

Einfluss der Aktivität von BCR-ABL  
auf die Immunogenität von Zellen der  
Chronisch Myeloischen Leukämie

der Fakultät für Biologie  
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

von

**Katharina Maria Brauer**

aus Hamburg

vorgelegte

**D i s s e r t a t i o n**

2008

Tag der mündlichen Prüfung:

04.02.2008

Dekan:

Prof. Dr. H. A. Mallot

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-G. Rammensee

Für meinen Opa  
Dr. Otto Braun

und meine ganze Familie



# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
VORBEMERKUNG.....	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Chronische Myeloische Leukämie .....	1
1.1.1 Klinische Grundlagen der CML.....	1
1.1.2 Molekulare Grundlagen der CML.....	1
1.1.3 Ph-negative CML.....	4
1.2 Therapie der CML .....	4
1.2.1 Therapie vor 2001 .....	4
1.2.2 Imatinib.....	5
1.2.2.1 Resistenzentwicklung gegen Imatinib.....	6
1.2.3 Neue Tyrosinkinaseinhibitoren .....	7
1.2.4 Kombinationstherapien.....	7
1.2.5 Allogene Stammzelltransplantation .....	8
1.3 Immunantwort gegen CML.....	9
1.3.1 Einfluss von Imatinib auf Zellen des Immunsystems .....	9
1.3.2 Immunantwort unter Therapie .....	9
1.3.3 Immuntherapeutische Strategien.....	10
1.4 Ziele der Arbeit.....	12
2 MATERIAL.....	13
2.1 Geräte .....	13
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	13
2.3 Chemikalien .....	14
2.4 Medien und Reagenzien .....	14
2.4.1 Zellkultur.....	14
2.4.2 Molekularbiologie.....	15
2.4.2.1 Reaktionskits.....	15
2.4.2.2 Oligonukleotide .....	15
2.4.3 Proteinbiochemie.....	16
2.4.4 Antikörper .....	17
2.4.4.1 unkonjugierte Antikörper .....	17

2.4.4.2 konjugierte Antikörper .....	18
2.5 Puffer und Stammlösungen .....	18
2.6 Zellen.....	22
3. METHODEN .....	23
3.1 Zellbiologische Methoden.....	23
3.1.1 Zellkultivierung .....	23
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	23
3.1.3 Isolation mononukleärer Zellen.....	23
3.1.4 Generierung reifer dendritischer Zellen aus Monozyten .....	24
3.1.5 Isolation primärer Zellen .....	24
3.1.6 Durchflusszytometrie .....	24
3.1.6.1 Messung der Oberflächenexpression von Antigenen .....	25
3.1.6.2 Durchflusszytometrische Messung der Apoptose.....	25
3.1.7 Transfektion von DCs mit RNA .....	26
3.1.8 Transfektion von CML-Zelllinien mit siRNA.....	26
3.1.9 Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten mittels RNA-transfizierter DCs .....	27
3.1.10 Standard <sup>51</sup> Cr-release Assays .....	27
3.1.11 IFN- $\gamma$ Elispot Assay .....	28
3.2 Molekularbiologische Methoden .....	29
3.2.1 Herstellung von Zelllysaten.....	29
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	29
3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
3.2.4 Western Blot .....	30
3.2.5 RNA-Isolation.....	31
3.2.6 Herstellung von cDNA.....	31
3.2.7 Quantitative Real-time PCR.....	32
3.2.8 Herstellung von <i>in vitro</i> -Transkripten (IVT) .....	33
4 ERGEBNISSE.....	35
4.1 Einfluss von Imatinib auf CML-Zellen .....	35
4.1.1 Apoptoseinduktion durch Imatinib in K-562- und K-562R-Zellen .....	35
4.1.2 Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten gegen Antigene aus mit Imatinib behandelten K-562- und K-562R-Zellen .....	36
4.1.2.1 Lytische Aktivität.....	36
4.1.2.2 Spezifität gegenüber definierten Antigenen.....	38

4.1.3 Expression von Tumorantigenen in K-562- und K-562R-Zellen nach Behandlung mit Imatinib .....	39
4.1.4 Erkennung von Targetzellen mit dem Antigenprofil primärer CML-Zellen .....	42
4.1.5 Expression von Tumorantigenen in primären CML-Zellen nach Behandlung mit Imatinib .....	43
4.2 Einfluss von Apoptose und Zellzyklusarrest auf die Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten .....	44
4.2.1 Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest .....	44
4.2.2 Einfluss von Apoptose und Zellzyklusarrest auf die Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten .....	46
4.3 Einfluss der Depletion von BCR-ABL in K-562- und K-562R-Zellen .....	47
4.3.1 Depletion der BCR-ABL-Expression in K-562- und K-562R-Zellen .....	47
4.3.2 Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten gegen Antigene aus mit siRNA transfizierten K-562- und K-562R-Zellen .....	49
4.3.3 Expression von Tumorantigenen in K-562- und K-562R-Zellen nach Depletion der BCR-ABL-Expression durch spezifische siRNA .....	51
5 DISKUSSION .....	53
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	59
7 SUMMARY .....	61
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	63
9 LITERATUR.....	67
10 DANKSAGUNG .....	79
11 LEBENSLAUF .....	81



## VORBEMERKUNG

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

**Brauer KM**, Werth D, von Schwarzenberg K, Bringmann A, Kanz L, Grünebach F, and Brossart P. BCR-ABL activity is critical for the immunogenicity of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.* 2007;67:5489-5497.



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Chronische Myeloische Leukämie

### 1.1.1 Klinische Grundlagen der CML

Die CML ist eine klonale Veränderung der Hämatopoese und gehört zu den chronischen myeloproliferativen Erkrankungen. Sie ist durch eine periphere Leukozytose mit einer Ausschwemmung myeloischer Zellen aller Reifungsstadien gekennzeichnet und beruht auf einer stark gesteigerten Myelopoese im Knochenmark. Der Verlauf ist zwei- oder dreiphasig mit einer meist mehrjährigen chronischen Phase, die entweder allmählich über eine Akzelerationsphase oder direkt in die Blastenkrise übergehen kann. Das klinische Bild ist in der chronischen Phase durch unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Gewichtsverlust oder Leistungsabfall gekennzeichnet (Hochhaus et al., 2004). Bei mehr als der Hälfte der Patienten wird die Diagnose in dieser Phase bei Routineuntersuchungen gestellt. Die wichtigsten Diagnosekriterien sind Leukozytose mit gehäuften Auftreten von myeloischen Vorstufen im peripheren Blut, Splenomegalie, Auftreten des Philadelphia-Chromosoms oder des *BCR-ABL*-Transkripts, sowie ein hyperzelluläres Knochenmark. In der akzelerierten Phase erhöhen sich die Anteile unreifer Vorstufen im Blut und im Knochenmark, die Leukozytose verschlechtert sich und wird häufig von einer Thrombozytopenie begleitet. Der plötzliche Übergang in die Blastenkrise ist durch einen Anteil von  $\geq 30\%$  Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark, sowie blastäre Infiltrate außerhalb von Lymphknoten oder Milz gekennzeichnet (Hochhaus et al., 2004). Das mediane Überleben unter Therapie beträgt in der Blastenkrise 3-9 Monate (Sacchi et al., 1999; Sawyers et al., 2002).

### 1.1.2 Molekulare Grundlagen der CML

Das zytogenetische Charakteristikum der CML ist das sog. Philadelphia-Chromosom (Ph). Das Ph ist ein verkürztes Chromosom 22, das durch eine erworbene reziproke Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22,  $t(9;22)(q34;q11)$ , entsteht.

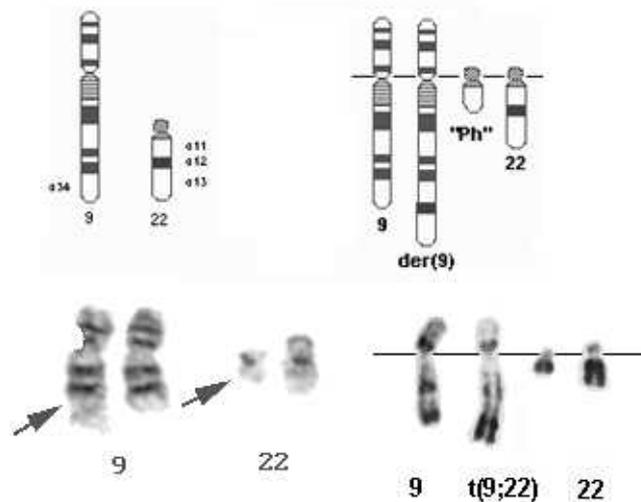


Abb. 1: Das Philadelphia-Chromosom (Ph; t(9;22)(q34;q11)) (aus [www.cmlsupport.com](http://www.cmlsupport.com))

Durch diese Translokation wird ein Teil des *BCR*-Gens, mit unbekannter Funktion, mit einem Teil des *c-ABL*-Gens, das eine Tyrosinkinase kodiert, fusioniert. Das chimäre *BCR-ABL*-Onkogen wird in ein chimäres Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 210 (p210), 190 oder 230 kDa translatiert, das konstitutive ABL-Kinase-Aktivität im Zytoplasma aufweist (Lugo et al., 1990). Seine Aktivität führt durch Deregulation der für Proliferation, Apoptose und Adhäsion verantwortlichen Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren, darunter der MAP Kinase-Weg, der PI3-Kinase-Weg, der Jak/STAT5-Weg und Myc, zur malignen Transformation der Philadelphia-Chromosom-positiven Zellen und wird als das ätiologische Ereignis in der Entstehung der CML angesehen (Heisterkamp et al., 1990). Etwa 7% der klinisch als CML diagnostizierten Patienten sind Ph- und *BCR-ABL*-negativ (Bennett et al., 1994).

Die Aufklärung der pathogenetischen Mechanismen begann 1960, als Nowell und Hungerford eine spezifische chromosomale Veränderung der leukämischen Zellen beschrieben. Diese wurde nach dem Ort der Entdeckung „Philadelphia-Chromosom (Ph)“ genannt und im Jahr 1973 als verkürztes Chromosom 22 identifiziert (Nowell and Hungerford, 1961; Rowley, 1973). Durch die Entdeckung, dass das zelluläre Onkogen *c-ABL* von Chromosom 9 in die Bruchpunktregion („breakpoint cluster region“, *BCR*) auf Chromosom 22 transloziert wird, konnte Mitte der 1980er Jahre die molekulare Basis der Translokation aufgeklärt werden (de Klein et al., 1982; Bartram et al., 1983; Heisterkamp et al., 1983; Heisterkamp et al., 1985). Kurz darauf wurde nachgewiesen, dass das durch das chimäre *BCR-ABL*-Onkogen kodierte 210-kDa-Fusionsprotein (p210<sup>BCR-ABL</sup>)

konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität aufweist (Konopka et al., 1985; Ben Neriah et al., 1986). Die pathogenetische Relevanz des *BCR-ABL*-Gens im Rahmen der Leukämogenese wurde durch Transfektions- und Transplantationsmodelle *in vitro* und *in vivo* sowie durch die Wirkung des selektiven ABL-Inhibitors Imatinib belegt. (Elefanty et al., 1990; Daley et al., 1990; Heisterkamp et al., 1990; Druker et al., 1996; Deininger et al., 1997; Zhao et al., 2001).

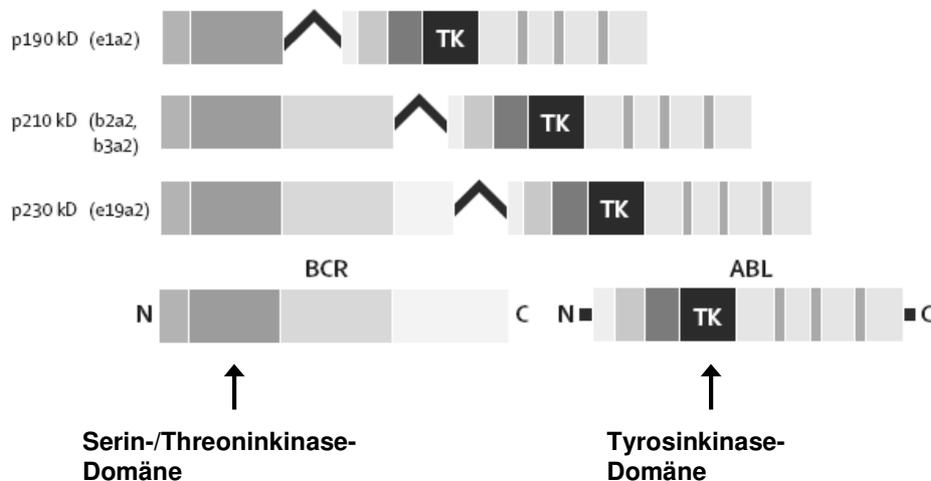


Abb. 2: **Molekulare Struktur der BCR-ABL Fusionsproteine** (nach Hehlmann et al., 2007 )

Obwohl die Pathogenese der CML heute weitgehend aufgeklärt ist, sind die zytogenetischen und molekularen Mechanismen der Progression nach wie vor unbekannt. Während des Übergangs von der chronischen Phase in die Blastenkrise können zusätzlich zum Philadelphia-Chromosom weitere zytogenetische Anomalien auftreten, was als klonale Evolution bezeichnet wird (Cortes and O'Dwyer, 2004). Mutationen und Deletionen in bestimmten Genen, wie z.B. *p53*, *p16/INK4a* und *RB* können ebenso auftreten. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass die Familie der Src-Kinasen an der Progression der CML beteiligt ist (Wetzler et al., 1993; Sacha et al., 2003; Markt et al., 2003; Donato et al., 2003).

### 1.1.3 Ph-negative CML

Das Philadelphia-Chromosom lässt sich bei ca. 10% der klinisch und morphologisch als CML charakterisierten Fälle nicht nachweisen. Mit Hilfe molekularbiologischer Techniken ist bei 30-50% dieser Patienten dennoch eine *BCR-ABL*-Fusion nachweisbar (Ph-negative, *BCR-ABL*-positive CML). Ursache sind alternative Translokationen mit varianten Rearrangierungen von *ABL* innerhalb des *BCR*-Locus oder auch die Beteiligung weiterer Chromosomen (Huret, 1990). In Bezug auf die Ausprägung und den Verlauf der Erkrankung sowie das Ansprechen auf Therapie und das Überleben entsprechen diese Fälle der Ph-positiven CML. Die klinische Ähnlichkeit der Ph-negativen, *BCR-ABL*-negativen, sog. atypischen CML, zur klassischen CML wird durch z.T. ungeklärte Mechanismen hervorgerufen. Es können Bruchpunkte außerhalb der typischen Lokalisationen innerhalb der *BCR*- und *ABL*-Loci auftreten, Rearrangierungen mit unbekanntem Genen auftreten oder Mutationen innerhalb der *BCR*- oder *ABL*-Gene ohne Translokation verantwortlich sein (Costello et al., 1995). Diese Form der CML betrifft vor allem ältere Patienten und hat eine schlechte Prognose. Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung ergeben sich große Unterschiede hinsichtlich der Therapieoptionen und des Therapieerfolges.

## 1.2 Therapie der CML

### 1.2.1 Therapie vor 2001

Vor 1980 wurde die CML konventionell mit Busulfan oder Hydroxyurea behandelt und hatte eine schlechte Prognose (Savona and Talpaz, 2006). Obwohl diese Substanzen die hämatologische Manifestation der Erkrankung kontrollierten, waren sie nicht in der Lage die Progression zu verhindern oder zu verzögern. Die Behandlung mit IFN- $\alpha$ , die seit den frühen 1980er Jahren angewendet wird, stellte eine signifikante Verbesserung dar, indem sie bei Patienten in der chronischen Phase zu hämatologischen und zytogenetischen Remissionen führte und das 5-Jahres-Überleben im Vergleich zu früheren Behandlungen deutlich verbesserte (Hehlmann et al., 1994; Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group, 1997). Eine Kombination des DNA-Syntheseinhibitors Cytarabin mit IFN- $\alpha$  zeigte weitere Vorteile (Guilhot et al., 1997; Kantarjian et al., 1999). Die einzige kurative Therapie bleibt bis heute die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

(allo-SZT), aufgrund diverser Schwierigkeiten bei der Durchführung, wie z.B. der hohen Frühmortalität, wird sie jedoch nur bei Patienten mit Hochrisiko-CML empfohlen. Die Erstlinientherapie gegen CML ist heute der selektive Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib.

### 1.2.2 Imatinib

Da das *BCR-ABL*-Fusionsprotein nur in den CML-Blasten vorkommt, nicht jedoch bei normalen Zellen, zielen verschiedene innovative Therapien auf dieses tumorspezifische Antigen. So war Glivec<sup>®</sup> (STI 571, Imatinib; Novartis) das erste Medikament gegen eine Krebserkrankung, welches ein spezifisches Enzym inhibiert. Dieses Molekül bindet in der inaktiven Konformation des Enzyms an einen Teil der ATP-Bindungsstelle (siehe Abb. 3) und wirkt dort als kompetitiver Inhibitor (Roskoski, Jr., 2003). Neben Abl-Rezeptor-Tyrosinkinasen inhibiert Imatinib zusätzlich PDGFR, sowie den Stammzellofaktor-Rezeptor c-Kit, nicht jedoch die eng verwandten Tyrosinkinasen Flt-3, Flt-1 und Tek, c-Met oder die Nonrezeptor-Tyrosinkinasen Src und Jak-2 (Buchdunger et al., 2000). Druker et al. zeigten, dass durch die Hemmung der BCR-ABL-Aktivität das Wachstum von CML-Zelllinien und Ph<sup>+</sup> Kolonien selektiv unterdrückt wird (Druker et al., 1996; Gambacorti-Passerini et al., 1997; Deininger et al., 1997). 2001 erhielt die Substanz die Zulassung der FDA und der EMEA für die Behandlung von IFN- $\alpha$ -resistenten Patienten in der chronischen Phase, seit 2002 ist Imatinib auch für die Erstlinientherapie in der chronischen Phase zugelassen.

Die Inhibition der Aktivität der Tyrosinkinase c-KIT wird in der Therapie gastrointestinaler Stromatumoren (GIST), die sehr häufig eine Mutation im *c-KIT*-Gen aufweisen, genutzt (Hirota et al., 1998). Seit 2002 ist Imatinib auch für diese Indikation zugelassen und hat zu außergewöhnlichen Erfolgen in der Therapie der klinisch durch eine hohe Refraktärität gegenüber konventionellen Zytostatika gekennzeichneten Tumoren geführt (Siddiqui and Scott, 2007).

Auch in der Therapie der CML konnte durch den Einsatz von Imatinib eine signifikante Verlängerung der hämatologischen und zytogenetischen Remissionen und der mittleren Überlebenszeit erreicht und so die Behandlung der Patienten stark verbessert werden (Lugo et al., 1990; Schindler et al., 2000; Tothova et al., 2005; Roy et al., 2006). Die Wirksamkeit wurde in der Phase III IRIS-Studie (International Randomized Study of Interferon and STI571) unter Beweis gestellt, in der eine tägliche Dosis von 400 mg

Imatinib mit der Kombination von IFN- $\alpha$  und Cytarabin bei Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase verglichen wurde ( $n = 1106$ ). Insgesamt erreichen 76%, je nach Risikogruppe sogar bis zu 90% der Patienten komplette zytogenetische Remissionen unter Imatinib-Therapie. Bei der früheren Erstlinientherapie mit IFN- $\alpha$ /Cytarabin erreichen nur 14% der Patienten komplette zytogenetische Remissionen (O'Brien et al., 2003; Hehlmann et al., 2007b).

