

Das humane c-MYC Protein als Zielantigen für T-Zellen in einem Mausmodell für hoch maligne B-Zelllymphome

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Florian Helm

aus Eisenhüttenstadt

Jahr der Einreichung: 2013

Die Arbeit wurde von Januar 2008 bis Januar 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. med. Armin Gerbitz an der medizinischen Klinik III der Charité Universitätsklinikum Berlin (Campus Benjamin Franklin) und dem Institut für Immunologie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Blankenstein
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Armin Gerbitz

Disputation am 17.05.2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Summary	6
1. Einleitung	8
1.1. T-Zellen und T-Zelltherapie	8
1.1.1. T-Zelleigenschaften und Toleranz	8
1.1.2. Antigenpräsentation und TZR-p-MHC Interaktion	10
1.1.3. T-Zellen zur Behandlung von Malignomen.....	12
1.2. Das c-MYC Protein als Transkriptionsfaktor und Onkogen	16
1.2.1. MYC: Eigenschaften und Funktionen	16
1.2.2. Verlust der MYC Regulation ermöglicht Tumorbildung	18
1.2.3. Mausmodelle für verschiedene c-MYC induzierte Tumorarten und das Konzept der Onkogenabhängigkeit	20
1.2.4. c-MYC als Ziel der therapeutischen Intervention.....	21
1.2.5. Die λ -MYC Maus als B-Zelllymphommodell	23
1.3. Fragestellung	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Materialien	25
2.1.1. Geräte	25
2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3. Medien und Puffer	26
2.1.4. Zelllinien	27
2.1.5. Antikörper, <i>beads</i> und Multimere.....	28
2.1.6. Primer, CpG und Peptide	29
2.2. Epitopvorhersage und <i>in silico</i> Analysen.....	31
2.3. Mausstämme, -zucht und -typisierung.....	32
2.4. Mausexperimente	33
2.4.1. Immunisierung mit Protein- bzw. Peptidvakzinen	33
2.4.2. Tumorzelltransferexperimente	33
2.4.3. Blutabnahme und Lymphozytengewinnung	34
2.4.4. Zelldepletion mit monoklonalen Anti-CD25 Antikörpern	34
2.4.5. <i>in vivo kill</i> Assay	34

2.5. Zellkultur und <i>in vitro</i> Analysen.....	35
2.5.1. Gewinnung von T-Zellen aus Mäusen	35
2.5.2. Generierung von antigenpräsentierenden Zellen	35
2.5.3. Transfektion und Transduktion	36
2.5.4. ELISPOT.....	36
2.5.5. <i>in vitro</i> Restimulation	37
2.5.6. ELISA	37
2.5.7. <i>Cytometric Bead Array</i>	37
2.5.8. Durchflusszytometrische Analysen	38
2.6. Molekularbiologische Assays.....	40
2.6.1 Bakterien	40
2.6.2. Gewinnung von rekombinantem c-MYC Protein	40
2.6.3. Gewinnung von Plasmid-DNA und genomischer DNA	41
2.6.4. PCR Analysen	41
2.6.5. Western Blot.....	42
2.7. Statistische Analysen.....	43
3. Ergebnisse	44
3.1. T-Zell vermittelte Abstoßung für c-MYC getriebene B-Zelllymphome mit Hilfe von Modellantigenen	44
3.1.1. Sowohl OVA als auch GFP Expression ermöglichen Lymphomabstoßung	44
3.1.2. Lymphomabstoßung erfordert IFN γ	46
3.2. Humanes c-MYC als Zielantigen: Homologievergleich und Epitopvorhersage im H2 ^b MHC-Kontext	49
3.2.1. Humanes und murines c-MYC sind zu 90% homolog.....	49
3.2.2. Die Epitopvorhersage zeigt potentiell immunogene Epitope auf	50
3.3. Die Immunisierung mit humanem c-MYC Protein induziert eine T-Zellantwort in C57Bl/6 Mäusen	52
3.3.1. Spezifische IFN γ Sekretion nach c-MYC Immunisierung	52
3.3.2. Immunisierung mit c-MYC, CpG und IFA erzeugt eine T _H 1 Antwort	54
3.3.3. Sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen zeigen eine c-MYC spezifische Antwort	55
3.4. Identifizierung immunogener Epitope des humanen c-MYC Proteins im H2 ^b Kontext	57
3.4.1. NHP-A, NHP-B und NHP-E induzieren eine CD4 Antwort.....	57
3.4.2. Ausschließlich NHP-B induziert eine CD8+ T-Zellantwort	58

3.4.3. Nachweis NHP-B2 spezifischer CD8+ T-Zellen <i>in vivo</i>	59
3.4.4. NHP-B Immunisierung induziert Zytotoxizität im <i>in vivo kill</i> Assay	61
3.5. c-MYC als Zielantigen im c-MYC-getriebenen B-Zelllymphommodell der Maus	63
3.5.1. Immunisierung mit c-MYC Gesamtprotein führt nicht zur Lymphomabstoßung	63
3.5.2. NHP-B immunisierte Mäuse zeigen verzögertes Lymphomwachstum und Abstoßung in 25% der Fälle	64
3.5.3. Mäuse, die nach NHP-B Immunisierung Lymphomzellen abstoßen, weisen ein immunologisches Gedächtnis auf	66
3.5.4. Die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen nach Immunisierung beeinflusst das Lymphomwachstum	66
3.5.5. NHP-B spezifische T-Zellen vermitteln Anti-Tumoreffekte bei subkutanen und bei i.v. Lymphomzelltransfer.....	69
3.5.6. Adoptiver T-Zelltransfer aus NHP-B immunisierten Spendern verzögert das Lymphomwachstum	72
4. Diskussion	75
4.1. Kriterien und Überlegungen zur Wahl des T-Zellantigens	75
4.2. OVA als T-Zellantigen	76
4.3. Das immunogene Potential von c-MYC in der C57Bl/6 Maus	76
4.4. Einfluss des Immunisierungsprotokolls auf das Lymphomwachstum.....	77
4.5. Kritische Aspekte zu c-MYC als T-Zellantigen	79
4.6. c-MYC im Vergleich zu anderen Antigenen	81
5. Literaturverzeichnis	84
6. Abkürzungen	92
7. Danksagung	94
8. Anhang	95

Zusammenfassung

Die adoptive T-Zelltherapie hat in der Behandlung von virusinduzierten Tumoren, Melanomen und B-Zelllymphomen erste Erfolge erzielt. Die entscheidende Frage hierbei ist, welches Antigen als Ziel für die eingesetzten T-Zellen genutzt werden soll. Generell sind tumorspezifische Antigene zu bevorzugen. Sie bieten die Möglichkeit einer zielgerichteten T-Zellantwort gegen den Tumor und da es sich um Neoantigene handelt, enthält das T-Zellrezeptor (TZR)-Repertoire eventuell hoch affine TZR. Tumorspezifische Neoantigene sind durch Viren eingebrachte Proteine, durch chromosomale Translokation entstandene Fusionsproteine oder somatische Mutationen in den Tumorzellen, welche eine Änderung in der Aminosäuresequenz bewirken. Während für viele virale Antigene aufgrund ihrer hohen Immunogenität gute Chancen für eine erfolgreiche Behandlung mit T-Zellen bestehen, ist die Immunogenität von Fusionsproteinen und mutierten Selbstantigenen meist gering und von Patient zu Patient unterschiedlich.

Daher werden gegenwärtig tumorassoziierte Autoantigene als Zielantigene genutzt. Diese bieten den Vorteil, dass sie in vielen verschiedenen Tumoren vorkommen und sich so die Möglichkeit einer breiten Anwendung ergibt. Tumorassoziierte Antigene sind z.B. die *cancer testis* (CT) Antigene, Differenzierungsantigene oder im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimierte Gene. Der Nachteil tumorassoziierter Antigene ist einerseits die geringe Immunogenität, da es sich um Selbstantigene handelt, die der immunologischen Toleranz unterliegen, und andererseits - im Falle, dass die Toleranz gebrochen wird - das Risiko von Autoimmunität aufgrund der Expression der Antigene in normalem Gewebe.

Das humane c-MYC Protein wird in einer Vielzahl menschlicher Tumoren überexprimiert. Es ist zudem die treibende Kraft zum Fortschreiten des Tumorwachstums und c-MYC überexprimierende Tumoren sind von dessen andauernder Expression abhängig. Dies macht c-MYC zu einem sehr attraktiven therapeutischen Ziel in der Tumorforschung. c-MYC wird jedoch vermutlich in allen sich teilenden Zellen zumindest vorübergehend exprimiert, weswegen auch hier die Möglichkeit von Autoimmunität besteht.

Um das therapeutische Potential von c-MYC als Zielantigen abzuschätzen, müssen zunächst c-MYC spezifische T-Zellen identifiziert werden. Hierzu wurde in einem ersten Schritt die Immunogenität von humanen c-MYC im H2^b Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)- Kontext der Maus analysiert. Anschließend wurden verschiedene immunogene Bereiche identifiziert, welche eine T-Zellantwort induzieren. Die identifizierte CD8+ T-Zellantwort wurde mit Hilfe von Multimeren in Bezug auf Frequenz

und Induktion durch Immunisierung charakterisiert. Zudem wurde analysiert, ob murine Lymphomzellen, welche das humane c-MYC Protein überexprimieren und einen Progressorphänotyp in der C57Bl/6 Maus aufweisen, durch die c-MYC spezifischen T-Zellen abgestoßen werden können. 25% der Mäuse, die mit dem Peptid immunisiert wurden, welches das MHC I-Epitop enthielt, konnten das Lymphom abstoßen, während naive, mit irrelevantem Protein immunisierte oder mit MHC II-restringierten Epitopen immunisierte Mäuse eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit aufwiesen. Durch die Nutzung von CD25+ zelldepletierenden Antikörpern vor Immunisierung erhöhte sich die Überlebensrate auf 62%. Mäuse mit höherer Frequenz Epitop spezifischer T-Zellen nach Immunisierung hatten eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit nach Tumorzellinokulation. Zudem zeigte sich, dass Mäuse, deren c-MYC spezifische CD8+ T-Zellen eine höhere Avidität zum Peptid-MHC-Komplex gemessen durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aufwiesen, eher eine komplette Abstoßung erzielten als Mäuse mit T-Zellen von niedrigerer Avidität. Die durch die c-MYC spezifischen T-Zellen verursachten Anti-Tumoreffekte waren auch bei i.v. Injektion der Lymphomzellen und in einem adoptiven T-Zelltransfermodell nachweisbar.

Zusammengefasst zeigt sich, dass durch Peptidimmunisierung eine c-MYC spezifische T-Zellantwort induziert werden kann, die auch dem Wachstum von c-MYC überexprimierenden Lymphomzellen entgegenwirkt. Zukünftige Untersuchungen werden sich auf die Optimierung dieser T-Zellen, vor allem aber auch auf die möglichen Nebenwirkungen in Form von Autoimmunität und die Übertragung dieser Antwort in den humanen MHC-Kontext konzentrieren.

Summary

Adoptive T-cell therapy has shown promising results for the treatment of virally induced tumors, melanomas and B-cell lymphomas. The most important question is which antigen should be targeted by the T-cells. Tumor specific antigens are considered first choice. They provide the opportunity to target the tumor specifically without causing autoimmunity. Since they are neo antigens, the T-cell repertoire may contain T-cell receptors with high affinity. Viral proteins introduced by infection, fusion proteins originating from chromosomal translocation or somatic mutations that change the protein amino acid sequence are examples for tumor-specific antigens. Immunogenicity of viral proteins is in many cases high and allows successful treatment of virus-induced tumors with T-cells. In contrast, immunogenicity of fusion proteins and mutated self antigens is low and variable from patient to patient.

Therefore, tumor associated antigens are used in most cases for adoptive T-cell therapy. They have the advantage that they are expressed in different tumors, allowing treatment of different patients with T-cells of the same specificity. Examples for tumor associated antigens are the cancer testis antigens, differentiation antigens and over-expressed antigens. The disadvantage of targeting tumor associated antigens is on one side the low immunogenicity as they represent self antigens underlying immunological tolerance, and on the other side the possible risk of autoimmunity, that affects non-tumorous tissue expressing these antigens if the tolerance is broken.

The human c-MYC protein is expressed in many different tumors at high level. It is responsible for tumor growth and tumors are addicted to continuous c-MYC expression. Therefore, c-MYC is a very attractive therapeutic target for T-cell therapy. However, since c-MYC expression is also induced in dividing cells, c-MYC specific T-cells may cause autoimmunity.

To investigate their therapeutic potential, c-MYC specific T-cells have to be identified. As a first approach the immunogenicity of human c-MYC has been analyzed in C57Bl/6 mice. Different immunogenic regions of the protein have been identified, which induce a T-cell response. The CD8⁺ T-cell response has been characterized in terms of frequency and response to immunization with the help of multimers. Additionally murine B lymphoma cells overexpressing human c-MYC were inoculated into the flanks of immunized C57Bl/6 mice. Lymphoma rejection was achieved in 25% of mice immunized with the CD8 epitope containing peptide. Naïve mice or control-immunized mice did not reject the tumor. Rejection has neither been observed with mice that have been immunized with CD4 epitope containing peptides. When CD25⁺ cell depleting antibodies were administered prior to immunization with the CD8 epitope containing peptide, rejection rate increased to 62%. Mice with higher frequency of c-MYC epitope-specific CD8⁺ T-cells after immunization exhibited a higher probability of rejection upon tumor challenge. Also T-cell avidity was a critical factor for complete rejection. Anti-tumor effects caused by c-MYC specific T-cells were also observed after i.v. injection of lymphoma cells and in an adoptive T-cell transfer model.

In summary, c-MYC specific T-cells can be induced by immunization in C57Bl/6 mice. c-MYC specific T-cells inhibit the growth of c-MYC over-expressing lymphoma cells. The aim of future experiments is to optimize the efficacy of these T-cells, to investigate the possible risk of autoimmunity and to identify c-MYC specific T-cells with restriction to human MHC.

