

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Charakterisierung des Bax Inhibitor-1 Peptides als
neues tumorassoziertes T-Zellepitop**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Thomas Martin König
aus
Sigmaringen

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

Meinen lieben Eltern

Karl-Heinz und Johanna.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau des Immunsystems	1
1.2 T-Lymphozyten	2
1.2.1 Zytotoxische T-Zellen (CTL) und T-Helferzellen (T _H)	2
1.2.2 Effektormechanismen der CTL.....	3
1.3 Dendritische Zellen	4
1.3.1 Antigenprozessierung	5
1.3.2 T-Zellaktivierung.....	7
1.4 Tumorimmunologie	9
1.4.1 Entstehung von Tumoren.....	9
1.4.2 <i>Immun-escape</i>	11
1.4.3 Tumorantigene	11
1.5 Spezifische Immuntherapie	14
1.5.1 Onkologische Therapieformen	14
1.5.2 Spezifische Immuntherapie.....	14
1.6 Bax Inhibitor-1 als Tumorantigen	16
1.7 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Geräte	19
2.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.3 Reagenzien	21
2.4 Puffer und Medien	22
2.5 gebrauchsfertige Kits	24
2.6 Antikörper	25
2.7 Primer, Peptide und in-vitro-Transcripte (IVT)	26
2.8 Tumorzelllinien	26

2.9 Zellkultur	27
2.9.1 Zellkultivierung	27
2.9.2 Bestimmung der Lebendzellzahl	28
2.9.3 Kryokonservierung von Zellen.....	28
2.9.4 Isolierung mononukleärer Zellen	28
2.9.5 Ex vivo-Generierung dendritischer Zellen	29
2.10 Transfektion von DC durch Elektroporation	29
2.11 Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL)	30
2.11.1 Induktion von CTL mittels Peptid.....	30
2.11.2 Induktion von CTL mittels RNA	30
2.12 Standard Chrom^[51Cr]-Release-Assay	31
2.12.1 Antikörperblockade der MHC Moleküle.....	32
2.12.2 <i>Cold Target Inhibition</i>	32
2.13 Nachweis von Proteinen im Western Blot	33
2.13.1 Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.13.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	33
2.13.3 Western Blot.....	34
2.14 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	36
2.14.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung.....	36
2.14.2 cDNA-Synthese und Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
2.14.3 Agarose-Gelelektrophorese	37
2.15 Herstellung des BI-1 <i>in-vitro</i>-Transkripts	38
2.16 Interferon-γ ELISPOT-Assay	38
2.17 Magnetische Zellisolierung von B- und T- Lymphozyten	39
3 Ergebnisse	41
3.1 RT-PCR und Western Blot Analyse von Tumorzelllinien	41
3.2 RT-PCR Analyse von Leukämien aus Patientenproben	42
3.3 Standard Chrom^[51Cr]-Release-Assay	43
3.3.1 Induktion von CTL durch Gesamttumor-RNA.....	43
3.3.2 Induktion von CTL durch BI-1 Peptid	45
3.3.3 Induktion von CTL durch BI-1 IVT	49

3.3.4	<i>Cold Target Inhibition Chrom[⁵¹Cr]-Release Assay</i>	53
3.4	IFN- γ ELISPOT-Assay.....	54
4	Diskussion	56
4.1	Fragestellung	56
4.2	Vorgehen	56
4.3	Bedeutung der Ergebnisse	57
4.4	Probleme und Grenzen der Arbeit.....	59
4.5	Klinische Studien.....	59
4.6	Ausblick.....	61
5	Zusammenfassung	62
6	Abkürzungsverzeichnis	64
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	66
8	Literaturverzeichnis	68
9	Danksagung	76

1 Einleitung

1.1 Aufbau des Immunsystems

Durch komplexe Reaktionen und Interaktionen schützt das Immunsystem den Menschen vor Pathogenen wie Mikroorganismen und Viren, aber auch vor der Entartung körpereigener Zellen. Klassisch erfolgt eine Einteilung (Abb. 1) in die angeborene, nicht-adaptive Immunität und die erworbene, adaptive Immunität.

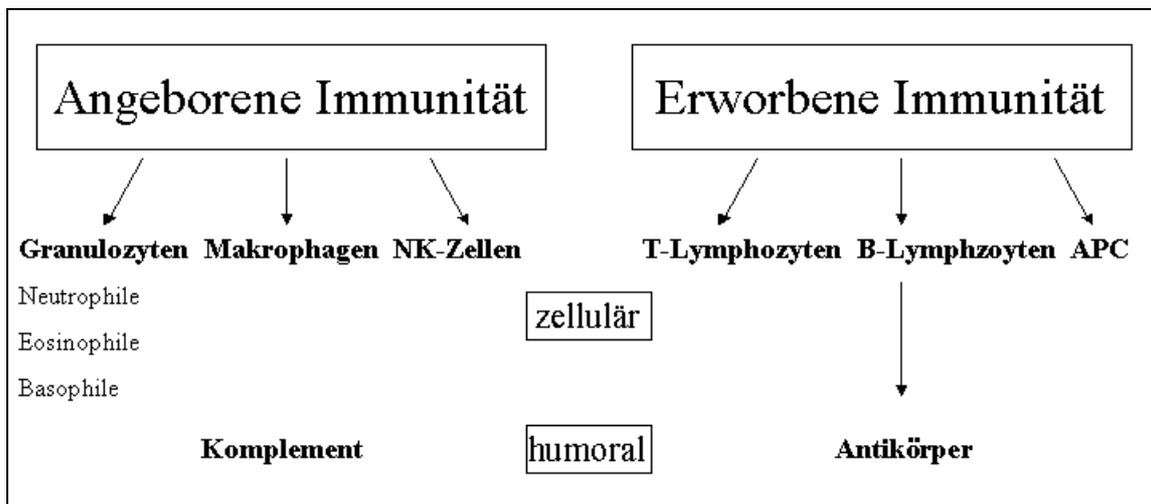


Abb. 1: Bestandteile des Immunsystems

Das angeborene Immunsystem beginnt bereits an den äußeren Grenzflächen des Organismus mit Schutzmechanismen mechanischer Art (Hautbarriere, Flimmerepithel), chemischer Art (Haut-Säuremantel, Magensäure, Lysozym) und biologischer Art (Bakterienflora). Im engeren Sinne besteht es aus zellulären und humoralen Komponenten, erkennt definierte Pathogenmuster und reagiert bereits beim ersten als auch wiederholtem Antigenkontakt schnell und stereotyp. Zur zellulären Komponente zählen neben den Granulozyten und Makrophagen auch die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). NK-Zellen können einerseits über ihren Fc-Rezeptor antikörpermarkierte Pathogene erkennen (Antikörpervermittelte Zytotoxizität), andererseits sind sie in der Lage, MHC-defiziente, entartete Zellen zu zerstören.

Das erworbene Immunsystem besteht aus Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen (APC). Es zeichnet sich durch eine hohe

Antigenspezifität aus. In Knochenmark und Thymus entsteht eine große Anzahl von B- bzw. T-Lymphozyten, die jeweils Rezeptoren einer einzigen Spezifität tragen. Nach Antigenkontakt durch APC kommt es zur Expansion von Lymphozytenklonen und zur Ausbildung von Effektorsystemen, die den betreffenden Erreger vernichten. B-Zellen produzieren lösliche Antikörper, die extrazelluläre Epitope erkennen. T-Zellen können verschiedenste Leukozyten aktivieren oder infizierte Zellen direkt abtöten. Ein Teil der Lymphozyten differenziert zu Gedächtniszellen. Diese gewährleisten als sogenanntes immunologisches Gedächtnis einen verstärkten Schutz vor einer erneuten Infektion. Die erworbene Immunität lässt sich also durch folgende vier Merkmale charakterisieren: Spezifität, Diversität, Unterscheidung von "selbst" und "fremd" und Gedächtnis¹.

1.2 T-Lymphozyten

Aus dem Knochenmark eingewanderte hämatopoetische Stammzellen differenzieren im Thymus zu T-Lymphozyten. Durch somatische Mutation und Rearrangementprozesse entsteht dort ein immenses Reservoir an T-Zellen mit jeweils einzigartigem T-Zellrezeptor (TCR), dem spezifischen Funktionsmolekül dieser Zellgattung. Durch die negative Selektion werden im Thymus autoreaktive T-Zellen, welche körpereigene Epitope (Autoantigene) erkennen, in die Apoptose getrieben. Positive Selektion bedeutet dagegen, dass funktionsfähige T-Zellen, die Autoantigene nur sehr schwach erkennen, am Leben erhalten werden. Der TCR dient zum Abtasten und Erkennen von MHC-Peptid-Komplexen. Die Tatsache, dass von T-Zellen nur MHC-gebundene Peptidantigene erkannt werden, wird als MHC-Restriktion bezeichnet. Anhand von Oberflächenmerkmalen (CD = Cluster of Differentiation) lassen sich zwei Hauptpopulationen von T-Zellen unterscheiden².

1.2.1 Zytotoxische T-Zellen (CTL) und T-Helferzellen (T_H)

Die CD8⁺ CTL oder T-Killerzellen sind für die zelluläre adaptive Immunantwort verantwortlich. Sie erkennen Peptide intrazellulärer Krankheitserreger oder mutierter Zellproteine, die MHC-Klasse-I-gebunden (MHC-I) präsentiert werden.

MHC-I Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und dienen der immunologischen Überwachung intrazellulärer Prozesse. Falls die Expression von MHC Molekülen beispielsweise durch einen Erreger unterdrückt wird, fehlt deren schützende Wirkung vor der Aktivität von NK-Zellen, was zur Zerstörung der betreffenden Zellen führt.

Die $CD4^+$ T_H werden durch den Komplex aus Peptid und MHC-Klasse-II (MHC-II) Molekül von APC aktiviert. Zu den APC zählen neben den Dendritischen Zellen (DC) auch Makrophagen und B-Zellen. Diese sind in der Lage, verschiedenste Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und MHC-II-gebunden an T-Zellen zu präsentieren. Durch das differenzielle Muster der Zytokinfreisetzung lassen sich T_H1 und T_H2 unterscheiden. T_H1 setzen Faktoren wie Interferon- γ frei, die Makrophagen stimulieren. Sie aktivieren damit die zelluläre Immunantwort und spielen eine bedeutende Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Erreger. T_H2 sezernieren IL4, IL5 und IL10. Sie stimulieren dadurch B-Zellen und Eosinophile und sind somit für die Abwehr von extrazellulären Bakterien und Parasiten sehr bedeutsam. Aufgrund ihrer Interaktion mit B-Zellen und mit Zellen des angeborenen Immunsystems spielen die T_H -Zellen eine wichtige Moderatorenrolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Immunantwort. Die CD4 bzw. CD8 Moleküle sind wichtige Korezeptoren bei der Interaktion von T-Zellen mit den MHC-II bzw. MHC-I Molekülen der APC¹.

1.2.2 Effektormechanismen der CTL

Reife, naive T-Lymphozyten verlassen den Thymus und besiedeln vorzugsweise die sekundären lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Milz, schleimhautassoziiertes lymphatisches Gewebe = MALT). Dort kommt es durch Kontakt mit aktivierten APC zur Antigenerkennung und der klonalen Expansion aktivierter T-Zellklone. Es folgt die Ausdifferenzierung in Gedächtnis- und Effektorzellen. Letztere verlassen den Lymphknoten und werden durch Chemokine in infiziertes Gewebe gelockt. Im Gegensatz zu den langlebigen Gedächtniszellen gehen die Effektorzellen nach Abklingen der Infektion durch Ausbleiben von Überlebensfaktoren in die Apoptose.

CTL zwingen erkrankte oder entartete Zellen durch verschiedene Mechanismen zur Apoptose. Eine Möglichkeit, Zielzellen zu zerstören ist die Freisetzung von Perforin und Granzymen. Perforin lagert sich in der Membran der infizierten Zelle zu Poren bildenden Komplexen zusammen, durch welche die Granzyme in die Zelle eindringen und die Apoptose induzieren. Alternativ kann der Zelltod auch durch die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- β (Tumor Nekrose Faktor-beta) oder Fas-Ligand erfolgen, die an die Todesrezeptoren der äußeren Membran (TNF-Rezeptor, Fas-Rezeptor = CD95) binden und eine intrazelluläre Kaspase-Kaskade auslösen. Kaspasen sind Proteasen, die nach ihrer Aktivierung im Rahmen des natürlichen Zelltodes eine Degradierung von Zellbestandteilen einleiten. CTL sezernieren außerdem Interferon- γ (IFN- γ). Dieses stimuliert Makrophagen welche ihrerseits apoptotische Zellen abräumen².

1.3 Dendritische Zellen

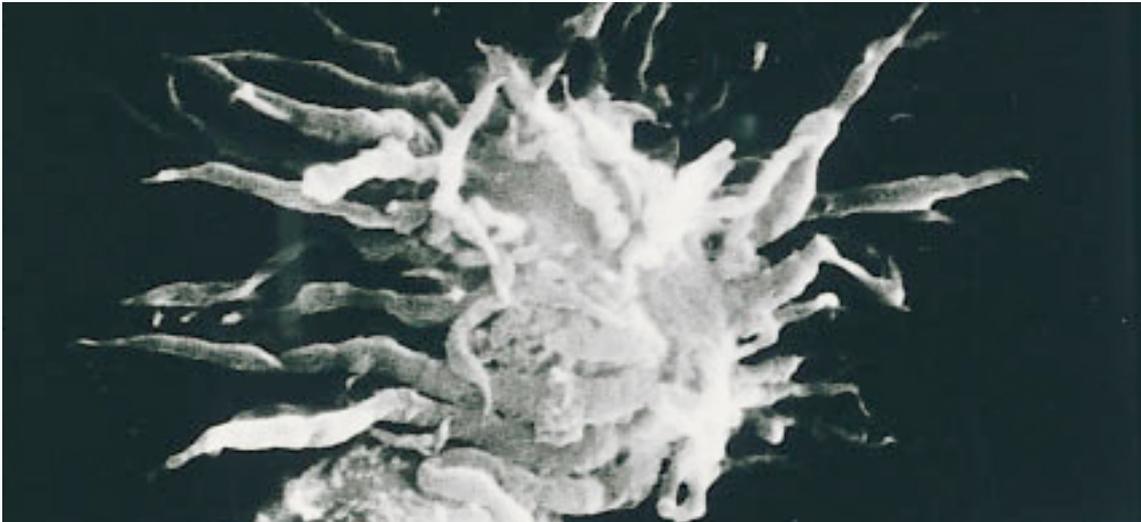


Abb. 2: Dendritische Zelle

DC bei 3000facher Vergrößerung im Rasterelektronenmikroskop Quelle: J. Exp. Med.© The Rockefeller University Press³.

Dendritische Zellen werden als die potentesten antigenpräsentierenden Zellen angesehen, mit der Fähigkeit, eine primäre Immunantwort zu induzieren und aufrecht zu erhalten^{4,5}.

Sie stellen Wächter des Immunsystems dar, die darauf spezialisiert sind, Antigene in der Peripherie aufzunehmen und zu prozessieren. Aktivierte DC migrieren daraufhin über die Lymphbahn in sekundäre lymphatische Gewebe, wo sie die Antigene, MHC-gebunden, den Lymphozyten präsentieren. In unreifem Zustand sind periphere DC darauf spezialisiert Antigene aufzunehmen, während die Voraussetzungen, T-Zellen zu aktivieren, noch schwach ausgeprägt sind. Nach Endozytose von Pathogenen kommt es zur Ausreifung der DC unter Stimulation von sogenannten PAMPs (pathogen associated molecular patterns, z.B. TLR-Liganden) und Zytokinen (z.B. TNF- α oder IL-1). Im Laufe dieses Reifungsprozesses reduzieren DC die Antigenaufnahme und verbessern z.B. durch Expression von Korezeptoren (CD80, CD86) und Zytokinen wie IL-12 und IL-6 ihre Fähigkeit zur T-Zellaktivierung. Eine weitere Aufgabe von DC ist die Aufrechterhaltung der peripheren Immuntoleranz. Normalerweise werden autoreaktive T-Zellen bereits im Thymus eliminiert. Manche Selbstantigene treten jedoch nur in spezialisiertem Gewebe auf. Diese werden von DC ohne kostimulatorische Signale präsentiert. Dadurch werden autoreaktive T-Zellen in einen anergen Zustand versetzt⁵.

Erst die Entwicklung von Protokollen⁶⁻⁹ zur Gewinnung und *ex vivo*-Generierung von DC machte diese Zellen in ausreichender Zahl für die experimentelle Erforschung verfügbar. Auf dieser Basis entwickelte sich in den letzten Jahren eine Vielzahl DC-basierter Vakzinierungsstrategien zur Behandlung von Tumor- und Infektionserkrankungen. DC können *in vitro* aus CD34⁺ Stammzellen⁷ oder CD14⁺ Monozyten des peripheren Blutes generiert werden⁸. Unter Zugabe von Zytokinen wie GM-CSF und IL4 differenzieren diese Vorläuferzellen zu unreifen DC. Monozyten werden aus Leukozytenkonzentraten (Buffy Coats), die bei der Herstellung von Blutkonserven anfallen, durch Plastikadhärenz oder durch magnetisch-gekoppelte Antikörper (MACS-Technologie) isoliert. *In vivo* können DC durch Leukaphärese von peripherem Blut gewonnen werden. Nach Injektion von GM-CSF oder Flt3L wird dabei die Ausbeute der DC deutlich erhöht¹⁰.

1.3.1 Antigenprozessierung

Der MHC (major histocompatibility complex) ist ein hochpolymorpher Genlokus auf Chromosom Sechs, der unter anderem für MHC-I und MHC-II Moleküle

kodiert. Der Name stammt aus der Transplantationsmedizin, in der MHC Proteine die Hauptverantwortung für Gewebeunverträglichkeiten tragen. Ursprünglich wurden MHC Moleküle durch monoklonale Antikörper auf Leukozyten detektiert, weshalb sie auch HLA (human leucocyte antigen) genannt werden¹.

MHC-I-Prozessierung

Bakterielle und virale Proteine, aber auch normale Zellproteine und tumorspezifische Proteine werden im Zytosol zu Peptiden degradiert und MHC-I-gebunden an der Zelloberfläche präsentiert.

Diese zytosolischen Proteine werden mit Ubiquitin markiert und dadurch einem multikatalytischen Proteasekomplex, dem Proteasom zugeführt. Das Proteasom degradiert Proteine zu Peptiden einer Länge von 7-15 Aminosäuren. Diese Peptide werden durch ATP-abhängige TAP-Transporter (Transporter associated with Antigen Processing), die sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befinden, zu den MHC-I Molekülen ins Lumen des ER transportiert. Dabei bilden TAP1 und TAP2 ein Heterodimer, das Peptide einer Größe von üblicherweise neun Aminosäuren durch die Membran schleust¹¹. Unter dem Einfluss von Chaperonen (Calnexin, Calretikulin, ERP57) wird das Peptid in die Bindungsfurche der partiell gefalteten α -Kette des MHC-I Moleküls eingefügt. Dadurch wird das Molekül stabilisiert und gelangt schließlich assoziiert an β_2 -Mikroglobulin (β_2M) an die äußere Zellmembran. Eine allele MHC-I Variante ist in der Lage, viele verschiedene Peptide zu binden. Diese müssen jedoch an definierten Stellen der Peptide chemisch verwandte Aminosäuren mit sogenannten Verankerungsresten aufweisen. Die spezifische Peptid-MHC Bindung entsteht durch Interaktion definierter Seitenketten der Aminosäuren auf Ankerpositionen und komplementären Taschen der Peptidbindungsfurche¹².

MHC-II-Prozessierung

Extrazelluläre Krankheitserreger, lösliche Pathogene und apoptotische Zellen werden von APC durch Phagozytose, Makropinozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose in intrazelluläre Vesikel (Phagosomen) aufgenommen⁴. Diese fusionieren mit Lysosomen zu Phagolysosomen, in denen durch einen

sauren pH und Proteasen die fremden Proteine zu Peptidfragmenten gespalten werden. APC exprimieren MHC-II Moleküle, deren peptidbindender Spalt im ER zunächst durch ein Peptid namens CLIP (Class II-associated Invariant Chain Peptide) blockiert wird. Dies verhindert eine Bindung zytosolischer Peptide. Die geblockten MHC-II Moleküle werden in exozytotische Vesikel transportiert, die mit den Phagolysosomen fusionieren. In diesem speziellen Zellkompartiment MIIC (MHC-class-II enriched compartment) wird CLIP durch das Protein HLA-DM entfernt und die fremden Peptidfragmente können an das MHC-II Molekül binden. Immundominante Epitope sind diejenigen Bereiche bzw. Peptidfragmente eines Antigen, die vorzugsweise präsentiert werden. Peptidbeladene MHC-II Moleküle sind stabil und gelangen durch Fusion von MIIC mit der äußeren Zellmembran an die Zelloberfläche^{13,14}. Beim MHC-II Molekül wird das Peptid im Gegensatz zum MHC-I Peptid nicht an den Peptidenden verankert. Die Peptidenden können an beiden Seiten aus der Peptidbindungsfurche herausragen, es liegt keine strenge Längenbegrenzung vor. Die Peptide weisen eine Länge von ca. 12-25 Aminosäuren auf. Die Bindung des Peptides erfolgt dabei über das Peptidrückgrat und bestimmte Seitengruppen¹². Bei DC wurde zusätzlich ein spezieller Modus der Antigenpräsentierung entdeckt, der als *cross-priming* bezeichnet wird. Dies bedeutet, dass DC auch in der Lage sind, extrazelluläre Antigene, MHC-I-gebunden zu präsentieren^{15,16}.