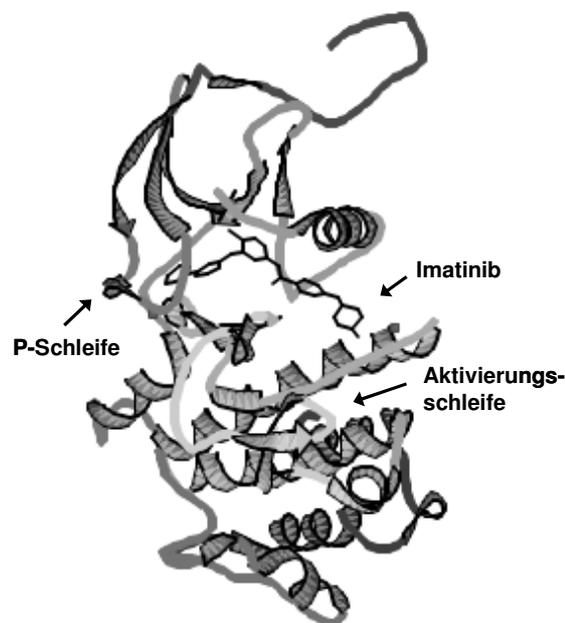


Abb. 3: Modell der Imatinib-Bindung an der ABL-Tyrosinkinase (modifiziert nach Protein Data Bank ID: 1IEP)

### 1.2.2.1 Resistenzentwicklung gegen Imatinib

Trotz der positiven Entwicklung in der Therapie der CML stellt die Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib ein Problem dar. In den meisten Fällen sind Punktmutationen in der katalytischen Domäne der BCR-ABL-Kinase (P-loop), die die Bindung des Imatinib beeinträchtigen, oder die Amplifikation des *BCR-ABL*-Gens für den Verlust der Effizienz verantwortlich, aber auch BCR-ABL-unabhängige Mechanismen, wie beispielsweise differentielle Genexpression in resistenten Zellen, sind beschrieben worden (Donato et al.,

2003; Sacha et al., 2003; Tauchi and Ohyashiki, 2004; Villuendas et al., 2006; Nicolini et al., 2006; Litzow, 2006). Die Therapie wird zunächst mit einer Erhöhung der täglichen Imatinibdosis, in der Regel die Verdopplung auf 800 mg, fortgesetzt. Bei einem erneuten Versagen der Therapie werden heute auch alternative Tyrosinkinaseinhibitoren und experimentelle Kombinationstherapien eingesetzt (Jabbour et al., 2007). In einigen Fällen kommt auch eine allo-SZT in Frage.

### **1.2.3 Neue Tyrosinkinaseinhibitoren**

Neue Substanzen, die bei Imatinib-Resistenz wirksam sein können, sind beispielsweise Dasatinib und Nilotinib. Dasatinib (SPRYCEL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb, NY, USA) ist ein potenter Tyrosinkinaseinhibitor, der ebenso wie Imatinib neben BCR-ABL, c-KIT und PDGFR, aber auch verschiedene onkogene Proteine wie Src-Kinasen inhibiert und 2006 in den USA und der EU für die Therapie Imatinib-resistenter oder –intoleranter Patienten zugelassen wurde. Er bindet im Gegensatz zu Imatinib nicht nur an die inaktive Konformation des BCR-ABL, sondern auch an die aktive Konformation und ist gegen die meisten Mutationen der BCR-ABL-Kinasedomäne aktiv (Shah et al., 2004; O'Hare et al., 2005; Jabbour et al., 2007). Nilotinib ist ein selektiver BCR-ABL-Kinaseinhibitor, der sich zurzeit in klinischer Entwicklung befindet. Die Zulassung für die USA und die EU wird Ende 2007 erwartet. Nilotinib zeigt eine 30- bis 50-fach höhere Potenz als Imatinib und inhibiert neben BCR-ABL ebenfalls c-KIT und PDGFR. In Phase I und II-Studien erwies sich Nilotinib, ähnlich wie Dasatinib, als wirkungsvoll gegen fast alle bekannten BCR-ABL-Mutationen (Kantarjian et al., 2006; Jabbour et al., 2007).

### **1.2.4 Kombinationstherapien**

Ein interessanter Ansatz zur Überwindung der Imatinib-Resistenz stellt neben neuen Tyrosinkinaseinhibitoren auch die Kombination von Imatinib mit anderen Substanzen wie klassischen Chemotherapeutika, Tyrosinkinaseinhibitoren oder spezifischer Inhibitoren zusätzlicher proliferativer Signalmoleküle wie z.B. Ras dar. Hierbei sollen synergistische Effekte der Substanzen mit Imatinib zu verbessertem Ansprechen besonders in der Blastenkrise sowie zur Prävention und Überwindung der Resistenzentwicklung und geringerer Toxizität der Behandlung führen. Präklinische Untersuchungen von Weisberg et

al. zeigten bereits eine additive Zytotoxizität von Nilotinib und Imatinib (Weisberg et al., 2007), was die klinische Bedeutung einer Kombination zweier Tyrosinkinaseinhibitoren nahelegt. Eine Kombination von Imatinib mit dem Farnesyltransferasehemmer Lonafarnib wurde in einer Phase I-Studie als sicher und gut verträglich eingestuft (Cortes et al., 2007). In einer Phase I/II-Studie zeigte die Kombination aus den Topoisomerase II-Inhibitoren Mitoxantron/Etoposid und dem Cytosin-Analogen Cytarabin mit Imatinib Wirkung bei Patienten in der Blastenkrise und bewirkte einen Überlebensvorteil bei anschließender allo-SZT im Vergleich mit konventioneller Behandlung (Fruehauf et al., 2007). Ebenso stellte sich die Kombination des DNA-Methyltransferaseinhibitors Decitabin mit Imatinib bei fortgeschrittenen Stadien der CML, insbesondere bei Patienten ohne Mutationen in der BCR-ABL-Kinase, als wirksam heraus (Oki et al., 2007).

### **1.2.5 Allogene Stammzelltransplantation**

Die bis heute einzige kurative Behandlungsoption ist die allogene Stammzelltransplantation. Durch den Erfolg der BCR-ABL-Inhibitoren hat sie in den letzten Jahren insbesondere als Erstlinientherapie stark an Bedeutung verloren. Zudem zeigen neue Studien, dass eine medikamentöse Therapie insbesondere bei frühen Stadien der CML einer allo-SZT vorzuziehen ist (Hehlmann et al., 2007a). Dennoch bleibt die allo-SZT unter bestimmten Bedingungen eine wichtige Behandlungsoption, insbesondere nach wiederholtem Therapieversagen. Die Möglichkeit einer Heilung muss allerdings sorgfältig gegen die vielfältigen Risiken für den Empfänger, wie beispielsweise eine hohe transplantations-assoziierte Mortalität, GVHD, Infektionen oder das Auftreten von Sekundärmalignomen, abgewogen werden (Hochhaus et al., 2004; Grigg and Hughes, 2006). Zusätzlich ist der Erfolg in hohem Maße von definierten Risikofaktoren abhängig, wie dem Alter des Patienten, dem Vorhandensein eines Geschwisterspenders sowie dem Zeitpunkt der Transplantation in Bezug auf das Krankheitsstadium und die Krankheitsdauer seit der Diagnose (Jabbour et al., 2007).

## 1.3 Immunantwort gegen CML

### 1.3.1 Einfluss von Imatinib auf Zellen des Immunsystems

In mehreren Forschungsarbeiten konnte bereits demonstriert werden, dass Imatinib hemmende Wirkung auf Zellen des Immunsystems hat. Appel et al. konnten nachweisen, dass therapeutische Konzentrationen von Imatinib sowohl die Differenzierung von Dendritischen Zellen verhindern als auch ihre Funktionen, wie z.B. Migration, Zytokinsekretion und Stimulation von T-Zellproliferation, unterdrücken können (Appel et al., 2004; Appel et al., 2005). Auch ein direkter hemmender Einfluss auf die Proliferation und Effektorfunktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Dietz et al., 2004) als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Seggewiss et al., 2005; Chen et al., 2006) wurde beschrieben, ebenso wie eine durch Imatinib bedingte verschlechterte Erkennung von BCR-ABL<sup>+</sup> Zellen durch NK-Zellen (Cebo et al., 2006). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse liegt der Schluss nahe, dass die klinische Anwendung von Imatinib eine Reduktion der Effektivität insbesondere von auf der Induktion von T-Zell-Antworten basierenden Immuntherapien zur Folge haben kann.

### 1.3.2 Immunantwort unter Therapie

Es gibt Hinweise darauf, dass die Induktion von Remissionen bei CML zumindest zum Teil von der Ausbildung spezifischer Immunantworten abhängt. Bei mit IFN- $\alpha$  behandelten CML-Patienten wurden zytotoxische T-Zellen (CTLs) gefunden, die spezifisch für Peptide aus überexprimierten Antigenen wie Proteinase-3 (PR3) oder WT1 waren und so zu einer Eliminierung der malignen Zellen beitragen können (Molldrem et al., 2000; Gao et al., 2000; Burchert et al., 2003; Grunebach et al., 2006). Von Burchert et al. konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu einer IFN- $\alpha$ -Therapie mit Imatinib behandelte Patienten stark verminderte CTL-Antworten aufweisen. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass IFN- $\alpha$  eine Induktion der Proteinase 3-Expression vermittelt, welche eine PR3-spezifische T-Zell-Antwort nach sich zieht, während dieser Effekt bei einer Imatinib-Behandlung nicht auftritt (Burchert et al., 2003). Möglicherweise werden also unter IFN- $\alpha$ -Therapie immunogene Antigene hochreguliert, so dass eine aktive Immunantwort gegen CML zustande kommen kann. Der unterschiedliche Charakter der Remissionen unter IFN- $\alpha$  bzw. Imatinib in Bezug auf die Beteiligung des Immunsystems könnte auf den bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesenen immunsuppressiven Effekt von Imatinib (siehe 1.3.1)

oder auf eine verringerte Immunogenität der CML-Zellen zurückzuführen sein. Imatinib könnte entsprechend mit immuntherapeutischen Ansätzen, die auf Dendritischen Zellen und der Induktion von CTL-Antworten *in vivo* basieren, interferieren.

### 1.3.3 Immuntherapeutische Strategien

Selbst bei einem vollständigen Ansprechen auf eine Imatinib-Therapie und der Ausbildung einer kompletten zytogenetischen Remission können bei den meisten Patienten mittels PCR *BCR-ABL*-Transkripte im peripheren Blut nachgewiesen werden (Lin et al., 2003). Eine Heilung durch einen Tyrosinkinaseinhibitor erscheint nach heutigem Verständnis wenig wahrscheinlich. Diese Medikamente erreichen lediglich die Eindämmung der minimalen Resterkrankung und wirken nicht direkt gegen die Leukämienstammzellen (Copland et al., 2005; Jiang et al., 2007). Die Entwicklung weiterführender Therapiestrategien hat daher unter anderem zum Ziel, die minimale Resterkrankung unter Umgehung der allo-SZT zu behandeln. In diesem Kontext erscheinen immuntherapeutische Strategien vielversprechend, da die Aktivierung der körpereigenen Abwehr eine vollständige Elimination der *BCR-ABL*-positiven Leukämienstammzellen zu ermöglichen scheint (Guinn et al., 2007).

Immuntherapiestudien haben zum Ziel, durch die Verwendung von verschiedenen Zell- oder Antigen-basierten Vakzinen leukämiespezifische Immunantworten gegen definierte oder undefinierte CML-assoziierte Antigene zu induzieren. Aufgrund der starken immunstimulatorischen Kapazität von Dendritischen Zellen (DCs) basieren viele Immuntherapieprotokolle auf dem Einsatz dieser professionellen antigenpräsentierenden Zellen (Takahashi et al., 2003; Reichardt and Brossart, 2005; Westermann et al., 2007). Allerdings sind bei der Anwendung während einer medikamentösen Therapie die bereits erläuterten immunsuppressiven Effekte des Imatinib zu bedenken.

Da das *BCR-ABL*-Protein als Neoantigen der CML-Zellen als tumorspezifisches Antigen fungieren kann, wurden klinische Vakzinierungsstudien mit dem Ziel entwickelt, T-Zellen zu induzieren, die Epitope aus *BCR-ABL* auf malignen Zellen erkennen und diese eliminieren. In den meisten dieser Studien wurden DCs verwendet, die aus Ph<sup>+</sup> Zellen hergestellt wurden und die gesamte antigene Information der Zellen, inklusive *BCR-ABL*, beinhalteten (Fujii et al., 1999; Westermann et al., 2000; Westermann et al., 2007). In diesen Studien gab es zwar klinisches Ansprechen auf die Vakzine, *BCR-ABL*-spezifische

T-Zellantworten konnten jedoch kaum nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass die Antigenität dieses Moleküls nicht sehr stark ist (Grunebach et al., 2006). Auch eine entsprechende *in vitro*-Studie kam unter Verwendung RNA-transfizierter dendritischer Zellen zu dem Ergebnis, dass BCR-ABL kein immundominantes Antigen in der CML darstellt (Grunebach et al., 2006).

Im Gegensatz dazu wurden bei weiteren Studien auf Basis des BCR-ABL-Neoantigens Peptidvakzine eingesetzt. Die Peptide stammten aus der Fusionsregion b3a2 des *BCR-ABL*-Gens und induzierten bei Patienten sogar unter Imatinib-Therapie peptidspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antworten und klinisches Ansprechen. Ob diese T-Zellen allerdings an der Elimination der CML-Zellen direkt beteiligt waren, konnte nicht abschließend geklärt werden (Cathcart et al., 2004; Bocchia et al., 2005).

Ein anderer Ansatz der Peptidvakzinierung verwendet tumorassoziierte Antigene (TAA), die in der CML und anderen malignen Erkrankungen überexprimiert werden und eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des leukämischen Phänotyps spielen. So hat beispielsweise das antiapoptotische Molekül Survivin in der CML eine proliferative und antiapoptotische Wirkung (Carter et al., 2006). Auch die an der Progression der CML beteiligte Telomerase ist ein solches für die Immuntherapie interessantes TAA, ebenso wie die häufig überexprimierten Antigene Proteinase-3 (PR3) und Wilms' Tumor 1 (WT1). Gegen diese Tumorantigene gerichtete CTLs sind in Patienten nachzuweisen und in der Lage, CML-Zellen spezifisch zu lysieren (Gao et al., 2000; Molldrem et al., 2000). Neben der MHC-Restriktion vorgefertigter Peptide sind Immunevasionsmechanismen ein weiteres Problem des Einsatzes einzelner Peptide dieser Antigene. Im Gegensatz zu Vakzinierungen mit Peptiden aus BCR-ABL können sie die Herunterregulierung, Deletion oder Mutation des Zielepitopes und damit die Vermeidung der Erkennung durch CTLs hervorrufen. Um dies zu umgehen, sollte eine Peptidvakzine auf mehreren unterschiedlichen TAA basieren.

Die Verwendung von Hitzeschockproteinen (HSP), die in Tumorzellen eine Reihe verschiedener tumorassoziierter Peptide gebunden haben, ist eine weitere neue Strategie der Therapie. Li et al. demonstrierten in einer Phase I-Studie, dass Patienten-spezifische Präparationen von HSPs sicher in der Anwendung sind und in 65% der Patienten ein klinisches Ansprechen auf die Behandlung hervorriefen (Li et al., 2005).

### **1.4 Ziele der Arbeit**

Da heute die Erstlinientherapie der CML auf Imatinib und nicht mehr auf IFN- $\alpha$  basiert, muss konsequenterweise die Kompatibilität dieser Behandlung mit immuntherapeutischen Strategien geprüft werden.

Da bekannt ist, dass Imatinib die Differenzierung und Funktion von dendritischen Zellen sowie die Effektorfunktionen von T-Zellen inhibiert, sollte in dieser Arbeit der Einfluss der Imatinib-vermittelten Inhibition der BCR-ABL Tyrosinkinase auf die Immunogenität von CML-Zellen und die Induzierbarkeit von CTL-Antworten gegen CML-assoziierte Antigene geklärt werden. Es wird vermutet, dass BCR-ABL aufgrund seiner dysregulierten Tyrosinkinaseaktivität zur Induktion oder Expression von Antigenen führt, die durch Überexpression als Tumorantigene fungieren könnten. Die Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität durch Substanzen wie Imatinib würde zwar die Remission der Erkrankung herbeiführen, gleichzeitig aber auch die Antigenität der CML-Zellen vermindern. Der Grund für die Abnahme von spezifischen T-Zellantworten unter Therapie könnte die verminderte Expression der Antigene in CML-Zellen sein.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Geräte

ABI Prism <sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Axiovert 25 Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Jena
Bestrahlungsquelle Gammacell 1000	Atomic Energy of Canada Ltd., Ottawa, Kanada
CO <sub>2</sub> -Inkubator	NuAire, Plymouth, USA
Elektroporations-Impulsgenerator	Dr. L. Fischer, Heidelberg
Elektroporator Cellject Pro	Thermo Scientific, Waltham, USA
FACSCalibur <sup>™</sup> Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Fluorescence/Absorbance Microplate Reader MicroTek FLI	BioTek Kontron Instruments, Basel, Schweiz
ImmunoSpot <sup>®</sup> Analyzer	Cellular Technology Ltd., Cleveland, USA
MiniProtean III Elektrophorese-Kammern	BioRad Laboratories, München
MiniTransBlot Kammer	BioRad Laboratories, München
Multi-Detektions-Reader (SLT Rainbow)	Tecan GmbH, Crailsheim
Sicherheitswerkbank HeraSafe 18/2	Heraeus, Hanau
Szintillationsspektrometer MicroBeta Trilux	Wallac, Freiburg
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 3.0RS	Heraeus, Hanau

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
14 ml-Röhrchen, PP	Greiner, Nürtingen
50 ml-Röhrchen, PP	BD Falcon, Heidelberg
6-Loch-Gewebekulturplatten	BD Falcon, Heidelberg
24-Loch-Gewebekulturplatten	Greiner, Nürtingen
96-Loch-Gewebekulturplatten	Greiner, Nürtingen

Gewebekulturflaschen	BD Falcon, Heidelberg
Elektroporationsküvette, 4 mm	Peqlab, Erlangen, Germany
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
LumaPlates™-96	Perkin Elmer, Boston, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Protran BA 83 Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Sterilfilterspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf
Whatmanpapier	Schleicher & Schuell, Dassel

## 2.3 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

## 2.4 Medien und Reagenzien

### 2.4.1 Zellkultur

Biocoll Dichtegradientenmedium	Biochrom AG, Berlin
<i>aqua ad iniectabilia</i>	B.Braun, Melsungen
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
GM-CSF (Leukine® liquid Sargramostim)	Berlex, Richmond, USA
Hydroxyurea	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden
Imatinib	Novartis, Nürnberg
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe

PMA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RPMI 1640 mit GlutaMAX I und 25 mM HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TNF	R&D Systems, Wiesbaden
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X 100	Roth, Karlsruhe
Vectastain <sup>®</sup> ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
X-VIVO 20	Cambrex, Verviers, Belgien

## 2.4.2 Molekularbiologie

$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dNTP	Peqlab, Erlangen

### 2.4.2.1 Reaktionskits

2x Taqman PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Darmstadt
hTERT: Hs00162669_m1	
WT1: Hs00240913_m1	
SuperScript <sup>™</sup> cDNA Synthese	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-free DNase	Qiagen, Hilden
RNeasy <sup>®</sup> MiniKit	Qiagen, Hilden

### 2.4.2.2 Oligonukleotide

siRNA-Einzelstränge

Synthetische Oligoribonukleotide wurden von Dharmacon (Chicago) bezogen.

*BCR-ABL* spezifisch:

sib3a2_1	sense,	GCA GAG UUC AAA AGC CCU UdTdT
	antisense,	AAG GGC UUU UGA ACU CUG CdTdT



Tris	Roth, Karlsruhe
Tween20	Merck, Darmstadt

## 2.4.4 Antikörper

### 2.4.4.1 unkonjugierte Antikörper

#### Blockierende Antikörper

PA2.1 (anti-human MHC Klasse I)	Stefan Stevanović, Uni Tübingen
Tü39 (anti-human MHC Klasse II)	Stefan Stevanović, Uni Tübingen

#### IFN- $\gamma$ Elispot

Anti-human IFN- $\gamma$ mAb 1-D1K	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
------------------------------------	---------------------------------

#### Western Blot

Maus anti-Kaninchen GAPDH IgG <sub>1</sub>	HyTest, Turku, Finnland
Maus anti-human PTEN IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
Maus anti-human Bcl-2 IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Maus anti-human c-Abl IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Maus anti-human XIAP IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
Kaninchen anti-human Bcl-x <sub>L</sub> (pk)	BD Biosciences, Heidelberg
Kaninchen anti-human mTOR IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen anti-human phospho-mTOR (pk)	Cell Signaling, Danvers, USA
Kaninchen anti-human Survivin (pk)	R&D, Minneapolis, USA
Meerschweinchen anti-human Adipophilin (pk)	Progen, Heidelberg
Ziege anti-human Aktin (pk)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA



Avidin-Peroxidase-Komplex (Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit)

2 Tropfen Reagenz A  
2 Tropfen Reagenz B  
in 20 ml PBS/0,1% Tween<sup>®</sup>20

Blockierungslösung für Western Blot

TBST 0,5%  
4% (w/v) SlimFast Schokolade

Einfriermedium

RPML 1640 mit GlutaMAX I und 25 mM HEPES  
20% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS  
50 U/ml Penicillin  
50 µg/ml Streptomycin  
10% (v/v) DMSO

FACS-Puffer

PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, pH 7,4  
0,5% (w/v) BSA

Imatinib Stammlösung

DMSO:Ethanol 1:1  
2 mg/ml Imatinib

## MATERIAL

---

### Laufpuffer für SDS-PAGE

192 mM Glycin  
25 mM Tris  
0,1% (w/v) SDS

### Propidiumiodidlösung

0,1% (v/v) Triton X 100  
0,1% Na-Citrat  
50 µg/ml PI

### RIPA-Lysepuffer

PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , pH 7,4  
1% (v/v) Igepal CA-630  
0,5% (w/v) Na-Desoxycholat  
0,1% (w/v) SDS  
2 mM EDTA  
*frisch*: 2 µg/ml Aprotinin  
1 mM PMSF  
1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$

### RP10-Medium

RPMI 1640 mit GlutaMAX I und 25 mM HEPES  
10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS  
50 U/ml Penicillin  
50 µg/ml Streptomycin

SDS-Probenpuffer für PAGE, 3-fach

0,18 M Tris-HCl pH 6,8  
28% (v/v) Glycerin  
6% (w/v) SDS  
0,001% (w/v) Bromphenolblau  
*frisch*: 0,3 M DTT

Stripping-Puffer

62,5 mM Tris/HCl pH 6,7  
2% (w/v) SDS  
100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

TBS

10 mM Tris-HCl pH 8,0  
140 mM NaCl

TBST, 0,5%

10 mM Tris-HCl pH 8,0  
140 mM NaCl  
0,5% (v/v) Tween<sup>®</sup>20

Transferpuffer für denaturierenden Western Blot

192 mM Glycin  
25 mM Tris  
0,1% (w/v) SDS  
20% (v/v) Methanol

## MATERIAL

---

Triton X 100-Lysepuffer

PBS

2% (v/v) Triton X 100

## 2.6 Zellen

K-562

Chronisch myeloische Leukämie in Blastenkrise  
ATCC Nummer CCL-243

K-562R

Imatinib-resistente K-562 Zelllinie, bereitgestellt  
durch J. Griffin, Dana Farber Cancer Institute,  
Boston, USA

## **3. METHODEN**

### **3.1 Zellbiologische Methoden**

#### **3.1.1 Zellkultivierung**

Die Tumorzelllinien K-562 und K-562R wurden in RP10-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Kulturmedium der Imatinib-resistenten K-562R-Zellen wurde zusätzlich mit 0,5µM Imatinib supplementiert (Weisberg and Griffin, 2000). Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1-5 \times 10^5$ /ml in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche eingesät und ca. alle 2-3 Tage subkultiviert. Dazu wurden 2 ml der Zellsuspension mit 10 ml frischem Medium aufgefüllt.