1. Einleitung

Die Einleitung gliedert sich in zwei zentrale Unterpunkte, die die theoretischen und praktischen Grundlagen für diese Arbeit schaffen, und schließt mit der Fragestellung des Projektes ab. Im ersten Kapitel werden die Eigenschaften von T-Zellen beschrieben und erläutert, wie diese Eigenschaften T-Zellen zur Behandlung von Krebserkrankungen qualifizieren. Im zweiten Abschnitt wird das c-MYC Protein vorgestellt. Neben den Eigenschaften und der transformierenden Wirkung von c-MYC wird die Frage, warum c-MYC als Zielantigen für T-Zellen genutzt werden sollte, erläutert. Anschließend wird das als Tumormodell verwendete murine B-Zelllymphom vorgestellt und die Vorarbeiten, die für diese Arbeit genutzt wurden.

1.1. T-Zellen und T-Zelltherapie

T-Zellen besitzen die Fähigkeit, in anderen Zellen exprimierte Antigene mit Hilfe der T-Zellrezeptoren zu erkennen und darauf - je nach Typ der T-Zelle - mit einem bestimmten Effektorprogramm zu antworten. Bestimmte T-Zellen sind in der Lage, andere Zellen abzutöten. In diesem Abschnitt sollen T-Zelleigenschaften und der Prozess der Antigenerkennung betrachtet. Die in den Kapiteln 1.1.1. und 1.1.2. wiedergegebenen Abläufe sind dem Lehrbuch „Janeway's Immunobiology 8th Edition“ [1] entnommen. In Abschnitt 1.1.3. wird beschrieben, wie T-Zellen genutzt werden können, um Tumorzellen abzutöten und welche Schwierigkeiten eine T-Zelltherapie begleiten.

1.1.1. T-Zelleigenschaften und Toleranz

T-Zellen sind hämatopoetische Zellen, deren Name sich aus der Abhängigkeit der Entwicklung dieser Zellen vom Thymus ableitet. Im Thymus erfolgt das Rearrangement der T-Zellrezeptorgene und die damit verbundene Ausbildung eines TZR sowie die sog. Positiv- und Negativselektion [1]. Das Merkmal, welches eine T-Zelle von anderen Zellen des Körpers unterscheidet, ist der TZR. Dieses Molekül ist ein Heterodimer, das in 95% der T-Zellen aus einer α - und β -Kette und in 5% der Zellen aus einer γ - und δ -Kette besteht [2]. Der TZR wird zu Beginn des Reifungsprozess der T-Zellen im Thymus gebildet. Er erscheint auf der Zelloberfläche als Komplex mit dem Oberflächenmolekül (CD, engl. für *cluster of differentiation*) CD3 (bestehend aus einer γ -, einer δ - und zwei ϵ -Ketten) und bindet zwei ζ -Ketten im zytoplasmatischen Bereich [2]. Das Besondere an diesem Rezeptor ist, dass er aus vielen verschiedenen

Gensegmenten zusammengesetzt wird, wobei diese Segmente in verschiedenen T-Zellen unterschiedlich rekombiniert werden können [1]. Dadurch hat jede reife T-Zelle einen TZR, der es ihr ermöglicht eine spezifische Struktur zu erkennen [3, 4]. Diese Struktur besteht aus einem MHC-Protein (MHC, engl. für *major histocompatibility complex*), an das ein Peptidbestandteil nicht kovalent gebunden ist [5-7]. Der Peptidbestandteil wird als Epitop bezeichnet und ist in der Regel Teil eines Proteins, welches wiederum als Antigen bezeichnet wird. Es ist möglich, dass ein TZR strukturell eng verwandte Epitope erkennen kann, auch wenn sie von unterschiedlichen Antigenen stammen. In diesem Fall spricht man von einer Kreuzreaktivität des TZRs [1]. Der Prozess der Antigenerkennung wird im Kapitel 1.1.2. erläutert.

Die Aufgabe von T-Zellen ist es, mit auf MHC-Molekülen präsentierten Epitopen zu interagieren und auf diese Epitoperkennung – je nach Typ der T-Zelle – mit einem bestimmten Effektorprogramm zu antworten, wie z.B. Zytokinsekretion im Fall der CD4+ T-Zellen oder Abtötung wie im Fall der zytotoxischen CD8+ T-Zellen [1]. Dabei sollen nur Zellen, welche Epitope aus Antigenen körperfremder Herkunft präsentieren, abgetötet werden, während Zellen, die Epitope von Antigenen körpereigener Herkunft präsentieren, nicht attackiert werden dürfen [8]. Um dies zu gewährleisten, sind die T-Zellen den Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz unterworfen.

Die zentrale Toleranz erfolgt als Negativselektion im Thymus. Nachdem die sich entwickelnden T-Zellen durch den Prozess der Positivselektion im Thymuskortex MHC restringiert sind [9], gelangen sie in die Medulla. Die dort ansässigen Epithelzellen der Medulla, dendritische Zellen und Makrophagen präsentieren den T-Zellen körpereigene Antigene. Hierbei werden die Thymozyten in die Apoptose getrieben, in denen ein starkes Signal nach Interaktion ihres TZRs mit den Peptid-MHC-Komplexen entsteht [10]. Hierbei werden in denjenigen T-Zellen Apoptose ausgelöst, in welchen ein starkes Signal nach Interaktion ihres TZRs mit den körpereigenen Peptid-MHC-Komplexen entsteht [10]. Das Ergebnis der T-Zellreifung im Thymus ist, dass CD4+ oder CD8+ T-Zellen, die einen spezifischen, MHC restringierten TZR exprimieren tolerant gegenüber allen körpereigenen Antigenen sein sollte. Es hat sich aber gezeigt, dass trotz Negativselektion T-Zellen mit Spezifität gegenüber körpereigenen Antigenen im Organismus zu finden sind [11, 12]. Als sozusagen zweite Sicherungsinstanz verhindert periphere Toleranz, dass diese autoreaktiven T-Zellen aktiv werden und Schaden anrichten können. Mechanismen der peripheren Toleranz umfassen die Induktion von Anergie oder die Deletion der reifen T-Zellen (wenn es zum Antigenkontakt ohne geeignete Kostimulation kommt) [13], Ignoranz (wenn das Antigen durch eine Barriere von den T-Zellen getrennt ist) [14] oder Unterdrückung der T-Zellantwort (durch z.B. regulatorische T-Zellen) [15].

1.1.2. Antigenpräsentation und TZR-p-MHC Interaktion

Die Aktivierung des TZRs ist ein sehr spezifischer Prozess, der die Ausbildung eines Komplexes bestehend aus TZR auf Seiten der T-Zelle und peptidbeladenem MHC-Molekül (TZR-p-MHC Komplex) auf Seiten der Zielzelle erfordert [3, 4]. Während die T-Zelle die genetische Information für einen TZR besitzt, können von den Zielzellen verschiedene MHC-Moleküle ausgebildet werden. Generell teilt man die MHC-Moleküle in zwei Klassen: MHC I und MHC II [1].

MHC I Moleküle sind aus einer polymorphen α -Kette und einer nicht kovalent gebundenen β -Kette, dem β_2 Mikroglobulin, aufgebaut. Für die α -Kette existieren drei verschiedene Gene in der Maus, welche auf Chromosom 17 positioniert sind. Dies sind H2-K, H2-D und H2-L. In der C57Bl/6 Maus gibt es hingegen nur zwei MHC I Moleküle. Dies sind H2-K^b und H2-D^b, da das H2-L^b Molekül nicht funktionell ist. Die α -Kette ist in drei Domänen unterteilt. $\alpha 1$ und $\alpha 2$ bilden die Peptidbindungsstelle aus, während $\alpha 3$ in der Zellmembran verankert ist und als Bindestelle für den CD8 Korezeptor dient [1].

MHC II Moleküle bestehen aus einer α - und β -Kette, welche beide aus zwei Domänen bestehen und in der Zellmembran verankert sind. Beide Ketten sind als Paare in der Maus auf Chromosom 17 kodiert, wobei zwei MHC II Moleküle vorkommen: H2-A und H2-E. In der C57Bl/6 Maus wiederum ist nur eines dieser Gene, H2-A^b, funktionell. Die von den MHC II Molekülen gebildete Peptidbindungsstelle zwischen der α - und β -Kette ist offener als die von MHC I Molekülen. Dadurch werden die präsentierten Peptide nicht umschlossen und sind in ihrer Länge nicht genau festgelegt, sondern können aus der Bindungsstelle herausragen. Die Länge für MHC II Peptidliganden beträgt mindestens 13 Aminosäuren (AS) oder mehr [1].

Während MHC I Moleküle von allen kernhaltigen Zellen gebildet werden, werden MHC II Moleküle konstitutiv vor allem von DCs, Makrophagen, B-Zellen, den Thymusepithelzellen und einigen weiteren Epithelzellen exprimiert. Allerdings können MHC II Moleküle auch in anderen Zellen durch inflammatorische Zytokine wie IFN γ induziert werden [1].

Die Wahrscheinlichkeit, dass bestimmte Peptide von den MHC-Molekülen gebunden werden, hängt von der Affinität von Peptid und MHC-Molekül ab [16, 17]. Die Affinität gilt als Maß für die Bindungsstärke zwischen zwei Bindungspartnern. Sie kann mit der Dissoziationskonstante K_d angegeben werden, wobei eine hohe Affinität hier einer geringen K_d entspricht. Die Bindungsstärke von MHC-Molekül und Peptid ist umso stärker, je mehr die Aminosäuresequenz des Peptids der Konsensussequenz für das spezifische MHC Molekül entspricht [16]. Ausgehend von experimentell ermittelten MHC Liganden können mögliche

Bindungspartner über eine Gewichtungsmatrix der AS der jeweiligen Position des Kandidatenpeptids *in silico* ermittelt werden [18]. Neben der Affinität von Peptid zu MHC beeinflussen weitere Faktoren, wie die Proteinspaltung durch das Proteasom, der Transport von Peptiden aus dem Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum (ER) durch den TAP-Transporter oder die Peptidprozessierung im ER, ob ein Protein Epitope enthält, welche durch die MHC-Moleküle präsentiert werden [1, 19]. Da in der Zelle verschiedene Proteine existieren, besteht eine Konkurrenz der Epitope um die Bindungsstellen in den MHC-Molekülen. Die Frage was ein Peptid immunogen macht, ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise, dass die Stabilität des Peptid-MHC Komplexes wichtiger ist als die Affinität des Peptids zum MHC [20].

Die Bindungsstärke eines TZR zu seinem spezifischen Peptid-MHC Ligand wird durch die Affinität beschrieben. Betrachtet man die T-Zelle als Ganzes, also alle Rezeptoren, spricht man von der Avidität. In Kombination mit der Zielzelle ergibt sich die funktionelle Avidität. Generell ist die TZR-p-MHC Affinität für die Aktivierung der T-Zelle und z.B. für eine effektive Anti-Tumor Aktivität entscheidend [21, 22]. Da im autologen Organismus die T-Zellen mit hoch affinen TZRs für tumorassoziierte Antigene im Verlaufe der negativen Selektion im Thymus eliminiert wurden, wird versucht hoch affine TZRs durch Mutationen in der TZR Sequenz [23], allogene Kultivierungsansätze [24] oder durch Immunisierung von xenogenen Organismen [25] zu generieren. Allerdings gibt es auch Hinweise, dass eine Art Affinitätsschwelle existiert, über die hinaus die T-Zellfunktion nicht zunimmt sondern eher nachlässt [26] oder sogar zum Verschwinden der hoch affinen CD8+ T-Zellen führen kann [27].

Obwohl die Antigenpräsentation ein sehr komplexer Prozess ist, folgt sie doch einem festen Ablauf, der bestimmten Regeln wie z.B. der Spaltung des Antigens durch das Proteasom, dem Transport der Spaltprodukte durch den TAP-Transporter in das ER oder der Bindungswahrscheinlichkeit der Peptide an das MHC-Molekül aufgrund ihrer Affinität unterworfen ist [1]. Unter Beachtung dieser Regeln ist es Epitopvorhersageprogrammen möglich, Vorhersagen über die Wahrscheinlichkeit der Präsentation von Epitopen innerhalb eines Proteins durch die MHC-Moleküle zu machen [28-31]. Allerdings sind diese Vorhersagen zum jetzigen Zeitpunkt unter Berücksichtigung der Komplexität der Antigenpräsentation eher eine Orientierung als eine sichere Voraussage.

1.1.3. T-Zellen zur Behandlung von Malignomen

Aktivierte T-Zellen können bei Kontakt mit einer Zelle, welche das spezifische Antigen präsentiert, je nach T-Zelltyp diese direkt abtöten oder durch Zytokinsekretion diese Zelle und das umliegende Gewebe beeinflussen. Diese Fähigkeiten sind sehr effektiv, um Viruserkrankungen zurückzudrängen und eine systemische Infektion zu kontrollieren, da T-Zellen beinahe jeden Ort im Körper erreichen und ihre Zielzellen aufgrund der Antigenpräsentation individuell erkennen können. Deshalb wurde in den vergangenen Jahren begonnen T-Zellen gegen Tumorzellen zu richten und so eine neue vielversprechende Form der Therapie zu schaffen: die adoptive T-Zelltherapie. Generell hat sich in der T-Zelltherapie gezeigt, dass bei verschiedenen Tumorerkrankungen die Behandlungserfolge unterschiedlich ausfallen. So ist die Erfolgswahrscheinlichkeit der T-Zelltherapie für virusinduzierte Tumoren am größten, gefolgt von malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, während solide Tumoren die zur Zeit größte Herausforderung darstellen.

Dass T-Zellen in der Lage sind, virusinduzierte Leukämien in der Maus zu heilen, wurde Ende der 70er Jahre gezeigt [32]. Eine bei Stammzelltransplantationen auftretende Komplikation ist die Virusreaktivierung in den immunsupprimierten Rezipienten. Häufig kann dies eine latente Epstein-Barr-Virus (EBV) Infektion sein, die dann als Folge der Reaktivierung eine sogenannte lymphoproliferative Krankheit in Form eines B-Zelllymphoms auslöst. Für diesen virusinduzierten Tumor konnten EBV spezifische T-Zellen erfolgreich zur Behandlung eingesetzt werden [33, 34]. Diese Zellen sind in gesunden EBV infizierten Patienten vorhanden und unterdrücken erfolgreich eine Reaktivierung. Durch Entnahme von Blut des Knochenmarkspenders oder des Patienten vor dessen Konditionierung können diese Zellen in einem Pool mit anderen T-Zellen entnommen, *in vitro* mit EBV-Epitopen stimuliert und expandiert und bei Bedarf den Patienten adoptiv transferiert werden. Virusspezifische T-Zellen konnten auch für weitere viral induzierte Tumoren oder Erkrankungen erfolgreich eingesetzt werden [35].

