998.
- [83] HUSTON, J. S., D. LEVINSON, M. MUDGETT-HUNTER, M. S. TAI, J. NOVOTNY, M. N. MARGOLIES, R. J. RIDGE, R. E. BRUCCOLERI, E. HABER, R. CREA und ET AL.: *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 85(16):5879–83, 1988.
- [84] IWASAKI, A., C. TORRES, P. OHASHI, H. ROBINSON und B. BARBER: *The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites*. J Immunol, 159(1):11–14, 1997.
- [85] JOHNSON, G. und T. T. WU: *Kabat Database and its applications: future directions*. Nucleic Acids Res, 29(1):205–6, 2001.
- [86] KAMINSKI, M. S., K. KITAMURA, D. G. MALONEY, M. J. CAMPBELL und R. LEVY: *Importance of antibody isotype in monoclonal anti-idiotypic therapy of a murine B cell lymphoma. A study of hybridoma class switch variants*. J Immunol, 136(3):1123–30, 1986.
- [87] KETTLEBOROUGH, C. A., J. SALDANHA, K. H. ANSELL und M. M. BENDIG: *Optimization of primers for cloning libraries of mouse immunoglobulin genes using the polymerase chain reaction*. Eur J Immunol, 23(1):206–11, 1993.
- [88] KIM, J. J., M. L. BAGARAZZI, N. TRIVEDI, Y. HU, K. KAZAHAYA, D. M. WILSON, R. CICCARELLI, M. A. CHATTERGOON, K. DANG, S. MAHALINGAM, A. A. CHALIAN, M. G. AGADJANYAN, J. D. BOYER, B. WANG und D. B. WEINER: *Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes*. Nat Biotechnol, 15(7):641–6, 1997.
- [89] KIM, J. J., N. N. TRIVEDI, L. K. NOTTINGHAM, L. MORRISON, A. TSAI, Y. HU, S. MAHALINGAM, K. DANG, L. AHN, N. K. DOYLE, D. M. WILSON, M. A. CHATTERGOON, A. A. CHALIAN, J. D. BOYER, M. G. AGADJANYAN und D. B. WEINER: *Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens*. Eur J Immunol, 28(3):1089–103, 1998.
- [90] KIM, K. J., C. KANELLOPOULOS-LANGEVIN, R. M. MERWIN, D. H. SACHS und R. ASOFSKY: *Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties*. J Immunol, 122(2):549–54, 1979.

- [91] KIM, S. H., D. G. SCHINDLER, A. B. LINDNER, D. S. TAWFIK und Z. ESHHAR: *Expression and characterization of recombinant single-chain Fv and Fv fragments derived from a set of catalytic antibodies*. Mol Immunol, 34(12-13):891–906, 1997.
- [92] KING, C. A., M. B. SPELLERBERG, D. ZHU, J. RICE, S. S. SAHOTA, A. R. THOMPSETT, T. J. HAMBLIN, J. RADL und F. K. STEVENSON: *DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against lymphoma and myeloma [see comments]*. Nat Med, 4(11):1281–6, 1998.
- [93] KING, C. A., M. R. WILLS, T. J. HAMBLIN und F. K. STEVENSON: *Idiotypic IgM on a B-cell surface requires processing for recognition by anti-idiotypic T cells*. Cell Immunol, 147(2):411–24, 1993.
- [94] KLINMAN, D. M., J. M. SECHLER, J. CONOVER, M. GU und A. S. ROSENBERG: *Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory*. J Immunol, 160(5):2388–92, 1998.
- [95] KLINMAN, D. M., G. YAMSHCHIKOV und Y. ISHIGATSUBO: *Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines*. J Immunol, 158(8):3635–9, 1997.
- [96] KROLICK, K. A., P. C. ISAKSON, J. W. UHR und E. S. VITETTA: *BCL1, a murine model for chronic lymphocytic leukemia: use of the surface immunoglobulin idiotype for the detection and treatment of tumor*. Immunol Rev, 48:81–106, 1979.
- [97] KROLICK, K. A., P. C. ISAKSON, J. W. UHR und E. S. VITETTA: *Murine B cell leukemia (BCL1): organ distribution and kinetics of growth as determined by fluorescence analysis with an anti-idiotypic antibody*. J Immunol, 123(5):1928–35, 1979.
- [98] KRONENBERGER, K., A. DIECKMANN, M. SELMAYR, J. STREHL, U. WAHL, H. LINDHOFER, G. KRAAL und R. MOCIKAT: *Impact of the lymphoma idiotype on in vivo tumor protection in a vaccination model based on targeting antigens to antigen-presenting cells*. Blood, 99(4):1327–31, 2002.
- [99] KUMAR, A., R. ARORA, P. KAUR, V. S. CHAUHAN und P. SHARMA: *Universal T helper cell determinants enhance immunogenicity of a Plasmodium falciparum merozoite surface antigen peptide*. J Immunol, 148(5):1499–505, 1992.
- [100] KUSAKABE, K.-I., K.-Q. XIN, H. KATOH, K. SUMINO, E. HAGIWARA, S. KAWAMOTO, K. OKUDA, Y. MIYAGI, I. AOKI, K. NISHIOKA, D. KLINMAN und K. OKUDA: *The Timing of GM-CSF Expression Plasmid Administration Influences the Th1/Th2 Response Induced by an HIV-1-Specific DNA Vaccine*. J Immunol, 164(6):3102–3111, 2000.
- [101] KWAK, L. W., M. J. CAMPBELL, D. K. CZERWINSKI, S. HART, R. A. MILLER und R. LEVY: *Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors*. N Engl J Med, 327(17):1209–15, 1992.
- [102] KWAK, L. W., R. PENNINGTON, L. BONI, A. C. OCHOA, R. J. ROBB und M. C. POPESCU: *Liposomal formulation of a self lymphoma antigen induces potent protective antitumor immunity*. J Immunol, 160(8):3637–41, 1998.