1.3.2 T-Zellaktivierung

Die Induktion einer T-Zellantwort lässt sich in drei Phasen einteilen: T-Zellaktivierung durch APC, Proliferation des T-Zellklons und Differenzierung zu Effektor- bzw. Gedächtniszellen. Die T-Zellaktivierung erfolgt dabei in vier Schritten: Adhäsion, antigenspezifische Aktivierung, Kostimulation und Zytokinausschüttung.

Im drainierenden Lymphknoten wird über Adhäsionsmoleküle vom Typ der Integrine und Immunglobuline (Ig) zunächst eine unspezifische Bindung zwischen naiven T-Zellen und APC vermittelt. Das Ig CD2 und das Integrin LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen-1) der T-Zellen binden an ihre Kontaktmoleküle LFA-3 (=CD58) bzw. ICAM-1-3 (Intercellular Adhaesion

Molecule) auf den APC (Abb. 3). Dies ermöglicht dem TCR, der selbst mit niedriger Affinität bindet, den MHC-Peptid-Komplex über einen ausreichend langen Zeitraum abzutasten. Erkennt der TCR das Peptid, wird der Zell-Zellkontakt über eine erhöhte Affinität von LFA-1 zu den ICAM-Molekülen verstärkt. Für die vollständige Aktivierung der T-Zelle wird neben dem Signal des TCR jedoch zusätzlich die Bindung kostimulatorischer Moleküle benötigt. Ein essenzielles kostimulatorisches Signal zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen entsteht aus der Interaktion von B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) Proteinen der APC mit dem CD28-Protein der T-Zellen¹.

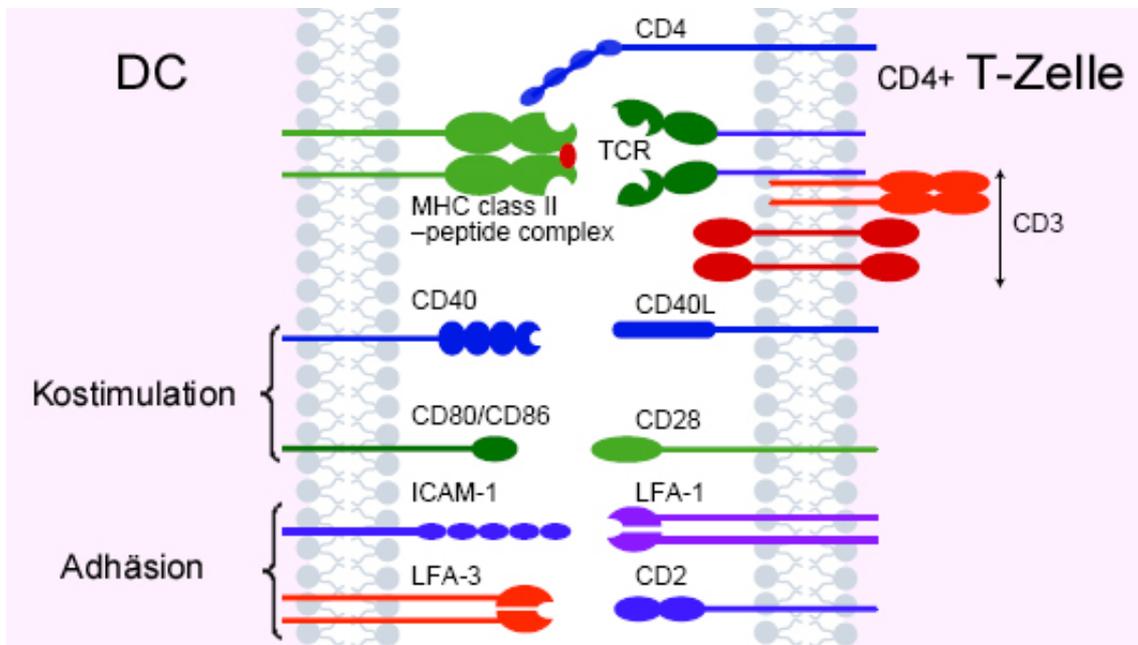


Abb. 3: Interaktion von DC und T-Zellen

Neben der Interaktion zwischen dem TCR und dem MHC-Peptid-Komplex spielen auch Adäsions- und Kostimulationsmoleküle eine wichtige Rolle bei der T-Zellaktivierung. Quelle: modifiziert nach Expert Reviews in Molecular Medicine © 1999 Cambridge University Press¹⁷

Weitere Interaktion erfolgt über den CD40-Rezeptor der APC bzw. den CD40-Ligand der T-Zellen. Dieser Mechanismus wirkt jedoch nicht direkt auf die T-Zelle, sondern verstärkt die antigenpräsentierenden Fähigkeiten der DC über eine vermehrte Expression von B7 Proteinen und Zytokinen (IL-12).

In aktivierten T-Zellen wird außerdem das mit CD28 verwandte Protein CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 = CD152) induziert, welches die kostimulatorischen B7-Proteine ca. zwanzigmal stärker bindet, aber eine hemmende Wirkung besitzt. Dadurch werden die aktivierten Tochterzellen weniger empfindlich gegenüber der Stimulation durch APC und eine überschießende Reaktion wird eingedämmt¹⁸.

Aktivierte T-Zellen sezernieren einerseits den T-Zellwachstumsfaktor IL-2, andererseits exprimieren sie verstärkt den IL-2 Rezeptor. Dieser autokrine Stimulationsmechanismus führt zu Proliferation und Differenzierung der T-Zellen. Wenn einer T-Zelle ein Antigen ohne kostimulatorische Signale präsentiert wird, wird sie anerg und kann auch auf spätere Stimulation nicht mehr reagieren¹⁹. Bei der Frage, wie CD8⁺-T-Zellen durch infizierte Zellen ohne Kostimulation aktiviert werden, wird vermutet, dass diese CTL aktivierte CD4⁺-T-Zellen für ihre Aktivierung benötigen.

Die Signaltransduktion des TCR-Komplexes erfolgt über seine konstante Region, über invariable Kofaktoren (CD3, ζ-Ketten) und über die Korezeptoren CD4 bzw. CD8. Bei der Erkennung eines Antigens führt eine Zusammenlagerung der Korezeptoren zur Aktivierung der membranständigen Tyrosinkinase Lck, die ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) von CD3 und ζ-Ketten phosphoryliert. In der Folge kommt es zur Aktivierung von Kinasen und Mediatorsystemen, die schließlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-κB (Nuclear Factor κ-B) oder NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) führen².

1.4 Tumormunologie

1.4.1 Entstehung von Tumoren

Bösartige Tumoren sind in den Industrienationen nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Die Risikofaktoren für die Entstehung von Tumoren sind vielfältig. So stellen vor allem karzinogene Viren, chronisch-entzündliche Prozesse sowie die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung oder chemischer Noxen ein erhöhtes Tumorrisiko dar.

Tumoren können als Erkrankung der DNA angesehen werden, bei der Regulationsmechanismen des Zellzyklus durch eine veränderte Genexpression gestört sind²⁰. Infolge eines gestörten Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Apoptose kommt es zu unkontrolliertem Zellwachstum. Im Rahmen der Tumorprogression entstehen bei Tochterzellen weitere Mutationen, die zur malignen Transformation führen. Darunter versteht man, dass der Tumor Kennzeichen bösartigen Wachstums wie Gewebeeinfiltration und Metastasierung erwirbt. Wichtige Mechanismen sind dabei die Unabhängigkeit gegenüber äußeren Wachstums- und Differenzierungsstimuli, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, die Überwindung der Apoptose, eine gestörte Zellalterung, *Immun-escape* Phänomene, die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) und schließlich das Verlassen des natürlichen Gewebeverbandes im Rahmen der Infiltration und Metastasierung^{21,22}.

Gene, die für die Entstehung von Tumoren verantwortlich sind, werden zu drei Gruppen zusammengefasst: Proto-Onkogene, Tumorsuppressorgene und Stabilitätsgene. Die Genprodukte der ersten beiden Gruppen regulieren Zellzyklus, Zellwachstum und Differenzierung. Bei mutierten Tumorsuppressorgenen kommt es zu einem reduzierten oder inaktiven Genprodukt, dessen hemmende Wirkung entfällt. Hierbei sind jedoch meist in beiden Allelen inaktivierende Mutationen notwendig. Im Falle der Proto-Onkogene reicht die aktivierende Mutation eines Allels aus, um die onkogene Aktivität des veränderten Genproduktes zu entfalten²³. Die dritte Gruppe der Stabilitätsgene ist dafür verantwortlich, das Genom durch Reparaturmechanismen vor einer schädigenden Mutation zu schützen²⁴.

Theoretisch müsste jede dramatisch veränderte Genexpression, wie sie im Laufe der malignen Transformation auftritt, über die MHC-I Präsentation von immunologisch unbekanntem Peptiden eine zytotoxische Immunreaktion auslösen, die den Tumor beseitigt. Dennoch gelingt es Tumoren über *Immun-escape* Mechanismen, sich nicht nur lokal auszubreiten, sondern über Blut- und Lymphbahn den gesamten Organismus zu befallen.

1.4.2 Immun-escape

Bei Tumoren wurde bereits eine Vielzahl an Mechanismen beobachtet der Erkennung und Vernichtung durch das Immunsystem zu entgehen²⁵. Dies geschieht u.a. durch Reduktion der MHC-I Moleküle an der Zelloberfläche. Tumorzellen sind jedoch bei vollständigem Fehlen von MHC-I Molekülen dem Angriff von NK-Zellen ausgesetzt. Ein anderer Mechanismus besteht in der Störung der Prozessiermaschine intrazellulärer Proteine durch Blockade des TAP-Transporters²⁶. Des Weiteren kann die Vermehrung der Glykokalix, eine oberflächliche Schicht aus Kohlenhydratketten, zu Antigenmaskierung führen.

Eine bedeutende Überlebensstrategie von Tumoren besteht in der Etablierung eines immunkompromittierenden Mikromilieus. Dies geschieht durch die Freisetzung immunsuppressiver Substanzen (z.B. IL-10, TGF- β ^{25,27}) oder durch Hemmung der T-Zellproliferation mittels Blockade der IL-2 Stimulation²⁸. Folglich ist es Tumoren möglich durch eine Vielzahl erworbener Fähigkeiten der Überwachung durch das Immunsystems zu entgehen, um sich unkontrolliert im Organismus auszubreiten.

1.4.3 Tumorantigene

Tumorzellen entstehen aus körpereigenen Zellen, gegen die im Normalfall eine Selbsttoleranz besteht. Jedoch kann das Immunsystem Tumorzellen aufgrund der Präsentation von veränderten oder vermehrten Genprodukten erkennen. Diese Tumorantigene werden grob eingeteilt in tumorspezifische Antigene (TSA), die ausschließlich auf den entarteten Zellen vorkommen und tumorassoziierte Antigene (TAA), die gleichzeitig auch in gesundem Gewebe exprimiert werden. TAA von gesundem Gewebe lösen jedoch keine Immunantwort aus, da sie nicht in ausreichender Menge oder in immunprivilegierten Bereichen vorkommen. Es wurden fünf Kategorien von Tumorantigenen identifiziert, die in vitro eine CTL-Reaktion auslösen können^{29,30}: *Cancer Testis* (CT) –Antigene, Differenzierungsantigene, tumorspezifische Antigene, überexprimierte Selbst-Antigene und onkovirale Antigene.

- CT-Antigene sind Produkte embryonaler Gene, die außer in bestimmten Tumoren nur im Hoden (teilweise auch in Plazenta³¹ und Ovar³²) vorkommen. Dort lösen sie jedoch mangels MHC-Präsentation keine Immunreaktion aus³³. Das bekannteste Beispiel für ein CT-Antigen ist das erste identifizierte TAA, MAGE1. Dieses Mitglied der Genfamilie MAGE wurde in einer Melanomlinie nachgewiesen^{34,35}.
- Differenzierungsantigene werden sowohl von Tumoren als auch von deren Ursprungsgewebe exprimiert. Die meisten dieser gewebsspezifischen Antigene wurden bei Melanomen beschrieben und sind wie die Tyrosinase³⁶ an der Melaninsynthese beteiligt. Außer bei Melanomen wurden Antigene dieser Kategorie auch bei Tumoren epithelialer Herkunft entdeckt. Beispiele hierfür sind CEA beim Kolon-Karzinom³⁷ (Ca), Mammaglobin-A beim Mamma-Ca³⁸ und PSA beim Prostata-Ca³⁹.
- Tumorspezifische Antigene können durch Punktmutationen von Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen entstehen. Viele dieser TSA, die hoch immunogen sind, treten ausschließlich in einer Tumorentität auf. Aus immuntherapeutischer Sicht ergeben sich hieraus logistische Probleme einer breiten klinischen Anwendbarkeit. Beispiele mutierter TSA sind β -catenin⁴⁰ oder K-RAS⁴¹. Ein weiterer Mechanismus zur Entstehung von TSA ist neben der Mutation die Translokation und Fusion von Genen. Diese Veränderungen wurden vor allem bei Leukämien beschrieben, wobei mögliche Epitope im Fusionsbereich zu finden sind. Ein Beispiel ist das Epitop abl-bcr^{42,43}, das dem bekannten Philadelphia Chromosom entstammt.
- Überexprimierte Selbst-Antigene treten sowohl in einer Vielzahl histologisch unterschiedlicher Tumoren auf als auch in gesundem Gewebe. Dort werden sie allerdings in niedrigerem Ausmaß exprimiert. Es scheint, dass ein Tumor durch die Überexpression dieser Genprodukte eine immunologische Schwelle überschreitet und dadurch dem Immunsystem sichtbar wird. Beispiele überexprimierter Tumorantigene sind Survivin⁴⁴, MUC-1⁴⁵ und P53⁴⁶.
- Auch Viren können Ursache maligner Tumoren sein. Es wurde gezeigt, dass virale Proteine dieser virusassoziierten Tumoren eine Immunantwort auslösen können. Das Epstein-Barr-Virus⁴⁷ wird z.B. mit der Entstehung von Naso-

Pharynx-Ca sowie Burkitt- und Hodgkin-Lymphomen in Verbindung gebracht. Eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus⁴⁸ (HPV 16 und 18) erhöht das Risiko eines Zervix-Ca, während HBV und HCV⁴⁹ mit dem Hepatozellulären-Ca assoziiert sind.

Die meisten bisher entdeckten tumorspezifischen T-Zellepitope sind MHC-I assoziierte Peptide. Doch in den letzten Jahren konnten mit Hilfe neuer immunologischer Methoden viele neue MHC-II assoziierte TAA identifiziert werden. Diese Peptide können von T_H erkannt werden, was als Voraussetzung für eine starke und anhaltende Immunreaktion gilt.

Die entwickelten Methoden zur Charakterisierung von Tumorantigenen lassen sich im Wesentlichen in drei Gruppen gliedern: cDNA-Expressionsklonierung, biochemische Verfahren und "Reverse Immunologie".

Die cDNA-Expressionsklonierung basiert auf der Isolierung von CTL, die Spezifität für einen autologen Tumor aufweisen³⁵. Mittels Transfektanten und Antigen-Verlustvarianten von Tumorzelllinien erfolgt anschließend die Identifizierung des Antigens. Zur gleichen Gruppe gehört das SEREX-Verfahren (Serological Analysis of Recombinant cDNA Expression Libraries), das auf der Erkennung von Tumorantigenen einer cDNA-Bibliothek durch IgG-Serumantikörper von Tumorpatienten beruht³².

Bei den biochemischen Verfahren steht die Säureelution MHC-I-gebundener Peptide von Tumorzellen im Vordergrund. Durch HPLC- (High Performance Liquid Chromatography) MS- (Massenspektrometrie) Verfahren können isolierte Peptide durch den Vergleich mit einer Eichpeptidmischung schnell und präzise analysiert werden. Die Eichpeptide entstammen Epitopvorhersagen potenzieller MHC-I Liganden⁵⁰.

Bei der "Reversen Immunologie" findet die Antigenidentifizierung in umgekehrter Richtung statt. Ausgangspunkt sind dabei nicht CTL oder Antikörper, die ein TAA erkennen, sondern das Antigen selbst. Interessante Kandidaten sind bereits bekannte Tumorantigene, die vielleicht zusätzliche T-Zellepitope für andere HLA-Typen bereithalten⁵¹.

1.5 Spezifische Immuntherapie

1.5.1 Onkologische Therapieformen

Die Behandlung von Krebserkrankungen basiert heute auf drei etablierten Therapieoptionen: Operation, Chemo- und Strahlentherapie. In einem kontinuierlichen Prozess werden auf internationaler Ebene immer neue Standards für die bestmögliche Behandlungsstrategie von Tumorpatienten erarbeitet. Die drei großen Therapieprinzipien stehen dabei - je nach Tumorentität und Tumorstadium - miteinander in Konkurrenz oder ergänzend zueinander. Das lokal begrenzte Prostata-Ca (T2,N0,M0) wird zum Beispiel in kurativer Absicht entweder durch radikale Prostatektomie oder durch Strahlentherapie behandelt. In fortgeschrittenem Stadium, bei Überschreiten der Organgrenzen (T3) oder auftretenden Metastasen (N1,M1), wird jedoch versucht, die weitere Ausbreitung durch Androgendeprivation (Antiandrogene, Östrogene, Orchiektomie, ...) zu reduzieren. Im Falle eines hormonresistenten Prostata-Ca kann eine palliative Chemotherapie eingeleitet werden⁵².

Probleme dieser konventionellen Therapieverfahren sind unter anderem einschneidende Nebenwirkungen und das Wiederaufkeimen verbleibender Tumorzellen im Rezidiv.

In den letzten Jahren haben Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung einen revolutionären Umbruch in der Onkologie herbeigeführt. Bei der sogenannten *Molecular Targeted Tumorthrapy* werden gezielt genetische Aberrationen und spezifische Merkmale maligner Zellen blockiert. Beispiele neuer Pharmazeutika sind "small molecules" wie Imatinib bei CML, Antikörper wie Rituximab bei der Behandlung von Lymphomen und Hormonblocker wie Tamoxifen bei der Brustkrebstherapie.

1.5.2 Spezifische Immuntherapie

Vielversprechende Ansätze liefert auch die Spezifische Immuntherapie, bei der das eigene Immunsystem den Tumor überwinden soll. Ziel dieser Strategie ist die Induktion einer gegen Tumorantigene gerichteten Immunität. Dabei sollen T-Lymphozyten den Primärtumor und Metastasen infiltrieren, um Tumorzellen

zu zerstören. Dieser Vorgang konnte bereits durch Bildgebung sichtbar gemacht werden^{53,54}.

Tumore sind trotz der Expression von Tumorantigenen aufgrund der bereits beschriebenen Mechanismen (s.1.4.2) meist wenig immunogen. Um die Immuntoleranz von Tumoren zu durchbrechen, müssen Abwehrzellen zunächst auf die entarteten Zellen aufmerksam gemacht werden. Hierzu werden DC als professionelle APC eingesetzt. Diese zeichnen sich durch eine starke Potenz bei der Antigenaufnahme und der Induktion einer primären Immunantwort aus. Außerdem sind DC in der Lage, prozessierte Antigene sowohl MHC-I als auch MHC-II assoziiert zu präsentieren und dadurch eine CTL- und eine T_H-Antwort zu generieren^{4,5}. Es wurden bereits viele Varianten der Verabreichung von TAA an DC evaluiert. Ein weitverbreiteter Ansatz, der in vielen Studien bereits zur Anwendung kam, ist die Beladung von DC mit synthetischen Peptiden⁵⁵. Nachteile sind hierbei die Voraussetzung, dass tumorspezifische Epitope bereits bekannt sein müssen und die Abhängigkeit vom HLA-Haplotyp des Patienten.

Bei sogenannten Gesamttumorvakzinierungsstrategien werden im Gegensatz dazu apoptotische Tumorzellen⁵⁶, Tumorzelllysate⁵⁷ oder Hybride aus Tumorzellen und DC⁵⁸ eingesetzt. Bei diesen polyvalenten Vakzinen müssen die TAA nicht bekannt sein. Verschiedene auch MHC-II assoziierte T-Zellepitope können präsentiert werden, was einen Schutz vor klonalem *Immunescape* darstellt. Andererseits bedarf es zur Umsetzung dieser Methoden relativ großer Mengen an Tumormaterial, welches insbesondere bei Patienten mit geringer Tumormasse oder minimaler Resttumorlast nicht ausreichend zur Verfügung steht.

Weitere Möglichkeiten der Applikation polyvalenter Antigene an DC basieren auf viralen Vektorsystemen⁵⁹ bzw. Elektroporation mit RNA⁶⁰. Dabei kann Gesamttumor-RNA oder für ein TAA kodierende mRNA eingesetzt werden. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass minimale RNA-Mengen in vitro amplifiziert und ohne Verlust der biologischen Aktivität zur Transfektion eingesetzt werden können⁶¹.

Autologe, antigenbeladende DC können in vitro spezifische T-Effektorzellen induzieren, die dem Patienten reinfundiert werden. Oder es werden direkt DC appliziert, um in vivo eine T-Zellantwort zu generieren. Durch zusätzliche Gabe von Adjuvantien (IL2, GM-CSF) wird versucht die Immunantwort zu verstärken⁵. In den letzten Jahren hat sich die Anzahl bekannter MHC-I und MHC-II assoziierter T-Zellepitope stetig vermehrt, sodass neue Entwicklungen in der spezifischen Immuntherapie auf ein patientenindividuelles Tumorstoff abzielen, das einen maßgeschneiderten Cocktail bekannter TAA enthält^{62,63}.