Nicht viral induzierte Tumoren enthalten in der Regel Mutationen, durch die mögliche Neoepitope entstehen können. Sie können diese Tumoren zu immunogenen Zielen für T-Zellen machen. Das Auftreten von Neoepitopen in Abwesenheit von aktivierten antigenpräsentierende Zellen (APCs) führt aber zu einer Toleranzinduktion, da die zur T-Zellaktivierung nötige Kostimulation fehlt und eine TZR Stimulation allein Anergie oder Deletion bewirkt [36].

Ein Beispiel für einen nicht viralen hämatologischen Tumor, der durch adoptive T-Zelltherapie geheilt werden kann, ist die Chronisch Myeloische Leukämie (CML). In den 70er Jahren wurde die allogene Stammzelltransplantation genutzt, um CML-Patienten mit einer hoch dosierten Chemotherapie

behandeln zu können [37]. Das Auftreten der *graft vs. host disease* (GvHD) führte zur Identifizierung von T-Zellen als deren Verursacher und zur Nutzung von T-Zell depletierten Stammzelltransplantaten in den 80er Jahren [37]. Diese Behandlung erzeugte keine GvHD aber es bildeten sich vermehrt Rezidive, was T-Zellen als Verursacher des *graft vs. leukemia* (GvL) Effekts identifizierte. Heute werden RIC (engl. für *reduced intensity conditioning*) Transplantationsprotokolle verwendet, welche eine reduzierte Intensität bei der Konditionierung des Patienten mit Chemotherapie vorsehen und die T-Zellen als wichtigsten Wirkmechanismus gegen die Leukämie nutzen. Eine Entkopplung des GvH vom GvL Effekt ist bisher nicht möglich und deshalb beinhaltet die allogene Stammzelltransplantation auch immer das Risiko einer Alloimmunität mit der klinischen Symptomatik der GvHD.

Die Nutzung von T-Zellen zur Behandlung und Heilung von malignen Melanomen geht zurück in die 80er Jahre. Hierbei wurden erstmals tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) in Kombination mit IL2 und Cyclophosphamid in der Maus eingesetzt [38]. Diese TILs wurden aus isolierten Metastasen gewonnen, welche *in vitro* mit Hilfe von IL2 kultiviert und expandiert wurden. Durch diese *in vitro* Kultur konnte, auf den Mensch übertragen, die Frequenz der tumorreaktiven T-Zellen erhöht werden, was eine verbesserte Tumorregressionsrate (49%) bei den lymphodepletierten Patienten im Vergleich zu Behandlung mit IL2 allein (12% bis 15%) bewirkte [39]. Die Kombination von Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung erhöhte die Effektivität des adoptiven T-Zelltransfers für das maligne Melanom bei 2 Gray (52%) und 12 Gray (72%) und zeigt, dass viele Faktoren den Erfolg dieser Art von Therapie beeinflussen [39]. Mit der Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen wie Melan A [40] bzw. MART-1 [41] wurde diese Art der Therapie antigenspezifisch. Es konnte gezeigt werden, dass der Gentransfer eines TZR für ein tumorassoziiertes Antigen die Spezifität und Reaktivität auf andere T-Zellen übertragen kann [42].

Um antigenspezifische T-Zellen in kurzer Zeit zu generieren, wird der TZR Gentransfer verwendet [43]. In einer ersten Studie wurden T-Zellen des peripheren Blutes von Melanompatienten mit einem TZR transduziert, welcher spezifisch für das MART-1 Antigen ist [44]. Dieses Antigen wird sowohl von den Tumorzellen als auch von den Pigmentzellen des Körpers exprimiert. Bei 16% der Patienten konnte nach Lymphodepletion und Transfer dieser genmodifizierten T-Zellen, komplementiert durch IL2 Gabe, eine Regression des Tumors erreicht werden, was dem Resultat einer Behandlung mit IL2 allein gleicht. Eine spätere Studie, welche einen anderen MART-1 spezifischen TZR nutzte, erzielte eine Regressionsrate von 30%, wobei die Patienten auch in dieser Studie einer Lymphodepletion, dem T-Zelltransfer und hoch dosierter IL2 Gabe unterzogen wurden [45]. Die Unterschiede der Regressionsraten bei Transfer der *ex vivo* kultivierten, mit den TZR transduzierten T-Zellen sind sicherlich mit der Vielzahl der Antigene im *in vitro* Kultivierungsansatz zu nur einer Antigenpezifität mit den MART-1 spezifischen T-Zellen erklärbar.

Zudem erzeugten die MART-1 spezifischen Zellen Autoimmunreaktionen, welche sich durch Vitiligo, vorübergehenden Hörverlust und Uveitis äußerten [45]. Die Nutzung des CT-Antigens NY-ESO-1 als Zielantigen hingegen bewirkte eine Tumorregression in fünf von elf behandelten Melanompatienten ohne auftretende Nebenwirkungen in anderen Geweben [46]. Die möglichen Nebenwirkungen müssen bei jedem tumorassoziierten Antigen individuell betrachtet werden und ein möglicher Anti-Tumor Effekt diesen entgegengestellt und abgewogen werden.

Die Wahl von CD19 als Zielantigen für T-Zellen, welche mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR) genetisch modifiziert wurden, hat gezeigt wie erfolgreich solch ein Ansatz für B-Zelllymphome sein kann, wenn man in Kauf nimmt, dass das gesamte B-Zellkompartiment deletiert wird [47, 48]. Der in dieser Studie verwendete CD19 spezifische CAR setzt sich aus einem variablen Teil eines CD19 spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb) zusammen, der über eine Gelenkregion mit Teilen des CD137 Moleküls und einer CD3 ζ -Kette verbunden ist [49]. Die so genmodifizierten T-Zellen expandierten nach Transfer in mit Chemotherapie konditionierte CLL Patienten um mehr als das Tausendfache. Die zuvor Chemotherapie resistenten Lymphome wurden in zwei Fällen in komplette Regression gezwungen und im dritten Fall, welcher aufgrund schwerer Nebenwirkungen mit Kortikosteroiden behandelt werden musste, konnte eine partielle Regression beobachtet werden [48].

Obwohl eine Tumorregression bei etlichen behandelten Patienten mit Melan-A oder NY-ESO-1 spezifischen T-Zellen erfolgt, tritt dies nicht bei allen behandelten Patienten auf. Zudem sind häufig Rezidive nach anfänglicher Regression zu beobachten, obwohl die antigenspezifischen T-Zellen nachweisbar sind [50]. Die rezidierten Tumoren weisen einen Verlust des Zielantigens der für die Therapie benutzten T-Zellen auf und werden als Antigenverlustvarianten bezeichnet. Dies veranschaulicht, dass die Faktoren, welche eine erfolgreiche T-Zelltherapie bedingen, nicht vollständig kontrolliert sind. Allgemein sind Tumoren genetisch instabil und es treten Resistenzen gegen das Tumortherapeutikum auf, wie am Beispiel eines Tyrosinkinaseinhibitors beobachtbar ist [51]. Die adoptive T-Zelltherapie hat das Potential resistente Tumorzellen bzw. Antigenverlustvarianten erfolgreich zu behandeln. Dies kann durch sogenanntes *bystander killing* erfolgen, wodurch die Antigenverlustvarianten in der Nähe der antigenpositiven Zellen eliminiert werden [52, 53] oder durch die gezielte Wahl des für das Tumorwachstum verantwortlichen Onkogens als Zielstruktur der T-Zellen [54].

Neben den Tumorzellen als direktem Ziel von T-Zellen wurde erkannt, dass das Tumorstroma ein wichtiges Ziel zur erfolgreichen Eliminierung des Tumors darstellt [55-57]. Der Begriff Stroma (Bett)

umfasst neben dem Bindegewebe im Tumor auch Blutgefäße und hämatopoetische Zellen wie Makrophagen. Durch die Zerstörung des Tumorstromas wird unter anderem das vaskuläre System im Tumor zerstört und somit seine Versorgung unterbrochen [56]. Sowohl die Konditionierung des Patienten durch Bestrahlung und Chemotherapie als auch die Zerstörung des immunsupprimierenden Tumormilieus, welches von Tumor und Stroma gemeinsam gebildet wird, haben maßgeblichen Einfluss auf den Erfolg einer T-Zelltherapie [58, 59].

Als wohl wichtigster Faktor für einen erfolgreichen adoptiven T-Zelltransfer ist vor allem die Wahl des Zielantigens zu betrachten [59-61]. Idealerweise ist dies ein zum MHC hoch affines und zugleich tumorspezifisches Epitop, welches eine vitale Funktion für den Tumor ausübt. Da solche „Wunschantigene“ bei den Tumorpatienten selten vorkommen und sich von Patient zu Patient unterscheiden können, muss zurzeit zwischen tumorassoziierten Antigenen gewählt werden.

Das c-MYC Protein wird, wie im folgenden Abschnitt erklärt, in diversen Tumoren als treibende Kraft des Tumorwachstums gebildet. Ein Verlust der c-MYC Aktivität kann von den Tumoren nicht toleriert werden [62, 63]. Deshalb soll die Eignung von c-MYC als Zielantigen für T-Zellen in dieser Arbeit untersucht werden.

1.2. Das c-MYC Protein als Transkriptionsfaktor und Onkogen

Das c-MYC Protein steht seit Jahren im Fokus der zellbiologischen Forschung und es sind zahlreiche Publikationen über dessen Funktion in gesunden und in transformierten Zellen in den letzten drei Dekaden erschienen. In diesem Abschnitt soll erläutert werden, welche Funktionen c-MYC ausübt und wie es durch Verlust der Regulation zum Tumorwachstum beiträgt. Es soll verdeutlicht werden, welche vitale Funktion c-MYC für den Tumor besitzt und welches großes Potential eine gezielte c-MYC Therapie enthält. Die dazu genutzten Informationen wurden diversen Publikationen [64-67] entnommen. Das für diese Arbeit verwendete Mausmodell soll mit den zugehörigen Vorarbeiten vorgestellt werden.

1.2.1. MYC: Eigenschaften und Funktionen

Das *myc* Gen wurde 1979 aus einem Geflügelretrovirus isoliert [68]. Dieses Virus (*avian acute leukemia virus*, MC29) besitzt die Fähigkeit Sarkome, Karzinome und vor allem Leukämien zu induzieren, woraus sich der Name *v-myc* (*v*: viraler Ursprung; *myc*: Kurzform für *myelocytomatosis*, engl. für myeloische Leukämie) ableitet. Das im Menschen vorkommende, evolutionär konservierte Homolog wurde 1982 entdeckt und *c-myc* genannt [69]. Es ist auf Chromosom 8q24.21 kodiert. Wie sich herausstellte, ist *c-myc* Bestandteil einer Genfamilie, die desweiteren *mycn* (in Neuroblastomen amplifiziert vorkommend) und *mycl* (in kleinzelligen Lungenkarzinomen amplifiziert vorkommend) umfasst [70]. Die *myc* Gene enthalten die Sequenzinformationen für kurzlebige Phosphoproteine, welche im Zellkern wirken und eine Halbwertszeit von 20-30 Minuten aufweisen. Der Abbau erfolgt über Ubiquitinierung und Spaltung durch das Proteasom [71]. Das im Menschen vorkommende *c-myc* Gen kodiert für zwei Isoformen, MYC-1 und MYC-2, welche sich durch die Startpunkte der Transkription, ihre Expressionsmuster und ihre biologische Aktivität unterscheiden [72]. Während MYC-1 von einem kryptischen CTG-Startcodon am Ende des ersten Exon translatiert wird, erfolgt die Transkriptionsinitiation von MYC-2 von einem ATG-Startcodon im zweiten Exon. Dementsprechend unterscheiden sich beide Isoformen im Molekulargewicht. Während man bei MYC-1 von p67 spricht, wird MYC-2 mit p64 bezeichnet, womit die Molekulargewichte der jeweiligen Proteine in kDa angegeben werden [72].

MYC wird als basisches „*Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper*“ (HLHZip) Protein bezeichnet, welches Heterodimere mit dem kleinen, basischen HLHZip Protein MAX ausbilden kann. Die basische Region dieser Heterodimere ermöglicht die Bindung an DNA-Sequenzen, welche ein E-Box Motiv (CACGTG) enthalten. Durch die Bildung von MYC-MAX-Heterodimeren kann die Transkription von DNA-Sequenzen

initiiert werden, welche eine sog. E-Box enthalten. Durch Interaktion von MYC mit anderen Proteinen wie dem Transaktivierung/Transformation-assoziierten Protein oder Histonacetyltransferasen reguliert MYC eine Reihe von unterschiedlichen Prozessen, darunter Zellzyklus, Wachstum, Metabolismus, Apoptose, Transformation, genomische Instabilität und Angiogenese [65, 73].

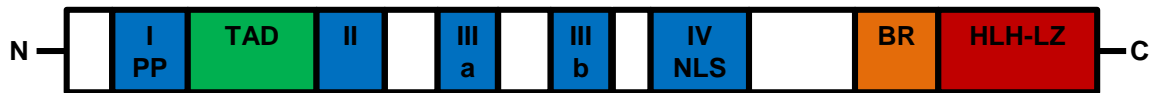


Abb. 1.1.: Schematischer Aufbau des c-MYC Proteins

Die wichtigsten Regionen des c-MYC Proteins sind schematisch vom N- zum C-Terminus dargestellt (I-IV: Homologieboxen, TAD: Transaktivierungsdomäne, BR: basische Region, HLH-LZ: Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper, PP: Phosphorylierungsstellen, NLS: nukleares Lokalisierungssignal). Abbildung modifiziert nach [65].