- [103] KWAK, L. W., D. D. TAUB, P. L. DUFFEY, W. I. BENSINGER, E. M. BRYANT, C. W. REYNOLDS und D. L. LONGO: *Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunised marrow donor*. *Lancet*, 345(8956):1016–20, 1995.
- [104] KWAK, L. W., H. A. YOUNG, R. W. PENNINGTON und S. D. WEEKS: *Vaccination with syngeneic, lymphoma-derived immunoglobulin idiotype combined with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor primes mice for a protective T-cell response*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(20):10972–7, 1996.
- [105] LAEMMLI, U. K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227(259):680–5, 1970.
- [106] LARRICK, J. W., L. DANIELSSON, C. A. BRENNER, M. ABRAHAMSON, K. E. FRY und C. A. BORREBAECK: *Rapid cloning of rearranged immunoglobulin genes from human hybridoma cells using mixed primers and the polymerase chain reaction*. *Biochem Biophys Res Commun*, 160(3):1250–6, 1989.
- [107] LARSEN, D. L., N. DYBDAHL-SISSOKO, M. W. MCGREGOR, R. DRAPE, V. NEUMANN, W. F. SWAIN, D. P. LUNN und C. W. OLSEN: *Coadministration of DNA Encoding Interleukin-6 and Hemagglutinin Confers Protection from Influenza Virus Challenge in Mice*. *J. Virol.*, 72(2):1704–1708, 1998.
- [108] LAURITZSEN, G., S. WEISS, Z. DEMBIC und B. BOGEN: *Naive Idiotype-Specific CD4+ T Cells and Immunosurveillance of B-Cell Tumors*. *PNAS*, 91(12):5700–5704, 1994.
- [109] LAURITZSEN, G. F., S. WEISS und B. BOGEN: *Anti-tumour activity of idiotype-specific, MHC-restricted Th1 and Th2 clones in vitro and in vivo*. *Scand J Immunol*, 37(1):77–85, 1993.
- [110] LEUTENEGGER, C. M., F. S. BORETTI, C. N. MISLIN, J. N. FLYNN, M. SCHROFF, A. HABEL, C. JUNGHANS, S. A. KOENIG-MEREDIZ, B. SIGRIST, A. AUBERT, N. C. PEDERSEN, B. WITTIG und H. LUTZ: *Immunization of Cats against Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection by Using Minimalistic Immunogenic Defined Gene Expression Vector Vaccines Expressing FIV gp140 Alone or with Feline Interleukin-12 (IL-12), IL-16, or a CpG Motif*. *J. Virol.*, 74(22):10447–10457, 2000.
- [111] LEVITSKY, H. I., J. MONTGOMERY, M. AHMADZADEH, K. STAVELEY-O'CARROLL, F. GUARNIERI, D. L. LONGO und L. W. KWAK: *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(10):3858–65, 1996.
- [112] LEVY, R., S. LEVY, M. L. CLEARY, W. CARROLL, S. KON, J. BIRD und J. SKLAR: *Somatic mutation in human B-cell tumors*. *Immunol Rev*, 96:43–58, 1987.
- [113] LI, Y., M. BENDANDI, Y. DENG, C. DUNBAR, N. MUNSHI, S. JAGANNATH, L. W. KWAK und H. K. LYERLY: *Tumor-specific recognition of human myeloma cells by idiotype-induced CD8(+) T cells*. *Blood*, 96(8):2828–33, 2000.

- [114] LIANG, G., C. E. SALEM, M. C. YU, H. D. NGUYEN, F. A. GONZALES, T. T. NGUYEN, P. W. NICHOLS und P. A. JONES: *DNA methylation differences associated with tumor tissues identified by genome scanning analysis*. *Genomics*, 53(3):260–8, 1998.
- [115] LIESCHKE, G. J., P. K. RAO, M. K. GATELY und R. C. MULLIGAN: *Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo*. *Nat Biotechnol*, 15(1):35–40, 1997.
- [116] LU, Y., K. Q. XIN, K. HAMAJIMA, T. TSUJI, I. AOKI, J. YANG, S. SASAKI, J. FUKUSHIMA, T. YOSHIMURA, S. TODA, E. OKADA und K. OKUDA: *Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) expression plasmid enhances DNA vaccine-induced immune response against HIV-1*. *Clin Exp Immunol*, 115(2):335–41, 1999.
- [117] LUTZ, M. B., C. U. ASSMANN, G. GIROLOMONI und P. RICCIARDI-CASTAGNOLI: *Different cytokines regulate antigen uptake and presentation of a precursor dendritic cell line*. *Eur J Immunol*, 26(3):586–94, 1996.
- [118] LYMAN, S. D., L. JAMES, T. VANDEN BOS, P. DE VRIES, K. BRASEL, B. GLINIAK, L. T. HOLLINGSWORTH, K. S. PICHA, H. J. MCKENNA, R. R. SPLETT und ET AL.: *Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells*. *Cell*, 75(6):1157–67, 1993.
- [119] LYNCH, D. H., A. ANDREASEN, E. MARASKOVSKY, J. WHITMORE, R. E. MILLER und J. C. SCHUH: *Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo*. *Nat Med*, 3(6):625–31, 1997.
- [120] LYNCH, R. G., R. J. GRAFF, S. SIRISINHA, E. S. SIMMS und H. N. EISEN: *Myeloma proteins as tumor-specific transplantation antigens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(6):1540–4, 1972.
- [121] MAECKER, H. T., G. HANSEN, D. M. WALTER, R. H. DEKRUYFF, S. LEVY und D. T. UMETSU: *Vaccination with Allergen-IL-18 Fusion DNA Protects Against, and Reverses Established, Airway Hyperreactivity in a Murine Asthma Model*. *J Immunol*, 166(2):959–965, 2001.
- [122] MAECKER, H. T., D. T. UMETSU, R. H. DEKRUYFF und S. LEVY: *DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin*. *Vaccine*, 15(15):1687–96, 1997.
- [123] MANETTI, C., E. ROUVIER, E. GAUTHEROT, E. LOUCIF, J. BARBET und J. M. LE DOUSSAL: *Targeting BCL1 lymphoma with anti-idiotypic antibodies: biodistribution kinetics of directly labeled antibodies and bispecific antibody-targeted bivalent haptens*. *Int J Cancer*, 71(6):1000–9, 1997.
- [124] MATULONIS, U., C. DOSIOU, G. FREEMAN, C. LAMONT, P. MAUCH, L. M. NADLER und J. D. GRIFFIN: *B7-1 is superior to B7-2 costimulation in the induction and maintenance of T cell-mediated antileukemia immunity. Further evidence that B7-1 and B7-2 are functionally distinct*. *J Immunol*, 156(3):1126–31, 1996.