#### **3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen in der log-Phase des Wachstums geerntet, gewaschen und in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in Einfriermedium (RP10-Medium + 10% FCS + 10% DMSO) aufgenommen. In Aliquots zu je 1 ml wurden die Zellen in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

Beim Auftauen der Zellen wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension zügig erwärmt und sofort in vorgewärmtes Medium überführt wurde. Nach zweimaligem Waschen in RP10-Medium wurden die Zellen in 5 ml RP10-Medium in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen eingesät und in den folgenden Tagen regelmäßig die Vitalität kontrolliert. Bei gutem Zellwachstum wurden die Zellen in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen überführt.

#### **3.1.3 Isolation mononukleärer Zellen**

Buffy coats gesunder Spender wurden durch die Blutbank der Universität Tübingen bereitgestellt. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurden über eine Ficoll/Paque-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Dazu wurde die Zellsuspension mit PBS verdünnt und in 50 ml-Zentrifugenröhrchen über 12 ml Ficoll-Dichtegradientenmedium mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml geschichtet. Nach

einer 18-minütigen Zentrifugation ohne Bremse bei 800 g erfolgte die Abnahme des Lymphozytenringes oberhalb der Ficollschicht. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in X-VIVO 20-Medium resuspendiert und die Lebendzellzahl bestimmt.

### **3.1.4 Generierung reifer dendritischer Zellen aus Monozyten**

In 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen wurden pro Flasche  $0,7 - 1 \times 10^8$  mononukleäre Zellen in 10 ml X-VIVO 20 eingesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 90 min inkubiert. Nach dieser Adhärenzphase wurden die nonadhärenten Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS abgelöst und zur weiteren Verwendung in CTL-Induktion und Restimulationen kryokonserviert. Die adhärenen Monozyten wurden zur Generierung dendritischer Zellen in RP10-Medium mit 100 ng/ml humanem rekombinatem GM-CSF und 20 ng/ml humanem rekombinatem IL-4 weiterkultiviert. Alle 2 Tage erfolgte eine erneute Zugabe der Zytokine. Die Reifung der DCs wurde durch die Zugabe von 20 ng/ml humanem rekombinatem TNF-alpha an Tag 6 der Kultur induziert. An Tag 7 wurden die reifen DCs durch die Inkubation mit 5 ml 7 mM EDTA in PBS vom Boden der Kulturflaschen gelöst, gründlich in RP10-Medium gewaschen, die zur Elektroporation von Stimulatoren für die CTL-Induktion benötigte Zellzahl sowie ein Aliquot zur durchflusszytometrischen Analyse der Differenzierungsmarker abgenommen und die verbleibenden Zellen kryokonserviert.

### **3.1.5 Isolation primärer Zellen**

Aus Blutproben neu diagnostizierter CML-Patienten wurden mittels Ficoll/Paque Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen wie unter 3.1.3 beschrieben isoliert.

### **3.1.6 Durchflusszytometrie**

In der Durchflusszytometrie können physikalische und nach Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen auch antigene und biochemische Eigenschaften von Zellen, DNA oder anderen Partikeln detektiert und quantifiziert werden. Die Partikel werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom der Durchflusskammer zugeführt, welche einen 488nm Argon-Laser und einen 635nm Diodenlaser enthält. Die Detektion erfolgt zum einen

anhand des Streulichts, welches Rückschlüsse über die Größe und Granularität der gemessenen Partikel zulässt. Zum anderen wird nach dem Prinzip der angeregten Emission detektiert: tritt eine mit Fluoreszenzfarbstoff gekennzeichnetes Teilchen in den Laserstrahl ein, so wird dieser Farbstoff angeregt und strahlt ein Emissionsspektrum mit einem charakteristischem Maximum aus. Für Fluoreszenzfarbstoffe, die im Fluoreszenzkanal 1 detektiert werden, wie beispielsweise Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), liegt das Emissionsmaximum bei 530 nm. In Kanal 2 liegt das Emissionsmaximum proportional zur Farbintensität von Phycoerythrin (PE) und Propidiumiodid (PI) bei 585nm. In dieser Arbeit wurden ein FACSCalibur™ Durchflusszytometer und die Software CellQuest verwendet.

### **3.1.6.1 Messung der Oberflächenexpression von Antigenen**

Zum Nachweis der Reifung der *in vitro* generierten dendritischen Zellen wurden mit FITC oder PE markierte Antikörper (Spezifitäten siehe 2.4.4.2) eingesetzt.

Für die Färbung der Zellen wurden  $0,5-1 \times 10^5$  Zellen in FACS-Puffer gewaschen und mit 3-6  $\mu$ l Antikörperlösung in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l FACS-Puffer für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Entfernen ungebundener Antikörper durch einen Waschschrift wurden die Zellen in 200  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert.

### **3.1.6.2 Durchflusszytometrische Messung der Apoptose**

Die Apoptoserate von Zellen nach Inkubation mit Imatinib wurde durch Messung der DNA-Fragmentierung in apoptotischen Nuclei mit der Methode nach Nicoletti et al. bestimmt (Nicoletti et al., 1991). Hierbei werden die Zellen in einem hypotonen Puffer lysiert. Durch die Interkalation des in diesem Puffer enthaltenen Propidiumiodids in die DNA können die freigesetzten Nuclei durchflusszytometrisch analysiert werden. Während der Apoptose spalten spezifische Endonukleasen, die sog. Caspasen, die DNA in oligonukleosomale Einheiten. Im Histogramm erscheinen die Zellkerne dieser Zellen mit fragmentierter, hypodiploider DNA links des 2N-Peaks, welcher Zellen mit diploidem Chromosomensatz repräsentiert.

### 3.1.7 Transfektion von DCs mit RNA

Für die Elektroporation von DCs wurden reife DCs wie unter 3.1.4 beschrieben an Tag 7 geerntet, zweimal in serumfreiem X-VIVO 20 gewaschen und in einer finalen Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml resuspendiert. 200  $\mu$ l der Zellsuspension wurden mit 5  $\mu$ g RNA gemischt und in einer 4 mm-Küvette mit folgenden physikalischen Parametern elektroporiert: Spannung von 300V, Kapazität von 150  $\mu$ F und Widerstand von 1540  $\Omega$ .

Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in RP10-Medium mit 100 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4 und 20 ng/ml TNF-alpha transferiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.1.8 Transfektion von CML-Zelllinien mit siRNA

Um die Expression des Fusionosproteins BCR-ABL in K-562 und K-562R-Zellen zu unterdrücken, wurde die Methode der RNA-Interferenz angewendet (Scherr et al., 2003). Sie kann zur Erzeugung eines spezifischen Gen-*knockdown* genutzt werden, indem kurze, zur Zielsequenz komplementäre doppelsträngige RNAs aus 21-23 Nukleotiden (siRNAs) in Zielzellen eingeschleust werden (Mittal, 2004). Nach dem Einbringen in die Zielzelle werden die doppelsträngigen siRNA-Moleküle durch den RISC-Komplex (*RNA-induced silencing-complex*), welcher katalytische RNase III- und dsRNA-bindende Domänen enthält, gebunden. Der Komplex wird durch den Verlust eines siRNA-Stranges aktiviert, woraufhin der verbliebene siRNA-Strang die Bindung an die komplementäre mRNA vermittelt. Eine RISC-assoziierte Endoribonuklease kann daraufhin die mRNA an einer spezifischen Stelle in der Mitte der komplementären Region spalten. Die Expression eines spezifischen Gens ist damit unterbunden, da gespaltene mRNA sehr instabil ist und rasch abgebaut wird. Ein RISC-Komplex mit einem gebundenen siRNA-Einzelstrang ist in der Lage, den Verdau mehrerer mRNA-Moleküle zu bedingen.

In dieser Arbeit wurden zur Fusionsregion des BCR-ABL-Gens komplementäre siRNA oder verschiedene Kontroll-siRNAs (siehe 2.4.2.2) durch Elektroporation in die Zielzellen verbracht. Vor der Transfektion wurden K-562 oder K-562R Zellen in der log-Phase des Wachstums geerntet, in X-VIVO 20 gewaschen und die Zellkonzentration auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. 200  $\mu$ l der Zellsuspension wurden mit den unter 3.1.7 beschriebenen Bedingungen elektroporiert. Hierzu wurde den Zellen 120 pmol bis 320 pmol siRNA beigemischt, entsprechend einer Konzentration von 0,6 bis 1,6  $\mu$ M siRNA im

Elektroporationsvolumen. Nach der Elektroporation wurden die Zellen direkt in vorgewärmtes RP10-Medium transferiert. Dem Medium von K-562R-Zellen wurde 0,5  $\mu\text{M}$  Imatinib zugesetzt. Die Zellen wurden 2 Tage nach der Elektroporation geerntet und die Herunterregulation der Expression von BCR-ABL mittels Western Blot verifiziert.

### **3.1.9 Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten mittels RNA-transfizierter DCs**

Für die Induktion spezifischer CTLs wurden reife DCs mit unterschiedlichen RNAs wie unter 3.1.7 beschrieben transfiziert und über Nacht kultiviert, um die Translation der eingebrachten RNA zu ermöglichen. Am Folgetag wurden die Zellen geerntet und  $5 \times 10^5$  DCs mit  $2 \times 10^6$  autologen nonadhärenten Zellen in RP10-Medium kokultiviert. Nach 7 Tagen wurden die CTLs geerntet und  $5 \times 10^5$  CTLs in 2 ml RP10-Medium in Kokultur mit  $5 \times 10^5$  am Tag zuvor mit den selben RNA-Proben wie für die Induktion transfizierten DCs und  $2 \times 10^6$  mit 30 Gy bestrahlten nonadhärenten Zellen restimuliert. An Tag 1, 3 und 5 wurden 2 ng/ml humanes rekombinantes Interleukin-2 pro well zugegeben. Weitere Restimulationen wurden an Tag 7 nach der letzten Restimulation in gleicher Weise durchgeführt. Die Spezifität der CTLs wurde in Standard  $^{51}\text{Cr}$ -release assays bestimmt.

### **3.1.10 Standard $^{51}\text{Cr}$ -release Assays**

Durch die Methode des  $^{51}\text{Cr}$ -release assays kann die Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen anhand der spezifischen Lyse verschiedener Targetzellen analysiert werden. Hierzu werden Zielzellen mit radioaktivem  $^{51}\text{Cr}$  markiert und mit den zu testenden T-Zellen inkubiert. Über die Messung der  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung in den Kulturüberstand ist es möglich, die lytische Kapazität sowie die Spezifität der induzierten CTLs zu ermitteln.

Einen Tag vor Durchführung des Experiments wurden aus autologen reifen DCs durch Elektroporation mit verschiedenen RNAs Targetzellen hergestellt und 24 h kultiviert um die Expression der Antigene zu gewährleisten. Nach dem Ernten der Targets wurden sie sofern benötigt mit den monoklonalen Antikörpern Pa2.1 (10  $\mu\text{g/ml}$ ), gerichtet gegen MHC Klasse I Moleküle, oder Tü39 (10  $\mu\text{g/ml}$ ), gerichtet gegen MHC Klasse II Moleküle, für 30 min inkubiert. Daraufhin wurden alle Targetzellen für 1 h bei 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  mit  $^{51}\text{Cr}$  (Natriumchromat; ca. 2,85 MBq/Target) in RP10-Medium inkubiert. Nach der Aufnahme durch die Targetzellen wurde überschüssiges Chrom durch zweimaliges Waschen entfernt

und  $1 \times 10^4$  Targetzellen pro well in 96-well Rundbodenplatten ausgesät. Die CTLs wurden in unterschiedlichen Konzentrationen bis zu einem Endvolumen von 200  $\mu$ l eingesät um Effektor zu Target-Ratios von 0,1:1 bis 30:1 zu erhalten. Die Platten wurden für 4 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor 50  $\mu$ l/well des Überstandes abgenommen und auf Szintillationsplatten übertragen wurden. Nach dem Trocknen der Platten erfolgte die Szintillationszählung in einem Szintillationsspektrometer. Der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde wie folgt berechnet:  $100 \times (\text{experimenteller Release} - \text{Spontanrelease}) / (\text{Maximalrelease} - \text{Spontanrelease})$ . Spontaner und maximaler Release wurden durch Zugabe von RP10-Medium bzw. 2% Triton X 100-Lysepuffer zu den Targetzellen bestimmt.

### 3.1.11 IFN- $\gamma$ Elispot Assay

Um die Spezifität der CTLs näher zu charakterisieren, wurde die Induktion der IFN- $\gamma$ -Sekretion nach Stimulation mit definierten Tumorantigenen im IFN- $\gamma$  Elispot untersucht. Bei dieser Methode wird von den CTLs ausgeschüttetes IFN- $\gamma$  durch spezifische Antikörper am Boden einer Mikrotiterplatte gebunden. Durch einen zweiten IFN- $\gamma$ -spezifischen biotinylierten Antikörper und einen Enzymkomplex wird am Ort der Zytokinsekretion durch eine Einzelzelle die Umsetzung eines Substrates zu einem roten Niederschlag katalysiert. Die Anzahl der auf diese Weise entstehenden „spots“ entspricht der Anzahl der spezifisch auf die Stimulatorzellen reagierenden T-Zellen.

Die CTLs wurden nach der dritten Restimulation geerntet und in einer mit anti-IFN- $\gamma$  Antikörper beschichteten (10  $\mu$ g/ml in PBS, Beschichtung über Nacht) Mikrotiterplatte in einem Verhältnis von 4:1 and 1:1 mit  $5 \times 10^4$  autologen Stimulatoren pro Kavität inkubiert. Als Stimulatoren wurden DCs verwendet, welche am Tag zuvor wie in 3.1.7 beschrieben mit für unterschiedliche Tumorantigene codierenden IVT-RNAs elektroporiert worden waren. Nach 40 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen aus den Platten durch kräftiges Schwenken in PBS/0,1% Tween<sup>®</sup>20 ausgewaschen und ein Biotin-gekoppelter anti-IFN- $\gamma$  Antikörper (2  $\mu$ g/ml in PBS/0,5% BSA) zur Detektion der IFN- $\gamma$  Spots eingesetzt. Nach 2 h Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe eines Avidin-Peroxidase-Komplexes (Vectastain<sup>®</sup> ABC Kit) für 1 h bei RT. Nach je dreimaligem Waschen in PBS/0,05% Tween<sup>®</sup>20 und PBS wurde eine AEC-Substratlösung für 4 min einwirken gelassen und die Platte daraufhin unter fließendem dest. Wasser gespült. Zum

Trocknen wurden die Platten über Nacht bei RT aufbewahrt und in der Folge bei 4°C gelagert. Die Spots wurden mit einem automatischen Elispot-Reader gezählt.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden Zellen geerntet und einmal in PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 100 µl detergentenhaltigem Puffer pro  $1 \times 10^6$  Zellen, kräftigen Auf- und Abpipettieren und anschließender Inkubation auf Eis für 30 min. Anschließend wurden die Lysate für 30 min bis 1 h bei 4°C und 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Aliquot von 5 µl Lysat in 20 µl RIPA-Puffer verdünnt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine im Zelllysate wurde mit Reagenzien des *BCA Protein Assays* von Pierce bestimmt. Diese Methode beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der  $\text{Cu}^{2+}$  durch bestimmte Aminosäuren im alkalischen Milieu zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert wird, das mit Bicinchonininsäure (BCA) einen wasserlöslichen violetten Farbkomplex bildet. Die Absorption dieses Komplexes bei 562 nm kann im Photometer quantifiziert werden. Anhand einer Standardreihe aus Rinderserumalbumin Fraktion V in Konzentrationen zwischen 0,09 mg/ml und 2 mg/ml in NP40-haltigem Puffer kann die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt werden. Dazu wurde in Mikrotiterplatten in Doppelbestimmung je 10 µl des verdünnten Zelllysats pipettiert und pro Vertiefung 200 µl der Arbeitslösung (Lösung A:Lösung B im Verhältnis 50:1) zugesetzt. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37°C erfolgte die Messung der Absorption bei 562 nm. Aus den Werten der Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte.

### 3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine anhand ihrer molekularen Masse über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufzutrennen, werden sie durch Inkubation mit dem negativ geladenen Detergens SDS denaturiert. Dies führt zur Auflösung nicht-kovalenter Proteinaggregate und zur Maskierung der Eigenladung der Proteine, so dass sie sich im Gel annähernd proportional zu ihrer Größe bewegen. Durch den Vergleich mit einem Proteingemisch bekannter molekularer Massen (Marker) lassen sich im anschließenden Western Blot die unterschiedlichen Proteine aus Gesamtzelllysaten identifizieren.

In dieser Arbeit wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele im vertikalen System der Firma BioRad verwendet. Dazu wurden zunächst 10%ige Trenngele gegossen, die nach dem Polymerisieren mit einem Sammelgel zur Konzentrierung der Proben und zum Schärfen der Proteinbanden überschichtet wurden.

Die Gele wurden in die Apparatur eingesetzt und SDS-haltiger 1x Laufpuffer eingefüllt. Je 20 µg Proteinprobe wurden vor dem Auftragen in die Taschen des Sammelgeles mit dem 0,5-fachen Volumen eines 3x Probenpuffers versetzt und für 5 min bei 100°C denaturiert. Die Elektrophoresen wurden bei 120 V für ca. 1 h 20 min betrieben, bis die Lauffront das untere Ende der Gele erreicht hatte.

### 3.2.4 Western Blot

Zu Detektion der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurde im Anschluss eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dazu werden die Proteine auf eine Trägermembran überführt und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Der Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen erfolgte in Apparaturen der Firma BioRad. Dazu wurden die Gele nach der Elektrophorese mit einer in Transferpuffer äquilibrierten Nitrozellulosemembran bedeckt. Daraufhin wurden Gel und Membran zwischen zwei Whatmanpapieren und zwei Schwämmen in die Apparatur eingespannt. Der Transferprozess erfolgte im Nassblotverfahren bei konstant 250 mA und 4°C für 1 h.