Der Aufbau des MYC-2 Proteins, nachfolgend als c-MYC bezeichnet, ist schematisch in Abbildung 1.1. dargestellt. c-MYC enthält mehrere evolutionär konservierte Homologieboxen, die die AS 44-63 (Box I), 128-143 (Box II), 188-199 (Box IIIa), 259-270 (Box IIIb) und 304-324 (Box IV) umfassen. Box I enthält zwei Phosphorylierungsstellen (PP) in Position 58 (Threonin) und 62 (Serin), welche die Stabilität und den Abbau von c-MYC regulieren [65]. Box IV enthält das Kernlokalisierungssignal (NLS) in den AS 320-328. Die Transaktivierungsdomäne (TAD) umfasst die AS 1 bis 143 und vermittelt die Aktivierung der Transkription an heterologen DNA Bindestellen. Nahe des C-Terminus befinden sich die basische Region (BR, AS 355-369) und die HLHZip-Domäne (HLH-LZ, AS 370- 439) [65].

In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor reguliert c-MYC eine Vielzahl von Genen. Eine Übersicht bietet die Datenbank <http://www.myc-cancer-gene.org/site/mycTargetDB.asp>. Etliche dieser Gene bewirken ein Fortschreiten im Zellzyklus und sind selbst Onkogene, wie an folgenden Beispielen dargestellt wird. Das Enzym Ornithin Decarboxylase ist essentiell für das Voranschreiten des Zellzyklus in die S-Phase. Seine Überexpression resultiert in der Transformation von Mausfibroblasten [74]. Das Enzym Carbamoylphosphat Dihydroorotase wird für die *de novo* Synthese von Pyrimidinen benötigt und sorgt für ein Voranschreiten von der G1- in die S-Phase [75]. Das Gen für die katalytische Untereinheit der Telomerase enthält E-Box Motive und wird so in seiner Aktivität durch c-MYC beeinflusst [76]. Der Zellzyklusregulator Cdk4 besitzt vier konservierte MYC Bindestellen in seinem Promotor und ist ein direktes Zielgen für c-MYC [77]. Ein Tumorsuppressorgen, das durch c-MYC aktiviert wird, ist p53. Diese Aktivierung könnte einen Sicherheitsmechanismus darstellen, der eine Tumortransformation durch die Einleitung der Apoptose in MYC überexprimierenden Zellen verhindern soll [78]. Deshalb weisen c-MYC überexprimierende Tumoren meist einen Defekt im p53 Protein auf oder haben eine erhöhte Aktivität von anti-apoptotischen Proteinen wie BCL-2.

Da c-MYC die Expression von vielen Genen beeinflusst, wird dessen Aktivität genau reguliert. Eine erhöhte c-MYC Aktivität ergibt sich aus dem Verlust dieser Regulierung und führt zur Tumorbildung.

1.2.2. Verlust der MYC Regulation ermöglicht Tumorbildung

In ruhenden Zellen sind *myc* mRNA und MYC Protein praktisch nicht nachweisbar. Eine Stimulation mit Serum induziert einen schnellen Anstieg von MYC, dem ein relativ langsamer Abbau vor dem Einsetzen der S-Phase folgt [70]. In sich ständig teilenden Zellen wird die Menge des MYC Proteins auf einer konstanten Menge gehalten. Die Menge und Aktivität des MYC Proteins wird in den meisten Zellen auf vielen verschiedenen Ebenen reguliert, wie z.B. Transkription, Stabilität der mRNA, Translation, Stabilität und Aktivität des Proteins, und Interaktion mit anderen Proteinen.

Die RNA-Menge wird durch Signalkaskaden reguliert, welche unter anderem zur MYC Transkription führen. Die wichtigsten Signalwege sind der *Sonic hedgehog*-, *Wnt*-, *Notch*-, *receptor tyrosine kinase signaling*- und TGF β -Signalweg [64]. Während andere Protoonkogene ihre onkogene Wirkung meist durch Mutationen im Protein erhalten, ist dies für MYC größtenteils nicht der Fall. Für MYC wurden Anfang der 80er Jahre drei neue Mechanismen aufgezeigt, durch die die MYC Expression ihrer Kontrolle entzogen wurde und dadurch eine transformierende Wirkung entfaltetete [65].

Der erste Mechanismus, die Insertionsmutagenese, wird z.B. durch Retroviren ausgelöst [79, 80]. Diese integrieren ihre Erbinformation in das Zellgenom nahe dem MYC Locus und verstärken die MYC Expression dramatisch durch die Wirkung ihrer *enhancer*-Elemente. Außerdem kann die Insertion eines Retrovirus zu einer direkten Transkription durch den Viruspromotor in der 3'LTR führen, falls sich das *myc* Gen in Lese- und 3'Richtung der viralen Insertion befindet.

Der zweite Mechanismus, die Kontrolle der MYC Regulation zu verlieren, ist die chromosomale Translokation [81, 82]. Dies beinhaltet einen reziproken Austausch von Chromosomenarmen, wodurch das *myc* Gen auf Chromosom 8 mit einem anderen Chromosom fusioniert wird und unter die Kontrolle eines anderen Gens gerät. Die Kontrollelemente des neu translozierten Chromosomenarms verändern die Expressionsregulation des *myc* Gens und bewirken so eine Überexpression. Das klassische Beispiel für die chromosomale Translokation ist das Burkitt-Lymphom, bei dem eine Translokation der Gene der Immunglobulin (Ig)-ketten auf Chromosom 2, 14 oder 22 mit Chromosom 8 erfolgt [83].

Der dritte aufgezeigte Mechanismus ist die Genamplifikation. Hier finden sich mehrere Kopien des *myc* Gens im Genom. Dies wurde in Kolonkarzinomen [84], akut myeloischen Leukämien [85, 86] und Neuroblastomen [87, 88] nachgewiesen.

Auf der Ebene der posttranskriptionellen Kontrolle erfolgt die Regulierung der MYC Aktivität durch Phosphorylierung der AS Threonin an Position 58 (T58) und Serin an Position 62 (S62) [89]. Durch Phosphorylierung von S62 erhöht sich die Stabilität von MYC, während die Phosphorylierung von T58 Ubiquitinierung und Abbau durch den SCF^{Fbw7} Komplex einleitet. Punktmutationen an beiden Stellen wurden sowohl in Burkitt-Lymphomen als auch anderen Lymphomen [90] beobachtet, wodurch die Stabilität des MYC Proteins erhöht wurde. In soliden Tumoren wurden diese Mutationen bisher nicht beobachtet, obwohl auch dort eine erhöhte MYC Stabilität beobachtet wurde. Diese Stabilität wird z.B. in vielen Kolonkarzinomen durch den Verlust des Tumorsuppressorgens *Fbw7* ermöglicht. Dieses wirkt als Ubiquitin Ligase und sorgt durch die Ubiquitinierung von c-MYC für dessen nachfolgenden Abbau durch das Proteasom [91]. Ein anderer Weg der Stabilisierung des MYC Proteins besteht in der Überexpression von USP28, wie es in Brust- und Kolonkarzinomen beobachtet wurde [92]. USP28 wirkt als Antagonist zu Fbw7 und nimmt eine Deubiquitinierung von MYC vor. Desweiteren wurden Mutationen des Proteins Axin1 in verschiedenen Tumoren entdeckt [93]. Axin1 ist ein Faltungsprotein (Chaperon), das die Interaktion von c-MYC mit der Glykogen Synthese Kinase 3b (GSK3b), Protein Phosphatase 2A (PP2A) und der Prolyl-Isomerase Pin1 vermittelt, welche zur Ubiquitinierung und zum Abbau des c-MYC Proteins führen. In Kopf-, Hals- und Kolon-Karzinomen wurde die Überexpression des CIP2A (engl. *cancerous inhibitor of PP2A*; krebserregender Inhibitor von PP2A) Proteins entdeckt [94]. Dieses Onkoprotein vermittelt die Stabilisierung von c-MYC durch Inhibierung der PP2A vermittelten Dephosphorylierung von S62. Neben Fbw7 sind zwei weitere Ubiquitin Ligasen an der Regulierung des MYC Abbaus und der MYC Aktivität beteiligt. Das Protein Skp2 vermittelt sowohl transkriptionelle Aktivität als auch den Abbau von c-MYC [95], während das Protein Hect H9 nur die transkriptionelle Aktivität von c-MYC verstärkt und essentiell für die Tumorpheriferation ist [96]. Die Expression von MYC wird z.B. durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt Signaltransduktionsweg induziert [97]. Durch die Bindung von Insulin oder den Insulin ähnlichen Wachstumsfaktoren an den jeweiligen Rezeptor, wird eine Phosphorylierung von GSK3b ausgelöst [97]. Diese ermöglicht sowohl die Induktion der c-MYC Expression durch β -Catenin im Wnt-Signalweg als auch eine Erhöhung der MYC Stabilität, wobei phosphorylierte GSK3b selbst keine Phosphorylierung von T58 am c-MYC Protein vornehmen kann. Generell sind Proteine, welche den PI3K/Akt Signalweg beeinflussen, wie z.B. Ras, in zahlreichen

humanen Tumoren mutiert, sodass sie die GSK-3b Aktivität inhibieren und dadurch MYC stabilisieren [98].

Diese Beispiele veranschaulichen, in wie vielen verschiedenen Tumorarten MYC dereguliert ist. Die Ursachen für die Deregulation sind zahlreich, enden aber alle in erhöhter MYC Aktivität. Bei Brustkrebspatienten verschlechtert eine erhöhte MYC Aktivität die Überlebensprognose [99]. Es gibt auch Vermutungen, dass MYC in allen Tumoren dereguliert ist, z.T. in späteren, aggressiven Stadien [100]. Interessant sind die dazu gewonnenen Erkenntnisse in transgenen Mausmodellen, in denen die MYC Aktivität ektopisch reguliert werden konnte. Diese werden im folgenden Kapitel erläutert.

1.2.3. Mausmodelle für verschiedene c-MYC induzierte Tumorarten und das Konzept der Onkogenabhängigkeit

Die erste MYC transgene Maus, die E μ -MYC Maus [101], wurde 1985 publiziert. Für diese Maus wurde ein Expressionskonstrukt entwickelt, welches einen Bereich des *enhancer* der schweren Immunglobulinkette μ *upstream* der drei kodierenden Exons des murinen c-MYC enthält. Dieses Konstrukt spiegelt die t(8;14) Translokation mit Koloaliation von regulatorischen Elementen des Immunglobulin Schwereketten-Locus und c-MYC wieder. Dies ist die häufigste Translokation im Burkitt-Lymphom. Spontane Tumoren in dieser transgenen Maus sind ausschließlich B-Zelllymphome, obwohl der μ -Enhancer auch in T-Zellen und anderen Zellen hämatopoetischen Ursprungs aktiv sein kann. Alle Lymphome weisen einen monoklonalen Ursprung auf.

Weitere Modelle für die durch chromosomale Translokation entstehende Überexpression von c-MYC sind die EnMYC [102], die E κ -MYC [103] und die in dieser Arbeit verwendete λ -MYC Maus [104], die in einem späteren Abschnitt (1.2.5.) genauer erläutert wird. Interessanterweise wird in der EnMYC und der λ -MYC Maus ein humanes c-MYC überexprimiert, welches zur Lymphombildung führt.

Die deregulierte Expression von c-MYC wird desweiteren in Modellen für Brustadenokarzinome [105], Prostatakarzinome [106], Lungenkarzinome [107] und Gliome [108] dargestellt und demonstriert den malignen Effekt von dereguliertem c-MYC in den verschiedensten Geweben.

Homozygote c-MYC Mutanten sind nicht lebensfähig. Die Embryonen sterben am Tag 10 der Embryonalentwicklung ab [109]. Die Nutzung von regulierbaren c-MYC Expressionssystemen ermöglichte es, die Bedeutung von c-MYC für den Tumor in T- und B-Zelllymphomen [63], Osteosarkomen [110],

Brustadenokarzinomen [111], Leberkarzinomen [112], Pankreaskarzinomen [113] und Papillomen [114, 115] zu demonstrieren. In allen Systemen erfolgte eine Regression des Tumors bedingt durch einen Verlust oder die Reduktion der c-MYC Expression. Die Ursachen für diese Regressionen waren direkte Apoptose oder die Ausdifferenzierung der Tumorzellen [63, 110-115]. Auch in verschiedenen anderen transgenen Modellen, wie z.B. im β -Catenin abhängigen Kolonkarzinom [116] und dem Ras abhängigen Lungenkarzinom [62] der Maus, zeigte sich eine Abhängigkeit des jeweiligen Tumors von c-MYC.

Daraus lässt sich eine Abhängigkeit des Tumors von der fortlaufenden Aktivität von Onkogenen wie c-MYC ableiten [117]. Dieser Prozess wird als „*Oncogene Addiction*“ oder Onkogenabhängigkeit bezeichnet. Für die Menge der c-MYC Aktivität scheint es eine kritische Schwelle zu geben, die, wenn sie unterschritten wird, zum Absterben der Tumorzellen führt [118].

Die Regression bei Inaktivierung von c-MYC war nicht in allen Fällen vollständig und es zeigten sich durchaus auch Rezidive [119]. Interessanterweise waren auch die rezidierten Tumoren, die nach der Abschaltung der c-MYC Expression auftraten, weiterhin von c-MYC abhängig. Es entwickelten sich diverse Varianten des ursprünglichen Tumors, welche eine Insensitivität gegenüber der ektopischen c-MYC Regulation, chromosomale Translokation des MYC Locus oder die Aktivierung der endogenen c-MYC Expression aufwiesen [119] und so die c-MYC Aktivität aufrechterhalten konnten. Dieses scheinbare Entkommen (*escape*) der Tumoren aus der c-MYC Abhängigkeit war nur möglich, da in diesem System ein transgenes humanes c-MYC zur Tumorinduktion genutzt wurde und die Abschaltung der c-MYC Expression indirekt über ein Transaktivatorprotein erfolgte.

1.2.4. c-MYC als Ziel der therapeutischen Intervention

Aufgrund der weiten Verbreitung und der vitalen Bedeutung von c-MYC in diversen Tumoren ist es ein attraktives, wenngleich herausforderndes Ziel für eine Anti-Tumorthherapie. Aufgrund seiner Protein-Protein Interaktionen ist c-MYC in den meisten Tumorentitäten nicht mutiert [120]. Ausnahmen hiervon sind humane B-Zelllymphome wie das Burkitt-Lymphom und bei erworbener Immunschwäche (AIDS, Organtransplantation etc.) auftretende Lymphome, bei denen ca. 30% der Lymphome Mutationen im *c-myc* Gen enthalten [90]. Diese Mutationen sind zumeist um T58 und S62 konzentriert und betreffen somit die Stabilität von c-MYC (s.o.), indem sie die ubiquitinvermittelte Degradation durch das Proteasom blockieren [90]. Somit ist c-MYC, obwohl es genomische Instabilität durch DNA-Strangbrüche induzieren kann, selbst ein stabiles Ziel für eine T-Zelltherapie.