1.6 Bax Inhibitor-1 als Tumorstoff

Bax Inhibitor-1 (BI-1) steht als Apoptoseregulator im Verdacht, bei der Onkogenese von Tumoren beteiligt zu sein. Es handelt sich um ein stark hydrophobes Protein mit einem Molekulargewicht von 26,5 kDa. BI-1 besitzt sieben membrandurchspannende Domänen und ist hauptsächlich in den Membranen des ER lokalisiert⁶⁴. Ursprünglich wurde BI-1 in Hodengewebe nachgewiesen und als "testis enhanced gene transcript" TEGT bezeichnet. Eine Funktionsanalyse in Hefezellen führte zur Entdeckung der hemmenden Wirkung auf das apoptotische Protein BAX, einem Mitglied der BCL2 Familie und zur Umbenennung in Bax inhibitor-1⁶⁵. BI-1 wurde als hochkonserviertes Protein beschrieben, das in einer Vielzahl eukaryoter Spezies (Reis, Tomate, Drosophila, Arabidopsis, Bierhefe) eine zytoprotektive Funktion gegenüber oxidativem Stress und Hitzeschock ausübt⁶⁶. BI-1 Knock-out-Mäuse weisen gegenüber der Wildtyp-Variante eine größere Anfälligkeit für Reperfusionsschäden und damit verbundenem oxidativem ER-Stress auf⁶⁷. Eine Überexpression von BI-1 wirkt zytoprotektiv durch eine Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie durch Inhibition von ER-Stress-Proteinen⁶⁸. Außerdem wird vermutet, dass BI-1 pH-abhängig die Ca^{2+} -Konzentration im Lumen des ER senkt. Dabei erhöht ein saures Milieu die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER und führt zu einer vermehrten Bax-Aktivierung. Dies erhöht die Zytocrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien und führt folglich zu gesteigerter Apoptose⁶⁹.

Es wurde bereits mehrfach eine dysregulierte Expression des BI-1 Proteins in unterschiedlichen Tumorentitäten nachgewiesen. Grzimir et al fanden eine Überexpression von BI-1 in Mamma-, Uterus-, Ovarial-⁷⁰ und Prosta-Ca⁷¹. Außerdem gelang der Arbeitsgruppe mit dem Einsatz von siRNA und der resultierenden Expressionsunterdrückung von BI-1 die vermehrte Induktion spontaner Apoptose in Mamma-⁷⁰ und Prosta-Ca⁷¹ Zelllinien.

In einer anderen Studie wurde bei Astrozytompatienten durch ein serologisches Screening Antikörper gegen das BI-Peptid im Plasma gefunden. Außerdem war BI-1 in allen untersuchten Proben überexprimiert⁷². Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass eine Fehlregulation oder Überexpression des BI-1 Proteins maßgeblich an der Kanzerogenese von Tumoren beteiligt ist und machen BI-1 zu einem interessanten Zielantigen für immuntherapeutische Verfahren.

1.7 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung neuer, immunogener T-Zellepitope bei der AML. Im Labor von Prof. Stevanović (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen) wurden mittels Säureelution, MHC-I-gebundene Peptide von AML-Blasten isoliert und durch massenspektrometrische Verfahren analysiert^{50,73}. Im Folgenden werden diese leukämischen Blasten als AML1 bezeichnet. Von den identifizierten Peptiden wurde das HLA-A24-bindende Peptid AYVHMTVF dem Protein Bax Inhibitor-1 (BI-1) zugeordnet. BI-1 wurde aus der Gesamtheit der eluierten Peptide ausgewählt, da es auf Grund seiner Rolle als Apoptoseregulator ein hochinteressantes Tumorantigen darstellt. Anschließend wurde dieses Peptid synthetisiert und zur Induktion von T-Zellen eingesetzt. Die Charakterisierung des BI-1 Peptids als neues, tumorassoziiertes T-Zellepitop stellt eine bedeutende vorklinische Voraussetzung für einen möglichen Einsatz in Antitumor-Vakzinierungsstrategien dar.

DC wurden als APC eingesetzt, die aus autologen PBMNC spezifische T-Zellen selektionierten und aktivierten. Dabei wurden folgende drei Varianten der Antigenapplikation an DC evaluiert:

- direktes Beladen mit BI-1 Peptid,
 - Transfektion mit Gesamt-RNA leukämischer Blasten (AML1),
 - Transfektion mit einem *in-vitro-Transkript* (IVT) des klonierten BI-1 Gens.
- Mittels Chrom^[51Cr]-Release-Assays wurde anschließend untersucht, ob T-Zellen induziert werden, die spezifisch den Komplex aus MHC-I Molekül und BI-1 Peptid auf Tumorzellen erkennen. Voraussetzung hierfür ist die Expression, Prozessierung und Präsentation des BI-1 Proteins auf Tumorzellen. Die endogene Expression von BI-1 wurde durch RT-PCR- und Western Blot Analysen von Tumorzelllinien und primären, malignen Zellen, untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Produkt	Hersteller
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000	MDS Nordion, Bucks, GB
Betaplatte liquid scintillation counter 1205	Perkin Elmer Wallac, Freiburg, D
CO2-Inkubator NUAIRE™™	NuAire, Plymouth, USA
Elektroporations-Impulsgenerator EPI-2500	Dr. L. Fischer, Heidelberg, D
Fotometer RNA/DNA Calculator Gene Quant™ II	Amersham Biosciences, Freiburg, D
ImmunoSpot® Analyzer	Cellular Tech. Ltd., Cleveland, USA
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, D
Mikropipetten 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Mini Trans Blot Cell	Bio-Rad Lab. GmbH, München, D
Mini-Protean 3 Electrophoresis System	Bio-Rad Lab. GmbH, München, D
Minishaker IKA-Works	IKA-Works, Inc., Wilmington, USA
Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow	Tecan GmbH, Crailsheim, D
Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Sigma, Deisenhofen, D
PCR-Gerät Gene Amp 9600	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Schüttelbank Plymax 1040	Heidolph, Schwabach, D
Sicherheitswerkbank HS 18/2	Heraeus, Hanau, D
Spannungsgerät EPS 601	Amersham Biosciences, Freiburg, D
UV-Reader Biometra Bio Doc Analyze	Whatman Biometra, Göttingen, D
Zentrifuge Eppendorf 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Kendro, Hanau, D

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
14 ml-Röhrchen, PP, steril Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
24 Well-Zellkulturplatte, Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
50 ml-Röhrchen, PP, steril, Falcon®	BD Biosciences, Heidelberg, D
96 Well-Zellkulturplatte, Cellstar®, U-shape	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Autoradiographiefilm, Amersham Hyperfilm ECL™ (18x24 cm)	GE Healthcare, Freiburg, D
Combitips Plus 0,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Einmalpipetten, steril	Peqlab GmbH, Oldendorf, D
Elektroporationsküvetten, 4 mm	Peqlab GmbH, Oldendorf, D
Kryoröhrchen NUNC Cryo Tube™, Vials, 1 ml, 1,8 ml	Nalge Nunc Internat., Rochester, USA
LumaPlates™ 96, Szintillationsplatte	Perkin Elmer, Boston, USA
MultiScreen® HA Filter Plates for ELISPOT, 96 well	Millipore Corporation, Billerica, USA
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, D
Pipetten, steril, gestopft, Falcon® 2 ml	BD Biosciences, Heidelberg, D
Pipetten, steril, gestopft, Costar® 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml,	Corning GmbH, Kaiserslautern, D
Pipettenspitzen, steril, gestopft, 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Sterilfilter Minisart 0,45 µm	Sartorius, Göttingen, D
TBE-Fertiggele, Reliant® 4% + EtBr	Lonza, Rockland, USA
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, D

Produkt	Hersteller
X-Ray Cassette	Gollwitzer GmbH, Augsburg, D
Zellkulturflaschen Falcon®, 75 cm ²	BD Biosciences, Heidelberg, D

2.3 Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Produkt	Hersteller
[⁵¹ Cr]-Natrium-Chromat	GE Healthcare, Freiburg, D
DNA Molecular Weight Marker VIII	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
PMA: Phorbol 12-Myristat 13-Azetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Primer 'random'	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Zellkultur:	
Fetal Bovine Serum	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D
PBS: Dulbeccos Phosphate Buffered Saline 0,0095 M (PO4)	Bio Whittaker Europe, Verviers, B
Penicillin-Streptomycin 100 ml	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D
RPMI-1640 mit GlutaMAX™-I +25mM HEPES	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Trypsin-EDTA	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D
DC- und CTL-Protokolle:	
Ficoll: Biocoll Separating Solution	BioChrom AG, Berlin, D
GM-CSF, Sargramostim, Leukin®	Berlex Biosciences, Seattle, USA
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden, D
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden, D
X-Vivo 20	Bio Whittaker, Wakersville, USA

Produkt	Hersteller
Western Blot:	
Amersham ECL Plus™	GE Healthcare, Freiburg, D
Bench Mark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, D
Biotinylated SDS Page Standards Low Range	Bio-Rad Lab. GmbH, München, D
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Slim Fast Schokolade	Slim Fast Deutschland GmbH, Wiesbaden, D
Streptavidin Horseradish-Peroxidase Conjugate	GE Healthcare, Freiburg, D
TWEEN® 20	Merck, Hohenbrunn, D

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, die in dieser Tabelle nicht explizit erwähnt sind, wurden von den Firmen Roche (Mannheim D), Roth (Karlsruhe D), Serva (Heidelberg D), Sigma (St. Louis USA) und Sigma-Albrich (Deisenhofen D) bezogen.

2.4 Puffer und Medien

Tabelle 4: Puffer und Medien

Puffer	Zusammensetzung
DNA-Ladepuffer	Glycerin 5 % EDTA 166,7 µM Bromphenolblau 0,025 %
MACS-Puffer	PBS pH 7,2 BSA 0,5 % EDTA 2 mM

Material und Methoden

Puffer	Zusammensetzung
Zellkultur:	
RP10-Medium	RPMI-1640+Glutamax-I+25mM HEPES ergänzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, Penicillin 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml
Gefriermedium	RP10-Medium ergänzt mit 10 % DMSO
ELISPOT:	
AEC-Substratlösung	1 Tablette AEC, gelöst in 2,5 ml DMF + 47,5 ml Acetatpuffer + 25 µl H ₂ O ₂ (30%ig)
Western Blot:	
Ladepuffer 3fach	Tris-HCl 180 mM pH 6,8 Glycerin 28 % SDS 6 % Bromphenolblau 0,001 %
Lysepuffer RIPA	Igepal CA-630 1% Na-Desoxycholat 0,5% SDS 0,1% EDTA 2 mM Aprotinin 2 mg/ml PMSF 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM in PBS
Sammelgel 6%ig	1 ml - 2M Tris pH 6,7 1 ml - 30 % Acrylamid 3 ml - Aqua bidest. 50 µl - 10 % SDS 50 µl - 10 % APS 5 µl - TEMED

Material und Methoden

Puffer	Zusammensetzung
Trenngel 10%ig	5,6 ml - 1M Tris pH 8,8 5 ml - 30 % Acrylamid 4,2 ml - Aqua bidest. 150 µl - 10 % SDS 100 µl - 10 % APS 10 µl - TEMED
Laufpuffer	Glycin 192 mM Tris 25 mM SDS 0,1 %
Transferpuffer	Glycin 192 mM Tris 25 mM SDS 0,1 % Methanol 20 %
TBS 1-fach	Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 NaCl 140 mM
TBST 0,5 %	1-fach TBS Tween 0,5 %
TBST 3 %	1-fach TBS Tween 3 %

2.5 gebrauchsfertige Kits

Tabelle 5: gebrauchsfertige Kits

Produkt	Hersteller
Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, D
MACS CD19 & CD3 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Perbio Science, Bonn, D
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.6 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

Produkt	Hersteller
Anti-human MHC-Klasse-I: W6/32	freundlicherweise zur Verfügung
Anti-human MHC-Klasse-II: Tü39	gestellt von Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, D
ELISPOT:	
Anti-human IFN- γ mAb 1-D1K	Mabtech, Nacka Strand, S
Anti-human IFN- γ mAb 7-B6-1-Biotin	Mabtech, Nacka Strand, S
Western Blot Erstantikörper:	
BI-1, sc-12393, polyclonal, goat	Santa Cruz, Heidelberg, D
BI-1, sc-52895, monoclonal, mouse	Santa Cruz, Heidelberg, D
GAPDH monoclonal, mouse	HyTest Ltd. Turka, Fin
Survivin AF886, rabbit	R&D Systems, Wiesbaden, D
Western Blot Zweitantikörper:	
anti-goat, IgG-HRP, sc-2020	Santa Cruz, Heidelberg, D
anti-goat, IgG-HRP, sc-2922	Santa Cruz, Heidelberg, D
anti-mouse, IgG-HRP, sc-2055	Santa Cruz, Heidelberg, D
anti-rabbit, IgG-HRP, sc-2054	Santa Cruz, Heidelberg, D

2.7 Primer, Peptide und in-vitro-Transcripte (IVT)

Tabelle 7: Primer, Peptide und in-vitro-Transcripte

Produkt	bereitgestellt von
synthetisches Zielpeptid , HLA-A24-bindend, abgeleitet von Bax Inhibitor-1 BI-1, bzw. Testis Enhanced Gene Transcript TEGT; 45-53, AYVHMVTHF	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, D
synthetisches, Kontrollpeptid , HLA-A24-bindend, abgeleitet von PP1G human; 113-121, KYPENFFLL	
BI-1 Primer (NM_003217) 5' GTGGCTTCGTCCTTGTTGAT 3' 5' GGGTGAAGGAGAGGAAGTC 3'	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Frank Grünebach
β₂-Mikroglobulin Primer (NM_004048) 5' GGGTTTCATCCATCCGACAT 3' 5' GATGCTGCTTACATGTCTCGA 3'	Medizinische Universitätsklinik II, Tübingen
BI-1 in-vitro-Transkript	
EGFP in-vitro-Transkript	

2.8 Tumorzelllinien

Tabelle 8: Tumorzelllinien

Tumorzelllinien im Standard Chrom^[51Cr]-Release-Assay:

Tumorzelllinie	Herkunft	HLA-Status
HL-60	Akute myeloische Leukämie, FAB M2	A1
NB-4	Akute myeloische Leukämie, FAB M3	A11
THP-1	Akute myeloische Leukämie, FAB M5	A2, A24
K-562	Chronisch myeloische Leukämie	A11
A498	Humanes Nierenzellkarzinom	A2

Tumorzelllinie	Herkunft	HLA-Status
SK-OV 3	Humanes Ovarialkarzinom	A3, A68
SW756	Humanes Cervix Karzinom	A1, A68

zusätzliche Tumorzelllinien für RT-PCR-Analyse:

Tumorzelllinie	Herkunft
Kasumi-1	Akute myeloische Leukämie, FAB M2
SD-1	Akute lymphatische Leukämie
CROFT	Humane EBV-immortalisierte B-Zelllinie
MZ1257	Humanes Nierenzellkarzinom
NT-2	Humanes Terato-Karzinom
CAKI-2	Humanes Nierenzellkarzinom
Weri-RB-1	Humanes Retinoblastom

2.9 Zellkultur

2.9.1 Zellkultivierung

Standard Brutschrankbedingungen für alle verwendeten Zellarten waren 37 °C Temperatur, 5 % CO₂-Sättigung und 100 % Luftfeuchtigkeit. Im Folgenden werden diese Parameter nicht mehr wiederholt. Tumorzelllinien wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen in RP10-Medium kultiviert. Adhärenzte Zelllinien wurden bei etwa 80%iger Konfluenz etwa zweimal pro Woche je nach Wachstumsgeschwindigkeit im Verhältnis 1:4 bis 1:10 gesplittet. Die Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen, die Flüssigkeit dekantiert und mit 3 ml Trypsin-EDTA für 5 min vom Plastikboden gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen in RP10-Medium resuspendiert, wovon ein Teil zur Kultivierung wieder ausplattiert wurde.

2.9.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe von Trypanblau bestimmt, das die Zellmembran von intakten Zellen nicht durchdringen kann, weshalb diese ungefärbt blieben. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Drei große Eckquadrate wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Für N [Zellzahl /ml] gilt: $N = n \times 10^4 \times f$

n: gezählte Zellen eines großen Eckquadrates (aus 16 Kleinquadraten)

10^4 : Neubauerzahl (ausgezähltes Volumen entspricht 1/10⁴ ml)

f: Verdünnungsfaktor (hier 2)

2.9.3 Kryokonservierung von Zellen

Adhärente Zelllinien wurden in einer Zellzahl von 5×10^6 , nicht adhärente Zelllinien mit 1×10^6 in Kryoröhrchen bei -80 °C tiefgefroren. Als Frostschutz wurde dem Medium 10 % DMSO zugesetzt. Beim Wiederauftauen wurden die Zellen zügig in 37 °C warmes RP10-Medium überführt und gewaschen.

2.9.4 Isolierung mononukleärer Zellen

Leukozytenkonzentrate, sogenannte *Buffy Coats*, stammten von gesunden Spendern der Blutspendezentrale Tübingen. Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurden aus den *Buffy Coats* PBMNC (peripheral blood mononuclear cells) isoliert. Bei diesem Verfahren wird eine Ficoll-Lösung eingesetzt, deren Dichte zwischen der Dichte von Granulozyten und Erythrozyten und der Dichte von PBMNC und Thrombozyten liegt. Durch Zentrifugation bildet sich zwischen der Ficoll- und der Serumschicht ein weißer Saum von PBMNC, der hauptsächlich aus Lymphozyten und Monozyten besteht.

In vier 50 ml-Röhrchen wurden 12 ml Ficoll vorgelegt. Das Blut wurde im Verhältnis 1:4 mit PBS verdünnt und der Ficoll-Lösung überschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT, 18 min, 1800 rpm, Brems- und Beschleunigungsgradient 3). Die PBMNC Interphase wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in ein frisches 50 ml-Röhrchen überführt. Die PBMNC wurden zweimal mit 40 ml PBS

gewaschen und jeweils 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in X-Vivo 20 aufgenommen und in der Neubauerzählkammer gezählt.

2.9.5 Ex vivo-Generierung dendritischer Zellen

Von den isolierten PBMNC wurden je 1×10^8 in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 10 ml X-Vivo 20 ausplattiert. Während der zweistündigen Inkubationszeit im Brutschrank adhärten die Monozyten an den Plastikboden der Zellkulturflasche. Anschließend wurde der Überstand mit sogenannten nicht adhären Zellen (NAZ), der vorwiegend aus B- und T-Lymphozyten bestand, abgenommen, gezählt und bei -80 °C tiefgefroren. Dann wurden die Zellkulturflaschen zweimal mit PBS gespült, mit je 10 ml RP10-Medium gefüllt und für sieben Tagen in den Brutschrank gestellt. Zur Ausdifferenzierung der Monozyten zu DC wurde an den Tagen 0, 2, 4, 6 jeweils GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (20ng/ml) supplementiert. Am Tag sieben wurden die unreifen DC geerntet. Dazu wurde der Überstand abgenommen, die verbleibenden Zellen für 3 min mit PBS-EDTA (7mmol) inkubiert und zweimal mit PBS gespült. Die DC wurden zentrifugiert (RT, 5 min, 1500 rpm) und gezählt und konnten für weitere Experimente verwendet werden.

2.10 Transfektion von DC durch Elektroporation

Die Elektroporation ist eine bewährte Methode zur Transfektion eukaryoter Zellen. Dabei wird mittels einer kurzen Rechteckspannung des Impuls-generators fremde RNA in die Zelle eingebracht, welche dann vom zelleigenen Translationsapparat abgelesen werden kann⁶⁰.

Die erforderliche Zellzahl wurde abzentrifugiert, in 200 µl serumfreien X-Vivo 20 Medium aufgenommen und in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt. Pro Zelle wurde $2,5 \times 10^{-6}$ µg RNA verwendet. Das zu pipettierende RNA-Volumen in µl berechnete sich wie folgt:

$$V = 2,5 \times 10^{-6} [\mu\text{g} / \text{Zelle}] \times \text{Zellzahl} / \text{RNA Konzentration} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Die Elektroporation erfolgte bei 360 V Spannung, 10 ms Impulszeit und 1200 µF Kapazität. Im Anschluss wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes

RP10-Medium überführt. Die transfizierten DC wurden sowohl zur Induktion und Restimulation von CTL als auch als Targets in Standard Chrom^[51Cr]-Release-Assays verwendet.

2.11 Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL)

2.11.1 Induktion von CTL mittels Peptid

Durch die Beladung von DC mit synthetischen, aus Tumorantigenen abgeleiteten Peptiden können spezifische CTL induziert werden. Peptidbeladene DC werden dabei mit autologen PBMNC kokultiviert. Naive, für dieses Peptid spezifische CTL erkennen das Peptid MHC-vermittelt. Es kommt zur T-Zell-Aktivierung und zur klonalen Expansion.

Die Induktion erfolgte in 24-Well-Zellkulturplatten in einem Endvolumen von 2 ml RP10-Medium. Pro Versuch wurden 5-8 Wells mit je 5×10^5 DC angesetzt. Die eingesetzten DC wurden mit BI-1 Peptid (50 µg/ml) in RP10-Medium für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Autologe PBMNC wurden aufgetaut, gewaschen und in einer Dichte von 3×10^6 Zellen / Well den DC hinzugegeben. Nach sieben Tagen Inkubation im Brutschrank folgte die erste Restimulation.