Nach dem Transfer wurden die Membranen kurz in 1x TBS gewaschen und daraufhin zum Blocken unspezifischer Bindungen für 1 h bei RT mit Blockierungslösung (2,5% (w/v) SlimFast, TBST, 0,5%) inkubiert. Im Anschluss wurden die Blots mit verschiedenen Antikörpern in TBST, 0,5% über Nacht bei 4°C inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit TBST, 0,5% für 5 min bei RT für 1 h in Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem

Sekundärantikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in TBST, 0,5% und zwei Waschschritten in TBS zur Entfernung ungebundenen Antikörpers erfolgte die Inkubation in ECL-Lösung (Lösung 1:Lösung 2 im Verhältnis 1:1) für 1 min unter ständigem Schwenken. Daraufhin wurde überschüssige Lösung entfernt, die Membran in Folie eingeschlagen und in einer Filmkassette fixiert. Je nach Antikörper wurden Röntgenfilme für verschiedene Zeiten exponiert und anschließend entwickelt. Das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol wird durch die HRP am Ort der Bindung des Sekundärantikörpers oxidiert. Aus diesem energiereichen Zustand kehrt das Luminol durch die Emission von Licht in seinen Ausgangszustand zurück, was über die Exposition eines Röntgenfilmes nachgewiesen werden kann. Die Expressionsstärke der Antigene ist dabei der Schwärzung des Films proportional. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde über die Expression der Haushaltsgene GAPDH oder Aktin nachgewiesen.

Die Membranen wurden nach der Exposition in Folie eingeschlagen bei 4°C gelagert. Sollte die Detektion der Expression eines weiteren Antigens folgen, so wurden sie entweder kurz in TBS gewaschen und mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert, oder der gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen für je 10 min in *Stripping*-Puffer bei 70°C entfernt. Nach 5 Waschschritten von je 5 min mit TBST, 0,5% wurde die Membran erneut in Blockierungslösung inkubiert, bevor die Detektion weiterer Antigene wie oben beschrieben erfolgte.

### 3.2.5 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA mit Imatinib oder DMSO behandelte Zellen wurde mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit unter zusätzlicher Behandlung mit RNase-freier DNase entsprechend dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die Quantität und Reinheit der RNA wurde mittels UV-Spektrophotometrie bestimmt und die RNA-Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.2.6 Herstellung von cDNA

Das Umschreiben der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde mit dem *SuperScript™ First Strand Synthesis System* durchgeführt. Dazu wurden 0,5 µg Gesamt-RNA mit 0,5 µg Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primern und je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in

einem Gesamtvolumen von 10 µl versetzt und für 5 min bei 65 °C denaturiert. Nach kurzer Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 10 mM DTT, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 U RNaseOUT™ rekombinatem RNase Inhibitor sowie 50 U SuperScript II™ reverser Transkriptase in 1x Reaktionspuffer und die reverse Transkription wurde in einem neuen Gesamtvolumen von 20 µl für 50 min bei 42 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes für 15 min auf 70 °C beendet und die cDNA bei -20 °C gelagert.

### 3.2.7 Quantitative Real-time PCR

Die Expression verschiedener Tumorantigene wurde auf mRNA-Ebene durch quantitative Real-time PCR durchgeführt. Diese erlaubt im Gegensatz zur konventionellen quantitativen PCR nicht nur eine Endpunktanalyse der Reaktion, sondern eine kontinuierliche Detektion und Quantifikation des Amplifikats während jedes Temperaturzyklus. Durch den Abgleich mit einer endogenen Kontrolle ist eine relative Quantifikation der Ausgangskopienzahl des Ziel-Templates möglich. Die Bestimmung der DNA-Menge wird durch den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*) ermöglicht. An eine Oligonuklotidsonde, die mit 20-30 Basen länger als die Primer ist und an interne Sequenzen der PCR-Produkte bindet, ist am 5'-Ende ein Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) gebunden, am 3'-Ende befindet sich ein sog. Quencher, dessen Absorptionsspektrum dem Emissionsspektrum des Reporterfarbstoffes entspricht. Wird der Reporter angeregt, so transferiert er bei intakter Sonde die Energie auf den Quencher, so dass keine Fluoreszenz detektiert werden kann. Durch die 5'-Exonucleaseaktivität der Taq Polymerase wird bei erfolgreicher Replikation die Sonde geschnitten und so Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt. Der FRET ist nicht mehr möglich und die Emission des Reporterfarbstoffes kann proportional der Degradation der Sonden und entsprechend der Zunahme des PCR-Produkts detektiert werden.

Die Real-time PCR wurde als Multiplexanalyse mit vorgefertigten TaqMan® Gene Expression Assays für die zu untersuchenden Targetantigene und GAPDH als endogene Kontrolle auf einem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System durchgeführt. Um die relative Expression der gewünschten Gene determinieren zu können, wurden deren Expressionslevel gegen die endogene Kontrolle normalisiert und daraufhin mit der  $\Delta\Delta C_T$  Methode auf eine Kontrollprobe kalibriert.

### **3.2.8 Herstellung von *in vitro*-Transkripten (IVT)**

*PR3*-, *PRAME*-, *WT1*-, *EGFP*- und *survivin*-IVT wurden von der CureVac GmbH in Tübingen bezogen.

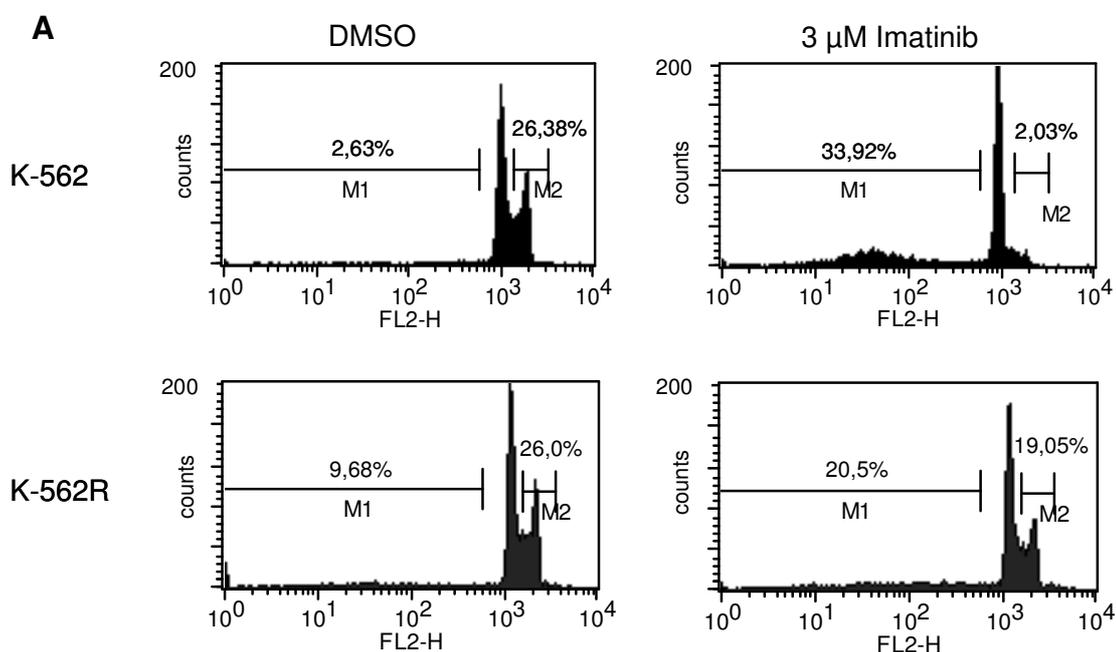


## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Einfluss von Imatinib auf CML-Zellen

#### 4.1.1 Apoptoseinduktion durch Imatinib in K-562- und K-562R-Zellen

Um den Einfluss von Imatinib auf die Immunogenität von CML-Zellen analysieren zu können wurden die CML-Zelllinien K-562 und K-562R mit unterschiedlichen Konzentrationen von Imatinib inkubiert und nach 48 h mit der Methode nach Nicoletti die Induktion der Apoptose untersucht. Die Behandlung der Zellen erfolgte zum Zeitpunkt 0 sowie erneut nach 24 h, da Imatinib sehr schnell von Zellen aufgenommen wird (le Coutre et al., 2004). Als Negativkontrolle diente das Lösungsmittel für Imatinib, ein Gemisch aus DMSO und Ethanol im Verhältnis 1:1 (in der Folge kurz als DMSO bezeichnet). Hierbei zeigte sich, dass die K-562-Zellen, wie erwartet, deutlich stärker auf die Imatinibzugabe reagierten als die gegen geringe Imatinib-Konzentrationen resistenten K-562R-Zellen. Der Resistenzmechanismus dieser Zellen ist nicht vollständig geklärt, beruht aber zumindest zum Teil auf einer 2- bis 3-fachen Überexpression von BCR-ABL (Weisberg and Griffin, 2000). Die der *steady-state* Plasmakonzentration bei einer Behandlung mit 400 mg/d entsprechende Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  (le Coutre et al., 2004) führte in K-562-Zellen zu einer durchschnittlichen Apoptoserate von 32%, K-562R-Zellen gingen nur zu ca. 20% in ein apoptotisches Stadium über (s. Abb. 4A und B).



**B**

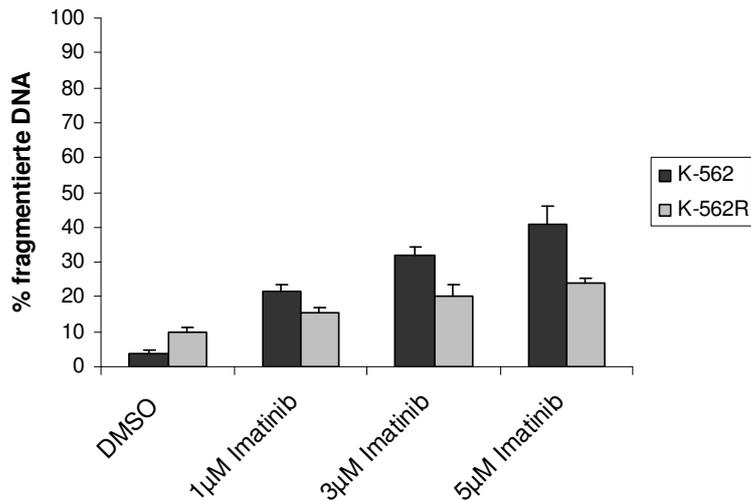


Abb. 4: Färbung der fragmentierten DNA zur Messung der Apoptose nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991) in K-562 und K-562R-Zellen nach Behandlung mit Imatinib für 48h. (A) Histogrammdarstellung der Färbung. M1 markiert die fragmentierte, hypodiploide DNA der apoptotischen Zellen links des 2N-Peaks, M2 markiert den 4N-Peak der Zellen mit repliziertem Chromosomensatz. Die Diagramme zeigen repräsentative Beispiele aus 5 unabhängigen Experimenten. (B) Zusammenfassende Darstellung der Apoptoseraten aus 5 unabhängigen Experimenten. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und SEM.

#### 4.1.2 Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten gegen Antigene aus mit Imatinib behandelten K-562- und K-562R-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit Imatinib und entsprechend die Inhibition der BCR-ABL-Tyrosinkinaseaktivität die Induzierbarkeit zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) beeinflusst, wurde aus den behandelten Zellen die Gesamt-RNA isoliert und diese zur Transfektion von DC verwendet. Diese Zellen wurden als antigenpräsentierende Zellen zur Induktion von CTLs aus autologen PBMC eingesetzt. Nach 2 Restimulationen der CTLs mit 24 h zuvor transfizierten DCs erfolgte die Analyse der Effektorfunktionen in <sup>51</sup>Cr-release und Elispot Assays.

##### 4.1.2.1 Lytische Aktivität

Für die Überprüfung der lytischen Aktivität der induzierten CTLs wurden diese mit unterschiedlichen mit radioaktivem <sup>51</sup>Cr beladenen Targetzellen kokubiert und nach 4 h

die Freisetzung der Radioaktivität als Maß für die Lyse der Zielzellen gemessen. Als Targetzellen wurden autologe DCs eingesetzt, die ebenso wie die Stimulatoren mit RNA der behandelten Zelllinien, bzw. als Negativkontrolle mit *EGFP-IVT*, transfiziert waren. Zum Nachweis der CD8+-vermittelten Lyse wurden blockierende Antikörper gegen MHC Klasse I und Klasse II verwendet, sowie K-562-Zellen als klassisches NK-Zell-Target zum Ausschluss NK-Zell-vermittelter Zytotoxizität eingesetzt.

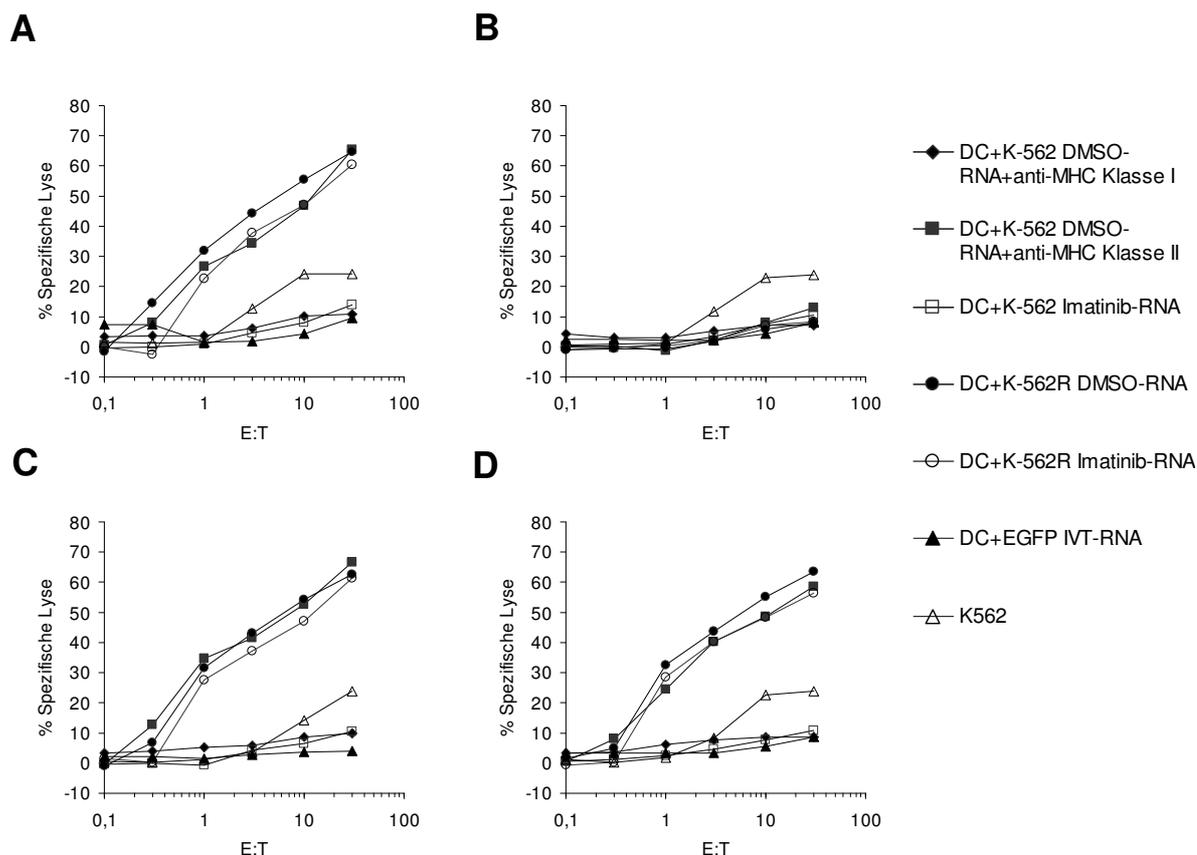


Abb.5: Analyse der spezifischen Lyse von Targetzellen durch *in vitro* induzierte CTLs im <sup>51</sup>Cr-release Assay. Als Stimulatoren zur Induktion der CTL wurden autologe DC eingesetzt, die mit RNA aus DMSO-behandelten K-562 (A), Imatinib-behandelten K-562 (B), DMSO-behandelten K-562R (C) oder Imatinib-behandelten K-562R (D) transfiziert wurden.

Wie in Abb. 5A zu erkennen, sind CTLs, welche unter Verwendung von RNA aus DMSO-behandelten K-562-Zellen induziert wurden, effektiv in der Lage, Zielzellen zu lysieren, welche mit RNA aus DMSO-behandelten K-562 oder K-562R sowie Imatinib-behandelten

K-562R-Zellen transfiziert waren. Im Gegensatz dazu wurden mit RNA aus Imatinib-behandelten K-562-Zellen transfizierte DCs nicht lysiert. Die Zugabe eines anti-MHC Klasse I-Antikörpers führte zur Blockade der Lyse von Targetzellen mit dem Antigenprofil DMSO-behandelter K-562-Zellen, wodurch die CTL-vermittelte spezifische Lyse nachgewiesen werden konnte. Ein vergleichbares lytisches Profil zeigten CTLs, welche unter Verwendung von RNA aus DMSO-behandelten K-562R induziert worden waren (C). Der Einsatz von RNA aus Imatinib-behandelten K-562-Zellen dahingegen führte zu einer vollständigen Unfähigkeit der induzierten CTLs Zielzellen zu lysieren (B), während eine entsprechende Behandlung der K-562R-Zellen keine Auswirkungen auf die Induktion funktionell aktiver CTLs hatte (D). Die *in vitro* induzierten CTL-Linien waren in der Lage Zielzellen zu lysieren, welche Antigene aus DMSO-behandelten K-562- und K-562R-Zellen, ebenso wie Antigene aus Imatinib-behandelten K-562R-Zellen präsentierten. Keine dieser CTL-Linien jedoch lysierte DCs, die mit RNA aus Imatinib-behandelten K-562 transfiziert waren. Zusammengefasst geben diese Ergebnisse den Hinweis, dass eine effektive Inhibition der Aktivität von BCR-ABL eine Reduktion der Immunogenität der CML-Zellen zur Folge hat.

### 4.1.2.2 Spezifität gegenüber definierten Antigenen

Mit dem Ziel, die Reaktivität und Spezifität der CTL genauer zu untersuchen, wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion der CTLs in Reaktion auf definierte Antigene in IFN- $\gamma$  Elispot Assays überprüft. Als Stimulatoren wurden autologe DCs eingesetzt, die mit *in vitro*-transkribierten RNAs (IVT) transfiziert waren. Es wurden IVTs eingesetzt, die für TAAs kodieren, welche mit der Erkennung durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen in myeloiden Leukämien in Verbindung gebracht werden, darunter Survivin, PRAME, PR3 und WT1 (Gao et al., 2000; Watari et al., 2000; Elmaagacli et al., 2005; Carter et al., 2006; Schmitt et al., 2006). Wie in Abb. 6 zu erkennen ist, führte die Transfektion mit RNA aus DMSO-behandelten K-562 zur Induktion von T-Zellen, die in der Lage waren, spezifisch autologe, mit RNA von DMSO-behandelten K-562-Zellen, *survivin*-IVT, *PRAME*-IVT, *PR3*-IVT oder *WT1*-IVT transfizierte DCs zu erkennen. Wurde RNA aus mit Imatinib behandelten K-562-Zellen für die Induktion der CTLs verwendet, waren diese gegen die o.g. Antigene nicht reaktiv (B).

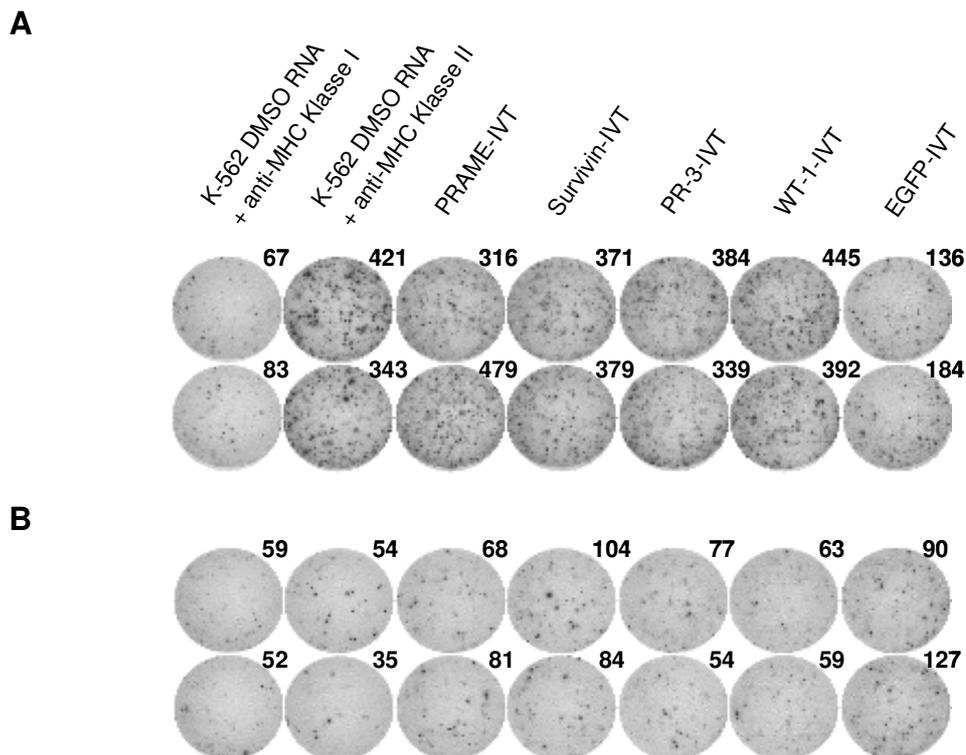


Abb. 6: Nachweis der IFN- $\gamma$ -Produktion von *in vitro* induzierten CTLs im Elispot Assay. Als Stimulatoren für die Induktion wurden autologe DCs verwendet, die mit RNA aus DMSO-behandelten K-562-Zellen (A) bzw. Imatinib-behandelten K-562-Zellen (B) transfiziert waren. Gezeigt ist eine Effektor:Stimulator Ratio von 4:1.