Das große Potential einer spezifischen Inhibierung von c-MYC als Tumorthherapie konnte in einem *Kras^{G12D}* gesteuerten Lungenkrebsmodell gezeigt werden [62]. Durch ektopisch regulierbare Expression eines dominant negativen c-MYC Inhibitors (*Omomyc*) wurden etablierte, *Kras^{G12D}* induzierte Lungentumoren zur Regression gezwungen. Die Nebenwirkungen in den proliferierenden Geweben wie der Haut und dem Dünndarmepithel konnten für einen Zeitraum von vier Wochen toleriert werden. Anschließend regenerierten sich diese Gewebe, während sich alle Tumoren in Regression befanden [62]. Um diese Art der Therapie klinisch umzusetzen, müssen allerdings geeignete Strategien zur Identifizierung von c-MYC Inhibitoren genutzt werden.

Ein erfolgreicher Ansatz, die Proteinfunktion zu inhibieren, ist die Nutzung von *small molecular compounds*, wie z.B. Tyrosinkinase-Inhibitoren im Fall des Bcr-Abl Fusionsproteins [121]. Allerdings hat c-MYC kein enzymatisch aktives Zentrum und die Oberflächen, welche die Protein-Protein Wechselwirkungen mit dem Max Protein ausüben, sind nur schwer mit hoher Affinität spezifisch zu blockieren. Die *in vivo* an einem *Xenograft* SCID-Model getestete Substanz 10058-F4 konnte keine signifikante Wirkung entfalten [122].

Weitere Strategien c-MYC direkt zu inhibieren, beinhalten antisense Oligodeoxynukleotide und microRNAs [64].

Diverse Strategien fokussieren sich darauf, die c-MYC Aktivität indirekt zu blockieren. Dazu werden *upstream* von c-MYC gelegene Proteine inhibiert, wie z.B. USP28, was die Deubiquitinierung von c-MYC katalysiert, CIP2A oder der PI3K/Akt Signalweg [67]. Die Blockade von Acetyl-Lysin erkennenden Proteinen der BET-Familie führte zur Reduktion der c-MYC Expression und zur Verlangsamung des Wachstums von Raji *Xenografts* [123, 124]. Der wohl vielversprechendste Ansatz, c-MYC abhängige Tumoren zu attackieren, ist die Inhibierung von SUMO aktivierenden Enzymen, was zu einer Fehlausprägung des Spindelapparates und zu einer nachfolgenden Apoptoseinitiation führt [125].

Der bisher einzige Ansatz, MYC überexprimierende Tumoren mit T-Zellen zu attackieren, erfolgte über die Generierung von MYCN Peptid-spezifischen, HLA-A1 restringierten T-Zellen [126]. Hier wurde die lytische Aktivität gegen Zellen eines MYCN überexprimierenden Neuroblastoms *in vitro* analysiert. Allerdings wurden die T-Zellen nicht *in vivo* eingesetzt und es sind keine weiteren Publikationen dazu veröffentlicht.

1.2.5. Die λ -MYC Maus als B-Zelllymphommodell

Die λ -MYC Maus wurde im Jahr 2000 als zweites Mausmodell für das Burkitt-Lymphom veröffentlicht [104]. Heute wird es weniger als Modell für das Burkitt-Lymphom sondern eher als aggressives B-Zelllymphommodell mit deregulierter c-MYC Aktivität genutzt, da es sich um ein Prä-Keimzentrums-Lymphom handelt, wohingegen das Burkitt-Lymphom ein Post-Keimzentrums-Lymphom ist. Die λ -MYC Maus spiegelt die Translokation von Teilen des Ig λ Locus auf Chromosom 22 in die 3' Position des *c-myc* Gens auf Chromosom 8 wieder [127]. Daraus resultierend entwickeln die zunächst gesund geborenen transgenen Mäuse mit unterschiedlicher Latenz spontane B-Zelllymphome vor allem in Milz und Lymphknoten. Das mediane Überleben liegt bei ca. 125 Tage. Die Lymphome sind durch die Gabe von Cyclophosphamid behandelbar und bilden sich z.T. komplett zurück. Aufgrund der transgenen c-MYC Expression bilden sich aber Rezidive nach einer Latenzzeit von einigen Monaten.

Aus den primären Lymphomen der λ -MYC Maus können in ca. 30% Zelllinien in Kultur etabliert werden. [128]. Diese Zellen sind, bis auf das humane c-MYC, syngen zu C57BL/6 Mäusen. Eine Dosis von 1×10^5 Zellen der Zelllinie 291PC wächst, subkutan injiziert, innerhalb von drei Wochen zu einem Tumor mit 1 cm im Durchmesser. Die Rezipienten müssen aufgrund der Tumorlast abgetötet werden. Die Zellen können auch i.v. in einer Dosis von 1×10^6 injiziert werden und infiltrieren dann die lymphatischen Organe. Allerdings ist die Erfassung der Tumorkinetik bei dieser Applikation nicht möglich. Beide Tumortransferarten haben Vor- und Nachteile und werden in dieser Arbeit eingesetzt.

Da die 291PC Zellen humanes c-MYC exprimieren, ergibt sich die Möglichkeit eine T-Zellantwort in einer, für humanes c-MYC nicht toleranten, C57Bl/6 Wildtypmaus zu induzieren und die Wirkung dieser T-Zellantwort gegen die Lymphomzellen *in vivo* zu untersuchen.

1.3. Fragestellung

Das humane c-MYC Protein ist in einer Vielzahl humaner Tumoren überexprimiert und die treibende Kraft für die Tumorpheriferation. Der Verlust von c-MYC führt in diversen Mausmodellen zur Regression der Tumoren. Dies bedeutet, dass viele Tumoren abhängig von c-MYC sind. Ansätze zur Inhibition von c-MYC zur Repression des Tumorstwachstums sind zahlreich. Allerdings gibt es bisher keine Ansätze, c-MYC überexprimierende Zellen durch c-MYC spezifische T-Zellen zu attackieren.

Deshalb sollen gegen humanes c-MYC spezifische T-Zellen in einem nicht toleranten Organismus generiert und ihre Eignung für einen adoptiven T-Zelltransfer untersucht werden. Dazu wird die Immunogenität des humanen c-MYC Proteins im H2^b MHC-Kontext der C57Bl/6 Maus analysiert und die Eignung des c-MYC Proteins als Abstoßungsantigen in einem murinen B-Zelllymphommodell untersucht.

Mit Hilfe von etablierten Surrogatantigenen soll untersucht werden, ob B-Zelllymphome abgestoßen werden können und wenn ja, welche Faktoren eine mögliche Abstoßung vermitteln.

Das immunogene Potential von humanem c-MYC soll mit Hilfe von *in silico* Analysen in Hinblick auf die Homologie zum murinem c-MYC im H2^b MHC-Kontext eingeschätzt werden.

Durch Immunisierungsexperimente soll geklärt werden, ob c-MYC eine T-Zellantwort induzieren kann. Wenn ja, soll diese T-Zellantwort in Bezug auf folgende Eigenschaften charakterisiert werden:

- Welche T-Zellkompartimente sind beteiligt?
- Welchen Phänotyp weisen die induzierten T-Zellen auf?
- Gegen welche Epitope ist die T-Zellantwort gerichtet?

Des Weiteren soll untersucht werden, ob durch Immunisierung mit humanem c-MYC das Wachstum von c-MYC getriebenen B-Zelllymphomen der Maus beeinflusst wird:

- Führt Immunisierung mit c-MYC zur Lymphomabstoßung?
- Beeinflusst eine mögliche c-MYC spezifische T-Zellantwort das Lymphomwachstum?
- Hat die Art des Lymphomtransfers (s.c. oder i.v.) Einfluss auf Wachstum oder Abstoßung der Lymphomzellen?
- Können adoptiv transferierte, c-MYC spezifische T-Zellen das Lymphomwachstum beeinflussen?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Autoklav	(Digital Biology)
Bakterieninkubator	(Heraeus)
Brutschrank	(Heraeus, Binder)
Bunsenbrenner	(Carl Roth)
Digitalkamera	(Sony)
Elektrophoresekammern	(Biometra, BioRad)
ELISA Leser	(Dynex Technologies)
ELISPOT Leser ELR02	(AID, Strassberg)
FACS Calibur	(Becton-Dickinson)
Gefrierschrank -80°C	(Colora)
Gefrierschrank -20°C	(Liebherr)
Geldokumentation	(Biometra)
Kühlschrank	(Liebherr)
Lichtmikroskop	(Zeiss)
Magnetrührer	(Carl Roth)
Millipore-Anlage	(Millipore)
Netzgerät	(BioRad)
PCR-Thermozykler	(Perkin Elmer, Biometra)
pH-Messgerät	(Knick)
Pipetten	(Eppendorf, Gilson)
Pipettierhilfe	(Integra)
Schüttelinkubator	(New Brunswick Scientific)
Spektrophotometer	(Eppendorf)
Sterilwerkbank	(MSC Advantage, Thermo Scientific)
Stickstofftank	(Air Liquide)
UV-Transilluminator	(UVP-Inc.)
Vortexer Genie	(Bender, Hobein)
Wasserbad	(Mettler)
Western Blot System	(XCell Sure Lock Mini Cell, Invitrogen)
Zählkammer nach Neubauer	(Carl Roth)
Zentrifugen	(Eppendorf, Thermo Scientific)

2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

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

2.1.3. Medien und Puffer

Medien und Puffer zur Arbeit mit Bakterien:

LB-Medium:	10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, Ad 1 L H ₂ O, pH 7.0, autoklaviert
SOB-Medium:	20 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , Ad 1 L H ₂ O, autoklaviert
LB-Agar:	10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, Ad 1L H ₂ O, autoklaviert
SOC-Medium:	SOB-Medium +, 0,2% Glukose, sterilfiltriert
Lysepuffer:	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, 10 mM Imidazole, 0,05% Tween 20, pH 8.0
Elutionspuffer:	Lysepuffer mit 500 mM Imidazole, pH 7.5

Medien und Puffer für die Zellkultur

DMEM komplett:	10% (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (PAN), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Gibco), 1 mM Natriumpyruvat (Gibco) in DMEM (Invitrogen)
RPMI komplett:	10% (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (PAN), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Gibco), 1 mM Natriumpyruvat (Gibco) in RPMI (Invitrogen)
APC Medium:	RPMI komplett mit 10% (v/v) Zellkulturüberstand NIH-3T3 GM-CSF und 10% (v/v) Zellkulturüberstand NIH-3T3 IL4
B-Zellmedium:	20% (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (PAN), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Gibco), 1 mM Natriumpyruvat (Gibco) in IMDM (Invitrogen)
Erythrozytenlysepuffer:	10 mM KHCO ₃ , 155 mM NH ₄ Cl, 0,1 mM Na ₂ EDTA, pH 7,2
Durchflusszytometriepuffer:	PBS, 0,5% BSA, 0,1% NaN ₃ , 2 mM EDTA
Zelllysatpuffer:	10 ml NP40 Zellysepuffer (Invitrogen), 1 mM PMSF, 1 cComplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche)

2.1.4. Zelllinien

291PC

Die Zelllinie 291PC wurde aus einer weiblichen λ -MYC transgenen C57Bl/6 Maus isoliert [128]. Die Zellen wurden in B-Zellmedium kultiviert. Bei Farbumschlag des Mediums erfolgte eine Zellzahlbestimmung und Neueinstellung der Zellzahl auf $0,2 \times 10^5$ Zellen pro ml.

291GFP

Die Zelllinie 291PC wurde retroviral mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) Expressionskonstrukt transduziert [128]. Das GFP wurde 3' einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) positioniert und die Expression von der LTR des MSCV gesteuert. Die transduzierten Zellen wurden durchflusszytometrisch angereichert, so dass die Rate der GFP positiven Zellen über 97% beträgt. Die Kultivierungsbedingungen sind mit denen der Zelllinie 291PC identisch.

291OVA

Die Zelllinie 291PC wurde retroviral mit einem Expressionskonstrukt transduziert, welches Hühnerovalbumin (OVA) und GFP enthält [128]. Die Expression wird von dem LTR des MSCV gesteuert, wobei beide Transgene über eine IRES verbunden sind, bei der OVA 5' und GFP 3' positioniert wurde. Die transduzierten Zellen wurden durchflusszytometrisch angereichert, so dass die Rate der GFP positiven Zellen über 97% beträgt [128]. Die OVA Expression wurde im Western Blot nachgewiesen [128]. Die Kultivierungsbedingungen sind mit denen der Zelllinie 291PC identisch.

50PC

Die Zelllinie 50PC wurde aus einer männlichen IFN γ R^{-/-} und λ -MYC transgenen C57Bl/6 Maus isoliert [128]. Die Zellen wurden in B-Zellmedium kultiviert. Bei Farbumschlag des Mediums erfolgte eine Zellzahlbestimmung und Neueinstellung der Zellzahl auf $0,2 \times 10^5$ Zellen pro ml.

50OVA

Die Zelllinie 50PC wurde analog zur Zelllinie 291PC retroviral mit einem Expressionskonstrukt transduziert, welches OVA und GFP enthält [128]. Die Expression wird von dem LTR des MSCV gesteuert, wobei beide Transgene über eine IRES verbunden sind, bei der OVA 5' und GFP 3' positioniert wurde. Die transduzierten Zellen wurden durchflusszytometrisch angereichert, so dass die Rate der GFP positiven Zellen über 97% beträgt [128]. Die OVA Expression wurde im Western Blot nachgewiesen [128]. Die Kultivierungsbedingungen sind mit denen der Zelllinie 291PC bzw. 50PC identisch.

MCA-205

Die Zelllinie MCA-205 wurde aus einem Methylcholanthrene induzierten Fibrosarkom einer C57Bl/6 Maus isoliert [129] und von Thomas Kammertöns zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in DMEM-Medium kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst, wenn die Kultur eine Konfluenz von >80% erreichte. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen mit einer Konzentration von $0,1 \times 10^5$ Zellen pro ml neu eingestellt.