Zur Restimulation wurden autologe PBMNC verwendet. Es wurden $2,5 \times 10^6$ PBMNC / Well aufgetaut, wie beschrieben mit Peptid beladen, und anschließend für 11,3 min mit 30 Gy bestrahlt. Die induzierten CTL wurden durch zweimaliges Spülen mit PBS geerntet und davon wurden 5×10^5 CTL / Well zu den bestrahlten PBMNC hinzupipettiert. An den Tagen 1, 3 und 5 wurde IL2 (2 µg/ml) zugegeben. Nach jeweils 7 Tagen wurde die Restimulation bis zu maximal dreimal wiederholt. Am Tag 7 nach der letzten Restimulation wurden die CTL als Effektorzellen bei einem Standard Chrom^[51Cr]-Release-Assays eingesetzt.

2.11.2 Induktion von CTL mittels RNA

Die Transfektion von DC mit RNA ist eine weitere Möglichkeit, antigenspezifische CTL zu induzieren. In dieser Arbeit wurde neben Gesamttumor-RNA von AML Blasten eines Patienten (AML1) auch ein IVT von

klonierter BI-1 cDNA zur Induktion von CTL eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente ein EGFP IVT.

Bei der Induktion wurden pro Well 5×10^5 elektroporierte DC mit 3×10^6 autologen PBMNC (5-8 Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte, in 2 ml RP10-Medium, für 7 Tage im Brutschrank) kokultiviert. Der Ansatz der Restimulation enthielt bei sonst gleichem Vorgehen pro Well 5×10^5 induzierte CTL, 5×10^5 elektroporierte DC und $2,5 \times 10^6$ bestrahlte, autologe NAZ (11.3 min, 30 Gy). Die NAZ wurden hinzugefügt, um ein geeignetes Mikromillieu für das Wachstum der CTL zu gewährleisten. An den Tagen 1, 3 und 5 wurde IL2 (2 µg/ml) zugegeben. Nach jeweils 7 Tagen wurde die Restimulation bis maximal dreimal wiederholt. Am Tag 7 nach der letzten Restimulation wurden die CTL als Effektorzellen bei einem Standard Chrom^[51Cr]-Release-Assay eingesetzt.

2.12 Standard Chrom^[51Cr]-Release-Assay

Diese Methode dient zur Funktionsanalyse der in vitro induzierten CTL. Unterschiedliche Zielzellen, sogenannte *Targets*, werden dabei mit radioaktivem Chrom^[51Cr] markiert und zusammen mit den Effektorzellen (CTL) inkubiert. Durch die Messung der ⁵¹Cr-Freisetzung im Überstand lässt sich sowohl die Zytotoxizität als auch die Spezifität der induzierten CTL ermitteln. Die CML-Linie K-562, welche keine MHC-I Moleküle exprimiert, dient dabei zum Ausschluss der Zytolyse durch NK-Zellen.

Als Targets dienten Tumorzelllinien, elektroporierte DC und peptidbeladene DC. Am Tag des Assays erfolgte sowohl die Beladung mit Peptiden (s. 2.11.1) als auch die Elektroporation mit RNA (s. 2.10). Die Targets wurden eine Stunde lang bei 37 °C mit 10 µg/ml [⁵¹Cr]-Natrium-Chromat inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Chrom^[51Cr] durch einmaliges Waschen mit RP10-Medium entfernt und die Zielzellen zu 1×10^4 / Well in 96 Well-Rundbodenplatten ausgesät. In den Rundbodenplatten waren bereits CTL in sechs verschiedenen Verdünnungsstufen vorgelegt (3×10^5 - 1×10^3). Dies entspricht Effektor to Target Ratios von 30:1, 3:1, 1:1, 0,3:1, 0,1:1. Die Zellen wurden in einem Endvolumen von 200 µl für 4 h im Brutschrank inkubiert. Die spontane und maximale Chromfreisetzung wurde durch je 3 Wells mit

unbehandeltem RP10-Medium bzw. 1%igem Triton X-100 Lysepuffer ermittelt. 50 µl Überstand pro Well wurde abgenommen, auf einer Szintillationsplatte über Nacht getrocknet und mit dem Betaplatte Liquid Scintillation Counter gemessen. Der Anteil spezifisch lysierter Zielzellen wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = \frac{\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}}{\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}} \times 100$$

2.12.1 Antikörperblockade der MHC Moleküle

Die HLA-Restriktion der induzierten Effektorzellen wurde im Standard Chrom^[51Cr]-Release-Assay durch den Einsatz des Antikörpers W6/32 nachgewiesen, der gegen MHC-I Moleküle gerichtet ist und die Bindung des TCR verhindert. Zur Kontrolle diente der gegen MHC-II gerichtete Antikörper Tü39. Die Zielzellen wurden mit den Antikörpern W6/32 (10 µg/ml) und Tü39 (10 µg/ml) für 45 min im Brutschrank inkubiert, einmal mit RP10-Medium gewaschen und wie beschrieben im Standard Chrom^[51Cr]-Release-Assay eingesetzt.

2.12.2 Cold Target Inhibition

Um die Antigenpezifität der induzierten CTL zusätzlich zu bestätigen, wurde das Prinzip der Cold Target Inhibition im Standard Chrom^[51Cr]-Release-Assay eingesetzt. Bei diesem Ansatz wird den chrommarkierten Zielzellen (Hot Target) zusätzlich die 20fache Menge von nicht chrombeladenen Zielzellen (Cold Target) hinzugegeben. Handelt es sich beim Cold Target um DC, die das BI-1 Peptid HLA-A24-gebunden präsentieren, so erkennen die induzierten CTL den MHC-Peptidkomplex und lysieren die im Überschuss vorhandenen Cold Target-Zellen, während die Hot Target-Zellen verschont bleiben. Dabei wird kein Chrom^[51Cr] freigesetzt. In der Gegenprobe werden DC als Cold Target-Zellen mit irrelevantem A24-bindendem Peptid beladen. In diesem Fall wird die zytotoxische Kapazität der CTL nicht durch das Cold Target gebunden und das Hot Target kann lysiert werden. Das dabei freigesetzte Chrom^[51Cr] wird im

Szintillationszähler gemessen und die spezifische Lyserate kann berechnet werden.

2.13 Nachweis von Proteinen im Western Blot

2.13.1 Herstellung von Zellysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Tumorzellen wurden geernetet, mit PBS gewaschen und anschließend zu je 10^6 in 100 μ l RIPA-Lysepuffer lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden die Lysate für 30 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80 °C eingefroren. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot von 5 μ l mit 20 μ l RIPA-Puffer verdünnt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem „BCA Protein Assay Reagent Kit“ nach Angaben des Herstellers für Microplates im Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow.

2.13.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei diesem Verfahren werden Proteine denaturiert und aufgrund ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Anhand von Proteingemischen bekannter Masse (Marker) kann schließlich eine Größenordnung erfolgen. Das Detergens SDS denaturiert Proteine und führt aufgrund seiner starken negativen Ladung zu einer Maskierung der Proteineigenladungen. Dadurch wandern die Proteine im elektrischen Feld annähernd proportional ihrer Größe. Die Matrix des Polyacrylamidgels wirkt dabei als molekularer Sieb.

In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE im Mini-Protean 3 Elektrophorese-System der Firma Bio-Rad verwendet. Durch das vorgeschaltete Sammelgel (6%ig) wird dabei eine stärkere Fokussierung der Banden im folgenden Trenngel (10%ig) erreicht. Das Gel wird in die Laufkammer eingespannt und vollständig mit Laufpuffer überschichtet. Von den Tumorzellysaten wurden bis zu 50 μ g Protein geladen. Dazu wurden die Proben im Verhältnis 2:1 mit 3fach Ladepuffer gemischt. Dem Ladepuffer wurde kurz vor Gebrauch 30%ig Dithiotreitol (DTT 1M) zugesetzt. DTT spaltet Disulfidbrücken und zerstört dadurch die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Das Zielvolumen der Proteinproben von 30 μ l wurde durch RIPA-

Puffer komplettiert, für 5 min bei 100 °C aufgeköcht und in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung wurden 0,5 µl biotinylierter SDS-Page Standards Low Range Marker 1:10 mit Ladepuffer versetzt, 30 s bei 100 °C gekocht und sofort in eine Geltasche pipettiert. Außerdem wurden 7 µl des Markers Bench Mark™ Prestained Protein Ladder direkt in eine Geltasche pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V etwa 1,5 h und wurde kurz, bevor die Lauffront des Gels das Ende der Gelkammer erreichte, beendet.

2.13.3 Western Blot

Im Western Blot werden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dort können einzelne Proteinbanden durch Bindung spezifischer Antikörper in einer gekoppelten Reaktion sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde nach der Elektrophorese zusammen mit einer Nitrozellulosemembran, zwei Whatman Papieren und zwei Schwämmen, nach Herstellerangaben in die Blotting-Kammer (Mini Trans Blot Cell) eingesetzt und vollständig mit Transferpuffer überschichtet. Die Nitrozellulosemembran muss auf Seite der Anode (positive Elektrode) zu liegen kommen, damit die negativ geladenen Proteine in die richtige Richtung wandern. Der Proteintransfer erfolgte bei 250 mA, ca. 80 V und 4 °C über 80 min. Anschließend wurde die Membran sofort in TBS überführt, um sie vor Austrocknung zu schützen.

Es erfolgte eine Stunde lang das Blocken, eine Absättigung der Membran mit Proteinen, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Es wurde versucht, das starke Hintergrundsignal, welches vermutlich durch den verwendeten BI-1 Goat-Primärantikörper verursacht wurde, zu reduzieren, indem in unterschiedlichen Versuchsreihen folgende Parameter variiert wurden. In verschiedenen Ansätzen wurden zum Blocken 4 % (w/w) Slimfast, 4 % (w/w) Milchpulver und 5 % (w/w) BSA als Proteinlösungen eingesetzt. Als Puffer dienten dabei 25 ml TBS mit 0,5 % bzw. 3 % (v/v) Tween (TBST 0,5 % bzw. 3 %). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem BI-1 Primärantikörper in 2% Slimfast, 2% Milchpulver bzw. 5% BSA für 1 h bei Raumtemperatur oder für 24 h bei 4 °C. Verschiedene Chargen folgender Primärantikörper der Firma Santa Cruz (Heidelberg, D) kamen zum Einsatz: BI-1 (sc-12393, polyclonal,

goat), BI-1 (sc-52895, monoclonal, mouse). Die Antikörper wurden 1:200 und 1:100 in 15 ml TBST 0,5 % aufgenommen.

Nach der Inkubation mit Primärantikörper wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBST 0,5% gewaschen. Anschließend erfolgte in verschiedenen Versuchen die Inkubation mit folgenden Sekundärantikörpern der Firma Santa Cruz (Heidelberg, D.): anti-goat IgG-HRP (*Horseradish Peroxidase Conjugate*, sc-2020), anti-goat IgG-HRP (sc-2922), anti-rabbit IgG-HRP (sc-2054), anti-mouse IgG-HRP (sc-2055). Bei den Sekundärantikörpern wurde die Inkubationszeit variiert von 15 min bis 45 min und die Konzentration in TBST 0,5 %, bzw. 3 % wurde von 1:2000 bis 1:40000 variiert. Ungebundene Antikörper wurden durch weitere Waschschriffe entfernt. Nun wurde die Membran für eine Minute in ECL-Lösung (Reagens 1 zu Reagens 2 im Verhältnis 1:1) geschwenkt, in Folie eingeschlagen und in eine Röntgenkassette eingeklebt. In der Dunkelkammer erfolgte die Belichtung eines Röntgenfilmes, wobei zwischen 1 min und 24 h belichtet wurde. Die mit dem Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-peroxidase oxidiert das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol, welches daraufhin Licht emittiert. Dieses Licht schwärzt den Röntgenfilm an der Stelle der Antikörperbindung. Nach der Filmentwicklung wurden die Nitrozellulosemembranen bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Spur mit dem biotinylierten Marker SDS Page Standards Low Range (Bio-Rad Laboratories GmbH München, D) wurde nach dem Blocken von der restlichen Nitrozellulosemembran abgetrennt und für 1 h mit dem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Amersham Biosciences, Freiburg, D) 1:10000 in TBST 0,5% inkubiert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschriffe. Nachdem der Membranstreifen mit ECL-Lösung benetzt wurde, konnten beide Teile der Nitrozellulosemembran auf einer Folie wieder aneinander gefügt werden. Grundlage für diese Reaktion ist die äußerst starke Affinität von Streptavidin zu Biotin.

Als Ladekontrolle diente das Protein des sogenannten *house-keeping gene* (ubiquitär exprimiertes Kontrollgen) GAPDH mit 36 kD (monoclonal, mouse, HyTest Ltd. Turka, Fin). Zum Nachweis von Proteinen mit niedrigem

Molekulargewichtes diente ein Antikörper gegen Survivin mit 16,5 kD (AF886, rabbit, R&D Systems, Wiesbaden, D). Die Banden des BI-1 Proteins mit 26 kD wurden folglich zwischen den Banden von GAPDH (36 kD) und Survivin (16,5 kD) erwartet.

2.14 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.14.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung

Gesamt-RNA von Tumorzellen wurde in einem Säulenchromatographieverfahren mit dem RNeasy® Mini Kit nach mitgeliefertem Protokoll für tierische Zellen isoliert. Die Konzentration und Reinheit der gewonnen RNA wurde mittels UV-Spektrophotometrie (Fotometer RNA/DNA Calculator Gene Quant™ II) bestimmt. Anschließend wurden die RNA-Proben bei -80 °C eingefroren.

2.14.2 cDNA-Synthese und Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der RT-PCR wird zunächst die vorliegende RNA in copyDNA (cDNA) umgeschrieben, anschließend in einer PCR vervielfältigt und durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch die PCR ist es möglich, in vitro DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen, sogenannten *Primern*, eingerahmt werden, exponentiell zu vervielfältigen. Möglich wurde diese Technik durch die Entdeckung des in heißen Quellen vorkommenden Bakteriums *Thermophilus aquaticus*, dessen DNA-Polymerase selbst bei Temperaturen von über 90 °C nicht denaturiert. Ein Amplifikationszyklus verläuft jeweils in drei Phasen. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang der Matrize bei über 90 °C in Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Anschließend folgt bei einer Temperatur von etwa 60 °C die Anlagerung (Annealing) der Primer an komplementäre Abschnitte eines Matrizenstranges. Im dritten Schritt (Synthese) erfolgt bei ca. 70 °C die Polymerisation der gewünschten Abschnitte zum DNA-Doppelstrang.

Die cDNA-Synthese erfolgte nach dem Protokoll von Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit mit Random Primern. Als Negativkontrolle wurde stets ein

Ansatz ohne Reverse Transkriptase durchgeführt. Die gewonnenen cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Bis zu 5 µg Gesamt-RNA wurden bei der Synthesereaktion von 20 µl cDNA eingesetzt, wovon 1 µl cDNA in einem 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt wurden. Um mögliche Kontaminationen auszuschließen wurde als Negativkontrolle ein Ansatz ohne cDNA geführt. Die PCR erfolgte im Thermocycler Gene Amp PCR System 9600. Als Kontroll-Gen wurde β 2-Mikroglobulin verwendet. Dieses Gen wird in allen Zellen in annähernd gleichem Ausmaß exprimiert und diente als Kontrolle bezüglich Integrität und Effizienz der cDNA Synthese bzw. Expressions-Ausmaß des untersuchten Proteins.

BI-1 Primer: (NM_003217)

5' GTGGCTTCGTCCTTGTTGAT 3'

5' GGGTGGGAAGGAGAGGAAGTC 3'

β 2-Mikroglobulin Primer: (NM_004048)

5' GGGTTTCATCCATCCGACAT 3'

5' GATGCTGCTTACATGTCTCGA 3'

Programm des Thermocyclers:

Parameter von β 2-Mikroglobulin-PCR bei Abweichung in Klammer.

Anzahl Zyklen: 27 (28)

Pre-Treatment: 5 min bei 94 °C

Denaturierung: 30 s (15 s) bei 94 °C

Annealing: 30 s bei 60 °C (55 °C)

DNA-Synthese: 30 s bei 72 °C

Extensionsschritt: 5 min bei 72 °C

2.14.3 Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und sichtbar gemacht. Die Gitterstruktur des Gels wirkt dabei als molekularer Sieb, der die Wanderung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekülgröße bremst. Nach Vervielfältigung wurden 10 µl des PCR-Produkts durch 4%ige TBE-Fertiggele aufgetrennt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht durch die UV-

Fluoreszenz von Ethidiumbromid. Dieses Agens, welches bereits im Gel enthalten war, interkaliert in DNA Moleküle. Zur Größenzuordnung diente der DNA Molecular Weight Marker VIII von Roche. Die Elektrophorese erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 90 V. Die Banden wurden mit Hilfe des Biometra Bio Doc visualisiert und dokumentiert.

2.15 Herstellung des BI-1 *in-vitro*-Transkripts

Der BI-1 Vektor wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Han-Jung Chae⁶⁸ (Burnham Institute for Medical Research La Jolla, California). Das BI-1 IVT wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Frank Grünebach (Medizinische Universitätsklinik II, Tübingen, D) bereitgestellt.

Zunächst wurde das Plasmid durch Restriktionsverdau mit XhoI linearisiert. Zur *in-vitro*-Transkription unter der Kontrolle des T7 Promotors wurde der T7 mMESSAGE mMACHINE® Kit (Ambion, Huntingdon, Großbritannien) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Reinigung des IVT wurde mit RNeasy® Mini Anionenaustauschersäulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem „RNA cleanup Protokoll“ des Herstellers durchgeführt. Menge und Reinheit wurden durch UV-Spektrophotometrie bestimmt. Größe und Integrität wurden routinemäßig durch Formaldehyd-agarosegelelektrophorese kontrolliert. Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

2.16 Interferon- γ ELISPOT-Assay

Der IFN- γ ELISPOT-Assay (Enzyme-Linked Immunospot Assay) ist eine hochsensitive Methode zur Quantifizierung der zellulären Immunantwort von T-Lymphozyten. Nach Stimulation von T-Lymphozyten wird dabei die Zytokinausschüttung auf Einzelzellebene detektiert. In dieser Arbeit wurden CTL wie bereits beschrieben über mehrere Wochen induziert, um anschließend die IFN- γ Ausschüttung nach Stimulation mit peptidbeladenen autologen DC zu messen. Die Methode beruht auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA mit dem Unterschied, dass hier die Aktivität zellulärer Bestandteile am Boden der Platten detektiert wird. Wird von den T-Lymphozyten IFN- γ sezerniert, bindet dieses an die mit Anti-IFN- γ beschichtete Nitrozellulosemembran am Boden der

Platte. Durch einen zweiten biotinylierten Anti-IFN- γ Antikörper können die aktivierten T-Zellen als rote Punkte (Spots) sichtbar gemacht werden. Dies geschieht, indem das Biotin des Zweitantikörpers an das Avidin des Avidin-Peroxidase Komplexes bindet. Diese Peroxidase setzt das zugegebene AEC-Substrat enzymatisch in einen unlöslichen roten Farbkomplex um.

Zunächst wurden 96 Well MultiScreen[®] HA Filter Plates (Millipore Corporation, Billerica, USA) über 24 h mit 100 μ l Anti-human IFN- γ Antikörper (10 μ g/ml, mAb 1-D1K, Mabtech, Nacka Strand, S) bei 4 °C *gecoatet*. Anschließend wurden die Platten viermal mit je 200 μ l PBS/Well gewaschen und 1 h bei 37 °C mit RP10-Medium vorinkubiert. Zur Stimulation wurden über 40 h 5×10^4 CTL und 5×10^4 peptidbeladene DC (Targets) in einem Volumen von 200 μ l RP10-Medium im Brutschrank kokultiviert. Am Tag 4 wurde die Spot-Entwicklung durchgeführt. Zunächst wurden die Platten 6-mal in eine Waschschüssel mit 2 L PBST 0,05% getaucht und ausgeklopft. Danach wurden die Platten für 2 h mit 100 μ l des biotinylierten Sekundärantikörpers (Anti-human IFN- γ mAb 7-B6-1-Biotin 2 μ g/ml) inkubiert. Nach weiterem sechsmaligen Waschen erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem Avidin-Peroxidase-Komplex (100 μ l/well). Die Platten wurden nun 3-mal mit PBST 0,05 % und 3-mal mit PBS gewaschen. Schließlich erfolgte die Entwicklung durch Zugabe von 100 μ l/well der AEC-Substratlösung. Nach 4 min wurde die Reaktion unter fließendem Leitungswasser gestoppt. Die Platten wurden im Dunkeln getrocknet und bis zur Auswertung im ImmunoSpot[®] Analyzer bei 4 °C aufbewahrt.

2.17 Magnetische Zellisolierung von B- und T- Lymphozyten

B- und T-Zellen wurden mit der MACS-Technologie (magnetic associated cell sorting) mit dem Kit MACS CD19 bzw. CD3 MicroBeads nach Protokoll des Herstellers isoliert. Diese Methode beruht auf der Antikörperbindung an zelltypspezifische Oberflächenmoleküle. Die Antikörper sind an magnetische Partikel gekoppelt, welche die Zielzellen an einer magnetischen Säule zurückhalten, während nicht markierte Zellen passieren. Anschließend wird die

Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die isolierten Zielzellen mit MACS-Puffer eluiert.

Die isolierten T- und B-Zellen wurden in Chrom^[51Cr]-Release-Assays als Zielzellen eingesetzt um zu überprüfen, ob autologe Lymphozyten von den induzierten CTL erkannt und angegriffen werden.