#### 4.1.3 Expression von Tumorantigenen in K-562- und K-562R-Zellen nach Behandlung mit Imatinib

Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, dass mit Imatinib behandelte Zellen gegenüber der Kontrollbehandlung mit DMSO ein verändertes Antigenprofil aufweisen. Dies führt zu der Frage, ob bestimmte Tumorantigene, die an der CTL-Induktion gegen CML beteiligt sind, möglicherweise durch die Aktivität von BCR-ABL verstärkt exprimiert und entsprechend durch Imatinib in ihrer Expression negativ reguliert werden. Verschiedene Tumorantigene wurden mit der Erkennung durch CTLs in Verbindung gebracht und sind nachweislich in CML-Zellen überexprimiert (Guinn et al., 2007). Dazu gehören unter anderem Survivin (Carter et al., 2006; Marioni et al., 2006; Zeis et al., 2003), Adipophilin (Schmidt et al., 2004), Bcl-2 (Andersen et al., 2005a; Andersen et al., 2005c), Bcl-x<sub>L</sub> (Andersen et al., 2005b), hTERT (Uziel et al., 2005) und WT1 (Elmaagacli et al., 2005).

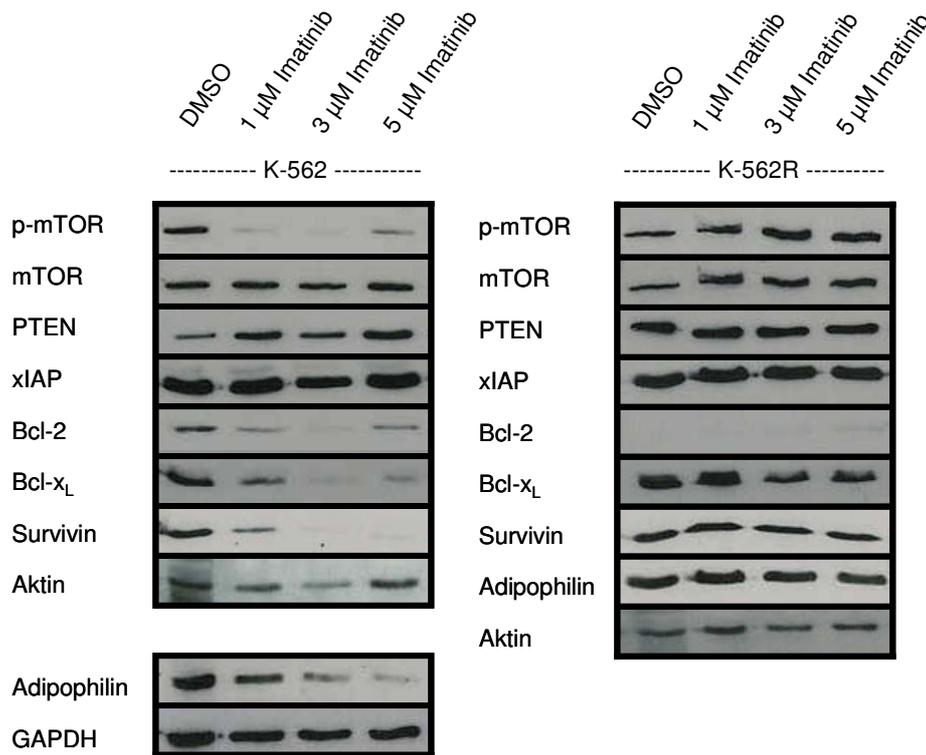


Abb. 7: Western Blot Analyse der Expression verschiedener Tumorantigene und zellulärer Proteine in K-562- und K-562R-Zellen nach Behandlung mit Imatinib. Als Ladekontrolle ist eine Hybridisierung mit GAPDH- bzw. Aktin-spezifischen Antikörpern gezeigt.

In den hier gezeigten Western Blot Experimenten ist erkennbar, dass Survivin, Adipophilin, Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> in K-562-Zellen mit steigender Imatinibkonzentration zunehmend herunterreguliert werden (Abb. 7). Da keine geeigneten Antikörper für die Detektion der Antigene WT1 und hTERT im Western Blot zu Verfügung standen, wurden diese Antigene auf RNA-Ebene durch quantitative Real-time PCR nachgewiesen. Die mRNA-Level von WT1, ebenso wie die von hTERT waren in K-562-Zellen unter den gezeigten Bedingungen stark herunterreguliert, während bei analoger Behandlung der K-562R-Zellen keine Veränderungen der Expressionslevel dieser Antigene verzeichnet werden konnten (s. Abb. 8). Neben diesen stark in ihrer Expression verminderten Proteinen wurden andere untersuchte Proteine in K-562-Zellen durch Imatinib nicht reguliert, wie beispielsweise xIAP (*x-linked inhibitor of apoptosis protein*). Ebenso ist die Expression der Phosphatase PTEN, die als Gegenspieler der PI3-Kinase einen der wichtigsten durch BCR-ABL

aktivierten Signalweg reguliert (Kharas and Fruman, 2005), nach Imatinib-Behandlung nicht verändert. Das Tumorantigen PR3, gegen das im Elispot eine deutliche Reaktivität nachweisbar war, konnte weder im Western Blot noch mittels Real-time PCR in K-562- bzw. K-562R-Zellen detektiert werden.

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Imatinib eine verminderte Phosphorylierung von mTOR auslöst, während eine kompensatorische Aktivierung des PI3K/mTOR Signalweges mit der Entwicklung von Imatinibresistenz in BCR-ABL-positiven Zellen assoziiert sein kann (Burchert et al., 2005; Kharas and Fruman, 2005). Daher wurde die Expression von mTOR untersucht und die beschriebene Reduktion der Phosphorylierung nachgewiesen, während die Expression des Proteins unverändert blieb (Parmar et al., 2005).

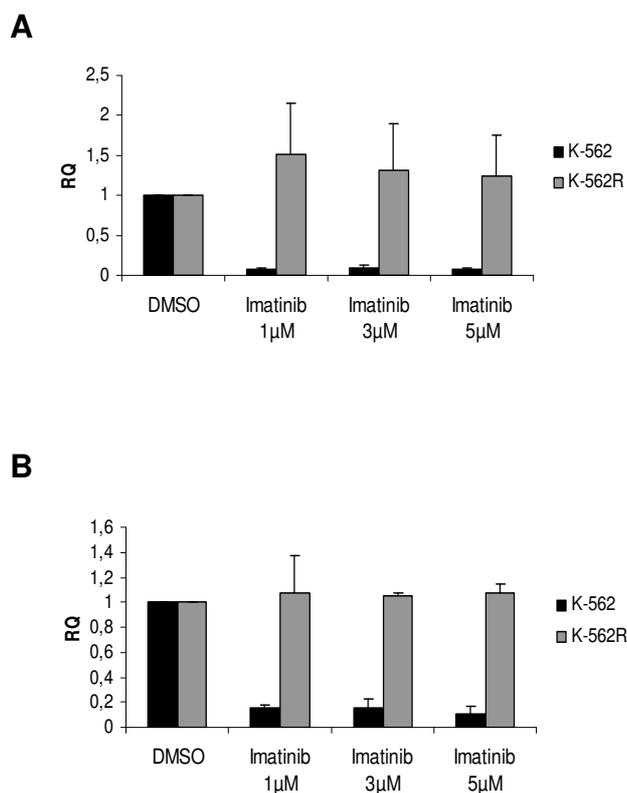


Abb. 8: Relative Quantifikation der Expression des Tumorantigene WT1 (A) und hTERT (B) durch quantitative Real-time PCR in K-562- bzw. K-562R-Zellen nach *in vitro*-Behandlung mit Imatinib für 48 h.

**4.1.4 Erkennung von Targetzellen mit dem Antigenprofil primärer CML-Zellen**

Um die mit Hilfe der Zelllinien erhaltenen Ergebnisse bestätigen zu können, wurden auch primäre Zellen neu diagnostizierter CML-Patienten einer Behandlung mit Imatinib unterzogen und die Auswirkungen der Hemmung von BCR-ABL auf diese Zellen analysiert. Die Patienten 1 und 2 befanden sich zum Zeitpunkt der Diagnose in der Blastenkrise, Patient 3 in der chronischen Phase. Da die primären Zellen wesentlich empfindlicher auf die Substanz reagierten als Zelllinien, wurden geringere Konzentrationen eingesetzt, das Imatinib nur einmalig zugegeben, sowie die Behandlungszeit auf 36 h reduziert.

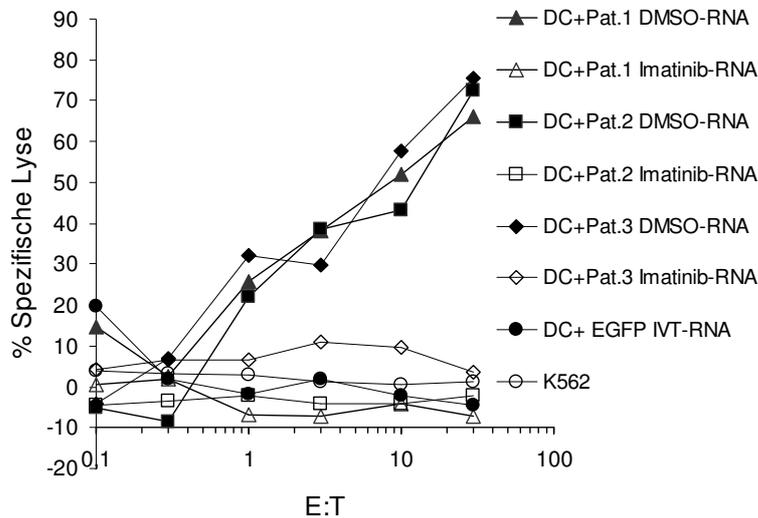


Abb. 9: : Analyse der spezifischen Lyse von Targetzellen mit dem Antigenprofil unterschiedlich behandelter Patientenzellen durch eine K-562-reaktive CTL-Linie (induziert unter Verwendung von RNA aus DMSO-behandelten K-562-Zellen) im <sup>51</sup>Cr-release Assay. Als Targetzellen wurden autologe DCs verwendet, die mit RNA aus DMSO-behandelten (gefüllte Symbole) bzw. mit 1 µM Imatinib behandelten (offene Symbole) Patientenzellen transfiziert wurden.

Nach der Behandlung der Zellen mit 1 µM Imatinib oder der entsprechenden Menge DMSO wurde die RNA isoliert und für die Transfektion von DCs zu Herstellung von Targetzellen eingesetzt. Im <sup>51</sup>Cr-release Assay wurde die Lyse dieser Zellen durch eine CTL-Linie untersucht, die unter Verwendung von RNA aus DMSO-behandelten K-562-Zellen induziert wurde. Diejenigen Zielzellen, die nach Elektroporation mit RNA aus Kontroll-behandelten primären Zellen eingesetzt wurden, wurden sehr effektiv lysiert (Abb.

9, geschlossene Symbole), während die Behandlung mit Imatinib bereits in der hier verwendeten sub-therapeutischen Konzentration die vollständige Inhibition der Erkennung der Targets zur Folge hatte (Abb. 9, offene Symbole). Auch in primären Zellen bewirkt Imatinib dementsprechend eine sehr deutliche Verringerung der Immunogenität.

#### 4.1.5 Expression von Tumorantigenen in primären CML-Zellen nach Behandlung mit Imatinib

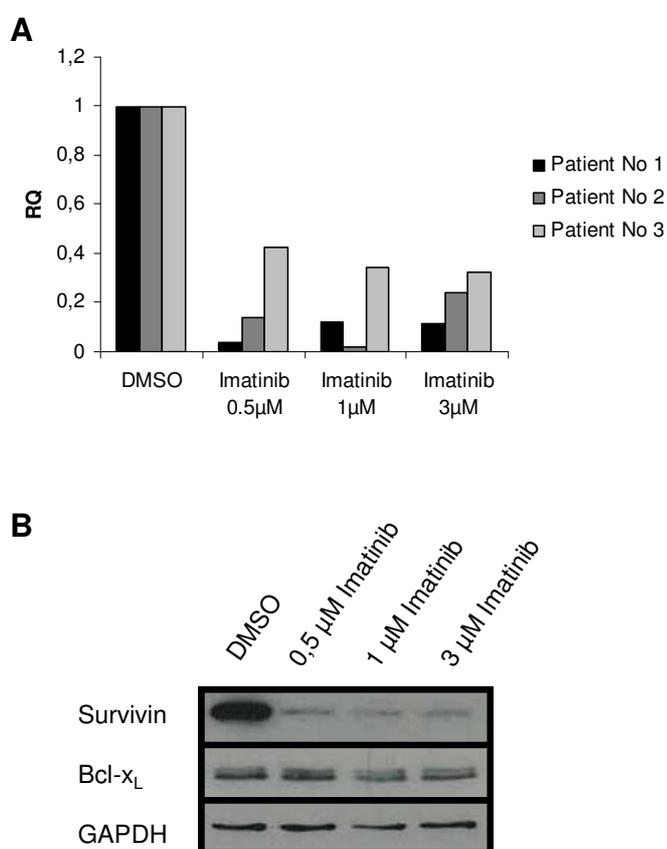


Abb. 10: (A) Relative Quantifikation der Expression des Tumorantigens hTERT durch quantitative Real-time PCR in Zellen dreier CML-Patienten (Pat. 1 und 2 in Blastenkrise, Pat. 3 in chronischer Phase; vor Beginn einer Therapie) nach *in vitro*-Behandlung mit Imatinib für 36 h. (B) Western Blot Analyse der Expression von Survivin und Bcl-X<sub>L</sub> in Zellen von Patient 2 nach *in vitro*-Behandlung mit Imatinib für 36 h. Als Ladekontrolle ist eine Hybridisierung mit GAPDH-spezifischem Antikörper gezeigt.

In allen untersuchten Patientenzellen konnte in Korrelation mit der verminderten Erkennung durch CTLs eine Reduktion der mRNA-Level von hTERT nachgewiesen

werden (Abb. 10A). Diese war bei den Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in der Blastenkrise befanden stärker ausgeprägt als bei dem Patienten in der chronischen Phase. Von Patient 2 konnten ausreichend Zellen gewonnen werden, um neben der RNA-Isolation auch Gesamtzell-Lysate anzufertigen und eine Western Blot-Analyse durchzuführen. Einige der bei K-562-Zellen nachgewiesenen Tumorantigene waren in dieser Probe nicht detektierbar, allerdings zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  Imatinib eine eindeutige Herunterregulation der Expression von Survivin. Dahingegen blieb die Expression von Bcl-x<sub>L</sub> unverändert (Abb. 10B).

### **4.2 Einfluss von Apoptose und Zellzyklusarrest auf die Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten**

Um auszuschließen, dass die Inhibition der Induktion zytotoxischer T-Zellen und die Verringerung der Erkennung von Targetzellen mit dem Antigenprofil Imatinib-behandelter Zellen darauf beruht, dass Imatinib Apoptose induziert, wurde über in K-562-Zellen alternative Wege Apoptose bzw. Zellzyklusarrest induziert und die Gesamt-RNA aus diesen Zellen für die Induktion von CTLs verwendet. Dadurch werden mit der Apoptoseinduktion und dem Zellzyklusarrest verbundene Mechanismen wie der Stopp der Transkription und Translation oder eine mindere Qualität der isolierten RNA aus apoptotischen Zellen als potentieller Grund für eine schlechtere Präsentation der immunogenen Antigene auf den zur Induktion der CTLs verwendeten APCs überprüft und analysiert, ob der Verlust der Immunogenität der CML-Zellen durch eine Reduktion der BCR-ABL-Aktivität bedingt ist.

#### **4.2.1 Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest**

Hierzu wurden K-562-Zellen jeweils für 48 h mit 15  $\mu\text{g/ml}$  des Alkaloids Etoposid, welches als Topoisomerase II-Inhibitor wirkt, bzw. 20  $\mu\text{M}$  des mTOR-Inhibitors Rapamycin behandelt. Ebenso wurden die Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit 200 Gy für 48 h in Kultur genommen, um in Analogie zu der Behandlung mit Imatinib nach 48 h Apoptose zu induzieren. Wie in Abbildung 11 durch die Markierung der fragmentierten DNA durch den Marker M1 gezeigt, führen diese Maßnahmen sogar zu höheren Apoptoseraten als durch

die Anwendung von 3  $\mu$ M Imatinib erreicht werden. Dadurch kann untersucht werden, ob über unterschiedliche Wege ausgelöste Apoptose in diesem Ausmaß für die hemmenden Auswirkungen auf die CTL-Induktion verantwortlich ist.

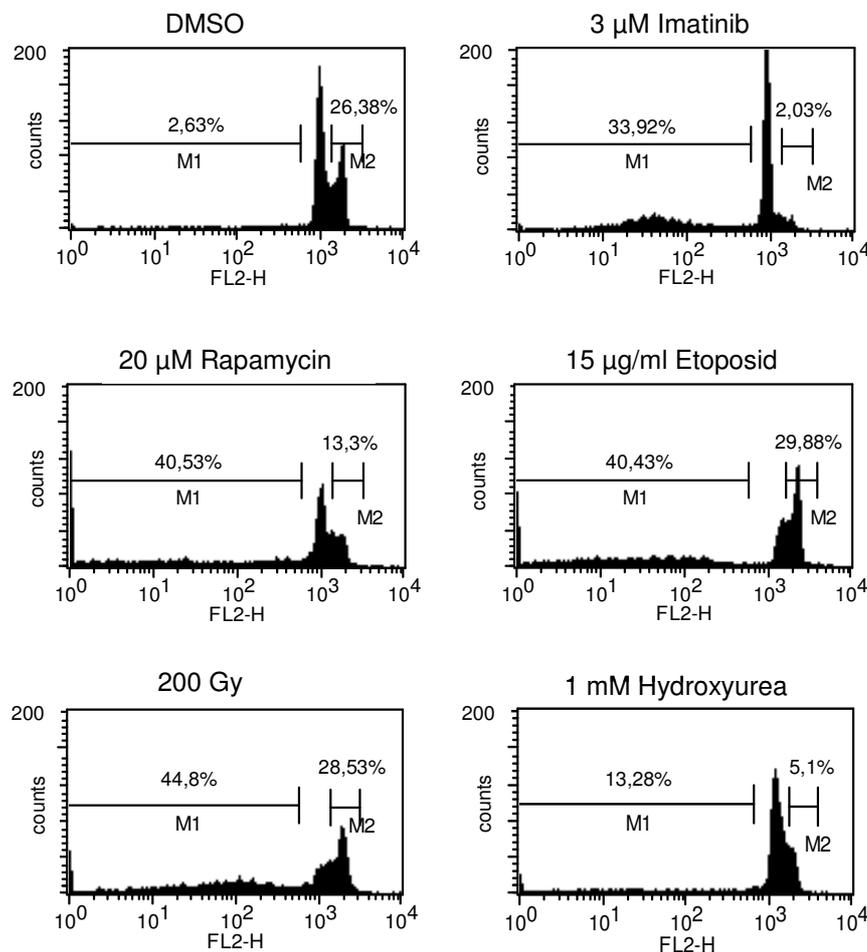


Abb. 11: Färbung der fragmentierten DNA zur Messung der Apoptose nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991) in K-562-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Apoptoseinduktoren für 48h. M1 markiert die fragmentierte, hypodiploide DNA der apoptotischen Zellen links des 2N-Peaks, M2 markiert den 4N-Peak der Zellen mit repliziertem Chromosomensatz. Die Diagramme zeigen repräsentative Beispiele aus drei unabhängigen Experimenten.