- [125] MILLER, R. A., D. G. MALONEY, R. WARNKE und R. LEVY: *Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody*. N Engl J Med, 306(9):517–22, 1982.
- [126] MIR, L. M., M. F. BUREAU, J. GEHL, R. RANGARA, D. ROUY, J.-M. CAILLAUD, P. DELAERE, D. BRANELLEC, B. SCHWARTZ und D. SCHERMAN: *High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses*. PNAS, 96(8):4262–4267, 1999.
- [127] MURASE, T., R. L. JIRTLE und G. B. McDONALD: *Transforming growth factor-beta plasma concentrations in patients with leukemia and lymphoma receiving chemoradiotherapy and marrow transplantation*. Blood, 83(8):2383, 1994.
- [128] NELSON, E. L., X. LI, F. J. HSU, L. W. KWAK, R. LEVY, C. CLAYBERGER und A. M. KRENSKY: *Tumor-specific, cytotoxic T-lymphocyte response after idiotype vaccination for B-cell, non-Hodgkin's lymphoma*. Blood, 88(2):580–9, 1996.
- [129] ORLANDI, R., D. H. GUSSOW, P. T. JONES und G. WINTER: *Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 86(10):3833–7, 1989.
- [130] OSTERBORG, A., Q. YI, L. HENRIKSSON, J. FAGERBERG, S. BERGENBRANT, M. JEDDI-TEHRANI, U. RUDEN, A. K. LEFVERT, G. HOLM und H. MELLSTEDT: *Idiotypic immunization combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in myeloma patients induced type I, major histocompatibility complex-restricted, CD8- and CD4-specific T-cell responses*. Blood, 91(7):2459–66, 1998.
- [131] OSTERROTH, F., A. GARBE, P. FISCH und H. VEELKEN: *Stimulation of cytotoxic T cells against idiotype immunoglobulin of malignant lymphoma with protein-pulsed or idiotype-transduced dendritic cells*. Blood, 95(4):1342–9, 2000.
- [132] PANINA-BORDIGNON, P., A. TAN, A. TERMIJTELEN, S. DEMOTZ, G. CORRADIN und A. LANZAVECCHIA: *Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells*. Eur J Immunol, 19(12):2237–42, 1989.
- [133] PERTMER, T. M., T. R. ROBERTS und J. R. HAYNES: *Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery*. J Virol, 70(9):6119–25, 1996.
- [134] PORGADOR, A., K. R. IRVINE, A. IWASAKI, B. H. BARBER, N. P. RESTIFO und R. N. GERMAIN: *Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization*. J Exp Med, 188(6):1075–82, 1998.
- [135] PULENDRAN, B., J. L. SMITH, G. CASPARY, K. BRASEL, D. PETTIT, E. MARASKOVSKY und C. R. MALISZEWSKI: *Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo*. PNAS, 96(3):1036–1041, 1999.