3 Ergebnisse

3.1 RT-PCR und Western Blot Analyse von Tumorzelllinien

In der RT-PCR wurde nachgewiesen, dass das BI-1 Gen in unterschiedlichen Neoplasien transkribiert wird (Abb. 4). In allen eingesetzten Tumorzelllinien wurde das Transkript des BI-1 Gens nachgewiesen. Zum Ausschluss eventueller Verunreinigungen der Reagenzien wurde als Negativkontrolle je ein Ansatz ohne cDNA geführt. Eine RT-PCR mit Primern für das Kontroll-Gen β 2-Mikroglobulin wurde hinsichtlich Integrität und Effizienz der cDNA Synthese durchgeführt (in dieser Abbildung nicht dargestellt). Die Ergebnisse wurden in wiederholten Experimenten bestätigt.

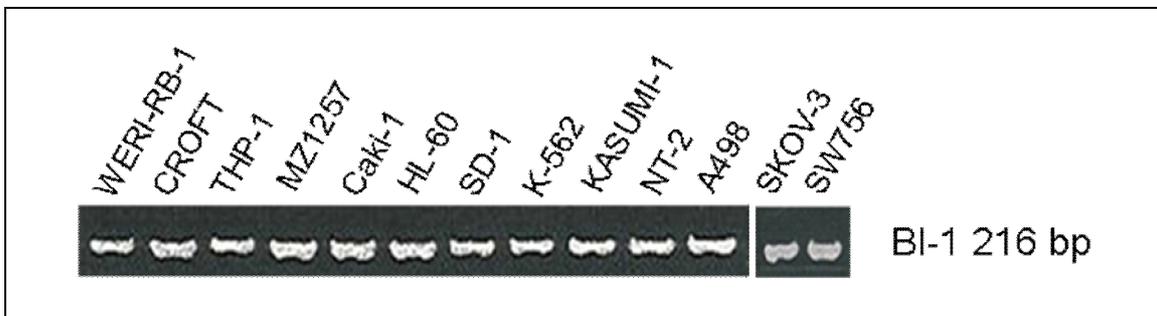


Abb. 4: Exemplarische Darstellung einer RT-PCR von Tumorzelllinien

Humane Tumorzelllinien wurden auf das Vorkommen von BI-1 mRNA untersucht. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne cDNA geführt.

Die Proteinexpression von BI-1 in den eingesetzten Tumorzelllinien wurde im Western Blot untersucht. Folgende Primärantikörper kamen dabei zur Anwendung: *BI-1 sc-12393, polyclonal, goat* und *BI-1 sc-52895, monoclonal, mouse* (Santa Cruz, Heidelberg, D). Die Vorgehensweise wurde im Abschnitt "Material und Methoden" bereits ausführlich beschrieben. Trotz großer Anstrengungen ist es nicht gelungen, das BI-1 Protein im Western Blot nachzuweisen. Im Zeitraum in dem diese Arbeit entstand, standen nur die beiden beschriebenen BI-1 Primärantikörper zur Verfügung, die vermutlich ursächlich dafür sind.

Doch die Tatsache, dass die untersuchten Tumorzelllinien BI-1 mRNA aufweisen und von BI-1-spezifischen CTL erkannt werden, zeigt, dass das BI-1 Protein exprimiert wird. Der Nachweis des erfolgreichen *Blotting* der

Proteinlysate auf die Nitrozellulosemembran, erfolgte mit den Kontrollen GAPDH (36 kD) und Survivin (16,5 kD) (Abb. 5). Zwischen den Banden dieser beiden Proteine wäre das BI-1 Protein (26 kD) zu erwarten gewesen.

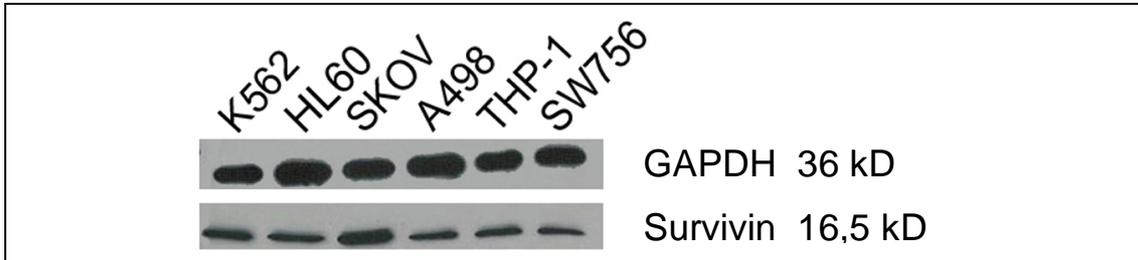


Abb. 5: Exemplarische Darstellung eines Western Blots von Tumorzelllinien

Die eingesetzten Antikörper gegen GAPDH und Survivin dienen als Ladekontrollen, zwischen denen das BI-1 Protein mit einem MG von 26 kD zu erwarten wäre.

3.2 RT-PCR Analyse von Leukämien aus Patientenproben

Gesamt-RNA leukämischer Blasten aus Patientenproben wurden in der RT-PCR auf das Vorkommen von BI-1 mRNA untersucht (Abb. 6). Im Folgenden wurde DC mit diesen RNA-Proben transfiziert und in Chrom^[51Cr]-Release-Assays als Zielzellen eingesetzt. Die Blasten der AML1, AML2 und CML1 waren positiv für BI-1 mRNA, während bei der AML3 kein BI-1 Transkript nachgewiesen wurde.

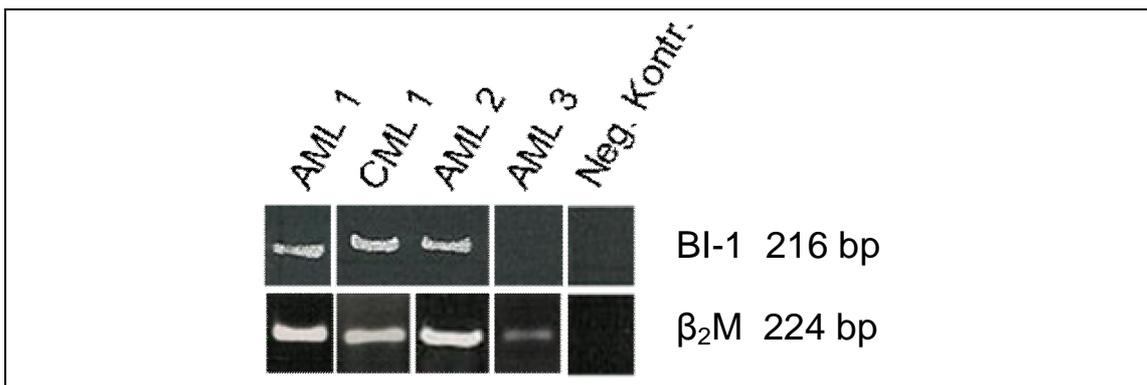


Abb. 6: RT-PCR von Gesamt-RNA leukämischer Blasten aus Patientenproben

Die Proben wurden auf das Vorkommen von BI-1 mRNA untersucht. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne cDNA durchgeführt sowie eine RT-PCR mit Primern für β₂-Mikroglobulin (β₂M).

3.3 Standard Chrom^[51Cr]-Release-Assay

3.3.1 Induktion von CTL durch Gesamttumor-RNA

Gesamt-RNA der AML1, von der das neue HLA-A24-bindende BI-1 Peptid stammt, wurde zur Elektroporation von DC verwendet. Diese DC dienten zur Induktion von CTL, die anschließend in einwöchigem Abstand dreimal restimuliert wurden. Abb. 7 zeigt einen Chrom^[51Cr]-Release-Assay, bei dem Tumorzellen als Targets eingesetzt wurden. Die HLA-A24 positiven Blasten von AML1 und THP-1 wurden lysiert. Die HLA-A24 negative Zelllinie HL60 wurde nicht lysiert, obwohl auch bei ihr BI-1 mRNA nachgewiesen wurde. Dies ist ein Indiz für eine HLA-A24-vermittelte Zytotoxizität. Die Zelllinie K-562 diente dem Ausschluss einer NK-Zell-Aktivität.

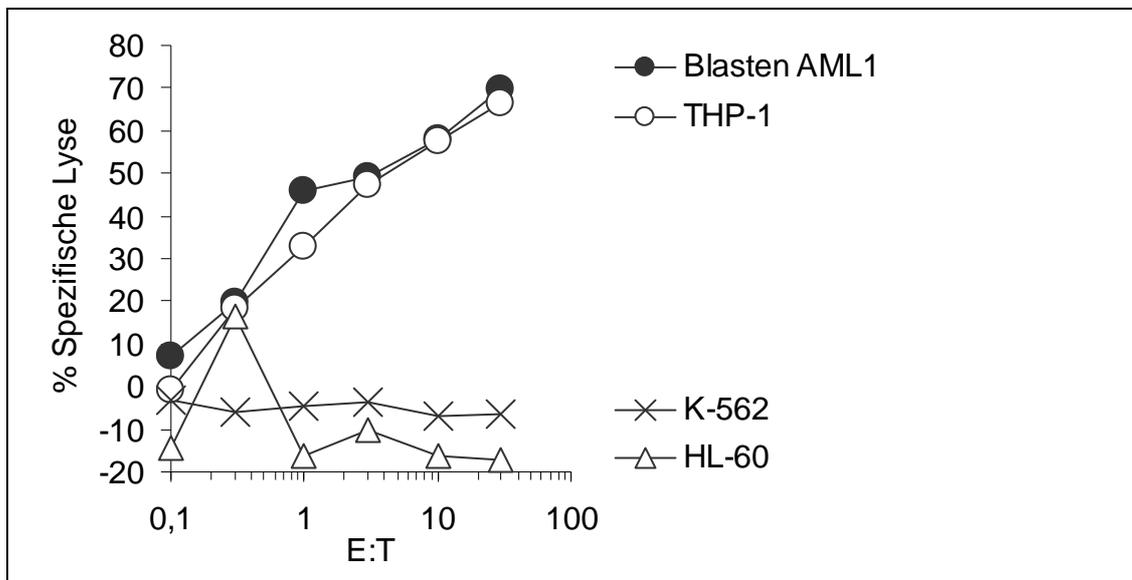


Abb. 7: Chrom^[51Cr]-Release-Assay: Induktion Gesamt-RNA; Tumorzellen

Als Targets dienten Tumorzellen. Die Blasten der HLA-A24⁺ THP-1 und AML1 wurden lysiert, während die HLA-A24⁻ HL60 und K-562 nicht lysiert wurden. X-Achse: Verhältnis der Anzahl von CTL zu Zielzellen (E:T = *effector to target ratio*), Y-Achse: Spezifische Lyserate in %.

In der Abb. 8 wird die MHC-I-Restriktion der induzierten CTL dargestellt. Targetzellen waren DC, die mit AML1-Gesamt-RNA transfiziert wurden und anschließend mit Antikörpern gegen MHC Moleküle (Anti-human MHC-I: W6/32, Anti-human MHC-II: Tü39) inkubiert wurden. Bei Blockade des MHC-I Moleküls konnten die CTL die Zielzellen nicht lysieren, während bei der

Blockade des MHC-II Moleküls eine Lyse erfolgte. Es handelt sich also um eine MHC-I-restringierte Lyse, bei der ein HLA-A, -B oder -C gebundenes Peptid erkannt wird.

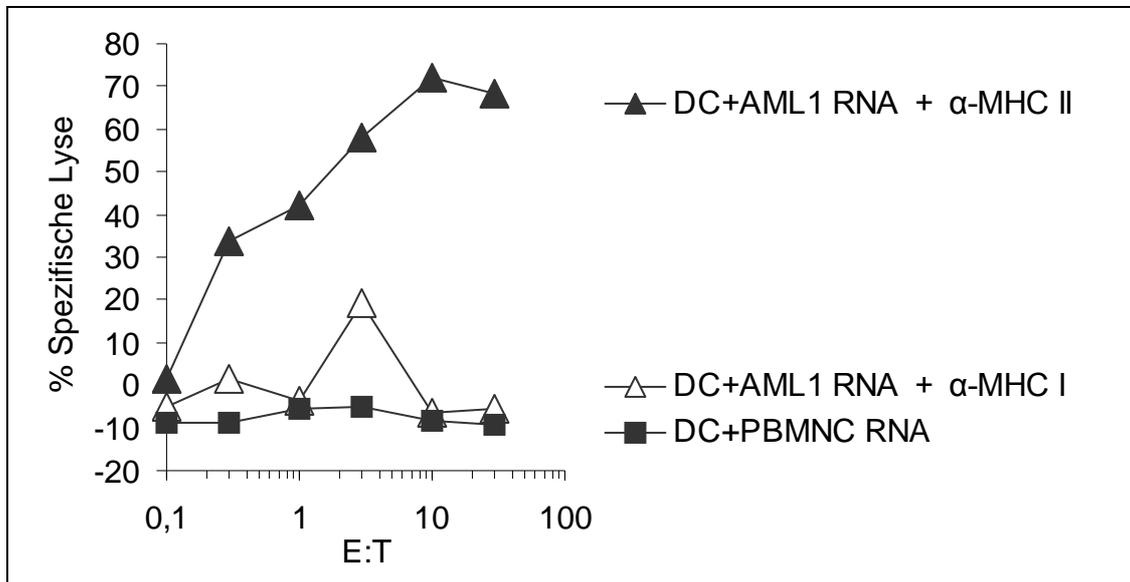


Abb. 8: Chrom⁵¹Cr]-Release-Assay: Induktion Gesamt-RNA; MHC-Blockade

DC wurden mit AML1-Gesamt-RNA transfiziert und mit Antikörpern inkubiert. Bei Blockade der MHC-I Moleküle wurden die Targetzellen von den CTL nicht erkannt, während DC mit blockierten MHC-II Molekülen lysiert wurden. Zur Kontrolle wurden DC eingesetzt, die mit Gesamt-RNA von nicht-autologen PBMNC transfiziert wurden.

In weiteren Chrom⁵¹Cr]-Release-Assays wurden die induzierten CTL hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, DC zu lysieren, die mit künstlich hergestelltem BI-1 Peptid beladen, bzw. mit BI-1 IVT transfiziert wurden. Abb. 9 zeigt, dass in beiden Fällen eine T-Zellantwort registriert wurde, während die Kontrollen mit irrelevantem Peptid (abgeleitet von PP1G human) bzw. irrelevantem EGFP IVT (enhanced green fluorescen protein) von den CTL nicht erkannt wurden.

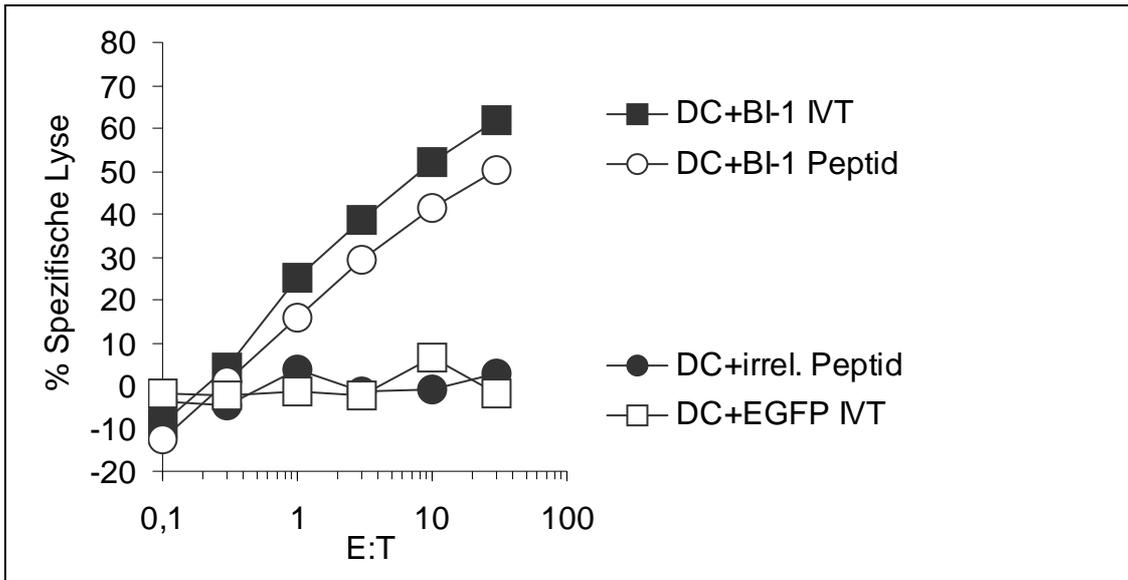


Abb. 9: Chrom⁵¹Cr]-Release-Assay: Induktion Gesamt-RNA; Peptide und IVT

Die mit BI-1 Peptid beladenen bzw. mit BI-1 IVT transfizierten DC wurden lysiert, während ihre Kontrollen mit irrelevantem Peptid („irrel. Peptid“, abgeleitet von PP1G human), bzw. EGFP IVT von den CTL nicht erkannt wurden.

3.3.2 Induktion von CTL durch BI-1 Peptid

In weiteren Experimenten wurde synthetisches BI-1 Peptid verwendet, um in vitro CTL zu induzieren. Dazu wurden DC von außen mit dem BI-1 Peptid beladen und mit autologen PBMNC kokultiviert. In einwöchigem Abstand wurde anschließend die Restimulation dreimal wiederholt. In der folgenden Abb. 10 wird die Fähigkeit der induzierten CTL dargestellt, spezifisch den BI-1-MHC-Komplex zu erkennen. Nur DC, die als *Targets* mit BI-1 Peptid beladen wurden, konnten von den CTL erkannt und lysiert werden. Zur Kontrolle dienten wiederum mit irrelevantem Peptid beladene DC.

Ergebnisse

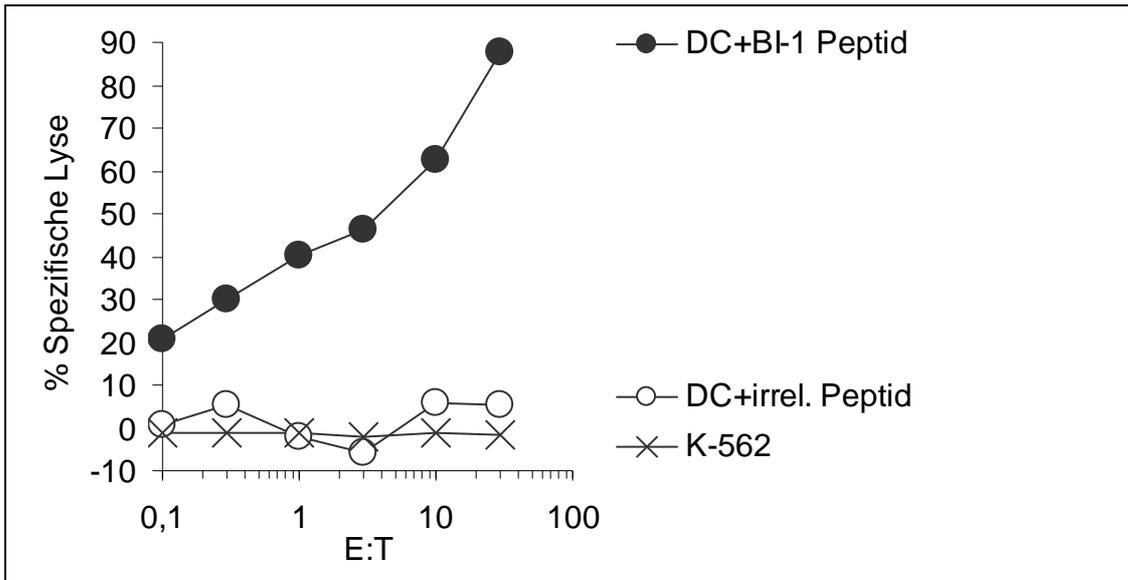


Abb. 10: Chrom^[51Cr]-Release-Assay: Induktion BI-1 Peptid; Peptide

Mit BI-1 Peptid inkubierte DC wurden lysiert, während DC, die mit irrelevantem Peptid (abgeleitet von PP1G human) inkubiert wurden, verschont blieben. Die Zelllinie K-562 diente dem Ausschluss einer NK-Zell-vermittelten Lyse.

Auch die Abb. 11 zeigt einen Chrom^[51Cr]-Release-Assays, bei dem die CTL durch das BI-1 Peptid induziert wurden. Targets waren aber diesmal Tumorzellen, in denen BI-1 mRNA nachgewiesen wurde. Interessanterweise wurden nur die HLA-A24 positiven Tumorzellen THP-1 und AML1 von den CTL lysiert. Auch dieses Ergebnis spricht für eine spezifische Lyse, die durch den Komplex von BI-1 Peptid und HLA-A24 Molekül vermittelt wurde.

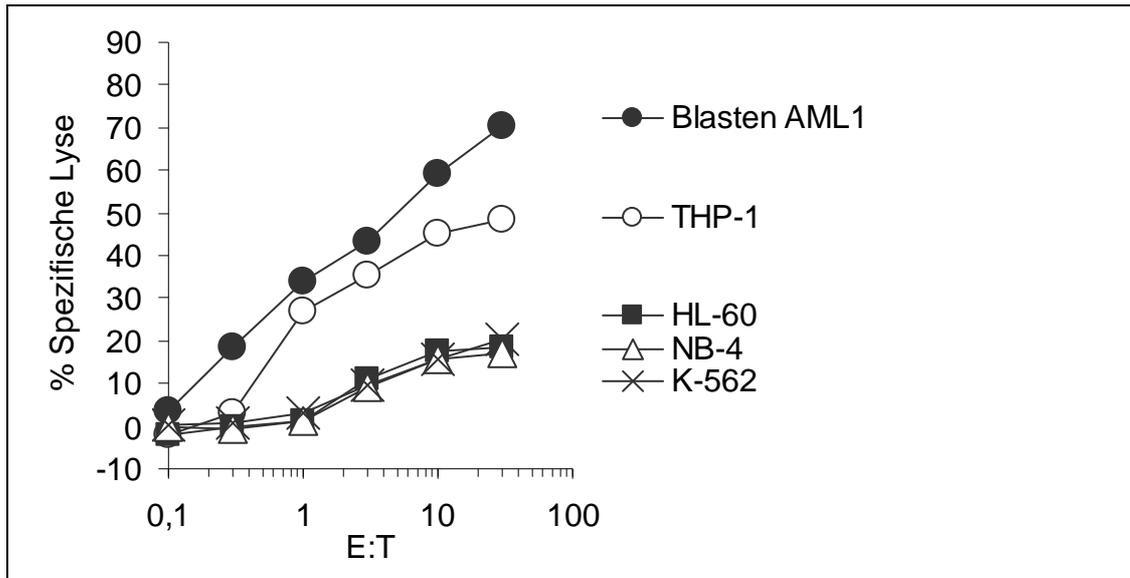


Abb. 11: Chrom⁵¹Cr]-Release-Assay: Induktion BI-1 Peptid; Tumorzellen

Lyse der BI-1⁺ und HLA-A24⁺ Tumorzellen THP-1 und AML1. Die BI-1⁺ und HLA-24⁻ Zelllinien HL60, NB-4, K-562 wurden nicht erkannt.