MCA-205 Myc tet

Die Zelllinie MCA-205 wurde mit einem Tetrazyklin induzierbaren humanen c-MYC Expressionsvektor transfiziert [130]. Die transfizierten Zellen wurden mit Hygromycin für vier Wochen selektioniert. Ein Klon wurde expandiert. Der Klon exprimiert humanes c-MYC in Abwesenheit von Doxyzyklin, welches in der nicht transfizierten Zelllinie nicht nachweisbar ist. Die Zellen wurden mit den gleichen Bedingungen wie die MCA-205 Zellen kultiviert. Allerdings wurde dem DMEM-Medium 0,5 mg/ml Hygromycin zugesetzt.

NIH-3T3-GM-CSF und NIH-3T3-IL4

Die Zelllinien NIH-3T3-GM-CSF und NIH3T3-IL4 [131] wurden von Thomas Kammertöns zur Verfügung gestellt. Beide Zelllinien wurden zur Produktion von GM-CSF bzw. IL4 haltigem Zellkulturüberstand (ZKÜ) verwendet. Die Zellen wurden mit den gleichen Bedingungen wie die MCA-205 Zellen kultiviert.

PlatE

Die Zelllinie PlatE ist eine Verpackungszelllinie zur Herstellung von ecotropen Retroviren [132] und wurde von Wolfgang Uckert zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden mit den gleichen Bedingungen wie die MCA-205 Zellen kultiviert.

2.1.5. Antikörper, *beads* und Multimere

ELISPOT

Der Anti-IFN γ "*catching*" mAb Klon AN18 und der Anti-IFN γ "*detection*" mAb Klon R4-6A2 wurden als Kit von der Firma Mabtech bezogen.

ELISA

Die für die Bestimmung der Konzentration von IFN γ , IL4 und GM-CSF verwendeten Antikörper wurden als ELISA Kits von der Firma BD bezogen.

Durchflusszytometrie

CD3 (Klon 145-2c11), CD4 (Klon RM4-5), CD8 (Klon 53-6.7), CD11b (Klon M1/70), CD11c (Klon HL3), CD19 (Klon 1D3), CD25 (Klon PC61), CD69 (Klon H1.2F3), CD80 (Klon 16-10A1), CD86 (Klon GL1), CD90.2 (Klon 53-2.1), CD117 (Klon 2B8), CD137 (Klon 1AH2), H2-K^b (Klon AF6-88.5), H2-IA^b (Klon AF6-120.1), FoxP3 (Klon FJK-16s) und IFN γ (Klon XMG1.2) spezifische mAbs wurden von der Firma BD bezogen.

Cytometric Bead Array

Zur Differenzierung eines T_H1 und T_H2 Zytokinprofils wurde der *cytometric bead array* (CBA) *Mouse T_H1/T_H2 cytokine kit* der Firma BD genutzt. Für den Nachweis von einzelnen Zytokinen im CBA wurden Beads für IFN γ , IL2, IL4, IL10, IL17 und TNF α genutzt.

Depletionsexperimente

Für die *in vivo* Depletion von CD25 exprimierenden Zellen wurde Anti-CD25 mAb des Klons PC61 genutzt und von Elisabeth Kremmer (LMU München) zur Verfügung gestellt.

Western Blot

Für den Nachweis von humanem c-MYC wurde der mAb Klon 9E10 genutzt und von Wolfgang Uckert (MDC Berlin) zur Verfügung gestellt. Für den Nachweis von rekombinanten Proteinen mit C-terminalen His-Tag wurde der mAb Klon3D5 (Invitrogen) verwendet. Polyklonale gegen OVA gerichtete Kaninchenantikörper und β -Aktin spezifische mAbs (Klon EP1123Y) wurden von der Firma Abcam bezogen.

Multimere

Zur Färbung antigenspezifischer T-Zellen wurden Pentamere der Firma ProImmune genutzt. Mit dem SIINFEKL Peptid konjugierte H2-K^b Pentamere wurden zur Färbung von SIINFEKL spezifischen CD8+ T-Zellen und mit dem SSPQGSPEPL Peptid konjugierte H2-D^b Pentamere zur Färbung von NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen eingesetzt.

2.1.6. Primer, CpG und Peptide

Primer

c-myc E2	gctcgtctcagagaagctgg
c-myc I2	atctctccagatctgctatctc
STAT1 p1	gagataattcacaaaatcagagag
STAT1 p2	ctgatccaggcaggcgttg
STAT1 p3	taatgtttcatagttggatatcat
IFN γ p1	ccttctatgccttcttgacg
IFN γ p2	agaagtaagtgaagggccagaag

IFN γ p3 agggaaactgggagaggagaatat
 IFN γ R p1 cccatttagatcctacatacgaacatacgg
 IFN γ R p2 tttctgtcatcatggaaaggaggatacag
 IFN γ R p3 cttgggtggagaggctattc
 IFN γ R p4 aggtgagatgacaggagatc

CpG

Das CpG ODN 1826 mit der Sequenz tccatgacgttctgacgtt wurde zur *in vivo* Stabilisierung mit einem Thioatester an den Phosphatgruppen versehen und von der Firma TibMolBiol bezogen. Das CpG wurde in PBS gelöst und auf eine Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt.

Peptide

Alle Peptide wurden lyophilisiert von der Firma Thermo Scientific Biopolymers bezogen und auf eine Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS bzw. in PBS 10% DMSO eingestellt. Die Reinheit der Peptide mit einer Länge <13 betrug 95%, während bei längeren Peptiden eine 70% Reinheit vorlag.

Name	Sequenz	Länge in AS
NHP-A	TMPLNVSFTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSEL	41
NHP-B	DSSSPKSCASQDSSAFSPSSDILLSSTESSPQGSPEPLVL	40
NHP-C	VEKRQAPGKRSESGSPSAGGHSKP	24
NHP-D	TAYILSVQAEEQKLISEEDLLRKRREQL	28
NHP-E	PSYVAVTPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLEMVTELLG	36
NHP-F	PAAKRVKLDsvrvlrqisnnrkctsprssdteenvkrrthnv	42
NHP-G	YQAARKDSGSPNPARGHSVCS	21
NHP-H	LYLQDLSAAASEC	13
NHP-B2	SSPQGSPEPL	10
NHP-EA2	YVAVTPFSL	9

2.2. Epitopvorhersage und *in silico* Analysen

Die AS-Sequenz für humanes c-MYC Protein (p67) wurde der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) unter der Kennung NP_002458 entnommen. Für murines c-MYC (p67) wurde die Sequenz der Kennung NP_034979 verwendet. Beide Sequenzen wurden mit Hilfe der Software BLASTP [133] (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) auf ihre Homologie verglichen.

Die nicht homologen Peptide (NHPs) wurden so ausgewählt, dass alle nicht homologen Bereiche zwischen Maus und Mensch enthalten sind (eine Ausnahme bildet der N-Terminus, da dieser nicht im p64 enthalten ist) und dass die Peptidlänge nicht über 42 AS liegt. Für die Epitopvorhersage wurde die Software des „*Center for biological Sequenceanalysis*“ (CBS, <http://www.cbs.dtu.dk/services/>) der Technischen Universität von Dänemark genutzt. Alle Peptide wurden mit Hilfe der HLA-Restrictor-Software [134] auf mögliche Epitope für die MHC I Moleküle H2-D^b und H2-K^b analysiert und die Epitope, welche die höchste Affinität zum MHC Molekül aufwiesen und Unterschiede in der AS Sequenz zur Maus beinhalteten, wurden als potentiell immunogene Epitope erfasst. Für MHC II restringierte Epitope wurde das Programm NETMHCII [31] genutzt. Aufgrund der variablen Länge der MHC II Epitope wurde für jedes NHP ein Epitop mit der höchsten Bindungsaffinität zum H2-IA^b Molekül ausgewählt, unabhängig von Peptidlänge des Epitops und AS-Unterschieden in der vorhergesagten Kernsequenz.

2.3. Mausstämme, -zucht und -typisierung

C57Bl/6

C57Bl/6 Mäuse wurden von der Firma Charles River bezogen.

λ -MYC

λ -MYC [104] transgene Männchen wurden mit Wildtyp C57Bl/6 Weibchen verpaart, um heterozygote Nachkommen zu erhalten. Die Genotypisierung der Nachkommen erfolgte durch PCR mit DNA aus Schwanzspitzen- oder Ohrstanzungsbiopsien mit den Primerpaar c-myc E2 und c-myc I2.

STAT1^{-/-}

STAT1^{-/-} Mäuse [135] wurden homozygot verpaart und die Genotypisierung mit den Primern STAT1 p1, STAT1 p2 und STAT1 p3 durchgeführt.

IFN γ ^{-/-}

IFN γ ^{-/-} (B6.129S7-*Ifng*^{tm1Ts}/J) Mäuse wurden homozygot verpaart und die Genotypisierung mit den Primern IFN γ p1, IFN γ p2 und IFN γ p3 durchgeführt.

IFN γ R^{-/-}

IFN γ R^{-/-} (B6.129S7-*Ifngr1*^{tm1Agt}/J) Mäuse wurden homozygot verpaart und die Genotypisierung mit den Primern IFN γ R p1, IFN γ R p2, IFN γ R p3 und IFN γ p4 durchgeführt.

GFP

GFP Mäuse [136] wurden homozygot verpaart. Die Typisierung erfolgte durchflusszytometrisch über den Nachweis der GFP-Fluoreszenz in Zellen des peripheren Bluts.

RAG1^{-/-}

RAG1^{-/-} (B6.129S7-*Rag1*^{tm1Mom}/J) Mäuse wurden homozygot verpaart. Die Typisierung erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbung der Zellen des Blutes mit Anti-CD4, Anti-CD8 und Anti-CD19 mAb und anschließender durchflusszytometrischer Analyse.

Alle Mäuse wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité Berlin in den Standorten Kraemerstraße 6-10, bzw. Garystraße 5, Campus Benjamin Franklin, Berlin gemäß den Tierschutzbestimmungen gezüchtet und gehalten. Mausstämme mit Immundefekten wurden unter SPF Bedingungen gehalten, während die Stämme mit intaktem Immunsystem einer offenen Käfighaltung unterlagen.

2.4. Mausexperimente

2.4.1. Immunisierung mit Protein- bzw. Peptidvakzinen

Die Immunisierung der Mäuse erfolgte durch eine subkutane Injektion der Vakzine in die ventrale Körperseite, nahe den inguinalen Lymphknoten. Die Vakzine besaß ein Volumen von 100 µl, das sich aus 50 µl inkompletten Freund'schen Adjuvants (IFA) und 50 µl PBS zusammensetzte. Das PBS enthielt 50 µg CpG DNA-Oligomer ODN1826 und entweder 50 µg Protein (humanes c-MYC oder OVA) oder 90 µg eines Peptids (NHP-A bis NHP-H, siehe 2.1.6.). Die Bestandteile der Vakzine wurden vor Injektion mit Hilfe eines Vortexers gemischt, so dass eine trübe Emulsion entstand. Drei Wochen nach der ersten Immunisierung (Prime) wurde eine weitere Immunisierung (Boost) durchgeführt. Bei Durchführung von weiteren Boostimmunisierungen erfolgten diese in einem Abstand von mindestens drei Wochen zur vorherigen Immunisierung.

2.4.2. Tumorzelltransferexperimente

Subkutaner Tumorzelltransfer

Die Lymphomzellen wurden subkutan mit einer Dosis von 1×10^5 Zellen in 100 µl PBS in die Flanke des Rezipienten injiziert. Das lokale Tumorstadium wurde engmaschig überwacht. Die Lymphome wurden in Bezug auf ihre Länge, Breite und Tiefe gemessen und der Mittelwert dieser drei Werte wurde als durchschnittlicher Tumordurchmesser angegeben. Die Tiere wurden bei einer Tumorstadiumgröße von 10 mm oder dem Auftreten von Kachexiesymptomen euthanasiert. Anschließend erfolgten eine Obduktion und die Entnahme von Tumorgewebe und Organen für spätere Analysen.

Tumorzelltransfer per i.v. Injektion

Für den i.v. Transfer wurden 1×10^6 Zellen in 200 µl PBS in die Schwanzvene injiziert. Die Symptome für die Lymphomentwicklung beinhalteten Kachexie, das Anschwellen von Lymphknoten und Lähmungserscheinungen der Hinterläufe. Das Auftreten eines der geschilderten Symptome führte zur umgehenden Euthanasie der Tiere. Zum Nachweis des Lymphoms wurde eine Obduktion durchgeführt und makroskopisch sichtbare Lymphome gegebenenfalls fotografisch dokumentiert und zusammen mit verschiedenen Organen für spätere Analysen entnommen.

2.4.3. Blutabnahme und Lymphozytengewinnung

Die Blutabnahme erfolgte über eine Punktierung der *Vena facialis* mit Hilfe einer 20 Gauge Kanüle. Das Blut wurde in 100 µl PBS Heparinmischung (100 IU/ml) in einem Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 ml) aufgefangen. Das Blut-Heparinmischung wurde mit 500 µl PBS verdünnt, über 1,5 ml Lymphoprep (Fresenius Kabi) in 5 ml Röhrchen geschichtet und für 25 min bei 21°C mit 800 g ohne Bremse zentrifugiert. Die weiße, lymphozytenhaltige Fraktion wurde mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgenommen und mit PBS gewaschen.

2.4.4. Zelldepletion mit monoklonalen Anti-CD25 Antikörpern

Die Depletion von CD25 hoch exprimierenden Zellen mit Hilfe des mAb des Klons PC61 ist beschrieben [137]. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Elisabeth Krämer (LMU, München) zur Verfügung gestellt. Es wurden 10 µg Anti-CD25 mAb/g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Wirksamkeit der Depletion wurde sechs Tage später überprüft, indem das Blut von Mäusen mit Hilfe von CD4, CD25 und FoxP3 spezifischen mAbs immunfluoreszenztechnisch gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert wurde. Die Immunisierung der Tiere erfolgte sieben Tage nach PC61 Injektion und wurde nach drei Wochen wiederholt.