- [136] RANIERI, E., W. HERR, A. GAMBOTTO, W. OLSON, D. ROWE, P. D. ROBBINS, L. S. KIERSTEAD, S. C. WATKINS, L. GESUALDO und W. J. STORKUS: *Dendritic cells transduced with an adenovirus vector encoding Epstein- Barr virus latent membrane protein 2B: a new modality for vaccination*. J Virol, 73(12):10416–25, 1999.
- [137] RAO, K. V. und A. R. NAYAK: *Enhanced immunogenicity of a sequence derived from hepatitis B virus surface antigen in a composite peptide that includes the immunostimulatory region from human interleukin 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(14):5519–22, 1990.
- [138] RAZ, E., A. WATANABE, S. M. BAIRD, R. A. EISENBERG, T. B. PARR, M. LOTZ, T. J. KIPPS und D. A. CARSON: *Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 90(10):4523–7, 1993.
- [139] REITAN, S. K. und K. HANNESTAD: *A syngeneic idiotypic is immunogenic when borne by IgM but tolerogenic when joined to IgG*. Eur J Immunol, 25(6):1601–8, 1995.
- [140] RIEDE, U. N. und H.-E. SCHÄFER: *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag, 4 Aufl., 1995.
- [141] RODRIGUEZ, F., J. ZHANG und J. L. WHITTON: *DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction*. J Virol, 71(11):8497–503, 1997.
- [142] ROMANOS, M. A., A. J. MAKOFF, N. F. FAIRWEATHER, K. M. BEESLEY, D. E. SLATER, F. B. RAYMENT, M. M. PAYNE und J. J. CLARE: *Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA*. Nucleic Acids Res, 19(7):1461–7, 1991.
- [143] ROSS, T. M., Y. XU, R. A. BRIGHT und H. L. ROBINSON: *C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge*. Nat Immunol, 1(2):127–31, 2000.
- [144] ROUSSEAU, J., G. BISERTE und H. BAZIN: *The differential enzyme sensitivity of rat immunoglobulin G subclasses to papain and pepsin*. Mol Immunol, 17(4):469–82, 1980.
- [145] ROUSSEAU, J., R. ROUSSEAU-PREVOST und H. BAZIN: *Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')₂ fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses*. J Immunol Methods, 64(1-2):141–6, 1983.
- [146] SAIKI, R. K., S. SCHARF, F. FALOONA, K. B. MULLIS, G. T. HORN, H. A. ERLICH und N. ARNHEIM: *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 230(4732):1350–4, 1985.
- [147] SAMBROOK, J., E. FRITSCH und T. MANIATIS: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2 Aufl., 1989.

- [148] SATO, Y., M. ROMAN, H. TIGHE, D. LEE, M. CORR, M. D. NGUYEN, G. J. SILVERMAN, M. LOTZ, D. A. CARSON und E. RAZ: *Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization*. *Science*, 273(5273):352–4, 1996.
- [149] SAVELYEVA, N., R. MUNDAY, M. B. SPELLERBERG, G. P. LOMONOSSOFF und F. K. STEVENSON: *Plant viral genes in DNA idiotypic vaccines activate linked CD4+ T-cell mediated immunity against B-cell malignancies*. *Nat Biotechnol*, 19(8):760–4, 2001.
- [150] SCHAGGER, H. und G. VON JAGOW: *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. *Anal Biochem*, 166(2):368–79, 1987.
- [151] SCHIRMBECK, R., K. MELBER, A. KUHROBER, Z. A. JANOWICZ und J. REIMANN: *Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo*. *J Immunol*, 152(3):1110–9, 1994.
- [152] SCHULTZE, J. L.: *Why do B cell lymphoma fail to elicit clinically sufficient T cell immune responses?*. *Leuk Lymphoma*, 32(3-4):223–36, 1999.
- [153] SCHULTZE, J. L., A. A. CARDOSO, G. J. FREEMAN, M. J. SEAMON, J. DALEY, G. S. PINKUS, J. G. GRIBBEN und L. M. NADLER: *Follicular lymphomas can be induced to present alloantigen efficiently: a conceptual model to improve their tumor immunogenicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(18):8200–4, 1995.
- [154] SCHULTZE, J. L. und L. M. NADLER: *T cell mediated immunotherapy for B cell lymphoma*. *J Mol Med*, 77(3):322–31, 1999.
- [155] SCHULTZE, J. L., M. J. SEAMON, S. MICHALAK, J. G. GRIBBEN und L. M. NADLER: *Autologous tumor infiltrating T cells cytotoxic for follicular lymphoma cells can be expanded in vitro*. *Blood*, 89(10):3806–16, 1997.
- [156] SCHWARZE, S. R., A. HO, A. VOCERO-AKBANI und S. F. DOWDY: *In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse [see comments]*. *Science*, 285(5433):1569–72, 1999.
- [157] SELMAYR, M., J. STREHL, J. P. KREMER, E. KREMMER, A. DOENECKE, M. HALLEK, H. MENZEL, K. THIELEMANS, S. THIERFELDER und R. MOCIKAT: *Induction of tumor immunity by autologous B lymphoma cells expressing a genetically engineered idioype*. *Gene Ther*, 6(5):778–84, 1999.
- [158] SHICHIJO, S., R. TSUNOSUE, K. MASUOKA, H. NATORI, M. TAMAI, J. MIYAJIMA, K. SAGAWA und K. ITOH: *Expression of the MAGE gene family in human lymphocytic leukemia*. *Cancer Immunol Immunother*, 41(2):90–103, 1995.
- [159] SHIMADA, S., O. YANO, H. INOUE, E. KURAMOTO, T. FUKUDA, H. YAMAMOTO, T. KATAOKA und T. TOKUNAGA: *Antitumor activity of the DNA fraction from Mycobacterium bovis BCG. II. Effects on various syngeneic mouse tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 74(3):681–8, 1985.