Neben der Induktion von Apoptose ist nach der Behandlung mit 3  $\mu$ M Imatinib zu erkennen, dass die K-562-Zellen in einen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase übergehen. Der 4N-Peak, der den verdoppelten Chromosomensatz nach der Replikation in der S- bzw. G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus repräsentiert (M2 in Abb. 11), nimmt im Vergleich zur Kontrolle deutlich ab. Um auch diesen Effekt als Ursache für die verminderte CTL-Induktion

ausschließen zu können, wurde durch das CML-Therapeutikum Hydroxyurea in einer Konzentration von 1 mM innerhalb von 48 h ein Zellzyklusarrest induziert. Hydroxyurea inhibiert die Ribonukleotidreduktase, was dazu führt, dass der intrazelluläre Desoxynukleotid-Vorrat dezimiert und so die DNA-Reparatur gehemmt wird. Die hier verwendete Konzentration entspricht der *steady-state* Plasmakonzentration in Patienten (Smith et al., 1993; Gandhi et al., 1998). Nach 48-stündiger Behandlung zeigten die K-562-Zellen in der DNA-Färbung nach Nicoletti eine deutlich verminderte S- bzw. G<sub>2</sub>-Phase, entsprechend dem G<sub>1</sub>-Zellzyklusarrest durch Imatinib, während die Apoptoserate nur rund 20% betrug.

### **4.2.2 Einfluss von Apoptose und Zellzyklusarrest auf die Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten**

Aus den apoptotischen bzw. im Zellzyklusarrest befindlichen Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und entsprechend der CTL-Induktion mit RNA aus Imatinib-behandelten Zellen für die Elektroporation von DCs und die darauf folgende Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten eingesetzt. In Abb. 12 ist die spezifische Lyse ausgewählter Targetzellen durch diese CTLs dargestellt (A-C). Alle CTLs waren in der Lage, das Antigenprofil von DMSO-behandelten K-562-Zellen zu erkennen und die entsprechenden Targetzellen zu lysieren. Targets, die mit RNA aus Imatinib-behandelten K-562-Zellen transfiziert waren, konnten von keiner der mit Hilfe von RNA aus apoptotischen Zellen induzierten CTL-Linien lysiert werden.

Ebenso wie nach Verwendung der RNA aus apoptotischen Zellen führte der Einsatz der RNA aus mit Hydroxyurea behandelten Zellen nicht zu einem Verlust der lytischen Aktivität der induzierten CTLs. Dies zeigt, dass ein Eingriff in den Zellzyklus ebenso wenig wie die Induktion von Apoptose die Immunogenität der CML-Zellen beeinflusst. Da Hydroxyurea ebenso wie IFN- $\alpha$  als CML-Therapeutikum eingesetzt wurde und zur Induktionstherapie auch heute noch verwendet wird, ist dieses Ergebnis auch ein wichtiger Hinweis darauf, dass die Elimination der CML-Zellen bei verschiedenen Behandlungen unterschiedlichen Mechanismen unterliegt.

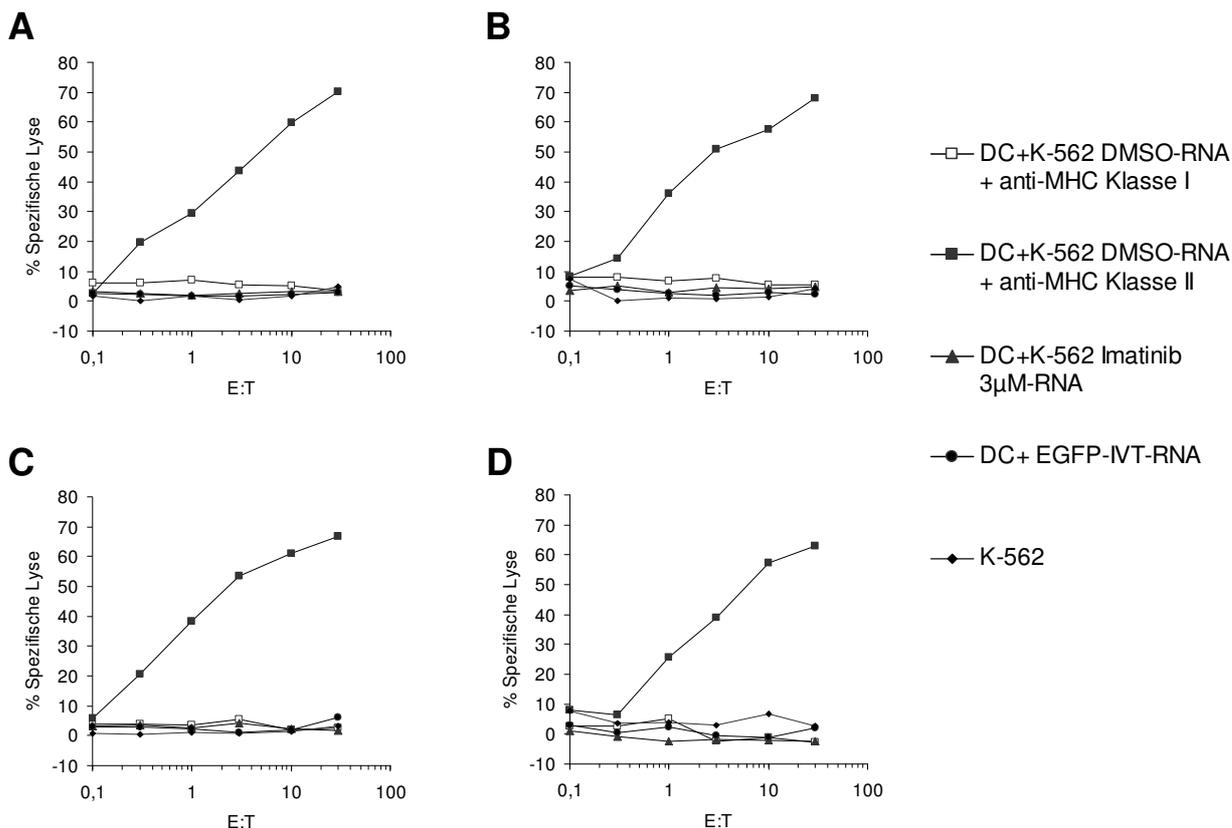


Abb. 12: Analyse der spezifischen Lyse von Targetzellen durch *in vitro* induzierte CTLs im <sup>51</sup>Cr-release Assay. Als Stimulatoren zur Induktion der CTL wurden autologe DC eingesetzt, die mit RNA aus mit 20 µM Rapamycin behandelten K-562 (A), mit 15 µg/ml Etoposid behandelten K-562 (B), mit 200 Gy bestrahlten K-562 (C) oder mit 1 mM Hydroxyurea behandelten K-562 (D) transfiziert wurden.

### 4.3 Einfluss der Depletion von BCR-ABL in K-562- und K-562R-Zellen

#### 4.3.1 Depletion der BCR-ABL-Expression in K-562- und K-562R-Zellen

Imatinib inhibiert neben BCR-ABL auch c-ABL, PDGF-R und c-KIT Kinaseaktivitäten (Heinrich et al., 2000; Buchdunger et al., 2000). Um nachzuweisen, dass die beeinträchtigte CTL-Induktion nach Behandlung der CML-Zellen mit Imatinib auf der direkten Inhibition von BCR-ABL beruht, wurde die Expression des Fusionsproteins mit der Methode der RNA-Interferenz in K-562- und K-562R-Zellen unterbunden. Dazu wurde siRNA eingesetzt, die gegen die in K-562-Zellen vorliegende *BCR-ABL*-Fusionsstelle b3a2 gerichtet ist (sib3a2\_1). Durch den Einsatz verschiedener Konzentrationen der siRNA

zwischen 120 pmol und 320 pmol pro  $2 \times 10^6$  Zellen ( $0,6 - 1,6 \mu\text{M}$ ) konnte in beiden Zelllinien die Expression effektiv vermindert werden (Abb. 13). Sekundäre Effekte, wie z.B. eine Interferonantwort in transfizierten Zellen, wurden durch den Einsatz einer mismatch-Kontrolle (simis), die sich im Vergleich zur spezifischen siRNA durch zwei ausgetauschte Nukleotide auszeichnet, sowie durch den Einsatz einer sequenz-unabhängigen siRNA (siGL2) und nichttransfizierten Zellen (*nontransfected cells*, NTC) ausgeschlossen.

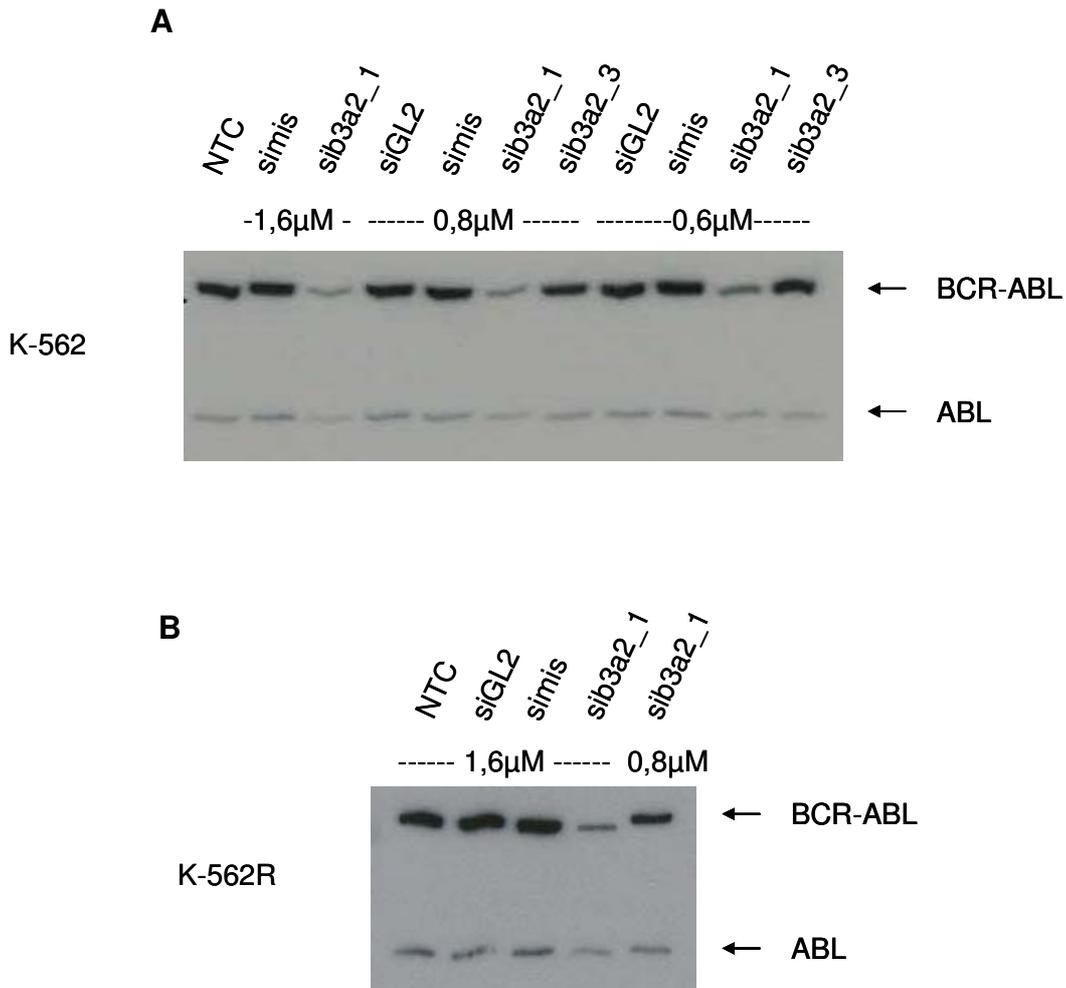


Abb.13: Analyse der verminderten Expression von BCR-ABL durch Transfektion mit spezifischer siRNA gegen die b3a2-Fusionsstelle (sib3a2\_1) in K-562- (A) und K-562R-Zellen (B). Die Expression der zellulären ABL-Tyrosinkinase bleibt unbeeinflusst und dient als Ladekontrolle.

In K-562-Zellen war nach der Transfektion mit  $0,6 \mu\text{M}$  der spezifischen siRNA bereits eine deutliche Reduktion der Expression von BCR-ABL zu verzeichnen, die sich durch leichte

Erhöhung der Konzentration auf 0,8  $\mu\text{M}$  noch steigern ließ. Keine der Kontroll-siRNAs hatte eine Auswirkung auf die Expression des Fusionsproteins. *sib3a2\_3* stellt eine spezifische siRNA dar, die im Gegensatz zu *sib3a2\_1* keine Wirkung zeigt, und ebenfalls als Negativkontrolle eingesetzt wurde. Die Transfektion der Imatinib-resistenten K-562R führte aufgrund der Überexpression von BCR-ABL in diesen Zellen (Weisberg and Griffin, 2000) erwartungsgemäß zu einer schwächeren prozentualen Reduktion der Expression beim Einsatz von 0,8  $\mu\text{M}$  spezifischer siRNA. Durch den Einsatz von 1,6  $\mu\text{M}$  ließ sich jedoch auch in diesen Zellen eine der Regulation durch 0,8  $\mu\text{M}$  siRNA in K-562 entsprechende Verminderung der Expression erreichen.

#### **4.3.2 Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten gegen Antigene aus mit siRNA transfizierten K-562- und K-562R-Zellen**

Die Gesamt-RNA aus siRNA-transfizierten K-562- und K-562R-Zellen wurde zur Elektroporation von DCs verwendet, um analog zum Vorgehen nach der Behandlung der Zelllinien mit Imatinib CTLs zu induzieren. Diese wurden in Standard  $^{51}\text{Cr}$ -release Assays auf ihre lytische Aktivität und Spezifität hin getestet. In diesen Versuchen wurden für die Herstellung der Targetzellen autologe DCs mit RNA aus siRNA-transfizierten K-562 elektroporiert. K-562-Zellen sowie mit *EGFP*-IVT transfizierte DCs wurden als Negativkontrollen eingesetzt.

CTLs, die unter Verwendung von Gesamt-RNA aus *simis*-transfizierten K-562 induziert wurden, waren in der Lage, Zielzellen zu lysieren, die das Antigenprofil von *simis*-transfizierten K-562-Zellen präsentierten. Gleichzeitig waren sie unfähig, solche DCs zu lysieren, die mit RNA aus *sib3a2\_1*-transfizierten K-562 elektroporiert waren (Abb. 14A). Die MHC-Klasse I-Restriktion konnte durch die Inhibition der Lyse mittels eines blockierenden Antikörpers gegen MHC Klasse I nachgewiesen werden. Das gleiche Lyseverhalten wurde erreicht, wenn CTLs mit DCs generiert wurden, die mit RNA aus *simis*-transfizierten K-562R-Zellen transfiziert waren (C).

Wurde für die CTL-Induktion RNA aus K-562-Zellen verwendet, die mit 0,8  $\mu\text{M}$  der spezifischen siRNA transfiziert waren, so führte dies zu einer kompletten Unfähigkeit der CTLs, Targetzellen zu erkennen und zu lysieren (B). Die Behandlung der resistenten Zellen mit der gleichen Konzentration der spezifischen siRNA, entsprechend einer weniger ausgeprägten Herunterregulation der BCR-ABL-Expression (siehe Abb. 13B), führte

## ERGEBNISSE

dagegen nur zu einer Reduktion der Reaktivität der CTLs. Im Vergleich zur Kontrolle, bei der die CTL-Induktion unter Verwendung von RNA aus mit mismatch-siRNA transfizierten K-562R erfolgte, ist eine deutliche Verminderung der lytischen Kapazität zu erkennen. Wurden die resistenten Zellen jedoch mit 1,6  $\mu\text{M}$  der spezifischen siRNA transfiziert und dementsprechend die Expression des BCR-ABL-Proteins auf eine BCR-ABL:c-ABL Ratio reduziert, die der Transfektion der nicht-resistenten Zellen mit 0,8  $\mu\text{M}$  entspricht (Abb. 13), so waren auch die in der Folge induzierten CTLs nicht lytisch aktiv.

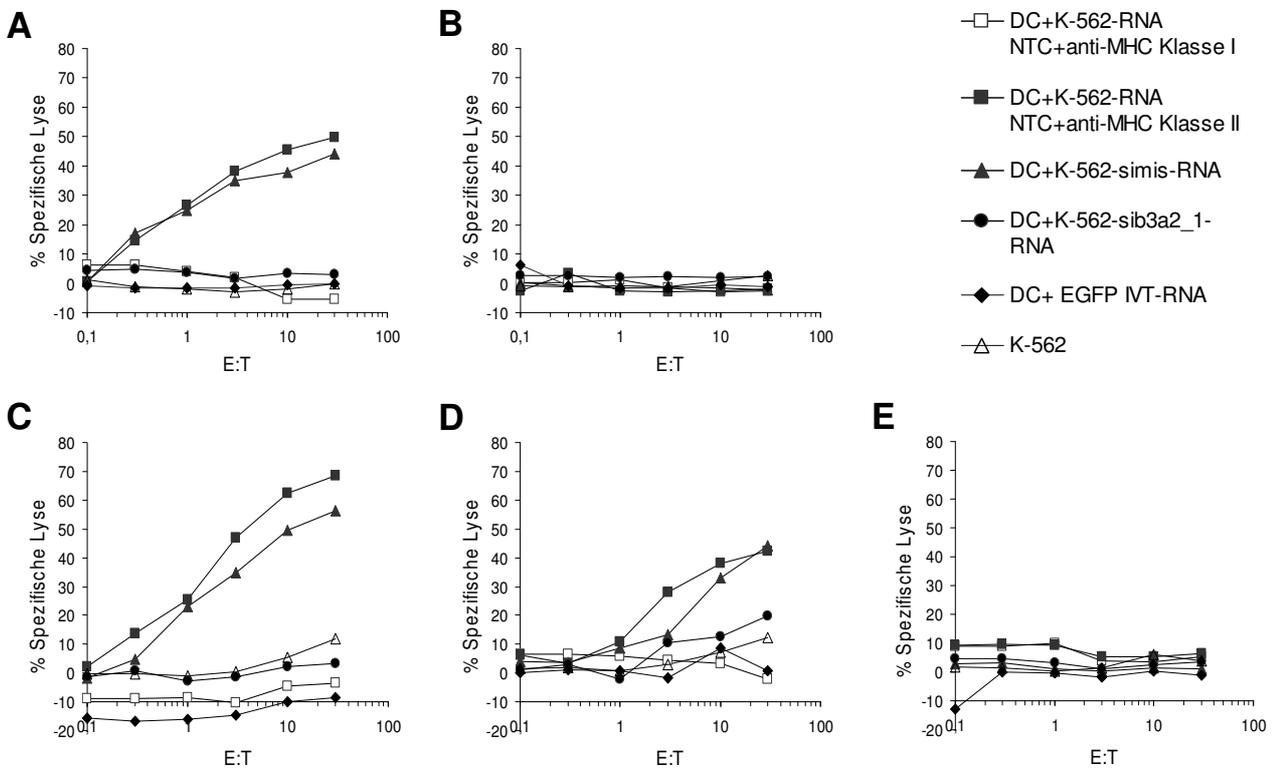


Abb. 14: Analyse der spezifischen Lyse von Targetzellen durch *in vitro* induzierte CTLs im  $^{51}\text{Cr}$ -release Assay. Als Stimulatoren zur Induktion der CTL wurden autologe DC eingesetzt, die mit RNA aus siRNA-transfizierten K-562-Zellen (A+B) oder K-562R-Zellen (C-E) transfiziert wurden. Folgende siRNAs wurden verwendet: (A) simis, (B) 0,8  $\mu\text{M}$  sib3a2\_1, (C) simis, (D) 0,8  $\mu\text{M}$  sib3a2\_1, (E) 1,6  $\mu\text{M}$  sib3a2\_1.

In Einklang mit den Ergebnissen nach Inhibition der Kinaseaktivität durch Imatinib führt die Herunterregulation der Expression durch spezifische siRNA zu einem hemmenden Effekt auf die CTL-Induktion. Eine Inhibition der Funktion durch die Verminderung der Expression

des Fusionsproteins hatte den vollständigen Verlust der Immunogenität der K-562-Zellen zur Folge, während dieser Effekt in den resistenten Zellen durch das Ausmaß der Inhibition von BCR-ABL durch siRNA titrierbar war. Dies zeigt die Anhängigkeit der Induzierbarkeit von CTL-Antworten von der Expression und Aktivität des BCR-ABL-Fusionsproteins und unterstützt daher die Annahme, dass BCR-ABL-Aktivität immunogene Antigene in CML-Zellen hochreguliert und im Gegenzug die Inhibition der Kinaseaktivität die Reduktion der Expression dieser Antigene zur Folge hat.

#### **4.3.3 Expression von Tumorantigenen in K-562- und K-562R-Zellen nach Depletion der BCR-ABL-Expression durch spezifische siRNA**

Die Depletion der BCR-ABL-Expression führt ebenso wie die Behandlung Ph-positiver Zellen mit Imatinib zu einem Verlust der konstitutiven BCR-ABL Kinaseaktivität und der daraus resultierenden Aktivierung von Signalwegen. Ein Einfluss der Aktivität von BCR-ABL auf die Expression von Tumorantigenen sollte daher nach der Transfektion mit siRNA nachweisbar sein. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde nach der Depletion von BCR-ABL im Western Blot die Expression der bereits in Reaktion auf die Behandlung mit Imatinib untersuchten Antigene überprüft.