In den in Abb. 12 dargestellten Experimenten dienten DC als Targetzellen, die mit Gesamt-RNA leukämischer Blasten von Patientenproben transfiziert wurden. Interessanterweise wurden nur diejenigen Targets lysiert, die mit BI-1 enthaltender Gesamt-RNA transfiziert wurden. Die ursprünglichen leukämischen Blasten waren also positiv für BI-1. Außerdem wird gezeigt, dass die Gesamt-RNA gesunder allogener PBMNC und CD34⁺-Progenitorzellen keine Lyse der transfizierten DC auslöst.

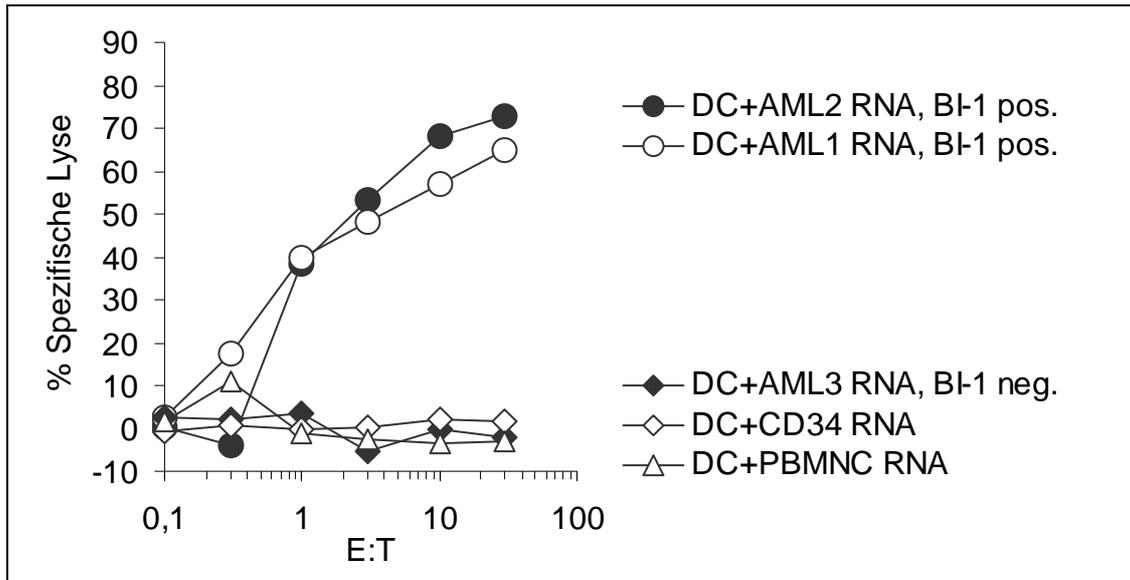


Abb. 12: Chrom⁵¹Cr]-Release-Assay: Induktion BI-1 Peptid; Leukämien

Targets waren DC, die mit Gesamt-RNA leukämischer Blasten von Patientenproben transfiziert wurden. Bei AML1 und AML2 wurden BI-1 mRNA in der RT-PCR nachgewiesen, während dieser Nachweis bei AML3 negativ ausfiel. Zur Kontrolle wurde Gesamt-RNA allogener PBMNC und CD34⁺-Progenitorzellen gesunder Spender eingesetzt.

Die Sensitivität der CTL-vermittelten Lyse wurde durch eine Titration des BI-1 Peptids untersucht (Abb. 13). Dazu wurde eine sechsstufige Verdünnungsreihe der Peptide hergestellt, die von 0,5 ng/ml bis zur Standardkonzentration von 50 µg/ml reichte. Als Targets dienen DC, die mit jeweils einer der genannten Peptidkonzentrationen behandelt wurden. Bereits bei einer Konzentration des BI-1 Peptids von 50 ng/ml wurden ca. 40% der beladenen DC lysiert.

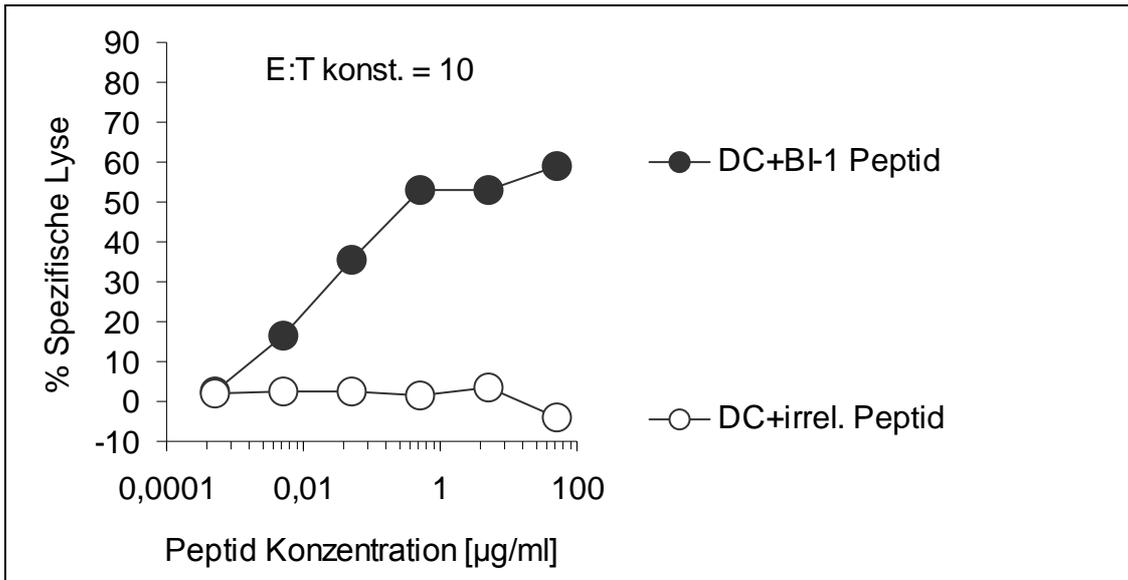


Abb. 13: Chrom^[51Cr]-Release-Assay: Induktion BI-1 Peptid; Peptidtitration

Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen (E:T) lag konstant bei zehn. Die Peptidkonzentration wurde bis zur Standardkonzentration (50 µg/ml), in Zehnerschritten exponentiell gesteigert: 0,5 ng/ml, 5 ng/ml, 50 ng/ml, 0,5 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml.

3.3.3 Induktion von CTL durch BI-1 IVT

Zusätzlich zur Induktion von CTL mit Gesamt-RNA und dem synthetischen BI-1 Peptid wurde in dieser Arbeit die T-Zellinduktion durch BI-1 mRNA evaluiert. Verwendet wurde dazu ein *in-vitro-Transkript* des klonierten BI-1 Gens. Die Induktion der T-Zellen erfolgte, wie bereits beschrieben, über die Transfektion von DC mit dem BI-1 IVT. Auch bei dieser Form der CTL-Generierung konnte eine BI-1-spezifische Lyse von DC nachgewiesen werden, die mit künstlich hergestelltem BI-1 Peptid beladen bzw. mit BI-1 IVT transfiziert wurden (Abb. 14).

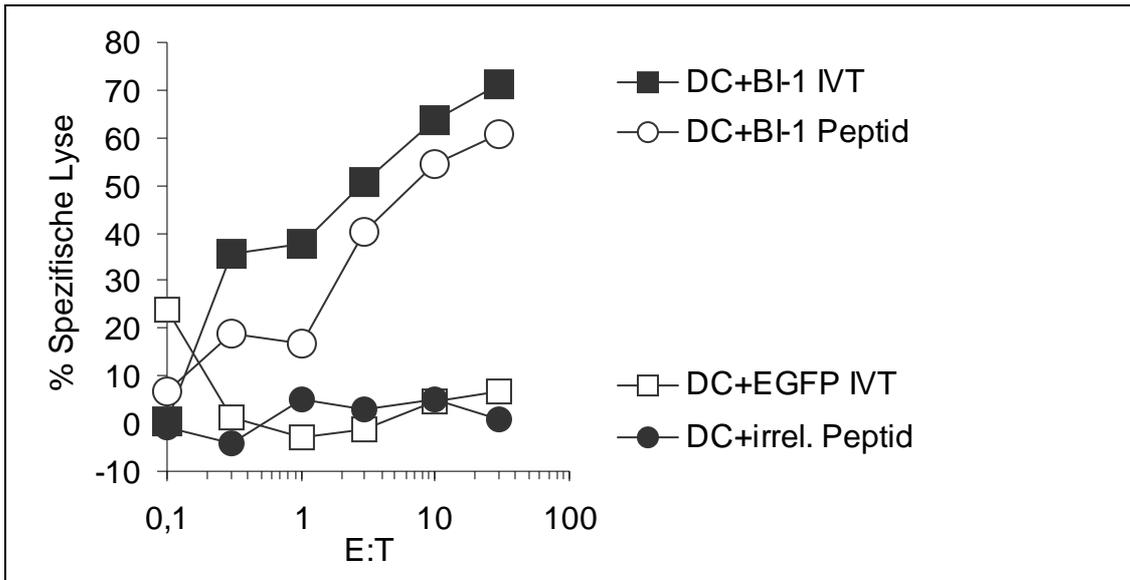


Abb. 14: Chrom⁵¹Cr-Release-Assay: Induktion BI-1 IVT; Peptide und IVT

Die mit BI-1 Peptid beladenen bzw. mit BI-1 IVT transfizierten DC wurden lysiert, während die Kontrollen mit irrelevantem Peptid („irrel. Peptid“, abgeleitet von PP1G human) bzw. EGFP von den CTL nicht erkannt wurden.

Im Chrom⁵¹Cr-Release-Assay, der in Abb. 15 dargestellt ist, dienten DC als Targetzellen, die mit Gesamt-RNA leukämischer Blasten von Patientenproben transfiziert wurden. Wiederum wurden nur diejenigen Targets lysiert, bei denen in der Ursprungsleukämie BI-1 mRNA nachgewiesen werden konnte. Dies spricht auch bei den CTL, die durch das BI-1 IVT induziert wurden, für eine spezifische, BI-1 Peptid vermittelte Lyse der Zielzellen. Gesamt-RNA gesunder CD34⁺-Progenitorzellen löste keine Lyse der transfizierten DC aus. Dieses Ergebnis zeigt, dass das BI-1 Protein in unterschiedlichen Leukämien in ausreichender Menge vorhanden ist, um in diesem experimentellen 'Setting' Immunogenität aufzuweisen.

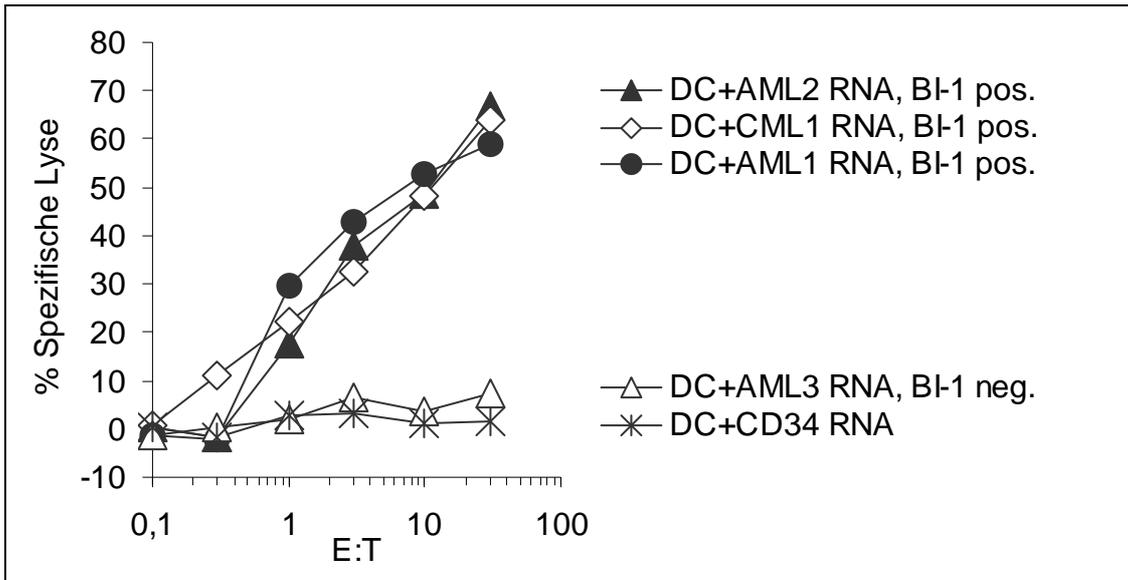


Abb. 15: Chrom⁵¹Cr]-Release-Assay: Induktion BI-1 IVT; Leukämien

Targets waren DC, die mit Gesamt-RNA leukämischer Blasten von Patientenproben transfiziert wurden. Bei AML1, AML2 und CML1 wurden BI-1 mRNA in der RT-PCR nachgewiesen, während dieser Nachweis bei AML3 negativ ausfiel. Zur Kontrolle diente Gesamt-RNA allogener gesunder CD34⁺-Progenitorzellen.

Im Standard Chrom⁵¹Cr]-Release-Assay von Abb. 16 wurden wiederum Tumorzellen als Targets eingesetzt. Die HLA-A24 positiven Blasten von AML1 und THP-1 wurden lysiert. Die HLA-A24 negative Zelllinien HL60 und K-562 wurden nicht lysiert, obwohl auch hier BI-1 mRNA nachgewiesen wurde. Durch MACS-Technologie isolierte, autologe B- und T-Lymphozyten des gesunden Spenders wurden ebenfalls nicht lysiert.

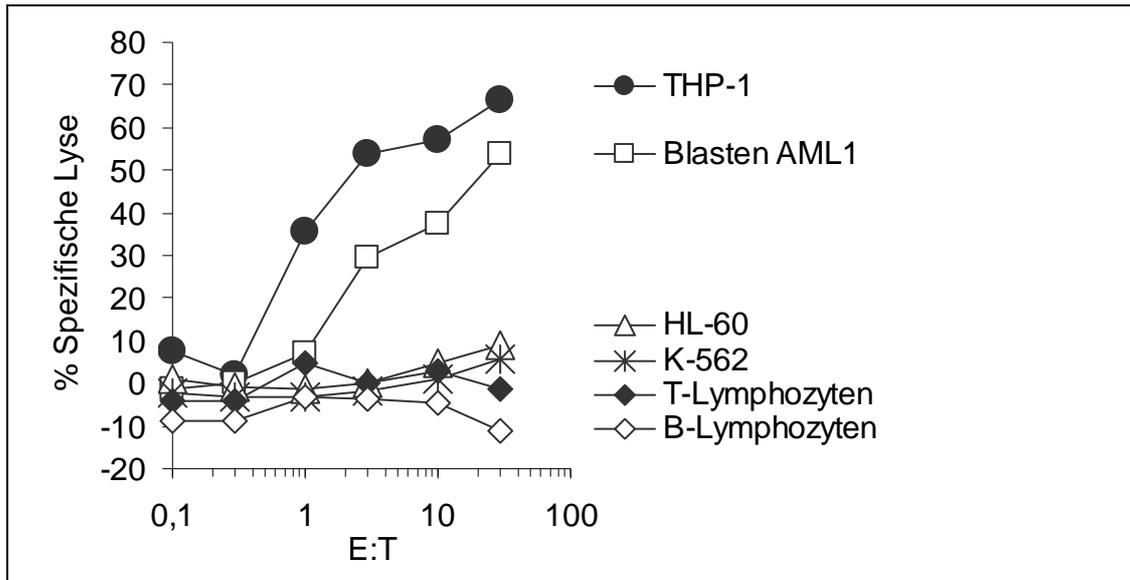


Abb. 16: Chrom^[51Cr]-Release-Assay: Induktion BI-1 IVT; Tumorzellen

Lyse der HLA-A24⁺, BI-1⁺ Tumorzellen von THP-1 und AML1. Die HLA-A24⁻, BI-1⁺ Zelllinien HL60 und K-562 wurden nicht lysiert. Autologe B- und T-Lymphozyten wurden nicht lysiert.

Die Zytotoxizität der induzierten T-Lymphozyten wurde hinsichtlich Spezifität und MHC-I-Restriktion in weiterführenden Experimenten bestätigt (Abb. 17). Als Zielzellen dienten die Blasten der AML1, welche in Vorversuchen effizient lysiert wurden. Bei der MHC-Blockade verhinderte der gegen das MHC-I Molekül gerichtete *Antikörper W6/32* die Interaktion mit dem TCR und folglich die Lyse der Zielzellen. Zur Kontrolle diente der gegen MHC-II gerichtete *Antikörper Tü39*. Nur Targets, bei denen das MHC-I Molekül blockiert war, konnten von den CTL nicht erkannt werden.

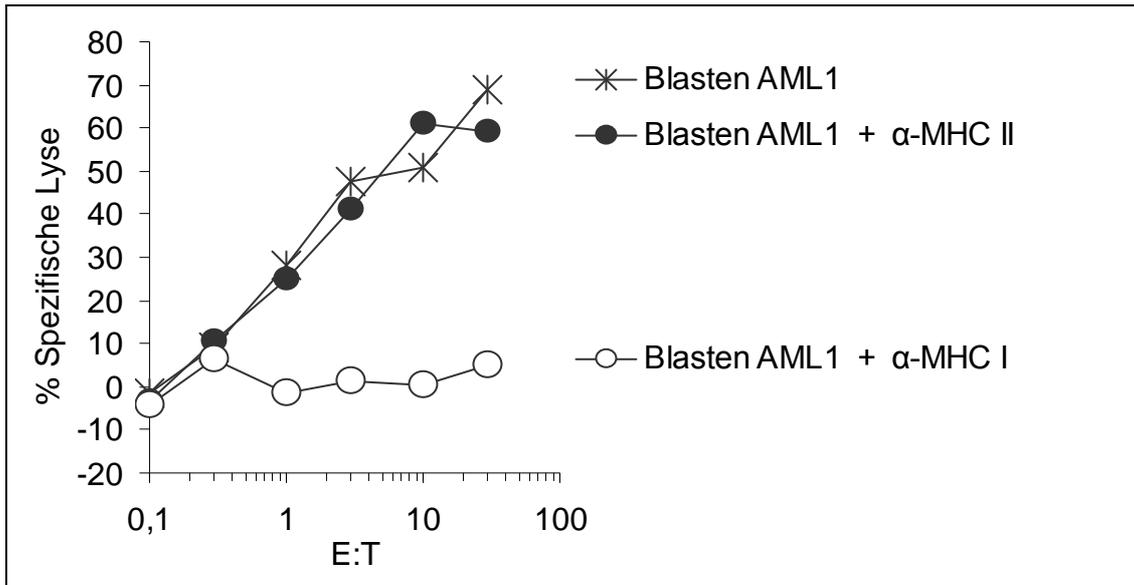


Abb. 17: Chrom⁵¹Cr]-Release-Assay: Induktion BI-1 IVT; MHC-Blockade

Bei Blockade des MHC-I Moleküls wurden die Targetzellen von den CTL nicht mehr erkannt, während DC mit blockiertem MHC-II Molekül lysiert wurden.

3.3.4 Cold Target Inhibition Chrom⁵¹Cr]-Release Assay

Beim *Cold Target Inhibition Chrom⁵¹Cr]-Release-Assay* wurde dem chrommarkierten *hot target* (Blasten AML1 bzw. THP-1) in 20fach höherer Konzentration ein nicht markiertes *cold target* (DC+Peptid) hinzugesetzt. Das im Überschuss vorliegende *cold target*, DC+BI-1 Peptid wurde von den CTL lysiert und verhinderte dadurch die Lyse und eine messbare Chromfreisetzung des *hot targets*. Das *cold target*, DC+irrel. Peptid wurde nicht erkannt, weshalb die CTL in diesem Fall zur Lyse des *hot targets* zur Verfügung standen.