- [160] SIN, J.-I., J. KIM, C. PATCHUK und D. B. WEINER: *Interleukin 7 Can Enhance Antigen-Specific Cytotoxic-T-Lymphocyte and/or Th2-Type Immune Responses In Vivo*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 7(5):751–758, 2000.
- [161] SIN, J. I., J. J. KIM, R. L. ARNOLD, K. E. SHROFF, D. MCCALLUS, C. PACHUK, S. P. MCELHINEY, M. W. WOLF, S. J. POMPA-DE BRUIN, T. J. HIGGINS, R. B. CICCARELLI und D. B. WEINER: *IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model: IL-12 enhances Th1-type CD4+ T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge*. J Immunol, 162(5):2912–21, 1999.
- [162] SIN, J. I., J. J. KIM, J. D. BOYER, R. B. CICCARELLI, T. J. HIGGINS und D. B. WEINER: *In vivo modulation of vaccine-induced immune responses toward a Th1 phenotype increases potency and vaccine effectiveness in a herpes simplex virus type 2 mouse model*. J Virol, 73(1):501–9, 1999.
- [163] SIN, J.-I., J. J. KIM, C. PACHUK, C. SATISHCHANDRAN und D. B. WEINER: *DNA Vaccines Encoding Interleukin-8 and RANTES Enhance Antigen-Specific Th1-Type CD4+ T-Cell-Mediated Protective Immunity against Herpes Simplex Virus Type 2 In Vivo*. J. Virol., 74(23):11173–11180, 2000.
- [164] SINGH, M. und D. O'HAGAN: *Advances in vaccine adjuvants*. Nat Biotechnol, 17(11):1075–81, 1999.
- [165] SKERRA, A. und A. PLUCKTHUN: *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*. Science, 240(4855):1038–41, 1988.
- [166] SPELLERBERG, M. B., D. ZHU, A. THOMPSETT, C. A. KING, T. J. HAMBLIN und F. K. STEVENSON: *DNA vaccines against lymphoma: promotion of anti-idiotypic antibody responses induced by single chain Fv genes by fusion to tetanus toxin fragment C*. J Immunol, 159(4):1885–92, 1997.
- [167] SPOONCER, E., C. M. HEYWORTH, A. DUNN und T. M. DEXTER: *Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors*. Differentiation, 31(2):111–8, 1986.
- [168] STEVENSON, F. K., D. ZHU, C. A. KING, L. J. ASHWORTH, S. KUMAR und R. E. HAWKINS: *Idiotypic DNA vaccines against B-cell lymphoma*. Immunol Rev, 145:211–28, 1995.
- [169] STORKUS, W. J., R. ZEH, H. J., R. D. SALTER und M. T. LOTZE: *Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution*. J Immunother, 14(2):94–103, 1993.
- [170] STRATFORD, R., G. DOUCE, L. ZHANG-BARBER, N. FAIRWEATHER, J. ESKOLA und G. DOUGAN: *Influence of codon usage on the immunogenicity of a DNA vaccine against tetanus*. Vaccine, 19(7-8):810–5, 2000.
- [171] SYRENGELAS, A. D., T. T. CHEN und R. LEVY: *DNA immunization induces protective immunity against B-cell lymphoma*. Nat Med, 2(9):1038–41, 1996.

- [172] SYRENGELAS, A. D. und R. LEVY: *DNA vaccination against the idiootype of a murine B cell lymphoma: mechanism of tumor protection*. J Immunol, 162(8):4790–5, 1999.
- [173] TANG, D. C., M. DEVIT und S. A. JOHNSTON: *Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response*. Nature, 356(6365):152–4, 1992.
- [174] TAO, M. H. und R. LEVY: *Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma*. Nature, 362(6422):755–8, 1993.
- [175] TIGHE, H., M. CORR, M. ROMAN und E. RAZ: *Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint*. Immunology Today, 19(2):89–97, 1998.
- [176] TIMMERMAN, J. M., C. B. CASPAR, S. L. LAMBERT, A. D. SYRENGELAS und R. LEVY: *Idiotype-encoding recombinant adenoviruses provide protective immunity against murine B-cell lymphomas*. Blood, 97(5):1370–7, 2001.
- [177] TIMMERMAN, J. M. und R. LEVY: *Linkage of Foreign Carrier Protein to a Self-Tumor Antigen Enhances the Immunogenicity of a Pulsed Dendritic Cell Vaccine*. J Immunol, 164(9):4797–4803, 2000.
- [178] TIOLLAIS, P., C. POURCEL und A. DEJEAN: *The hepatitis B virus*. Nature, 317(6037):489–95, 1985.
- [179] TORRES, C., A. IWASAKI, B. BARBER und H. ROBINSON: *Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations*. J Immunol, 158(10):4529–4532, 1997.
- [180] TROJAN, A., J. L. SCHULTZE, M. WITZENS, R. H. VONDERHEIDE, M. LADETTO, J. W. DONOVAN und J. G. GRIBBEN: *Immunoglobulin framework-derived peptides function as cytotoxic T-cell epitopes commonly expressed in B-cell malignancies*. Nat Med, 6(6):667–72, 2000.
- [181] ULMER, J. B., J. J. DONNELLY, S. E. PARKER, G. H. RHODES, P. L. FELGNER, V. J. DWARKI, S. H. GROMKOWSKI, R. R. DECK, C. M. DEWITT, A. FRIEDMAN und ET AL.: *Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein [see comments]*. Science, 259(5102):1745–9, 1993.
- [182] VALMORI, D., A. PESSI, E. BIANCHI und G. CORRADIN: *Use of human universally antigenic tetanus toxin T cell epitopes as carriers for human vaccination*. J Immunol, 149(2):717–21, 1992.
- [183] VEIBY, O. P., F. W. JACOBSEN, L. CUI, S. D. LYMAN und S. E. JACOBSEN: *The flt3 ligand promotes the survival of primitive hemopoietic progenitor cells with myeloid as well as B lymphoid potential. Suppression of apoptosis and counteraction by TNF-alpha and TGF-beta*. J Immunol, 157(7):2953–60, 1996.
- [184] WANG, R. F. und S. A. ROSENBERG: *Human tumor antigens for cancer vaccine development*. Immunol Rev, 170:85–100, 1999.
- [185] WATANABE, A., E. RAZ, H. KOHSAKA, H. TIGHE, S. M. BAIRD, T. J. KIPPS und D. A. CARSON: *Induction of antibodies to a kappa V region by gene immunization*. J Immunol, 151(5):2871–6, 1993.