Wie in Abb. 15 ersichtlich ist, wurde nur die Expression von Survivin nach der siRNA-Transfektion von K-562-Zellen deutlich reduziert. In K-562R-Zellen ist selbst bei entsprechend ausgeprägter Verminderung der Expression durch 1,6  $\mu$ M sib3a2\_1 kein Effekt erkennbar. Demnach wäre es möglich, dass die Effekte auf die Expression von tumorassoziierten Antigenen, die nach Behandlung mit Imatinib nachweisbar sind, durch sekundäre Wirkungen der Substanz, bsp. durch Hemmung der Aktivität von c-KIT, entstehen. Dennoch ist die Hemmung der Induzierbarkeit von CTLs ebenso stark ausgeprägt wie nach Applikation von Imatinib und durch die Konzentration der siRNA und dementsprechend die Expression von BCR-ABL in der Zelle titrierbar. Die Aktivität von BCR-ABL hat also einen direkten Einfluss auf die Immunogenität und wirkt möglicherweise durch die Beeinflussung nicht in dieser Arbeit untersuchter Antigene.

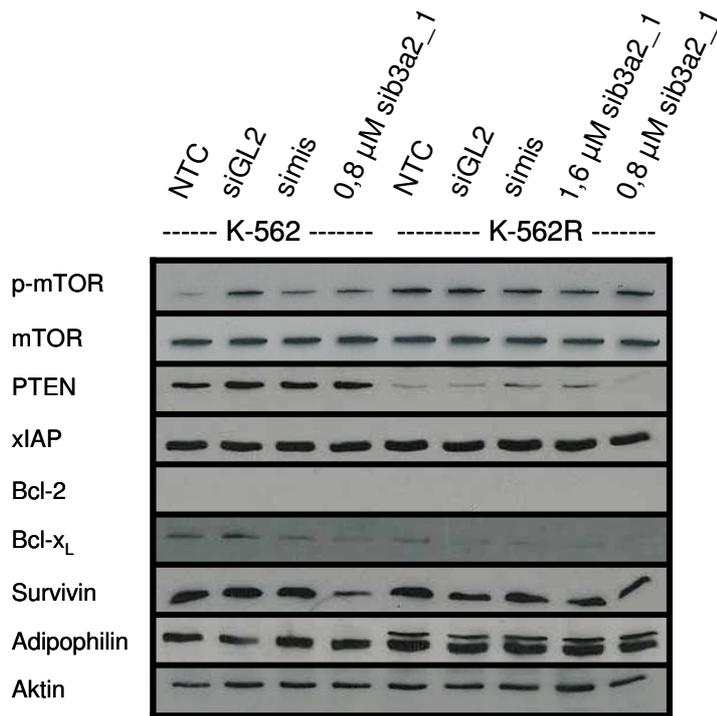


Abb. 15: Analyse der Expression verschiedener Tumorantigene und zellulärer Proteine nach Depletion der Expression von BCR-ABL durch spezifische siRNA (sib3a2\_1). Als Ladekontrolle ist eine Hybridisierung mit Aktin-spezifischem Antikörper gezeigt.

## 5 DISKUSSION

In ca. 90% aller Fälle ist die chronische myeloische Leukämie mit der reziproken Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$  assoziiert, welche die Expression des Fusionsproteins BCR-ABL zur Folge hat. Dessen konstitutive Tyrosinkinaseaktivität verursacht die maligne Transformation der CML-Blasten durch Deregulation der Proliferation, Apoptose und Adhäsion. Zusätzlich stellt BCR-ABL ein für die CML-Blasten spezifisches Antigen dar, das die Möglichkeit eröffnet, gezielte medikamentöse oder immuntherapeutische Therapiestrategien zu entwickeln.

Imatinib (Gleevec<sup>®</sup>/Glivec<sup>®</sup>) ist ein Inhibitor der BCR-ABL Kinaseaktivität und wurde im Jahr 2001 in den USA und der EU für die Behandlung von CML-Patienten in der chronischen Phase nach Versagen einer IFN- $\alpha$ -Therapie oder in fortgeschrittenen Stadien, Ende 2002 auch als Erstlinientherapie der CML zugelassen. Weiterhin hat Imatinib seit 2002 die Zulassung für die Therapie gastrointestinaler Stromatumoren (GIST), die in der Mehrzahl der Fälle auf Mutationen der Kinase c-KIT beruhen. Die Einführung dieser spezifischen Therapie hat zu signifikanten Verbesserungen des Ansprechens und des Überlebens der Patienten geführt.

In die gezielte Therapie der CML wurde zu Beginn die Hoffnung gesetzt, die Patienten heilen zu können. Mittlerweile führten jedoch neue Erkenntnisse über die Existenz von Leukämienstammzellen dazu, großes Augenmerk auf die Beteiligung des Immunsystems an der Eliminierung leukämischer Zellen zu legen (Copland et al., 2005). CML-Stammzellen sind ruhende Zellen insbesondere im Knochenmark, die im Gegensatz zu den proliferativ aktiven Leukämiezellen des peripheren Blutes nicht von der Aktivität der BCR-ABL Tyrosinkinase abhängig sind. Dies führt dazu, dass sie durch Tyrosinkinaseinhibitoren nicht eliminiert werden können (Jiang et al., 2007). Eine aktive Immunantwort gegen für CML-Zellen charakteristische Antigene könnte diese Zellen jedoch möglicherweise erreichen und eliminieren. Bei Patienten, die mit IFN- $\alpha$ , der Standardtherapie vor der Zulassung von Imatinib, behandelt wurden, beruht die anti-leukämische Aktivität zum Teil auf der Induktion von zytotoxischen T-Zell-Antworten gegen die Leukämiezellen. Im Gegensatz dazu konnten Burchert et al. nachweisen, dass mit Imatinib behandelte Patienten verminderte CTL-Antworten aufweisen (Burchert et al., 2003). Die Gründe für diese unterschiedlich ausgeprägte Beteiligung des Immunsystems

sind unklar. Auslöser könnten ein negativer Einfluss des Medikamentes auf die Funktionen des Immunsystems oder eine reduzierte Immunogenität der CML-Zellen sein.

Imatinib wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen mit hemmenden Einflüssen auf das Immunsystem in Verbindung gebracht. So wird die Funktion und die Differenzierung von APCs und die Effektorfunktion von T-Zellen inhibiert, wodurch Imatinib mit auf dendritischen Zellen basierenden immuntherapeutischen Strategien durch die Hemmung der Induktion von CTL-Antworten *in vivo* interferieren könnte (Dietz et al., 2004; Appel et al., 2004; Appel et al., 2005; Seggewiss et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob die Immunantwort gegen CML auch unabhängig von der direkten Beeinflussung des Immunsystems durch Imatinib gehemmt wird. Die zentrale Frage war hierbei, ob die Aktivität der Tyrosinkinase BCR-ABL eine Rolle in der Immunogenität von CML-Zellen spielt.

Die Untersuchung der Hemmung der Kinaseaktivität durch die Behandlung von CML-Zellen mit Imatinib führte ebenso wie die Reduktion der Expression von BCR-ABL durch spezifische siRNA zu dem Ergebnis, dass Zelllinien und primäre CML-Zellen nach BCR-ABL-Hemmung eine stark verminderte Immunogenität aufweisen. So war die Induktion einer spezifischen CTL-Antwort gegen das veränderte Antigenprofil dieser Zellen nicht mehr möglich, sowie die Erkennung des Antigenprofils Imatinib-behandelter Zellen durch CML-spezifische CTLs gehemmt (Brauer et al., 2007).

Um die Auswirkungen der BCR-ABL-Inhibition zu untersuchen, wurden Zellen der CML-Zelllinie K-562 und einer neben anderen Mechanismen aufgrund einer BCR-ABL-Überexpression gegen Imatinib resistenten Variante, K-562R (Weisberg and Griffin, 2000), mit Imatinib oder zur Kontrolle mit DMSO behandelt, die RNA isoliert und diese zur Transfektion von aus Monozyten generierten DCs verwendet. Diese Zellen wurden dann als antigenpräsentierende Zellen zur Induktion polyklonaler T-Zell-Antworten verwendet. Unter Verwendung von RNA aus Imatinib-behandelten Zellen induzierte CTLs waren nicht in der Lage Targetzellen mit verschiedenen CML-assoziierten Antigenprofilen zu lysieren, während die Verwendung von RNA aus DMSO-behandelten K-562-Zellen, ebenso wie RNA aus DMSO- oder Imatinib-behandelten K-562R-Zellen zur Induktion spezifischer CTLs mit starker lytischer Aktivität führte. Zudem waren diese CTLs in der Lage, verschiedene CML-assoziierte Antigene wie Survivin, PRAME, WT1 und PR3 in Elispot-Assays zu erkennen. Keine der aktiven CTL-Linien lysierte jedoch Targetzellen, die unter Verwendung von RNA aus Imatinib-behandelten K-562-Zellen hergestellt wurden. Dies legt nahe, dass die antigene Information, die die isolierte RNA aus unterschiedlich

behandelten Zellen enthält, distinkte Unterschiede aufweist, die die Induzierbarkeit von zytotoxischen T-Zellen determiniert. Da in den CML-Zellen ebenso wie in den hier verwendeten DCs die Translation der in der RNA codierten Proteine die Voraussetzung für eine Präsentation immunogener Epitope auf der Zelloberfläche ist, können diese Ergebnisse auf die Immunogenität der CML-Zellen übertragen werden. Die Reduktion der Immunogenität nach Hemmung von BCR-ABL könnte also beispielsweise auf einer verminderten Expression immunogener Antigene beruhen. Es ist bekannt, dass die konstitutive Aktivität der ABL-Tyrosinkinase in CML-Zellen über die Aktivierung diverser Signalkaskaden die Expression unterschiedlicher Proteine beeinflusst und teilweise induziert (Watari et al., 2000; Hakansson et al., 2004).

Um die Auswirkungen der BCR-ABL-Inhibition genauer zu analysieren wurde die Expression von Antigenen, die in Zusammenhang mit Immunantworten gegen CML stehen, nach der Applikation von Imatinib untersucht. Die durch Imatinib vermittelte Inhibition von BCR-ABL führt in K-562-Zellen zu einer verminderten Expression von Tumorantigenen und zellulären Proteinen wie Survivin, Adipophilin, hTERT, WT1, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 in Korrelation mit einer verminderten Induktion spezifischer CTLs, während die Expression mehrerer anderer Proteine unverändert blieb. Diese Herunterregulation wurde in K-562R-Zellen nicht beobachtet. Da nach einer Imatinib-Behandlung in resistenten Zellen keine Beeinflussung der Immunogenität festgestellt werden konnte, unterstützt dieses Ergebnis die Hypothese, dass durch die Aktivität von BCR-ABL hochregulierte Antigene für die Erkennung der CML-Zellen verantwortlich sind.

In primären CML-Zellen, die mit Imatinib inkubiert wurden, konnte die Herunterregulation von hTERT und Survivin detektiert werden, die mit der verminderten Lyse von mit RNA dieser Zellen transfizierten DCs als Targets in <sup>51</sup>Cr-release Assays korrelierte. Es besteht dementsprechend ein Zusammenhang zwischen Induzierbarkeit von CTLs und Expression von Antigenen. Neben den hier untersuchten könnten auch weitere Immunogene an diesem Prozess beteiligt sein. Außerdem ist es denkbar, dass nicht nur die Expression, sondern auch die Prozessierung und Präsentation der Antigene von der Aktivität der BCR-ABL-Kinase beeinflusst werden.

Um auszuschließen, dass die inhibitorischen Effekte durch Apoptose und dementsprechend globale Herunterregulation der Proteinsynthese bedingt sind, wurden alternative Methoden zur Apoptoseinduktion eingesetzt und der Einfluss auf die Induzierbarkeit von CTL-Antworten gegen CML-assoziierte Antigene untersucht. Zu

diesem Zweck wurden K-562-Zellen mit Etoposid, Rapamycin oder  $\gamma$ -Strahlung behandelt um Apoptoseraten von ca 40% zu erreichen, einer höheren Rate als durch die Behandlung mit 3  $\mu$ M Imatinib erreicht wird. Die analog induzierten CTLs waren spezifisch in der Lage, Targets zu lysieren und wiesen eine lytische Kapazität auf, die der Lyse der mit RNA aus DMSO-behandelten K-562-Zellen induzierten CTLs entsprach. Entsprechend hatte der durch Hydroxyurea ausgelöste Zellzyklusarrest keinen Einfluss auf die CTL-Induktion. Dies legt nahe, dass ebenso wie bei der Behandlung von CML-Patienten mit IFN- $\alpha$  auch bei einer Behandlung mit Hydroxyurea die Induktion von zytotoxischen Immunantworten möglich ist und diese Zellen an der Elimination der CML-Zellen beteiligt sind. Dies scheint nach den vorliegenden Ergebnissen während einer Behandlung mit Imatinib aufgrund der verminderten Immunogenität der CML-Zellen nicht möglich zu sein und legt nahe, dass die Beseitigung der CML-Zellen bei mit Imatinib behandelten Patienten ohne Beteiligung des Immunsystems durch eine zytotoxische Antwort erfolgt. Da Hydroxyurea als CML-Therapeutikum eingesetzt wurde und zur Induktionstherapie auch heute noch verwendet wird, ist dieses Ergebnis neben den bereits veröffentlichten Erkenntnissen über den Einfluss von IFN- $\alpha$  auf das Immunsystem bei CML ein wichtiger Hinweis darauf, dass die Elimination der CML-Zellen bei verschiedenen Behandlungen unterschiedlichen Mechanismen unterliegt.

Neben BCR-ABL inhibiert Imatinib auch die Kinasen c-KIT und PDGF-Rezeptor (Buchdunger et al., 2000). Wie bereits erwähnt, macht man sich die Hemmung von c-KIT in der Behandlung von GIST zu Nutze. In der CML-Behandlung ist dieser Effekt nicht nötig, könnte aber dennoch in CML-Zellen zusätzliche Auswirkungen auf die Antigenexpression und die Immunogenität haben. Um zu zeigen, dass die beobachteten Effekte durch die Inhibition von BCR-ABL vermittelt sind, wurde spezifische siRNA gegen die Fusionsstelle des *BCR-ABL*-Gens b3a2 eingesetzt, um die Expression des Proteins in den CML-Zellen zu unterbinden.

Während K-562-Zellen auf Imatinib ansprechen, ist die Resistenz der K-562R-Zellen zumindest zum Teil durch eine zwei- bis dreifache Überexpression von BCR-ABL bedingt, was die Widerstandsfähigkeit dieser Zellen gegenüber den hier verwendeten Imatinib-Konzentrationen erklärt (Weisberg and Griffin, 2000). Die direkte Beeinflussung der Expression durch spezifische siRNA jedoch zeigt, dass das Ausmaß der Herunterregulation mit der Induzierbarkeit von CTLs korreliert. Die Verwendung von 0,8  $\mu$ M siRNA, einer Konzentration, die in nicht-resistenten Zellen sehr effektiv die Expression

von BCR-ABL vermindert und die Induktion von spezifischen CTLs inhibiert, resultiert durch den deutlich geringeren Einfluss auf die BCR-ABL-Expression in K-562R-Zellen entsprechend in einer nur geringen Verminderung der CTL-Induktion. Wird eine Konzentration von 1,6  $\mu$ M verwendet, die zu einer der Herunterregulation in nicht-resistenten Zellen entsprechenden Reduktion der BCR-ABL-Expression führt, bewirkt dies einen entsprechenden nachteiligen Effekt auf die CTL-Induktion.

Zusammengenommen bestätigen diese Ergebnisse, dass die Inhibition der BCR-ABL-Aktivität direkt die Immunogenität der CML-Zellen determiniert. Dies ist nicht auf Apoptoseinduktion, mTOR-Inhibition oder andere Einflüsse auf den Zellzyklus und evtl. verminderte RNA-Qualität bei der Transfektion zurückzuführen. Über welchen Mechanismus die Hemmung erfolgt, ist allerdings nicht abschließend zu klären. Nach der Behandlung mit Imatinib ist die Expression mehrerer Tumorantigene deutlich reduziert, was auch mit der eindeutig verminderten Erkennung diverser Antigene im Elispot korreliert. Nach der erfolgreichen Herunterregulation der BCR-ABL-Expression durch siRNA ist dagegen kein so deutlicher Effekt auf die Antigenexpression zu beobachten.

Auffällig ist allerdings, dass sowohl nach Imatinib-vermittelter Hemmung der Aktivität, als auch nach Depletion der BCR-ABL-Expression in CML-Zelllinien ebenso wie in primären Zellen die Expression von Survivin sehr stark vermindert ist.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Expression von Survivin durch Signalkaskaden downstream von BCR-ABL reguliert wird und Survivin essentiell für das Überleben BCR-ABL positiver Zellen ist (Carter et al., 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zudem in Elispot Assays gezeigt werden, dass Survivin an der Erkennung von CML-Zellen durch CTLs beteiligt ist. Die Expression von Survivin ist sowohl in mit Imatinib behandelten K-562-Zellen als auch nach Depletion von BCR-ABL durch spezifische siRNA, ebenso wie in mit Imatinib behandelten primären CML-Zellen, stark reduziert. Diese Herunterregulation korreliert mit der eingeschränkten Erkennung von Targetzellen mit dem Antigenprofil dieser behandelten Zellen durch CTLs, welche gegen das Antigenprofil unbehandelter K-562-Zellen generiert worden waren. Zusätzlich war die Erkennung von DCs, welche mit *survivin*-IVT elektroporiert waren in Elispot-Assays durch diese CTLs sehr stark. Dies legt eine Beteiligung von Survivin am Prozess der Erkennung von CML-Zellen durch CTLs nahe. Dennoch könnten andere tumorassoziierte Antigene, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, durch die konstitutive BCR-ABL-Aktivität in ihrer Expression verstärkt und dadurch für die Immunogenität von Bedeutung sein.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Aktivität von BCR-ABL von entscheidender Bedeutung für die Immunogenität von CML-Zellen ist, da sowohl die Inhibition der Aktivität durch BCR-ABL als auch die Verminderung der Expression durch spezifische siRNA die Induktion von spezifischen CTL-Antworten unterbindet. Dies kann in einer Hochregulation der Expression immunogener tumorassoziierter Antigene durch die unkontrollierte Tyrosinkinaseaktivität begründet liegen. Die Inhibition oder Reduktion der Expression von BCR-ABL führt dementsprechend zu einer Herunterregulation der Expression dieser Antigene und bedingt dadurch den Verlust der Immunogenität.

Da die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen im Bereich der *steady-state* Plasmalevel behandelter Patienten liegen (le Coutre et al., 2004), könnte die Behandlung mit Imatinib aufgrund einer Inhibition der Induktion von CTL-Antworten und der fehlenden Erkennung der CML-Zellen durch spezifische CTLs mit immuntherapeutischen Ansätzen interferieren. Insbesondere bei Therapiestrategien, die auf der Induktion von CTL-Antworten gegen CML-assoziierte Antigene *in vivo* beruhen, hätte eine verminderte Immunogenität der Leukämiezellen das Scheitern der Therapie zur Folge. Aber auch der adoptive Transfer *in vitro* generierter CTLs hätte wenig Aussicht auf Erfolg, da sie die CML-Zellen während der Imatinib-Behandlung nicht erkennen und eliminieren könnten. Die starke Beeinflussung des Antigenprofils würde zwar möglicherweise in CML-Stammzellen nicht auftreten, da diese Zellen nicht von der Aktivität der Tyrosinkinase abhängig sind. Sie könnten also möglicherweise durch eine aktive Immunantwort gegen CML-assoziierte Antigene eliminiert werden. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass die Induktion von CTL von diesen im Knochenmark residierenden Zellen ausgelöst und aufrechterhalten werden kann. Zusätzlich würden auch die T-Zellen durch Imatinib in ihrer Funktion beeinträchtigt, wie bereits 2005 von Seggewiss et al. gezeigt, und ein Therapieerfolg könnte sich trotz einer *ex vivo*-Generierung von CTL nicht einstellen.

Demnach erscheint aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die Kombination von auf zytotoxischen Immunantworten beruhenden immuntherapeutischen Strategien mit einer Imatinib-Behandlung nicht aussichtsreich.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Chronisch myeloische Leukämie ist eine durch exzessive Granulopoese gekennzeichnete myeloproliferative Erkrankung, die in über 90% der Fälle durch die Expression der konstitutiv aktiven Tyrosinkinase BCR-ABL ausgelöst wird. Die Therapie basiert auf dem spezifischen Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, der Abl-Kinasen, c-KIT und PDGFR durch kompetitive Hemmung der ATP-Bindung inhibiert.