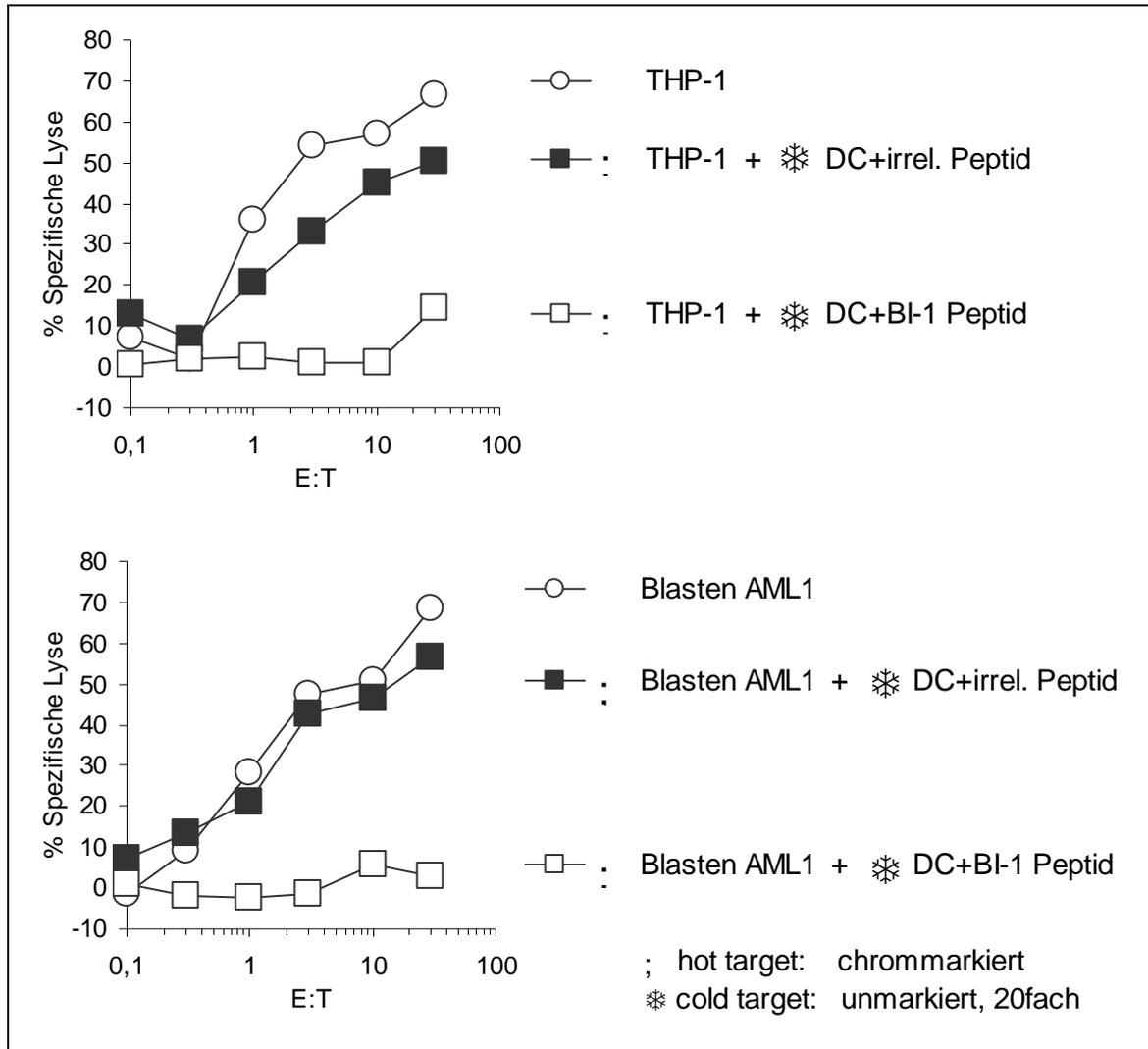


Abb. 18: Cold Target Inhibitor Chrom⁵¹Cr]-Release-Assay: Induktion BI-1 IVT

Als chrommarkierte *hot targets* dienen Blasten der AML1 (oben) und die Tumorzelllinie THP-1 (unten). Die unmarkierten *cold targets* (DC+Peptid) lagen den *hot targets* im Überschuss von 20:1 vor. Das *cold target* DC+BI-1 Peptid wurde in beiden Fällen effektiv lysiert und verhinderte dadurch die Lyse des jeweiligen *hot targets*.

3.4 IFN- γ ELISPOT-Assay

Als zusätzliche Methode, um die Antigen-spezifität der induzierten CTL zu untersuchen, wurde der Interferon- γ ELISPOT-Assay eingesetzt. Zur Stimulation der CTL dienten DC, die mit Peptiden beladen wurden. In der oberen Reihe wurden die DC mit dem BI-1 Peptid beladen. Zur Kontrolle wurden die DC der unteren Reihe mit irrelevantem Peptid beladen. Da die Farbreaktion beim BI-1 Peptid so stark war, dass teilweise keine einzelnen

Spots mehr differenziert wurden, konnte der Assay nicht quantitativ ausgewertet werden. Der qualitative Vergleich der Reaktionen ist in Abb. 19 dargestellt.

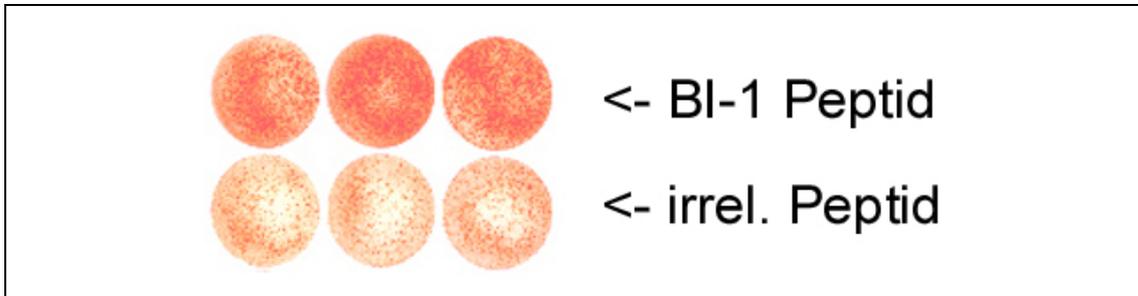


Abb. 19: ELISPOT: Induktion BI-1 IVT; Stimulation durch Peptide

In der oberen Reihe dienten zur Stimulation der CTL, BI-1-Peptid-beladene DC. Zur Kontrolle wurden die DC der unteren Reihe mit irrelevantem Peptid (abgeleitet von PP1G human) beladen.

4 Diskussion

4.1 Fragestellung

Den etablierten onkologischen Therapieoptionen Operation, Chemo- und Strahlentherapie haftet trotz aller erzielbarer Erfolge der Makel an, mit sehr belastenden und einschneidenden Konsequenzen für den Patienten einherzugehen. Gleichzeitig ist ein langfristiger Erfolg nicht immer gesichert.

Immuntherapeutische Verfahren liefern hierbei einen vielversprechenden Ansatz, bei dem das eigene Immunsystem den Tumor überwinden soll. Bei DC-basierten Vakzinierungsstrategien werden diese professionellen APC dazu eingesetzt, immunogene TAA naiven Lymphozyten zu präsentieren. Dadurch soll eine spezifische, gegen Tumorzellen gerichtete, T-Zellimmunität induziert werden. Als zukünftiges Konzept der Spezifischen Immuntherapie wurde bereits ein patientenindividuelles Tumorstoffvakzin gefordert, das einen maßgeschneiderten Cocktail bekannter TAA enthält^{62,63}. In den letzten Jahren hat sich die Anzahl beschriebener, tumorspezifischer T-Zellepitope stetig vermehrt²⁹. Dennoch bedarf es für dieses Vorhaben der Identifizierung weiterer potenter TAA.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung neuer, immunogener T-Zellepitope bei der AML. Dies stellt eine bedeutende vorklinische Voraussetzung für einen möglichen Einsatz in Antitumor-Vakzinierungsstrategien dar. Im Labor von Prof. Stevanović (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen) wurden MHC-I-gebundene Peptide von AML-Blasten eluiert und identifiziert^{50,73}. Davon wurde ein Peptid dem Protein Bax Inhibitor-1 zugeordnet, von dem es Hinweise gibt, als Apoptoseregulator eine Rolle bei der Onkogenese von Tumoren zu spielen. Das BI-1 Peptid wurde synthetisiert und zur Stimulation von T-Zellen eingesetzt.

4.2 Vorgehen

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag darin, in vitro zytotoxische T-Lymphozyten zu generieren, die spezifisch den Komplex aus MHC-I Molekül und BI-1 Peptid auf der Oberfläche von Tumorzellen erkennen und diese zerstören. Durch Plastikadhärenz wurden Monozyten aus Leukozytenkonzentraten gesunder

Blutspender gewonnen. Aus diesen Monozyten wurden durch Stimulation mit IL4 und GM-CSF unreife DC generiert. Diese vermittelten in ihrer Funktion als APC nach Aufnahme des Antigens die Induktion spezifischer T-Zellen aus PBMNC. Antigene wurden den DC dabei auf drei unterschiedlichen Wegen verabreicht:

- direktes Beladen mit BI-1 Peptid,
- Transfektion mit Gesamt-RNA der leukämischen Blasten (AML1),
- Transfektion mit einem IVT des klonierten BI-1 Gens.

Mittels Chrom[⁵¹Cr]-Release-Assays wurde anschließend untersucht, ob T-Zellen induziert wurden, die BI-1-spezifisch Tumorzellen zerstören können.

4.3 Bedeutung der Ergebnisse

Voraussetzung für die HLA-gebundene Präsentation des BI-1 Peptids auf der Zelloberfläche von Tumoren ist die Transkription des BI-1 Gens und die endogene Prozessierung des BI-1 Proteins. Durch die RT-PCR konnte im Rahmen dieser Arbeit BI-1 mRNA sowohl in primären malignen Zellen aus Patientenproben als auch in einer Vielzahl solider und hämatologischer Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Der Proteinnachweis von BI-1 im Western Blot ist dabei in Ermangelung eines funktionsfähigen Antikörpers nicht gelungen. Dieser Proteinnachweis wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen für verschiedene Tumorentitäten (Mamma-Ca⁷⁰, Prostata-Ca⁷¹) beschrieben.

In ersten Experimenten wurden unreife DC mit Gesamt-RNA derjenigen leukämischen Blasten transfiziert (AML1), von deren Oberfläche das BI-1 Peptid isoliert wurde (Abb. 7-9). Mittels dieser DC wurden T-Zellen induziert. In Chrom[⁵¹Cr]-Release-Assays konnte gezeigt werden, dass diese T-Zellen, die HLA-A24⁺, BI-1 exprimierende Tumorzelllinie THP-1 erkennen und angreifen. Außerdem zerstörten die induzierten CTL autologe DC, die entweder mit BI-1 Peptid beladen wurden oder mit AML1-Gesamt-RNA bzw. BI-1 mRNA transfiziert wurden, während die entsprechenden Kontrollen mit irrelevantem Peptid bzw. irrelevanter EGFP-RNA verschont blieben. Die MHC-I restringierte Lyse der CTL konnte durch den Einsatz eines Antikörpers, der gegen das humane MHC-I Molekül gerichtet ist, nachgewiesen werden.

In weiteren Schritten erfolgte die CTL-Generierung durch Beladung autologer DC mit synthetischem BI-1 Peptid (Abb. 10-13) oder durch Transfektion mit in vitro transkribierter mRNA des klonierten BI-1 Gens (Abb. 14-17). In anschließenden Chrom^[51Cr]-Release-Assays konnte gezeigt werden, dass durch beide Methoden eine BI-1-spezifische, MHC-I restringierte CTL-Reaktion induziert werden kann. Auch diese CTL zerstörten autologe DC, die entweder mit BI-1 Peptid beladen wurden oder mit AML1-Gesamt-RNA bzw. BI-1 mRNA transfiziert wurden. Ferner wurden HLA-A24⁺, BI-1-exprimierende Tumorzellen erfolgreich lysiert. Auch hier wurde die MHC-Restriktion über Antikörperblockade nachgewiesen.

In *Cold Target Inhibition Chrom^[51Cr]-Release-Assays* wurde die Antigen-spezifität der induzierten T-Zellen bestätigt (Abb. 18). Die induzierten CTL reagierten jedoch weder auf gesunde, autologe T- und B- Zellen noch auf DC, die mit Gesamt-RNA gesunder, nicht-autologer CD34⁺-Vorläuferzellen elektroporiert wurden. Weitere Targets waren DC, die mit Gesamt-RNA verschiedener Leukämien aus Patientenproben transfiziert wurden. Dabei wurden nur die AML1 AML2 und CML1, bei denen BI-1 mRNA nachgewiesen wurde, lysiert, während die AML3 ohne BI-1 Nachweis verschont blieb (Abb. 15).

In einem weiteren Experiment wurde die Peptidkonzentration, bei der DC als Targetzellen inkubiert wurden, ausgehend von der Standardkonzentration (50 µg/ml) in Zehnerschritten exponentiell gesenkt (Abb. 13). Dabei verringerte sich erwartungsgemäß mit sinkender Peptidkonzentration die Lyserate der Targets. Diese ging jedoch erst ab einer Konzentration von 50 ng/ml deutlich zurück. Dies spricht für eine starke Immunogenität des BI-1 Peptids.

Alle diese Ergebnisse sind Belege für eine spezifische, MHC-I restringierte CTL-Reaktion, die gegen das BI-1 Peptid gerichtet ist. Dieser Nachweis ist mit allen drei verwendeten Methoden zur CTL Induktion gelungen.

Durch eine zusätzliche Methode, dem Interferon-γ ELISPOT-Assay, konnte außerdem die Antigenspezifität der induzierten CTL qualitativ gezeigt werden. Als Effektorzellen dienten dabei CTL, die durch BI-1 IVT generiert wurden. Autologe DC, die mit BI-1 Peptid bzw. mit irrelevantem Peptid beladen wurden,

stimulierten diese CTL zur Interferonfreisetzung. In beiden Reihen wurden *Spots* detektiert, was für einen unspezifischen, hohen Aktivierungsgrad der CTL spricht. Beim qualitativen Vergleich der Farbreaktion hebt sich jedoch der mit BI-1 Peptid stimulierte Ansatz stark von der Kontrolle ab.

4.4 Probleme und Grenzen der Arbeit

Ein problematischer Aspekt dieser Arbeit ist die Übertragung der experimentell gewonnenen Daten auf das komplexe System des menschlichen Organismus. Außerdem vernachlässigt das verwendete experimentelle Design die Rolle und Bedeutung von CD4+ T-Helfer-Zellen bei der Etablierung und Aufrechterhaltung einer zellulären Immunantwort.

Eine Beschränkung des möglichen Einsatzes in Tumor-Vakzinierungsstrategien stellt die HLA-A24 Restriktion des untersuchten BI-1 Peptids dar. Allerdings ist die Frequenz von HLA-A24 mit 15 % (vgl. A2, 48%; A1, 34%; A3, 26%) in der kaukasischen Bevölkerung relativ häufig vertreten⁷⁴. Ein kritischer Aspekt bezüglich der verwendeten Methoden könnte in den eingesetzten Targets gesehen werden. Als Negativ-Kontrolle standen keine Zelllinien oder primäre maligne Zellen zur Verfügung, die HLA-A24 positiv und für BI-1 mRNA negativ waren. Außerdem stellen die peptidbeladenen bzw. transfizierten DC, eingesetzt als Targets, eine artifizielles Modell einer Immunreaktion dar.

4.5 Klinische Studien

Bislang wurden über 180 klinische Studien publiziert, bei denen DC-basierte Antitumor-Vakzinierungen erprobt wurden. Eine aktuelle Liste kann von der Homepage des Mater Medical Research Institute, Brisbane abgerufen werden⁷⁵. Die dabei am häufigsten erforschte Tumorentität ist das Melanom⁷⁶, gefolgt vom Prostata-Ca⁷⁷ und Nierenzell-Ca⁷⁸. Die häufigsten Applikationsformen der DC waren intravenös, intradermal und subkutan. Außerdem wurden in manchen Studien DC direkt in Lymphknoten bzw. in Tumoren injiziert⁵.

Die bisher gesammelten Erfahrungen zeigen, dass DC unbedenklich, ohne größere Nebenwirkungen appliziert werden können. Die beobachteten

Symptome wie Temperaturanstieg, Lymphknotenvergrößerung, Kopfschmerzen, Übelkeit und ein lokales Erythem an der Einstichstelle sind vor allem als Zeichen der Induktion einer zellulären Immunantwort zu deuten, bzw. auf das verwendete Adjuvans zurückzuführen⁷⁹. Bei Patienten einer Melanomstudie kam es vereinzelt zum Auftreten von Vitiligo⁸⁰. In der Mehrzahl aller Studien wurde eine gegen das Zielantigen gerichtete Immunreaktion mittels verschiedener Methoden (Tetramer-Färbung, ELISPOT, CTL-Assay, ...), nachgewiesen. Klinische Auswirkungen wurden bislang jedoch nur in einer kleinen Zahl der Fälle beobachtet. Teilweise konnte dabei eine Korrelation zwischen klinischer Auswirkung und tumorspezifischer Immunität nachgewiesen werden⁵.

Da die Immuntherapie noch kein Standardverfahren darstellt, wurden Antitumor-Vakzinierungen bisher nur bei stark vorbehandelten Patienten in fortgeschrittenem, meist generalisiertem Erkrankungsstadium eingesetzt. Ein Grund, weshalb dieses Verfahren so häufig beim Melanom und Nierenzell-Ca erprobt wurde, ist folglich das in fortgeschrittenem Stadium eingeschränkte Ansprechen dieser Tumoren auf konventionelle onkologische Therapieverfahren. Dieser Sachverhalt wirkt sich aber auch negativ auf mögliche Therapieerfolge von Antitumor-Vakzinierungen aus. Eine chemotherapeutische Vorbehandlung schwächt das Immunsystem und reduziert somit die Chance auf eine starke, gegen den Tumor gerichtete Immunität. Bei großer Tumorlast bzw. Tumormassen fällt es Lymphozyten schwer den Tumor zu infiltrieren. Außerdem führt eine fortgeschrittene Tumorerkrankung durch Mutationen und Selektionsvorgänge vermehrt zu *Immun-escape* Phänomenen.

Ein internationales Gremium, bestehend aus 50 Experten aus Wissenschaft, Industrie und Behörden, hat in den letzten Jahren ein neues, speziell zugeschnittenes Studienparadigma für die Entwicklung von Tumorkvakzinen formuliert⁸¹. Damit soll durch vergleichbare Methoden und Studienstandards bei gewährleisteter Patientensicherheit die Erforschung und Etablierung immuntherapeutischer Verfahren in der Onkologie vorangetrieben werden.

4.6 Ausblick

Auf DC basierende, Antitumor-Vakzinierungen zeigten in bisherigen klinischen Studien viel versprechende Ergebnisse. In einer Vielzahl der Fälle wurde eine Immunität gegen den Tumor registriert und teilweise klinische Effekte beobachtet. Bislang wurden jedoch keine ausreichenden klinischen Erfolge erzielt, um dieses Therapieverfahren zu etablieren. Ein Problem der bisherigen Studien ist das fortgeschrittene Stadium und die starke medikamentöse Vorbehandlung des eingeschlossenen Patientenguts. Möglicherweise zeigt sich ein größerer Überlebensvorteil bei Vakzinierung der Patienten in einem früheren Stadium. Hinsichtlich der Frage nach dem optimalen Vakzinierungsintervall, Dosierungen, Adjuvantien und Applikationswegen konnte sich bisher kein Protokoll klar durchsetzen. Die Erforschung und Weiterentwicklung dieser Parameter liefert neben der Identifikation neuer Zielantigene in den kommenden Jahren Möglichkeiten zur Steigerung des Therapieerfolges.

Um eine möglichst breite Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren bedarf es neuer tumorassoziierter T-Zellepitope wie dem BI-1 Peptid. In dieser Arbeit wurden experimentelle Voraussetzungen erbracht für den Einsatz des BI-1 Peptides in Vakzinierungsstudien. Neben der Beladung von DC mit Peptid wurden auch auf RNA basierende Verfahren als wirksam beschrieben, die in vitro eine CTL-Immunantwort induzieren.

Zukünftig werden weitere potente Tumorantigene identifiziert, deren Kombinationen auf die jeweilige Tumorentität abgestimmt, starke Immunreaktionen hervorrufen werden. Auf diese Weise könnte das Auftreten von "Resistenzen" durch *Immun-escape* verhindert werden. Langfristiges Ziel der Antitumor-Immuntherapie ist, eine nebenwirkungsarme und hochwirksame Behandlung von Krebspatienten zu etablieren. Möglicherweise wird zukünftig nach dem Vorbild der anti-infektiösen Impfprophylaxe auch eine anti-tumorale Vorsorgevakzinierung zum Beispiel bei hereditären Tumorerkrankungen in Betracht gezogen werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das neue Bax Inhibitor-1 Peptid hinsichtlich seiner Fähigkeit untersucht, *in vitro* eine T-Zellreaktion hervorzurufen. Dies stellt die experimentelle Voraussetzung für den späteren Einsatz in Antitumor-Vakzinierungsstudien dar. Von der Arbeitsgruppe Stevanović wurden über 70 MHC-I-gebundene Peptide von leukämischen Blasten eines AML-Patienten isoliert und analysiert. Davon wurde das HLA-A24-bindende BI-1 Peptid (AYVHMVTHF) ausgewählt, da das BI-1 Protein auf Grund seiner Rolle als Apoptoseregulator ein hochinteressantes Tumorantigen darstellt.

Mit Hilfe von autologen DC wurden *in vitro* BI-1 spezifische zytotoxische T-Zellen induziert. Dabei wurden folgende drei Protokolle der Antigenapplikation evaluiert: DC wurden direkt mit synthetischem BI-1 Peptid beladen, DC wurden mit Gesamt-RNA von AML-Blasten elektroporiert und DC wurden mit einem *in-vitro-Transkript* des klonierten BI-1 Gens elektroporiert. Anschließend wurde mittels Chrom^[51Cr]-Release- und ELISPOT-Assays die Aktivität und Spezifität der induzierten CTL untersucht. Außerdem wurde mittels RT-PCR und Western-Blot Analysen die Expression des BI-1 Proteins in verschiedenen Tumorzelllinien untersucht.