2.4.5. *in vivo kill Assay*

Für den *in vivo kill Assay* wurden Milzzellen aus C57Bl/6 Mäusen (CD45.1 oder CD45.2) gewonnen. Diese Zellen wurden in zwei Populationen eingeteilt, wobei eine Population als Kontrollpopulation definiert wurde und die andere Population als Ziel für den Test diente und 15 min bei 37°C mit dem Zielpeptid in einer Konzentration von 10 µM pro 1×10^7 Zellen inkubiert wurde. Anschließend wurde die Kontrollpopulation mit 0,01 µM Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) und die Zielpopulation mit 0,1 µM CFSE für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden beide Populationen in einem 1:1 Verhältnis gemischt und 2×10^7 Zellen in 200 µl PBS den immunisierten Mäusen und den Kontrollen injiziert. 18 h später wurden die mononuklearen Zellen des Blutes per Dichtegradientenzentrifugation (Lymphoprep, Fresenius Kabi) isoliert und die CFSE-Fluoreszenz durchflusszytometrisch ermittelt. Für die Berechnung der *in vivo kill* Aktivität wurde das Verhältnis der Anzahl der Ziel- zur Kontrollpopulation (ursprünglich 50% zu 50%) in den immunisierten Tieren geteilt durch das Verhältnis der Anzahl der Ziel- zur Kontrollpopulation in den Kontrollen. Das Ergebnis wurde von 1 abgezogen und mit 100 multipliziert, um die *in vivo kill* Aktivität in Prozent zu erhalten.

2.5. Zellkultur und *in vitro* Analysen

2.5.1. Gewinnung von T-Zellen aus Mäusen

Den euthanasierten Mäusen wurden die inguinalen Lymphknoten und die Milz entnommen und mit PBS gespült. Die Organe wurden mit Hilfe des Stempels einer 5 ml Spritze und eines 40 µM Zellsiebs unter PBS Spülung zu einer Einzelzellsuspension zerrieben. Die Zellen wurden abzentrifugiert und eine Erythrozytenlyse mit Erythrozytenlysepuffer durchgeführt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Trypanblaufärbung in einer Neubauerzählkammer ermittelt. Zur Gewinnung von T-Zellen wurden die so aufbereiteten Milzzellen immunomagnetisch selektioniert. Dazu wurden die Zellen gemäß Herstellervorgaben mit CD90.2 Beads (für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen), PAN CD4 Beads (CD4 Negativselektion) oder PAN CD8 (CD8 Negativselektion) inkubiert. Die überschüssigen Beads wurden nach Zentrifugation verworfen und die markierten Zellen auf LS-Säulen (Miltenyi) gegeben. Nach dreimaligem Spülen der Säule mit PBS wurden die gebundenen Zellen als Positivfraktion eluiert, während die Zellen, welche zuvor die Säule durchliefen, als Negativfraktion aufgefangen wurden. Die Zellzahl von beiden Fraktionen wurde bestimmt und eine Färbung mit CD3, CD4, CD8 und CD90.2 mAb durchgeführt.

2.5.2. Generierung von antigenpräsentierenden Zellen

APCs wurden nach einem bereits veröffentlichten Protokoll generiert [138]. Dazu wurden die Zellen des Knochenmarks von C57Bl/6 Mäusen aus dem Femur mit Hilfe einer Kanüle (27 G) und einer 1 ml Spritze mit RPMI gespült. Die Zellen wurden nach einer Erythrozytenlyse mit Erythrozytenlysepuffer für 2 h in Petrischalen in komplettem RPMI Medium bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhärenen Zellen geerntet, auf eine Zellzahl von 4×10^6 Zellen pro ml in zytokinhaltigen (GM-CSF und IL4) APC Medium eingestellt und in 6-*well* Platten eingesät. Die nicht adhärenen Zellen wurden nach einem und nach drei Tagen verworfen und frisches APC Medium wurde zugegeben. Ab Tag fünf wurden 50% des alten Mediums durch frisches APC Medium an jedem zweiten Tag ersetzt. Die APCs wurden an Tag 12 geerntet und für *in vitro* Stimulationen verwendet.

2.5.3. Transfektion und Transduktion

Transfektion

Die Transfektion von PlatE und MCA-205 Zellen erfolgte mit Hilfe des FuGene Transfektionskits (Promega). Die Zellen wurden dazu 12 h vor Transfektion in einer Dichte von 7×10^5 Zellen pro *well* in 3 ml DMEM Medium in einer 6-*well* Platte eingesät. Von der für die Transfektion verwendeten Plasmid DNA wurden 2 µg in 94 µl IMDM mit 6 µl Transfektionsreagenz gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die 100 µl der Transfektionslösung wurden anschließend gleichmäßig auf die Zellen gegeben und diese für 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Transduktion

Die zu transduzierenden Lymphomzellen wurden in 1 ml B-Zellmedium in einem *well* einer 24-*well* Platte mit einer Zellzahl von 1×10^6 eingesät. Anschließend wurde 1 ml virushaltiger ZKÜ zugegeben und die Platte für 1 h bei 30°C und 400 g zentrifugiert. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml des ZKÜ abgenommen und durch 1 ml frischen virushaltigen ZKÜ ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert und die Transduktionseffizienz anhand der GFP Fluoreszenz am Durchflusszytometer ermittelt.

2.5.4. ELISPOT

ELISPOT Platten wurden für 12 h mit IFN γ „*catching*“ Antikörper, Klon AN18, mit einer Konzentration von 15 µg/ml in PBS beschichtet. Nach 12 h wurden 1×10^4 APCs pro *well* in einer 96-*well* Platte eingesät. MYC, OVA oder NHP A-H wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert. 1×10^5 CD90.2 MACS selektionierte T-Zellen von c-MYC immunisierten Mäusen wurden zu Protein oder Peptid gepulsten APCs oder in „leere“ *wells* gegeben und für 48 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend verworfen und die IFN γ haltigen Punkte mit einem zweiten, mit Biotin markierten Anti-IFN γ mAb, Klon R4-6A2, versehen. Über das Biotin wurde streptavidinvermittelt eine Alkalische Phosphatase gebunden. Die IFN γ haltigen Punkte wurden durch Farbumschlag nach Inkubation mit dem Substrat der alkalischen Phosphatase sichtbar gemacht und die Reaktion durch fließendes Wasser gestoppt. Die Anzahl der Punkte pro *well* wurde mit Hilfe des ELISPOT Leser ELR02 und der zugehörigen Software ermittelt.

2.5.5. *in vitro* Restimulation

Restimulation von Milzzellen

Die Milzzellen wurden in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro *well* in 100 μ l IMDM Medium eingesät. Anschließend wurden die zur Stimulation verwendeten NHPs in einer Konzentration von 2 μ g pro *well* in 100 μ l IMDM Medium zugegeben. Bei Stimulation mit Zelllinien, wie MCA-205, wurden diese 12 h zuvor mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^4$ Zellen pro *well* in 100 μ l IMDM vorgelegt.

Restimulation von selektionierten T-Zellen mit Peptid oder Protein gepulsten APCs

Die APCs wurden in einer Konzentration von $2,5 \times 10^4$ Zellen pro *well* in 100 μ l IMDM eingesät. Anschließend wurden 2 μ g c-MYC, OVA oder NHPs pro *well* in 50 μ l IMDM zugegeben und die Zellen für 12 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die selektionierten T-Zellen wurden anschließend in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro *well* in 50 μ l IMDM zugegeben und für 48 h im Brutschrank inkubiert.

2.5.6. ELISA

Für die Ermittlung der Zytokinkonzentrationen für IFN γ , GM-CSF und IL4 wurden jeweils ELISA Kits der Firma BD genutzt. Die ELISA Platten wurden für 12 h mit *catching* mAb bei 4°C beschichtet. Nach dreimaliger Spülkubation der Platte mit PBS 0,05% Tween wurde die Platte mit PBS 10% FCS für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut dreimal mit PBS 0,05% Tween gereinigt. Der zu analysierende ZKÜ wurde in einer 1:1 Verdünnung mit PBS 10% FCS aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde fünfmal mit PBS 0,05% Tween gereinigt und der *detection* mAb, welcher über Biotin-Streptavidin mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war, zugegeben und für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Platte wurde sechsmal mit einer Pause von mindestens 1 min zwischen den Schritten mit PBS 0,05% Tween gereinigt und das Substrat zugegeben. Der Substratumsatz wurde nach 30 min durch Zugabe von H₃PO₄ abgestoppt und die Absorption bei 450 nm mit Hilfe des ELISA-Readers ermittelt. Die IFN γ Konzentration wurde anhand einer Standardkurve (30 bis 2000 pg/ml) aus den Triplikaten berechnet.

2.5.7. Cytometric Bead Array

Für den CBA wurde eine Verdünnungsreihe von 2500 bis 10 pg/ml des jeweils zu ermittelnden Zytokins in 1:1 Verdünnungsschritten erstellt. Anschließend wurde ein Mastermix der Zytokin *capture beads*

gemäß dem Protokoll des Anbieters angesetzt. Dieser Mastermix enthält die Zytokin *capture beads*, welche mit den „*catching*“ mAbs beschichtet sind. Pro zu messendem Zytokin und Test wurden 0,2 µl *capture beads* mit der *detection reagent dilution* Lösung auf ein Volumen von 10 µl pro Test verdünnt. Für eine Bestimmung von IFN γ , IL2, IL4, IL5 und TNF α wurden je 0,2 µl der für diese Zytokine spezifischen *capture beads* mit 9 µl Verdünnungslösung gemischt. Anschließend wurden 10 µl des zu testenden ZKÜ zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden 10 µl des *PE-detection* Mix zugegeben, welcher die zur Detektion im Durchflusszytometer mit Phycoerythrin markierten „*detection*“ mAbs enthielt. Die Proben wurden für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 200 µl PBS verdünnt und bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Die *beads* wurden mit 100 µl PBS resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert.

Das Durchflusszytometer wurde dazu mit spezifischen *beads* des Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit der Firma BD unter Verwendung des Cellquest Programms kalibriert. Dadurch war es möglich die für verschiedene Zytokine spezifischen *beads* zu unterscheiden. Die Auswertung und Ermittlung der Zytokinkonzentrationen erfolgte mit dem FCAP Array Programm.

2.5.8. Durchflusszytometrische Analysen

Antikörperfärbung

1×10^6 Zellen wurden in 100 µl Durchflusszytometriepuffer mit 0,2 µl des mAb Klon 2.4G2 (0,5 mg/ml) für 10 min bei 4°C inkubiert (F_c Block). Anschließend wurden 0,2 µl des zu färbenden mAbs (0,2mg/ml) in 50 µl Durchflusszytometriepuffer zugegeben und die Zellen für weitere 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden dreimal abzentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 500 µl PBS resuspendiert. Die finale Resuspension erfolgte mit 200 µl Durchflusszytometriepuffer. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer und eine spätere Auswertung mit Hilfe des Cellquest oder FlowJo Programms. Als Kontrolle wurden ungefärbte, bzw. mit Isotypenkontrollen gefärbte Proben verwendet.

Multimerfärbung

Für die Multimerfärbung wurden die Zellen des Blutes oder der Milz einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen, wie im Abschnitt 2.4.3 beschrieben. Anschließend erfolgte ein F_c Block, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. 2 µl des zu untersuchenden Multimers wurden mit 48 µl Durchflusszytometriepuffer verdünnt und zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei RT im

Dunkeln wurden die für die Oberflächenfärbung verwendeten mAbs in 50 µl Durchflusszytometriepuffer zugegeben und für weitere 15 min bei RT unter Lichtabschluss inkubiert. Die Zellen wurden dreimal abzentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 500 µl PBS resuspendiert. Nach der dritten Zentrifugation wurden die Zellen in 200 µl Durchflusszytometriepuffer resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert. Zur Differenzierung von antigenspezifischen von unspezifischen Zellen wurden Kontrollen von nicht immunisierten oder irrelevant immunisierten Mäusen mitgeführt. Außerdem wurden die CD19 positiven Zellen von der Analyse ausgeschlossen, da diese den Herstellerangaben zufolge unspezifische Multimerfärbung aufweisen.

Intrazelluläre Färbung

Für die Färbung von intrazellulär lokalisierten Proteinen wurde der BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit der Firma BD verwendet. Die zu färbenden Zellen wurden dazu 12 h vor Färbung in Anwesenheit von BD GolgiPlug™ (welcher Brefeldin A enthält) mit Peptiden, Proteinen oder gepulsten APCs *in vitro* restimuliert, wie im Abschnitt 2.5.5. beschrieben. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit dem mAb des Klons 2.4G2 die F_c Rezeptoren bei 4°C geblockt. Danach wurden die Oberflächenmoleküle durch Zugabe von 50 µl Durchflusszytometriepuffer mit den jeweiligen mAbs (0,2 µl bei einer Stockkonzentration von 0,2 mg/ml) für 20 min bei 4°C gefärbt und die Zellen zweimal abzentrifugiert und mit 500 µl Durchflusszytometriepuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch Resuspension in 100 µl *Fixation/Permeabilization* Lösung und Inkubation für 20 min bei 4°C. Die Zellen wurden nachfolgend zweimal abzentrifugiert und mit 500 µl BD Perm/Wash™ Puffer resuspendiert. Für die Färbung der intrazellulären Proteine wurden die Zellen mit 100 µl BD Perm/Wash™ Puffer resuspendiert, der 0,2 µl des zur intrazellulären Färbung verwendeten mAbs (0,2 mg/ml) enthielt. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min wurden die Zellen zweimal abzentrifugiert und mit 500 µl Perm/Wash™ Puffer resuspendiert. Die finale Resuspension erfolgte mit 200 µl Durchflusszytometriepuffer. Anschließend erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer. Als Kontrollen wurden mit Isotyp gefärbte Zellen, Zellen aus nicht oder irrelevant immunisierten Mäusen oder irrelevant stimulierte Zellen verwendet.

2.6. Molekularbiologische Assays

2.6.1 Bakterien

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

Genotyp: F':Tu10 proA+B+ lacIq D (lacZ) M15/recA1 end A1 gyr A96 (Nalr) thi hsd R17

(rk-mk+) glu V44 rel A1 lac. Der Originalbakterienstamm wurde von der Firma Stratagene bezogen und von Josef Mautner zur Verfügung gestellt.