- [186] WEBER, J. S., J. C. YANG, S. L. TOPALIAN, D. J. SCHWARTZENTRUBER, D. E. WHITE und S. A. ROSENBERG: *The use of interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Oncol, 10(1):33–40, 1992.
- [187] WEISS, S. und B. BOGEN: *B-lymphoma cells process and present their endogenous immunoglobulin to major histocompatibility complex-restricted T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 86(1):282–6, 1989.
- [188] WEISS, S. und B. BOGEN: *MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen*. Cell, 64(4):767–76, 1991.
- [189] WEN, Y. J., B. BARLOGIE und Q. YI: *Idiotype-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: evidence for their capacity to lyse autologous primary tumor cells*. Blood, 97(6):1750–5, 2001.
- [190] WEN, Y. J. und S. H. LIM: *T cells recognize the VH complementarity-determining region 3 of the idiotypic protein of B cell non-Hodgkin's lymphoma*. Eur J Immunol, 27(4):1043–7, 1997.
- [191] WILSON, A., A. J. GEORGE, C. A. KING und F. K. STEVENSON: *Recognition of a B cell lymphoma by anti-idiotypic T cells*. J Immunol, 145(11):3937–43, 1990.
- [192] WOLFF, J. A., R. W. MALONE, P. WILLIAMS, W. CHONG, G. ACSADI, A. JANI und P. L. FELGNER: *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. Science, 247(4949 Pt 1):1465–8, 1990.
- [193] XIANG, Z. und H. C. ERTL: *Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines*. Immunity, 2(2):129–35, 1995.
- [194] XIANG, Z. Q., S. PASQUINI und H. C. J. ERTL: *Induction of Genital Immunity by DNA Priming and Intranasal Booster Immunization with a Replication-Defective Adenoviral Recombinant*. J Immunol, 162(11):6716–6723, 1999.
- [195] YANG, N. S., J. BURKHOLDER, B. ROBERTS, B. MARTINELL und D. MCCABE: *In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(24):9568–72, 1990.
- [196] YANG, N. S. und W. H. SUN: *Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy*. Nat Med, 1(5):481–3, 1995.
- [197] YOKOTA, K., K. ARIIZUMI, T. KITAJIMA, P. R. BERGSTRESSER, N. E. STREET und A. TAKASHIMA: *Cytokine-mediated communication between dendritic epidermal T cells and Langerhans cells. In vitro studies using cell lines*. J Immunol, 157(4):1529–37, 1996.

8 Anhang

8.1 Verwendete Oligonukleotide

Idiotyp-Primer:

A20-ATG-AflII:

5' -ACTTAAGATGGCATCGAACTTCATCATGGT-3'

A20-TAG-SapI:

5' -GCTCTTCTACCGTTTGACTTCCAGCTTGGTGCC-3'

scVL-BCL1-linker:

5' -TCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTCAGGCTGTTGTGACTCAGGAA-3'

scHSJH-45-linker:

5' -CGACCCACCACCGCCCGAGCCACCGCCACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTCCC-3'

scVK-4A:

5' -TCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTGACATC GTGATGACCCAGTCTCCA-3'

scVH-A20-FOR:

5' -TCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGCGGATCTGATGTTGTGATGACCCAGACT-3'

scVH-A20-BACK:

5' -CGACCCACCACCGCCCGAGCCACCGCCACCTGAGGAGACTGTGAGTTCGGT-3'

scVH-BCL1-BACK-richtig:

5' -CGACCCACCACCGCCCGAGCCACCGCCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCCTTG-3'

A20-GS??????:

5' -TCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGCGGATCTggtagcGATGTTGTGATGACCCAGACT-3'

scHSVK-4Aneu:

5' -GGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTGACATCGTGATGACCCAGTCTCCA-3'

Daudi-VH-sense-AflII:

5' -CCTTAAGGACTGCACACAGAGAACTCACCATGG-3'

Daudi-VK-TGA-sap:

5' -GCTCTTCTACCGTTTGTGTCACCTTGGTCCC-3'

scVK-A20-link+GS:

5' -TCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTGGTAGCGATGTTGTGATGACCCAGACT-3'

sap-A20-mat:

5' -GGCTCTTCAGGTCCGCGGGACCGGTCCAATTGCAACAGTCCGGG-3'

A20-SacII-anti:

5' -CCGCGGGCCGTTTGACTTCCAGCTTGGTGCC-3'

A20-TAG-NotI:

5' -GCGGCCGCTACCGTTTGGACTTCCAGCTTGGTGC-3'

A20-AflII-Koz:

5' -CCTTAAGCAGGACCTCACCATGGCATCGAACTTCATCATGG-3'

VH-BCL1-FOR:

5' -CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCT-3'

VH-BCL1-BACK:

5' -TGAGGAGACTGTGAGAGTGGT-3'

VL-BCL1-FOR:

5' -CAGGCTGTTGTGACTCAGGAA-3'

VL-BCL1-BACK:

5' -GCCTAGGACAGTCAGTTTGGT-3'

Zytokine:mIL12-mat-SapI:

5' -GGCTCTTCAGGTCCGCGGGAATGTGGGAGCTGGAGAAAGACG-3'

IL12p35-for-TGA-NotI:

5' -TGGCGGCCGCTCAGGCGGAGCTCAGATAGCCCATCACCC-3'

mIL12p40-Leader-NcoI-back:

5' -ACCATGGGTCCCTCAGAAGCTAACCATCTCC-3'

mIL12sc-p40-for:

5' -CGACCCACCACCGCCCGAGCCACCGCCACCGGATCGGACCCTGCAGGGAACACATGC-3'

mGM-CSF-mat-SapI:

5' -GGCTCTTCAGGTCCGCGGGA GCACCCACCCGCTCACCCATCAC-3'

mGMCSF-TGA-NotI:

5' -GCGGCCGCGATTCAGAGCTGGCCTGGGCTTCC-3'

mIL4-mat-SapI:

5' -GGCTCTTCAGGTCCGCGGGACATATCCACGGATGCGACAAAAATC-3'

mIL4-TGA-NotI:

5' -GCGGCCGCGATGGTGGCTCAGTACTACGAG-3'

mGM-CSF-mat-SapI:

5' -GGCTCTTCAGGTCCGCGGGAGCACCCACCCGCTCACCCATCAC-3'

mGMCSF-TGA-NotI:

5' -GCGGCCGCGATTCAGAGCTGGCCTGGGCTTCC-3'

mIL4-mat-Sap:

5' -GGCTCTTCAGGTCCGCGGGACATATCCACGGATGCCACAAAAATC-3'

mIL4-TGA-NotI:

5' -GCGGCCGCGATGGTGGCTCAGTACTACGAG-3'

scIL12-Sap:

5' -GGCTCTTCAGGTCCGCGGGACATGTGGGAGCTGGAGAAAGACG-3'

mIL4-Eco-ATG:

5' -CAGAATTCACGGCACAGAGCTATTGATGGG-3'

mIL4-Eco-TGA:

5' -CTGAATTCGCATGGTGGCTCAGTACTACG-3'

mGM-CSF-Eco-ATG:

5' -GAGAATTC AAGTCCCTGAGGAGGATGTGGC-3'

mGM-CSF-Eco-TGA:

5' -GAGAATTCAGAGCTGGCCTGGGCTTCC-3'

sap-mFltL:

5' -GGCTCTTCAGGTCCGCGGGAGGGACACCTGACTGTTACTTCAGC-3'

mFltL-TGA-N1:

5' -GGCGGCCGCTCACAGCAGGGTGGAGGAGTCC-3'

mFlt3l-back:

5' -CCTGTCACAGGCATGAGGGGTCC-3'

mFlt3l-for:

5' -GGCTGAGTCAACGATGCACAAGGC-3'

mIL12p40-Leader-NcoI-back:

5' -ACCATGGGTCCCTCAGAAGCTAACCATCTCC-3'

mIL12sc-p40-for:

5' -CGACCCACCACCGCCCGAGCCACCGCCACCGGATCGGACCCTGCAGGGAACACATGC-3'

mIL12sc-p35-back:

5' -TCGGGCGGTGGTGGGTTCGGGTGGCGGCGGATCTAGGGTCATTCCAGTCTCTGGACCTGCC-3'

mIL12p35-SpeI-for:

5' -ACTAGTGGCGGAGCTCAGATAGCCCATCACCC-3'

IL1beta-SapI-sense:

5' -GGTCCGCGGGAGTTCAGGGTGAAGAAAGTAACGATAAATGA-3'

IL1beta-TGA-NotI:

5' -GGCCTCATTTATCGTTACTTTCTTCACCCTGAACTCCCGCGG-3'

GM-CSF-Mutagenese:

CSF-E21K-sense:

5' -GGCCATCAAAAAGGCCCTGAACCTCC-3'

CSF-E21K-anti:

5' -GGAGGTTTCAGGGCCTTTTTGATGGCC-3'

26.6.99

CSF-21Ksense:

5' -AAGGCCCTGAACCTCCTGGATGACATGCC-3'

CSF-anti(-20K):

5' -TTTGATGGCCTCTACATGCTTCCAAGGCCGG-3'

RACE-Primer:

RACE-Anchor:

5' -CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'

(I=Inosin)

mouseIgK/2:

5' -GTCGTTCACTGCCATCAATCTTCC-3'

mouseIgK/1:

5' -GGGTGAAGTTGATGTCTTGTGAGTGGC-3'

mouseIgL/1:

5' -GAGCTC (CT) TCAGAGGAAGGTGGAAAC-3'

gfp-SacII:

5' -CCGCGGGAATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAC-3'

gfp-TGA-NotI:

5' -GGCGGCCGCTCAATGCATGCCATGTGTAATCCC-3'

FragC-SacII-sense-R:

5' -CCGCGGGAAAAATCTGGATTGTTGGGTTG ATAATG-3'

FragC-SacII-for:

5' -CCGCGGGATCATTTGTCCATCCTTCATCTGTAG-3'

FragC-TGA-NotI:

5' -GGCGGCCGCTCAATCATTTGTCCATCCTTCATCTGTAG-3'

HBsAg-SacII-sense:

5' -GCTACCGCGGGAATGGAGACCATCACATCAGGATTCC-3'

HBsAg-SacII-anti:

5' -TACCGCGGGAATGTATACCCAAAGACAAAAGAAAATTGG-3'

HBsAg-TGA-NotI:

5' -ATGCGGCCGCTAAATGTATACCCAAAGACAAAAGAAAATTGG-3'

Sequenzierprimer:

BGH-rev:

5' -TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

T7:

5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'

FragC-284:

5' -TTAGCTTTTGGTTGAGGGTTCC-3'

FragC/434:

5' -GGACTTTAAAAGATTCCGCGGG-3'

A20-511:

5' -GCCGTCAGTCTTGGAGATCACG-3'

BCL-523:

5' - AACAGTCACACTCACTTGTCG - 3'

scIL12-785-anti:

5' - TTGAGGGAGAAGTAGGAATGGG - 3'

8.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
APC	Antigen Präsentierende Zelle
APS	Amoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
Aminosäuren:	
A (Ala)	Alanin
C (Cys)	Cystein
D (Asp)	Asparaginsäure
E (Glu)	Glutaminsäure
F (Phe)	Phenylalanin
G (Gly)	Glycin
H (His)	Histidin
I (Ile)	Isoleucin
K (Lys)	Lysin
L (Leu)	Leucin
M (Met)	Methionin
N (Asn)	Asparagin
P (Pro)	Prolin
Q (Gln)	Glutamin
R (Arg)	Arginin
S (Ser)	Serin
T (Thr)	Threonin
V (Val)	Valin
W (Trp)	Tryptophan
Y (Tyr)	Tyrosin
Basen:	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
N	A, C, G oder T
I	Inosin

BBS	BES-gepuffertes Salz
BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	zur RNA komplementäre DNA (complementary DNA)
CDR	complementarity determining region
CFA	complete Freund's adjuvant
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
Ci	Curie ($3.7 * 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde)
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
cmp	radioaktive Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CMV	Cytomegalievirus
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
ddNTP	Didesoxynucleotid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid
ds	Doppelstrang
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETDA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
ELISPOT	
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Foetales Kälberserum
FR	Framework Region
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde
HBsAg	Hepatitis B Surface Antigen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Human Immundeficiency Virus
Id	Idiotyp

i.d.	intradermal
i.p.	intraperitoneal
ISS	Immunstimulatorische Sequence
i.v.	intravenös
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
l	Liter
LB	Luria-Bertani (Medium)
LC	Langerhans-Zelle
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
mm	Millimeter
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
NK Zelle	natürliche Killerzelle
nls	nuclear localisation sequence
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung
PBL	Periphere Blutleukozyten
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
PHA	Phytohemagglutinin
Poly(A)	Polyadenylat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
scFv	single chain Fragment der variablen Domäne
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
s.c.	subkutan

ss	Einzelstrang
t	Zeit
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-ETDA-Puffer
TdT	Terminale Didesoxy Transferase
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumenanteile einer Flüssigkeit in einer Lösung (volume per volume)
w/v	Gewichtsanteil eines Stoffes in einer Lösung (weight per volume)
W	Watt

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: **Dieter Johannes Edbauer**

Geburtsdatum: 27. November 1976

Geburtsort: München

Ausbildung:

1986-1994 Carl-Spitzweg-Gymnasium Germering
07/1994 Abitur (Note 1.0)
11/1994-10/2000 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
08/1996 Physikum (Note 2)
04/1997 Vordiplom in Physik (Note 2)
08/1997 1. Abschnitt der Medizinischen Prüfung (Note 2)
09/1999 2. Abschnitt der Medizinischen Prüfung (Note 3)
10/1999-09/2000 Praktisches Jahr:
1. Tertial: Dr. von Haunersches Kinderspital, München
2. Tertial: Medizinische Klinik 3, Großhadern
3. Tertial: Chirurgische Klinik und Poliklinik, Großhadern
10/2000 3. Abschnitt der Medizinischen Prüfung (Note 1)
08/1998-03/2001 Promotionsarbeit (Dr. med.) unter Anleitung von Prof. Dr. Michael Hallek am Genzentrum der LMU-München.
04/2001-9/2002 Arzt im Praktikum (Adolf Butenandt Institut und Neurologie Großhadern)
10/2002-jetzt wissenschaftlicher Mitarbeiter im Adolf Butenandt Institut (Lehrstuhl Prof. Haass)

8.4 Schriftenverzeichnis:

1. Poster Präsentation auf dem Jahreskongreß der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO): D. Edbauer, A. Doenecke, R. Mocikat, T. Röhnisch, W. Hidemann, und M. Hallek, *DNA-Vaccination with Idiotypic (Id)-Cytokine fusion constructs*. Jena, 1999.
2. D. Edbauer, M. Willem, S. Lammich, H. Steiner, und C. Haass: *Insulin-degrading Enzyme Rapidly Removes the β -Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD)*. J. Biol. Chem. 277: 13389-13393, 2002.
3. T. Möhlmann, E. Winkler, X. Xia, D. Edbauer, J. Murrel, A. Capell, C. Kaether, H. Zheng, B. Ghetti, C. Haass, und H. Steiner: *Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of Notch and APP intracellular domains independent of their effect on A β 42 production*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99: 8025-8030, 2002.
4. D. Edbauer, E. Winkler, C. Haass, H. Steiner: *Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 8666-8671, 2002.
5. C. Kaether, S. Lammich, D. Edbauer, M. Ertl, J. Rietdorf, A. Capell, H. Steiner, und C. Haass: *Presenilin-1 affects trafficking and processing of β -APP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane*. J. Cell Biol., 158: 551-561, 2002.
6. H. Steiner, E. Winkler, D. Edbauer, S. Prokop, G. Basset, A. Yamasaki, M. Kostka, und C. Haass: *PEN-2 is an integral component of the γ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin*. J. Biol. Chem., 277: 39062-39065, 2002
7. S. Lammich, M. Okochi, M. Takeda, C. Kaether, A. Capell, A.-K. Zimmer, D. Edbauer, J. Walter, H. Steiner, und C. Haass: *Presenilin dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide*. J. Biol. Chem., 277: 44754-9, 2002