Bei allen drei Varianten der CTL-Induktion konnte eine antigenspezifische, HLA-restringierte Lyse nachgewiesen werden. Die CTL lysierten zuverlässig HLA-A24 positive, BI-1 positive Tumorzellen. Die HLA- Restriktion wurde durch HLA-Antikörper-Blockierung nachgewiesen. Die Antigenpezifität konnte in *Cold Target Inhibition Assays* bestätigt werden. Auch beim Einsatz autologer DC als Targets, die entweder mit BI-1 Peptid beladen oder mit BI-1 IVT transfiziert wurden, erfolgte eine antigenspezifische, HLA-restringierte Lyse. Erwartungsgemäß wurden von DC, die mit Gesamt-RNA verschiedener leukämischer Blasten transfiziert wurden nur diejenigen lysiert, bei denen BI-1 mRNA nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit also gezeigt werden, dass mit dem neuen BI-1 Peptid eine antigenspezifische, HLA-restringierte T-Zellreaktion induziert werden kann. Die Charakterisierung des BI-1 Peptids als tumorassoziertes T-Zellepitop, das eine starke Immunantwort zytotoxischer T-

Zellen auszulösen kann stellt die experimentelle Voraussetzung für den Einsatz in Antitumor-Vakzinierungsstudien dar. Damit wurde die vorklinische Voraussetzung erbracht für den Einsatz des BI-1 Peptides in der onkologischen Immuntherapie.

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden am 05.06.2009 von der Fachzeitschrift *Leukemia* unter dem Titel: „*Characterization of BAX Inhibitor-1 as a novel leukemia associated antigen*“ zur Publikation angenommen. Es liegt eine gleichberechtigte Erstautorenschaft mit Dr. S.M. Schmidt vor.

6 Abkürzungsverzeichnis

µF	Mikrofarad
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Antigen Presenting Cell
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid
CEA	Carcinoembryonal Antigen
CLIP	Class II-associated Invariant Chain Peptide
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4
DC	Dendritic Cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
E:T	Effector to Target Ratio
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunospot Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetal Calf Serum
GM-CSF	Granulocyte-Makrophage Colony Stimulating Factor
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase Conjugate
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVT	in-vitro-Transkript
kD	Kilodalton

Abkürzungen

LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen-1
mA	Milliampere
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger Ribonucleinacid
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMNC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Azetat
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
rpm	revolutions per minute
RPMI-1640	Zellkulturmedium, Roswell Park Memorial Institute-1640
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEREX	Serological Analysis of Recombinant cDNA Expression Libraries
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline + Tween
TCR	T-cell Receptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
T _H	T-Helferzelle
TNF- α /- β	Tumornekrosefaktor-alpha /-beta
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
V	Volt

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Bestandteile des Immunsystems	1
Abb. 2: Dendritische Zelle.....	4
Abb. 3: Interaktion von DC und T-Zellen.....	8
Abb. 4: Exemplarische Darstellung einer RT-PCR von Tumorzelllinien	41
Abb. 5: Exemplarische Darstellung eines Western Blots von Tumorzelllinien	42
Abb. 6: RT-PCR von Gesamt-RNA leukämischer Blasten aus Patientenproben.....	42
Abb. 7: Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion Gesamt-RNA; Tumorzellen.....	43
Abb. 8: Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion Gesamt-RNA; MHC-Blockade	44
Abb. 9: Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion Gesamt-RNA; Peptide und IVT.....	45
Abb. 10: Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion BI-1 Peptid; Peptide.....	46
Abb. 11: Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion BI-1 Peptid; Tumorzellen	47
Abb. 12: Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion BI-1 Peptid; Leukämien	48
Abb. 13: Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion BI-1 Peptid; Peptidtitration	49
Abb. 14: Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion BI-1 IVT; Peptide und IVT.....	50
Abb. 15: Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion BI-1 IVT; Leukämien.....	51
Abb. 16: Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion BI-1 IVT; Tumorzellen.....	52
Abb. 17: Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion BI-1 IVT; MHC-Blockade	53
Abb. 18: Cold Target Inhibitor Chrom ^[51Cr] -Release-Assay: Induktion BI-1 IVT	54
Abb. 19: ELISPOT: Induktion BI-1 IVT; Stimulation durch Peptide.....	55

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Geräte	19
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	20
Tabelle 3: Reagenzien	21
Tabelle 4: Puffer und Medien	22
Tabelle 5: gebrauchsfertige Kits.....	24
Tabelle 6: Antikörper.....	25
Tabelle 7: Primer, Peptide und in-vitro-Transcripte	26
Tabelle 8: Tumorzelllinien	26

8 Literaturverzeichnis

1. Vollmar A. and Dingermann T. (2005). Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart).
2. Janeway C.A., Travers P., Walport M., and Shlomchik M. (2002). Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin).
3. Grouard,G., Rissoan,M.C., Filgueira,L., Durand,I., Banchereau,J., and Liu,Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 185, 1101-1111.
4. Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
5. Nencioni,A., Grunebach,F., Schmidt,S.M., Muller,M.R., Boy,D., Patrone,F., Ballestrero,A., and Brossart,P. (2008). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 65, 191-199.
6. Caux,C., Dezutter-Dambuyant,C., Schmitt,D., and Banchereau,J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258-261.
7. Siena,S., Di Nicola,M., Bregni,M., Mortarini,R., Anichini,A., Lombardi,L., Ravagnani,F., Parmiani,G., and Gianni,A.M. (1995). Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp. Hematol.* 23, 1463-1471.
8. Zhou,L.J. and Tedder,T.F. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 2588-2592.
9. Brossart,P., Grunebach,F., Stuhler,G., Reichardt,V.L., Mohle,R., Kanz,L., and Brugger,W. (1998). Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92, 4238-4247.
10. Maraskovsky,E., Daro,E., Roux,E., Teepe,M., Maliszewski,C.R., Hoek,J., Caron,D., Lebsack,M.E., and McKenna,H.J. (2000). In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 96, 878-884.
11. Cresswell,P., Bangia,N., Dick,T., and Diedrich,G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* 172, 21-28.

12. Rammensee,H.G. (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 85-96.
13. Kleijmeer,M.J., Ossevoort,M.A., van Veen,C.J., van Hellemond,J.J., Neefjes,J.J., Kast,W.M., Melief,C.J., and Geuze,H.J. (1995). MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J. Immunol.* 154, 5715-5724.
14. Chapman,H.A. (1998). Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 93-102.
15. Melief,C.J. (2003). Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur. J. Immunol.* 33, 2645-2654.
16. Berard,F., Blanco,P., Davoust,J., Neidhart-Berard,E.M., Nouri-Shirazi,M., Taquet,N., Rimoldi,D., Cerottini,J.C., Banchereau,J., and Palucka,A.K. (2000). Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J. Exp. Med.* 192, 1535-1544.
17. Bushell,A. and Wood,K.J. (1999). Permanent survival of organ transplants without immunosuppression: Experimental approaches and possibilities for tolerance induction in clinical transplantation. *Expert. Rev. Mol. Med.* 1999, 1-31.
18. Slavik,J.M., Hutchcroft,J.E., and Bierer,B.E. (1999). CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol. Res.* 19, 1-24.
19. Schwartz,R.H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248, 1349-1356.
20. Cohen,S.M. and Ellwein,L.B. (1991). Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res.* 51, 6493-6505.
21. Hahn,W.C. and Weinberg,R.A. (2002). Rules for making human tumor cells. *N. Engl. J. Med.* 347, 1593-1603.
22. Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
23. Vogelstein,B. and Kinzler,K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10, 789-799.
24. Friedberg,E.C. (2003). DNA damage and repair. *Nature* 421, 436-440.
25. Gabilovich,D. and Pisarev,V. (2003). Tumor escape from immune response: mechanisms and targets of activity. *Curr. Drug Targets.* 4, 525-536.

26. Seliger,B., Maeurer,M.J., and Ferrone,S. (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol. Today* 21, 455-464.
27. Torre-Amione,G., Beauchamp,R.D., Koeppen,H., Park,B.H., Schreiber,H., Moses,H.L., and Rowley,D.A. (1990). A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 1486-1490.
28. Rayman,P., Uzzo,R.G., Kolenko,V., Bloom,T., Cathcart,M.K., Molto,L., Novick,A.C., Bukowski,R.M., Hamilton,T., and Finke,J.H. (2000). Tumor-induced dysfunction in interleukin-2 production and interleukin-2 receptor signaling: a mechanism of immune escape. *Cancer J. Sci. Am.* 6 *Suppl* 1, S81-S87.
29. Novellino,L., Castelli,C., and Parmiani,G. (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 187-207.
30. Jager,D., Jager,E., and Knuth,A. (2001). Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *J. Clin. Pathol.* 54, 669-674.
31. Cox,A.L., Skipper,J., Chen,Y., Henderson,R.A., Darrow,T.L., Shabanowitz,J., Engelhard,V.H., Hunt,D.F., and Slingluff,C.L., Jr. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264, 716-719.
32. Chen,Y.T., Scanlan,M.J., Sahin,U., Tureci,O., Gure,A.O., Tsang,S., Williamson,B., Stockert,E., Pfreundschuh,M., and Old,L.J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 1914-1918.
33. Jassim,A., Ollier,W., Payne,A., Biro,A., Oliver,R.T., and Festenstein,H. (1989). Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur. J. Immunol.* 19, 1215-1220.
34. Van den,E.B., Peeters,O., De Backer,O., Gaugler,B., Lucas,S., and Boon,T. (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J. Exp. Med.* 182, 689-698.
35. van der,B.P., Traversari,C., Chomez,P., Lurquin,C., De Plaen,E., Van den,E.B., Knuth,A., and Boon,T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.

36. Wolfel,T., Van Pel,A., Brichard,V., Schneider,J., Seliger,B., Meyer zum Buschenfelde,K.H., and Boon,T. (1994). Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* *24*, 759-764.
37. Tsang,K.Y., Zaremba,S., Nieroda,C.A., Zhu,M.Z., Hamilton,J.M., and Schlom,J. (1995). Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* *87*, 982-990.
38. Jaramillo,A., Majumder,K., Manna,P.P., Fleming,T.P., Doherty,G., Dipersio,J.F., and Mohanakumar,T. (2002). Identification of HLA-A3-restricted CD8+ T cell epitopes derived from mammaglobin-A, a tumor-associated antigen of human breast cancer. *Int. J. Cancer* *102*, 499-506.
39. Correale,P., Walmsley,K., Nieroda,C., Zaremba,S., Zhu,M., Schlom,J., and Tsang,K.Y. (1997). In vitro generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen. *J. Natl. Cancer Inst.* *89*, 293-300.
40. Robbins,P.F., El Gamil,M., Li,Y.F., Kawakami,Y., Loftus,D., Appella,E., and Rosenberg,S.A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* *183*, 1185-1192.
41. Gjertsen,M.K., Bjorheim,J., Saeterdal,I., Myklebust,J., and Gaudernack,G. (1997). Cytotoxic CD4+ and CD8+ T lymphocytes, generated by mutant p21-ras (12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide and kill autologous tumour cells carrying this mutation. *Int. J. Cancer* *72*, 784-790.
42. Wagner,W.M., Ouyang,Q., and Pawelec,G. (2003). The abl/bcr gene product as a novel leukemia-specific antigen: peptides spanning the fusion region of abl/bcr can be recognized by both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* *52*, 89-96.
43. Grunebach,F., Mirakaj,V., Mirakaj,V., Muller,M.R., Brummendorf,T., and Brossart,P. (2006). BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* *66*, 5892-5900.
44. Schmidt,S.M., Schag,K., Muller,M.R., Weck,M.M., Appel,S., Kanz,L., Grunebach,F., and Brossart,P. (2003). Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood* *102*, 571-576.
45. Brossart,P., Heinrich,K.S., Stuhler,G., Behnke,L., Reichardt,V.L., Stevanovic,S., Muhm,A., Rammensee,H.G., Kanz,L., and Brugger,W. (1999). Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from

- the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 93, 4309-4317.
46. Umamo,Y., Tsunoda,T., Tanaka,H., Matsuda,K., Yamaue,H., and Tanimura,H. (2001). Generation of cytotoxic T cell responses to an HLA-A24 restricted epitope peptide derived from wild-type p53. *Br. J. Cancer* 84, 1052-1057.
47. Murray,R.J., Kurilla,M.G., Brooks,J.M., Thomas,W.A., Rowe,M., Kieff,E., and Rickinson,A.B. (1992). Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J. Exp. Med.* 176, 157-168.
48. Feltkamp,M.C., Smits,H.L., Vierboom,M.P., Minnaar,R.P., de Jongh,B.M., Drijfhout,J.W., ter Schegget,J., Melief,C.J., and Kast,W.M. (1993). Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 2242-2249.
49. Koziel,M.J., Dudley,D., Afdhal,N., Grakoui,A., Rice,C.M., Choo,Q.L., Houghton,M., and Walker,B.D. (1995). HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J. Clin. Invest* 96, 2311-2321.
50. Schirle,M., Keilholz,W., Weber,B., Gouttefangeas,C., Dumrese,T., Becker,H.D., Stevanovic,S., and Rammensee,H.G. (2000). Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur. J. Immunol.* 30, 2216-2225.
51. Kessler,J.H., Beekman,N.J., Bres-Vloemans,S.A., Verdijk,P., van Veelen,P.A., Kloosterman-Joosten,A.M., Vissers,D.C., ten Bosch,G.J., Kester,M.G., Sijts,A., Wouter,D.J., Ossendorp,F., Offringa,R., and Melief,C.J. (2001). Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J. Exp. Med.* 193, 73-88.
52. Deutsche Gesellschaft für Urologie. Leitlinie zur Therapie des Prostatakarzinoms. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. 1-6-1997. Ref Type: Electronic Citation
53. Agger,R., Petersen,M.S., Petersen,C.C., Hansen,S.B., Stodkilde-Jorgensen,H., Skands,U., Blankenstein,T., Andersen,T.E., Hulgaard,E.F., Jorgensen,J.T., Marqversen,J., Gundersen,H.J., and Hokland,M.E. (2007). T cell homing to tumors detected by 3D-

- coordinated positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *J. Immunother.* *30*, 29-39.
54. Boissonnas,A., Fetler,L., Zeelenberg,I.S., Hugues,S., and Amigorena,S. (2007). In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J. Exp. Med.* *204*, 345-356.
55. Brossart,P., Wirths,S., Stuhler,G., Reichardt,V.L., Kanz,L., and Brugger,W. (2000). Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* *96*, 3102-3108.
56. Chang,J.W., Peng,M., Vaquerano,J.E., Zhou,Y.M., Clinton,R.A., Hyun,W.C., Giedlin,M.A., and Leong,S.P. (2000). Induction of Th1 response by dendritic cells pulsed with autologous melanoma apoptotic bodies. *Anticancer Res.* *20*, 1329-1336.
57. Herr,W., Ranieri,E., Olson,W., Zarour,H., Gesualdo,L., and Storkus,W.J. (2000). Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte responses. *Blood* *96*, 1857-1864.
58. Gottfried,E., Krieg,R., Eichelberg,C., Andreesen,R., Mackensen,A., and Krause,S.W. (2002). Characterization of cells prepared by dendritic cell-tumor cell fusion. *Cancer Immun.* *2*, 15.
59. Specht,J.M., Wang,G., Do,M.T., Lam,J.S., Royal,R.E., Reeves,M.E., Rosenberg,S.A., and Hwu,P. (1997). Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J. Exp. Med.* *186*, 1213-1221.
60. Muller,M.R., Grunebach,F., Nencioni,A., and Brossart,P. (2003). Transfection of dendritic cells with RNA induces CD4- and CD8-mediated T cell immunity against breast carcinomas and reveals the immunodominance of presented T cell epitopes. *J. Immunol.* *170*, 5892-5896.
61. Nair,S. and Boczkowski,D. (2002). RNA-transfected dendritic cells. *Expert. Rev. Vaccines.* *1*, 507-513.
62. Weinschenk,T., Gouttefangeas,C., Schirle,M., Obermayr,F., Walter,S., Schoor,O., Kurek,R., Loeser,W., Bichler,K.H., Wernet,D., Stevanovic,S., and Rammensee,H.G. (2002). Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* *62*, 5818-5827.

63. Rammensee,H.G., Weinschenk,T., Gouttefangeas,C., and Stevanovic,S. (2002). Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination. *Immunol. Rev.* 188, 164-176.
64. Cowling,R.T. and Birnboim,H.C. (1998). Preliminary characterization of the protein encoded by human testis-enhanced gene transcript (TEGT). *Mol. Membr. Biol.* 15, 177-187.
65. Huckelhoven,R. (2004). BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis.* 9, 299-307.
66. Chae,H.J., Ke,N., Kim,H.R., Chen,S., Godzik,A., Dickman,M., and Reed,J.C. (2003). Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* 323, 101-113.
67. Bailly-Maitre,B., Fondevila,C., Kaldas,F., Droin,N., Luciano,F., Ricci,J.E., Croxton,R., Krajewska,M., Zapata,J.M., Kupiec-Weglinski,J.W., Farmer,D., and Reed,J.C. (2006). Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 2809-2814.
68. Lee,G.H., Kim,H.K., Chae,S.W., Kim,D.S., Ha,K.C., Cuddy,M., Kress,C., Reed,J.C., Kim,H.R., and Chae,H.J. (2007). Bax inhibitor-1 regulates endoplasmic reticulum stress-associated reactive oxygen species and heme oxygenase-1 expression. *J. Biol. Chem.* 282, 21618-21628.
69. Kim,H.R., Lee,G.H., Ha,K.C., Ahn,T., Lee,B.J., Cho,S.G., Kim,S., Seo,Y.R., Shin,Y.J., Chae,S.W., Reed,J.C., and Chae,H.J. (2008). Bax inhibitor-1 (BI-1) is a pH-dependent regulator of Ca²⁺ channel activity in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*
70. Grzmil,M., Kaulfuss,S., Thelen,P., Hemmerlein,B., Schweyer,S., Obenauer,S., Kang,T.W., and Burfeind,P. (2006). Expression and functional analysis of Bax inhibitor-1 in human breast cancer cells. *J. Pathol.* 208, 340-349.
71. Grzmil,M., Thelen,P., Hemmerlein,B., Schweyer,S., Voigt,S., Mury,D., and Burfeind,P. (2003). Bax inhibitor-1 is overexpressed in prostate cancer and its specific down-regulation by RNA interference leads to cell death in human prostate carcinoma cells. *Am. J. Pathol.* 163, 543-552.
72. Schmits,R., Cochlovius,B., Treitz,G., Regitz,E., Ketter,R., Preuss,K.D., Romeike,B.F., and Pfreundschuh,M. (2002). Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas. *Int. J. Cancer* 98, 73-77.

73. Falk,K., Rotzschke,O., Stevanovic,S., Jung,G., and Rammensee,H.G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296.
74. Brown,J., Poles,A., Brown,C.J., Contreras,M., and Navarrete,C.V. (2000). HLA-A, -B and -DR antigen frequencies of the London Cord Blood Bank units differ from those found in established bone marrow donor registries. *Bone Marrow Transplant.* 25, 475-481.
75. Mater Medical Research Institute, Brisbane. www.mmri.mater.org.au. - . 17-4-2008. Ref Type: Electronic Citation
76. Cassaday,R.D., Sondel,P.M., King,D.M., Macklin,M.D., Gan,J., Warner,T.F., Zuleger,C.L., Bridges,A.J., Schalch,H.G., Kim,K.M., Hank,J.A., Mahvi,D.M., and Albertini,M.R. (2007). A phase I study of immunization using particle-mediated epidermal delivery of genes for gp100 and GM-CSF into uninvolved skin of melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 13, 540-549.
77. Fong,L., Brockstedt,D., Benike,C., Wu,L., and Engleman,E.G. (2001). Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J. Immunol.* 166, 4254-4259.
78. Wiernecky,J., Muller,M.R., Wirths,S., Halder-Oehler,E., Dorfel,D., Schmidt,S.M., Hantschel,M., Brugger,W., Schroder,S., Horger,M.S., Kanz,L., and Brossart,P. (2006). Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res.* 66, 5910-5918.
79. Jager,E., Jager,D., and Knuth,A. (2002). Clinical cancer vaccine trials. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 178-182.
80. Jager,E., Ringhoffer,M., Dienes,H.P., Arand,M., Karbach,J., Jager,D., Ilsemann,C., Hagedorn,M., Oesch,F., and Knuth,A. (1996). Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int. J. Cancer* 67, 54-62.
81. Hoos,A., Parmiani,G., Hege,K., Sznol,M., Loibner,H., Eggermont,A., Urba,W., Blumenstein,B., Sacks,N., Keilholz,U., and Nichol,G. (2007). A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics. *J. Immunother.* 30, 1-15.

9 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Peter Brossart sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Ich danke Frau Dr. Susanne Schmidt für die Einarbeitung in die Methoden, für ihre Beiträge zu meiner Arbeit und für die andauernde liebevolle Betreuung.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Frank Grünebach für die Erklärung und Bereitstellung von molekularbiologischen Methoden und Proben.

Ich danke den Damen vom Laborteam: Stefanie Held, Anita Bringmann, Karin von Schwarzenberg, Katharina Brauer und Daniela Dörfel für gelegentliche Aufmunterungen und geduldige Erklärungen.

Besonderer Dank gilt Frau Sylvia Stephan die mir stets in Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke und bin dankbar für meine Familie: Johanna, Karl-Heinz, Markus, Claudia und Sophie, die mir Liebe und bedingungslosen Rückhalt schenken.