Studien haben gezeigt, dass mit Imatinib therapierte Patienten im Gegensatz zu mit IFN- $\alpha$  behandelten Patienten verminderte CTL-Antworten gegen CML-assoziierte Antigene aufweisen. Dies könnte auf immunsuppressiven Effekten von Imatinib beruhen, aber auch durch eine Verminderung der Immunogenität der CML-Zellen bedingt sein. Um dies zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer Inhibition der BCR-ABL-Aktivität sowie der Reduktion der BCR-ABL-Expression auf die Induzierbarkeit von CTL-Antworten *in vitro* untersucht.

Die medikamentöse Inhibition von BCR-ABL führt zu einer Herunterregulation der Expression verschiedener immunogener Antigene auf CML-Zellen in Korrelation zu einer verminderten Induktion CML-spezifischer zytotoxischer Immunantworten. Dieser Effekt trat entsprechend auch in primären CML-Zellen von Patienten in chronischer Phase oder Blastenkrise auf. Ebenso führt die siRNA-vermittelte Hemmung der Expression von BCR-ABL zu einer stark verminderten Immunogenität von CML-Zellen. In Imatinib-resistenten K-562R-Zellen war dieser Effekt durch die siRNA-Konzentration titrierbar, was den direkten Einfluss der Kinaseaktivität von BCR-ABL demonstriert.



## 7 SUMMARY

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder characterized by excessive granulopoiesis, which in over 90% of the cases is due to the formation of the constitutively active tyrosine kinase BCR-ABL. The therapy is based on the tyrosine kinase inhibitor imatinib, which inhibits Abl kinases, c-KIT and platelet-derived growth factor receptor by competitive inhibition of ATP binding.

Recently, studies revealed that patients treated with imatinib showed impaired CTL responses against CML-associated antigens in comparison to patients treated with IFN- $\alpha$ . This might be due to immunosuppressive effects of imatinib or a treatment induced reduction in immunogenicity of CML cells. To test this, the influence of an inhibition of the activity of BCR-ABL as well as the Reduktion of BCR-ABL expression on the inducibility of CTL responses was analyzed *in vitro*.

The pharmacological inhibition of BCR-ABL leads to a downregulation of the expression of different immunogenic antigens on the CML cells in correlation to a diminished induction of CML directed cytotoxic immune responses. This effect accordingly occurred in primary CML cells of patients in chronic phase or blast crisis. Similarly, the siRNA-mediated knockdown of BCR-ABL expression leads to a strongly reduced immunogenicity of CML cells. This effect was titrateable in imatinib resistant K-562R cells by the concentration of siRNA, which underlines the direct influence of BCR-ABL kinase activity.



## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$ -	anti- (Antikörper gegen)
$\mu\text{F}$	Mikrofarad, Einheit für die elektrische Kapazität
A	Adenosin
<i>ABL</i>	humanes Abelson-Protoonkogen
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
b3a2	<i>BCR</i> -Exon 3 fusioniert an <i>ABL</i> -Exon 2
Bcl	<i>B-cell leukemia/lymphoma</i>
<i>BCR</i>	<i>breakpoint cluster region</i>
BCR-ABL	Fusionsprotein aus BCR und ABL, translatiert nach reziproker Translokation der langen Arme von Chromosom 9 und 22 (t(9;22) (q34;q11))
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
C	Cytosin
CD	Differenzierungsantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten ( <i>cytotoxic T lymphocytes</i> )
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	grünes Fluoreszenzprotein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
Elispot	Enzymgekoppelter Immun-Spot Test ( <i>enzyme linked immunospot technique</i> )

FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIST	gastrointestinale Stromatumoren
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor ( <i>granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i> )
Gy	Gray, Einheit der Dosis radioaktiver Strahlung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSP	Hitzeschockprotein ( <i>heat shock protein</i> )
hTERT	humane Telomerase ( <i>human telomerase reverse transcriptase</i> )
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IM	Imatinib
IVT	<i>in vitro</i> -Transkript ( <i>in vitro transcript</i> )
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
mA	Milliampère
mAb	monoklonaler Antikörper ( <i>monoclonal antibody</i> )
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	Bindeprotein des Rapamycins in Mammalia ( <i>mammalian target of rapamycin</i> )
NP-40	Nonidet P-40
NTC	nichttransfizierte Kontrolle ( <i>nontransfected control</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGFR	Plättchenwachstumsfaktor-Rezeptor ( <i>platelet derived growth factor receptor</i> )
PE	Phycoerythrin
Ph	Philadelphia-Chromosom
PI	Propidiumiodid
pk	polyklonal
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PR3	Proteinase 3
PRAME	<i>preferentially expressed antigen in melanoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
SEM	Mittelabweichung ( <i>standard error of means</i> )
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SZT	Stammzelltransplantation
T	Thymidin
TAA	tumorassoziiertes Antigen ( <i>tumor associated antigen</i> )
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>Tris buffered saline</i> )
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U	Uridin
U/ml	Enzymeinheiten pro Milliliter ( <i>units per ml</i> )

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

V	Volt
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>
xIAP	x-gekoppelter Inhibitor der Apoptose ( <i>x-linked inhibitor of apoptosis protein</i> )

## 9 LITERATUR

- (1) Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials: Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:1616-1620.
- (2) Andersen MH, Becker JC, thor SP. The antiapoptotic member of the Bcl-2 family Mcl-1 is a CTL target in cancer patients. *Leukemia.* 2005a;19:484-485.
- (3) Andersen MH, Reker S, Kvistborg P, Becker JC, thor SP. Spontaneous immunity against Bcl-xL in cancer patients. *J Immunol.* 2005b;175:2709-2714.
- (4) Andersen MH, Svane IM, Kvistborg P et al. Immunogenicity of Bcl-2 in patients with cancer. *Blood.* 2005c;105:728-734.
- (5) Appel S, Balabanov S, Brummendorf TH, Brossart P. Effects of imatinib on normal hematopoiesis and immune activation. *Stem Cells.* 2005;23:1082-1088.
- (6) Appel S, Boehmler AM, Grunebach F et al. Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood.* 2004;103:538-544.
- (7) Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A et al. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1983;306:277-280.
- (8) Ben Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science.* 1986;233:212-214.
- (9) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-

American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br J Haematol.* 1994;87:746-754.

- (10) Bocchia M, Gentili S, Abruzzese E et al. Effect of a p210 multipeptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *Lancet.* 2005;365:657-662.
- (11) Brauer KM, Werth D, von Schwarzenberg K et al. BCR-ABL Activity Is Critical for the Immunogenicity of Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *Cancer Res.* 2007;67:5489-5497.
- (12) Buchdunger E, Cioffi CL, Law N et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295:139-145.
- (13) Burchert A, Wang Y, Cai D et al. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia.* 2005;19:1774-1782.
- (14) Burchert A, Wolf S, Schmidt M et al. Interferon-alpha, but not the ABL-kinase inhibitor imatinib (STI571), induces expression of myeloblastin and a specific T-cell response in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2003;101:259-264.
- (15) Carter BZ, Mak DH, Schober WD et al. Regulation of survivin expression through Bcr-Abl/MAPK cascade: targeting survivin overcomes imatinib resistance and increases imatinib sensitivity in imatinib-responsive CML cells. *Blood.* 2006;107:1555-1563.
- (16) Cathcart K, Pinilla-Ibarz J, Korontsvit T et al. A multivalent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2004;103:1037-1042.
- (17) Cebo C, Da Rocha S, Wittnebel S et al. The decreased susceptibility of Bcr/Abl targets to NK cell-mediated lysis in response to imatinib mesylate involves

- modulation of NKG2D ligands, GM1 expression, and synapse formation. *J Immunol.* 2006;176:864-872.
- (18) Chen J, Schmitt A, Chen B et al. Imatinib impairs CD8+ T lymphocytes specifically directed against the leukemia-associated antigen RHAMM/CD168 in vitro. *Cancer Immunol Immunother.* 2006.
- (19) Copland M, Fraser AR, Harrison SJ, Holyoake TL. Targeting the silent minority: emerging immunotherapeutic strategies for eradication of malignant stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54:297-306.
- (20) Cortes J, Jabbour E, Daley GQ et al. Phase 1 study of lonafarnib (SCH 66336) and imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia who have failed prior single-agent therapy with imatinib. *Cancer.* 2007.
- (21) Cortes J, O'Dwyer ME. Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004;18:671-84, x.
- (22) Costello R, Lafage M, Toiron Y et al. Philadelphia chromosome-negative chronic myeloid leukaemia: a report of 14 new cases. *Br J Haematol.* 1995;90:346-352.
- (23) Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science.* 1990;247:824-830.
- (24) de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1982;300:765-767.
- (25) Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood.* 1997;90:3691-3698.

- (26) Dietz AB, Souan L, Knutson GJ et al. Imatinib mesylate inhibits T-cell proliferation in vitro and delayed-type hypersensitivity in vivo. *Blood*. 2004;104:1094-1099.
- (27) Donato NJ, Wu JY, Stapley J et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*. 2003;101:690-698.
- (28) Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2:561-566.
- (29) Elefanty AG, Hariharan IK, Cory S. bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *EMBO J*. 1990;9:1069-1078.
- (30) Elmaagacli AH, Koldehoff M, Peceny R et al. WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells. *Haematologica*. 2005;90:326-334.
- (31) Fruehauf S, Topaly J, Buss EC et al. Imatinib combined with mitoxantrone/etoposide and cytarabine is an effective induction therapy for patients with chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. *Cancer*. 2007;109:1543-1549.
- (32) Fujii S, Shimizu K, Fujimoto K et al. Analysis of a chronic myelogenous leukemia patient vaccinated with leukemic dendritic cells following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Jpn J Cancer Res*. 1999;90:1117-1129.
- (33) Gambacorti-Passerini C, Bertazzoli C, Dermime S et al. Mapping of HLA class I binding motifs in forty-four fusion proteins involved in human cancers. *Clin Cancer Res*. 1997;3:675-683.
- (34) Gandhi V, Plunkett W, Kantarjian H et al. Cellular pharmacodynamics and plasma pharmacokinetics of parenterally infused hydroxyurea during a phase I

- clinical trial in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol.* 1998;16:2321-2331.
- (35) Gao L, Bellantuono I, Elsasser A et al. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood.* 2000;95:2198-2203.
- (36) Grigg A, Hughes T. Role of allogeneic stem cell transplantation for adult chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:795-807.
- (37) Grunebach F, Mirakaj V, Mirakaj V et al. BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2006;66:5892-5900.
- (38) Guilhot F, Chastang C, Michallet M et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *N Engl J Med.* 1997;337:223-229.
- (39) Guinn BA, Mohamedali A, Thomas NS, Mills KI. Immunotherapy of myeloid leukaemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56:943-957.
- (40) Hakansson P, Segal D, Lassen C et al. Identification of genes differentially regulated by the P210 BCR/ABL1 fusion oncogene using cDNA microarrays. *Exp Hematol.* 2004;32:476-482.
- (41) Hehlmann R, Berger U, Pffirmann M et al. Drug treatment is superior to allografting as first-line therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2007a;109:4686-4692.
- (42) Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood.* 1994;84:4064-4077.

- (43) Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007b;370:342-350.
- (44) Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ et al. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood*. 2000;96:925-932.
- (45) Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J et al. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature*. 1990;344:251-253.
- (46) Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature*. 1985;315:758-761.
- (47) Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J et al. Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983;306:239-242.
- (48) Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 1998;279:577-580.
- (49) Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R. Chronische myeloische Leukämie. 2. ed. UNI-MED Verlag AG, Bremen; 2004.
- (50) Huret JL. Complex translocations, simple variant translocations and Ph-negative cases in chronic myelogenous leukaemia. *Hum Genet*. 1990;85:565-568.
- (51) Jabbour E, Cortes JE, Giles FJ, O'Brien S, Kantarjian HM. Current and emerging treatment options in chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2007;109:2171-2181.
- (52) Jiang X, Smith C, Eaves A, Eaves C. The challenges of targeting chronic myeloid leukemia stem cells. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2007;7 Suppl 2:S71-S80.

- (53) Kantarjian H, Giles F, Wunderle L et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med.* 2006;354:2542-2551.
- (54) Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive early chronic phase chronic myelogenous leukemia with daily doses of interferon alpha and low-dose cytarabine. *J Clin Oncol.* 1999;17:284-292.
- (55) Kharas MG, Fruman DA. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res.* 2005;65:2047-2053.
- (56) Konopka JB, Watanabe SM, Singer JW, Collins SJ, Witte ON. Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:1810-1814.
- (57) le Coutre P, Kreuzer KA, Pursche S et al. Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53:313-323.
- (58) Li Z, Qiao Y, Liu B et al. Combination of imatinib mesylate with autologous leukocyte-derived heat shock protein and chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2005;11:4460-4468.
- (59) Lin F, Drummond M, O'Brien S et al. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia patients who achieve complete cytogenetic remission on imatinib. *Blood.* 2003;102:1143.
- (60) Litzow MR. Imatinib resistance: obstacles and opportunities. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130:669-679.

- (61) Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247:1079-1082.
- (62) Marioni G, Ottaviano G, Marchese-Ragona R et al. High nuclear expression of the apoptosis inhibitor protein survivin is associated with disease recurrence and poor prognosis in laryngeal basaloid squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol*. 2006;126:197-203.
- (63) Markt S, Marin D, Foot N et al. Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. *Haematologica*. 2003;88:260-267.
- (64) Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet*. 2004;5:355-365.
- (65) Molldrem JJ, Lee PP, Wang C et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2000;6:1018-1023.
- (66) Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991;139:271-279.
- (67) Nicolini FE, Corm S, Le QH et al. Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients: a retrospective analysis from the French intergroup of CML (Fi(varphi)-LMC GROUP). *Leukemia*. 2006.
- (68) Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 1961;27:1013-1035.

- (69) O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003;348:994-1004.
- (70) O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res.* 2005;65:4500-4505.
- (71) Oki Y, Kantarjian HM, Gharibyan V et al. Phase II study of low-dose decitabine in combination with imatinib mesylate in patients with accelerated or myeloid blastic phase of chronic myelogenous leukemia. *Cancer.* 2007;109:899-906.
- (72) Parmar S, Smith J, Sassano A et al. Differential regulation of the p70 S6 kinase pathway by interferon alpha (IFNalpha) and imatinib mesylate (STI571) in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood.* 2005;106:2436-2443.
- (73) Reichardt VL, Brossart P. Current status of vaccination therapy for leukemias. *Curr Hematol Rep.* 2005;4:73-76.
- (74) Roskoski R, Jr. STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309:709-717.
- (75) Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243:290-293.
- (76) Roy L, Guilhot J, Krahnke T et al. Survival advantage from Imatinib compared to the combination Interferon- $\alpha$  plus Cytarabine in chronic phase CML: historical comparison between two phase III trials. *Blood.* 2006.
- (77) Sacchi S, Kantarjian HM, O'Brien S et al. Chronic myelogenous leukemia in nonlymphoid blastic phase: analysis of the results of first salvage therapy with three different treatment approaches for 162 patients. *Cancer.* 1999;86:2632-2641.

- (78) Sacha T, Hochhaus A, Hanfstein B et al. ABL-kinase domain point mutation as a cause of imatinib (STI571) resistance in CML patient who progress to myeloid blast crisis. *Leuk Res.* 2003;27:1163-1166.
- (79) Savona M, Talpaz M. Chronic myeloid leukemia: changing the treatment paradigms. *Oncology (Williston Park).* 2006;20:707-711.
- (80) Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood.* 2002;99:3530-3539.
- (81) Scherr M, Battmer K, Winkler T et al. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood.* 2003;101:1566-1569.
- (82) Schindler T, Bornmann W, Pellicena P et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science.* 2000;289:1938-1942.
- (83) Schmidt SM, Schag K, Muller MR et al. Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis. *Cancer Res.* 2004;64:1164-1170.
- (84) Schmitt M, Li L, Giannopoulos K et al. Chronic myeloid leukemia cells express tumor-associated antigens eliciting specific CD8+ T-cell responses and are lacking costimulatory molecules. *Exp Hematol.* 2006;34:1709-1719.
- (85) Seggewiss R, Lore K, Greiner E et al. Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood.* 2005;105:2473-2479.
- (86) Shah NP, Tran C, Lee FY et al. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science.* 2004;305:399-401.
- (87) Siddiqui MA, Scott LJ. Imatinib: a review of its use in the management of gastrointestinal stromal tumours. *Drugs.* 2007;67:805-820.

- (88) Smith DC, Vaughan WP, Gwilt PR, Trump DL. A phase I trial of high-dose continuous-infusion hydroxyurea. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1993;33:139-143.
- (89) Takahashi T, Tanaka Y, Nieda M et al. Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res.* 2003;27:795-802.
- (90) Tauchi T, Ohyashiki K. Molecular mechanisms of resistance of leukemia to imatinib mesylate. *Leuk Res.* 2004;28 Suppl 1:S39-S45.
- (91) Tothova E, Kafkova A, Fricova M et al. Imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon alpha. *Neoplasma.* 2005;52:63-67.
- (92) Uziel O, Fenig E, Nordenberg J et al. Imatinib mesylate (Gleevec) downregulates telomerase activity and inhibits proliferation in telomerase-expressing cell lines. *Br J Cancer.* 2005;92:1881-1891.
- (93) Villuendas R, Steegmann JL, Pollan M et al. Identification of genes involved in imatinib resistance in CML: a gene-expression profiling approach. *Leukemia.* 2006.
- (94) Watari K, Tojo A, Nagamura-Inoue T et al. Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. *FEBS Lett.* 2000;466:367-371.
- (95) Weisberg E, Catley L, Wright RD et al. Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL+ leukemias. *Blood.* 2007;109:2112-2120.
- (96) Weisberg E, Griffin JD. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood.* 2000;95:3498-3505.

- (97) Westermann J, Kopp J, Korner I et al. Bcr/abl+ autologous dendritic cells for vaccination in chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25 Suppl 2:S46-S49.
- (98) Westermann J, Kopp J, van Lessen A et al. Vaccination with autologous non-irradiated dendritic cells in patients with bcr/abl+ chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;137:297-306.
- (99) Wetzler M, Talpaz M, Estrov Z, Kurzrock R. CML: mechanisms of disease initiation and progression. *Leuk Lymphoma.* 1993;11 Suppl 1:47-50.
- (100) Zeis M, Siegel S, Wagner A et al. Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170:5391-5397.
- (101) Zhao RC, Jiang Y, Verfaillie CM. A model of human p210(bcr/ABL)-mediated chronic myelogenous leukemia by transduction of primary normal human CD34(+) cells with a BCR/ABL-containing retroviral vector. *Blood.* 2001;97:2406-2412.

## 10 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die externe Betreuung und die vielfältigen Anregungen zur Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Peter Brossart danke ich für die Bereitstellung des spannenden Forschungsthemas, die exzellente Betreuung und stetige Motivation, auch in schwierigen Phasen der Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich allen Mitgliedern der AG experimentelle Immuntherapien aussprechen, die stets für ein herzliches Arbeitsklima gesorgt haben und jederzeit zu Diskussionen, Anregungen und Unterstützung bereit waren.

In diesem Zusammenhang geht ein großer Dank an Karin von Schwarzenberg und Stefanie Held, meine Mitstreiterinnen aus Labor D0.12, für moralische Unterstützung und so manche lustige Stunde.

Ganz herzlich danke ich auch Sylvia Stephan, Bruni Drotleff, Solveig Daecke und Regina Heselmaier für ihre zuverlässige Hilfe und ihre motivierende Art.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne deren Rückhalt und Vertrauen diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Bei Falk bedanke ich mich von ganzem Herzen für seine grenzenlose Unterstützung und Liebe.



## 11 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

Name: Katharina Maria Brauer  
 Geburtsdatum: 01.10. 1979  
 Geburtsort: Hamburg  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1986 – 1990 Grundsichule Heist  
 1990 – 1996 Ludwig-Meyn-Schule Uetersen  
 1996 – 1997 Cole Harbour District High School, Dartmouth, Nova Scotia, Kanada  
 1997 – 1999 Ludwig-Meyn-Schule Uetersen  
 1999 Abitur

### Hochschulbildung:

1999 – 2004 Studium der Humanbiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
 Anfertigung der Diplomarbeit an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, in Kooperation mit dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Abteilung Immunologie.  
 Gutachter: Prof. Dr. med. Claus-Dieter Heidecke und Prof. Dr. med. Barbara Bröker

2004 – 2007 Promotion an der Eberhard Karls Universität Tübingen  
 Durchführung der Arbeit am Universitätsklinikum Tübingen, Innere Medizin II, Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie  
 Gutachter: Prof. Dr. rer.nat. Hans-Georg Rammensee und Prof. Dr. med. Peter Brossart