DH-5 α : *Escherichia coli*-Stamm

Genotyp: F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ . Der Bakterienstamm wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

2.6.2. Gewinnung von rekombinantem c-MYC Protein

Ein Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbares Expressionsplasmid für humanes c-MYC, GFP oder Chloramphenicoltransferase wurde von Josef Mautner zur Verfügung gestellt. Einzelne Bakterienkolonien wurden gepickt, um 400 ml Superbroth Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin anzupflanzen. Die Kultur wurde bei 37°C in einem Bakterieninkubator geschüttelt, bis eine optische Dichte (OD 600) von 0,8 erreicht war. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 3 bis 6 h inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (3000 x g für 15 min) und das entstandene Pellet in 50 ml Lysepuffer gelöst. Eine weitere Zentrifugation (5000 x g für 15 min) wurde durchgeführt, um nicht lösliche Bakterienbestandteile abzutrennen. Das Lysat wurde in ein neues 50 ml Gefäß überführt und 300 μ l Nickel-NTA Agarose wurden zugegeben. Um eine Bindung der Proteine mit Hilfe des His-tag an die Nickel-NTA Agarose zu ermöglichen [139], wurde die Lösung über Nacht bei 4°C und ständigem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Agarosebeads abzentrifugiert (2000 x g für 10 min) und mit Lysepuffer gespült. Anschließend wurden die Beads durch Schwenken in Lysepuffer resuspendiert und in ein 15 ml Falcon überführt. Die Proteine wurden durch dreimalige Inkubation und Zentrifugation (10000 x g für 3 min) mit je 300 μ l Elutionspuffer eluiert und der proteinhaltige Überstand in Kryoröhrchen gesammelt. Das Eluat wurde über eine Dialysemembran für zwei Tage mit PBS dialysiert und der Proteingehalt mit Hilfe der Micro-Lowry Methode bestimmt. Anschließend wurde ein Proteinnachweis im Western Blot durchgeführt. Eine Bestimmung möglicher Lipopolysaccharidrückstände wurde nicht durchgeführt.

2.6.3. Gewinnung von Plasmid-DNA und genomischer DNA

Gewinnung von Plasmid-DNA

Das gewünschte, zu amplifizierende Plasmid wurde durch Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien des Stamms XI-1 oder Dh-5 α per Hitzeschock in diese übertragen. Bei -80°C gelagerte Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit dem gewünschten Plasmid für 20 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für eine min, mit anschließender Inkubation auf Eis für zwei min. Danach wurden die Bakterien in SOC-Medium überführt und 40 min bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 200 Rotationen pro min inkubiert. Von der Bakterienkultur wurden 100 μl auf ampicillinhaltigen LB-Agar ausgestrichen, da alle Plasmide das β -Lactamase Resistenzgen enthielten. Die Platte wurde für 16 h im Brutschrank inkubiert. Einzelne Klone wurden von der Platte gepickt und zum Ansetzen von Starterkulturen (5 ml) genutzt. Die Starterkulturen wurden nach erfolgreichem Anwachsen in Maxikulturen (250 ml) überführt und bis zum Erreichen einer OD von 0,8 bei 600 nm im Bakterieneschüttler bei 37°C inkubiert. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde ein Kit (Qiagen) eingesetzt, welches die Bakterien nach dem Prinzip der alkalischen Hydrolyse aufschließt und eine Aufreinigung über ein Säulensystem nutzt. Die DNA bindet an die Säulenmatrix, wird mehreren Reinigungsschritten unterzogen und kann in aufgereinigter Form eluiert werden. Eine Aufkonzentrierung erfolgte über Isopropanol Präzipitation, mit einem Waschritt mit 70% Ethanol. Die Plasmid-DNA wurde in bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert werden. Eine Charakterisierung der DNA erfolgte über die photometrische Bestimmung der Extinktion bei 260 und 280 nm, sowie einem Restriktionsenzymverdau mit anschließender Agarosegelelektrophorese.

Gewinnung von genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Geweben (Schwanzspitzen- oder Ohrstanzungsbiopsien) oder Zellen in Zellkultur gewonnen. Dazu wurde ebenfalls ein Kit der Firma Qiagen verwendet, der ein Säulensystem nach Zellaufschluss beinhaltet. Die Gewebestücke wurden vor DNA Aufreinigung mit Hilfe von Proteinase K verdaut. Die DNA wurde in 50 μl H_2O eluiert und bei -20°C gelagert.

2.6.4. PCR Analysen

Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde ein Mastermix mit 50 μl pro Probe angesetzt. Dazu wurde H_2O (35,7 μl bei zwei Primern, 35,2 μl bei drei Primern oder 34,7 μl bei 4 Primern im Reaktionsansatz) vorgelegt. Anschließend wurden 5 μl 10 x PCR Puffer (Invitrogen), 1 μl dNTPs (10 mM, Roche), 2 μl MgCl_2 (25 mM),

2 µl RediLoad (Invitrogen), je 0,5 µl der für die PCR benötigten Primer (10 mM) und 0,3 µl Taq Polymerase (Invitrogen) zugegeben und der Mastermix gevortext. 47 µl wurden in die PCR *tubes* vorgelegt und 3 µl genomische DNA zugegeben. Anschließend erfolgte die PCR mit den spezifischen Programmen, welche der Jax®Mice Database oder den in Abschnitt 2.3. unter den jeweiligen Mausstämmen aufgeführten Publikationen entnommen wurde. 12 µl des PCR Produkts wurden auf ein 1,5% Agarosegel geladen und per Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.6.5. Western Blot

Zur Durchführung von Western Blots wurde das XCell Sure Lock Mini Cell System und das XCell II Blot Modul in Kombination mit den NuPAGE® Puffern und Proteingelen der Firma Invitrogen genutzt. 6,5 µl der Probe wurde mit 2,5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer und 1 µl NuPAGE® Reducing Agent 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in ein 12% NuPAGE®Novex Bis-Tris SDS PAGE Gel geladen und 1 h bei 200 V und 125 mA in NuPAGE®MOPS SDS Running Buffer mit NuPAGE®Antioxidant aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF Membran per Blot transferiert. Dazu wurde das Gel aus seiner Hülle entfernt und auf der PVDF Membran positioniert. Gel und Membran wurden von Filterpapier und *Blotting Pads* umschlossen in das XCell II Blot Modul gelegt, welches anschließend mit NuPAGE®Transferpuffer aufgefüllt wurde. Der Blot erfolgte bei konstant 30 V für 1 h bei einer Ausgangsstromstärke von 170 mA. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln mit PBS 5% Trockenmilchpulver inkubiert. Die Färbung mit dem Primärantikörper erfolgte ebenfalls in PBS 5% Trockenmilchpulver für eine Dauer von 1h bei RT. Im Anschluss wurde die Membran dreimal mit PBS 0,05% Tween und nachfolgend für 1 h mit dem Sekundärantikörper, gelöst in PBS 5% Trockenmilchpulver, inkubiert. Es erfolgten drei weitere Inkubationsschritte mit PBS 0,05% Tween. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte über Chemilumineszenz, da der sekundäre Antikörper mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt war.

2.7. Statistische Analysen

Vergleich Tumorwachstumskinetik und Überlebenskurven

Zur Darstellung der Tumorwachstumskinetik nach subkutaner Lymphomzellinokulation wurde der durchschnittliche Tumordurchmesser der jeweiligen Gruppe über die Zeit abgebildet. Zu jedem Messzeitpunkt ist die Standardabweichung der Gruppe vom durchschnittlichen Tumordurchmesser angegeben. Zum Vergleich der Tumorwachstumskinetik von zwei Gruppen wurden die durchschnittlichen Tumordurchmesser der individuellen Tiere der Gruppe A am Tag x ermittelt und den durchschnittlichen Tumordurchmessern der Tiere aus Gruppe B desselben Tages mit Hilfe des Mann-Whitney Tests gegenüber gestellt. Dabei wurde eine Signifikanzschwelle von $p \leq 0,5$ gewählt. Mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt, die das Überleben (welches als Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgröße von 10 mm im Durchmesser definiert wurde) nach Tumorzellinokulation darstellen. Der Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven verschiedener Gruppen erfolgte mit Hilfe des Log-Rank Tests. Hierbei wurde ebenfalls eine Signifikanzschwelle von $p \leq 0,5$ gewählt. Die Gruppengrößen sind neben den jeweiligen Gruppennamen angegeben.

Darstellung und Vergleich der Ergebnisse nach *in vitro* Restimulation

Die Ergebnisse der ELISPOT Analysen sind als Streudiagramm mit den zugehörigen Restimulationsbedingungen auf der X-Achse und der Anzahl der Messwerte auf der Y-Achse angegeben. Jeder Punkt stellt das Ergebnis der Zellen einer individuellen Maus dar. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind im Diagramm dargestellt. Der Vergleich von der Anzahl der Punkte zwischen zwei Restimulationsbedingungen erfolgte mit dem Mann-Whitney Test (Signifikanzschwelle von $p \leq 0,5$). Die Ergebnisse der Zytokinbestimmung mit Hilfe des ELISA oder CBA sind als Balkendiagramme angegeben, wobei die im Diagramm eingezeichneten Standardabweichungen die bei Mehrfachbestimmungen auftretenden Abweichungen darstellen.

Ermittlung von Unterschieden bezüglich der Frequenz nach Messung am Durchflusszytometer

Die mit dem Durchflusszytometer ermittelten Frequenzen bestimmter Zellpopulationen sind als Streudiagramm mit der Zeit oder Immunisierungsart auf der X-Achse und der Frequenzhöhe auf der Y-Achse dargestellt. Jeder Punkt stellt das Ergebnis der Messung der Zellen einer individuellen Maus dar. Die Mittelwerte sind im Diagramm dargestellt. Der Vergleich von der Anzahl der Punkte zwischen zwei Restimulationsbedingungen erfolgte mit dem Mann-Whitney Test (Signifikanzschwelle von $p \leq 0,5$). Die *in vivo kill* Aktivität wurde analog dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. T-Zell vermittelte Abstoßung für c-MYC getriebene B-Zellymphome mit Hilfe von Modellantigenen

3.1.1. Sowohl OVA als auch GFP Expression ermöglichen Lymphomabstoßung

Die Überexpression von c-MYC wird mit einem nicht immunogenen Phänotyp von EBV infizierten B-Zellen in Verbindung gebracht [140]. Deshalb wurde die Frage gestellt, ob die murine schwach oder nicht immunogene Lymphomzelllinie 291PC, welche humanes c-MYC überexprimiert, antigenabhängig durch T-Zellen abgestoßen werden kann. 291PC wurde mit zwei Surrogatantigenen retroviral transduziert, die in anderen Modellen bereits als Abstoßungsantigene verwendet wurden [141], um die Zelllinien 291GFP und 291OVA zu erzeugen (Abb. 3.1.1.1.). Die Zelllinie 291GFP exprimiert GFP unter Kontrolle des LTR-Promotors des Maus-Stammzell-Virus. Die Zelllinie 291OVA exprimiert unter Kontrolle des gleichen LTR-Promotors sowohl OVA als auch GFP. Beide Gene sind als Transgenkassette über eine IRES verbunden.

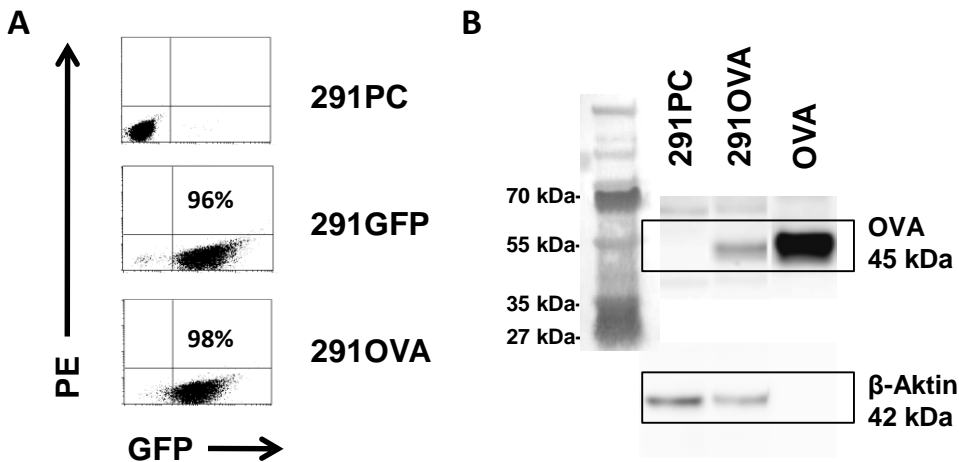


Abb. 3.1.1.1. Expressionsnachweis von Surrogatantigenen in B-Lymphomzellen.

Die GFP Expression nach retroviraler Transduktion wurde für die Zelllinien 291GFP und 291OVA durchflusszytometrisch nachgewiesen (A). OVA kann im Western Blot im 291OVA Zelllysate und in 1 µg rekombinantem OVA Protein nachgewiesen werden, nicht aber im 291PC Lysate (B). Als Kontrolle diente β-Aktin, welches auf derselben Membran im Anschluss an den OVA Nachweis detektiert wurde.

Bei subkutaner Inokulation der Tumorzellen in C57Bl/6 Mäuse mussten die 291PC Rezipienten aufgrund des Lymphomwachstums innerhalb von 21 Tagen abgetötet werden. 60% der Mäuse, welche die Zelllinie 291GFP erhielten, überlebten während eines Beobachtungszeitraumes von 100 Tagen. Die Rezipienten der Zelllinie 291OVA überlebten mit einer Rate von 75% (Abb. 3.1.1.2.). Die Injektion der Zelllinie

291OVA führte zu einem Anstieg der SIINFEKL spezifischen CD8+ T-Zellen im Blut (Abb. 3.1.1.2.C). SIINFEKL ist das immundominante Epitop des OVA Antigens [142]: Ein Anstieg der SIINFEKL spezifischen T-Zellen weist auf eine OVA spezifische Immunantwort hin. Die 291OVA Lymphome, welche in 25% der Rezipienten auswuchsen, wiesen keine Expression von OVA oder GFP bei Analyse der reisolierten Tumoren auf (Abb. 3.1.1.2.D) und waren somit Antigenverlustvarianten. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Einbringen von Modellantigenen die Immunogenität der c-MYC überexprimierenden Zelllinie erhöht und 291 Lymphomzellen abgestoßen werden können. Gleichzeitig wird deutlich, dass humanes c-MYC nicht oder schwach immunogen ist und die Expression in den Lymphomzellen keine Abstoßung bewirkt.

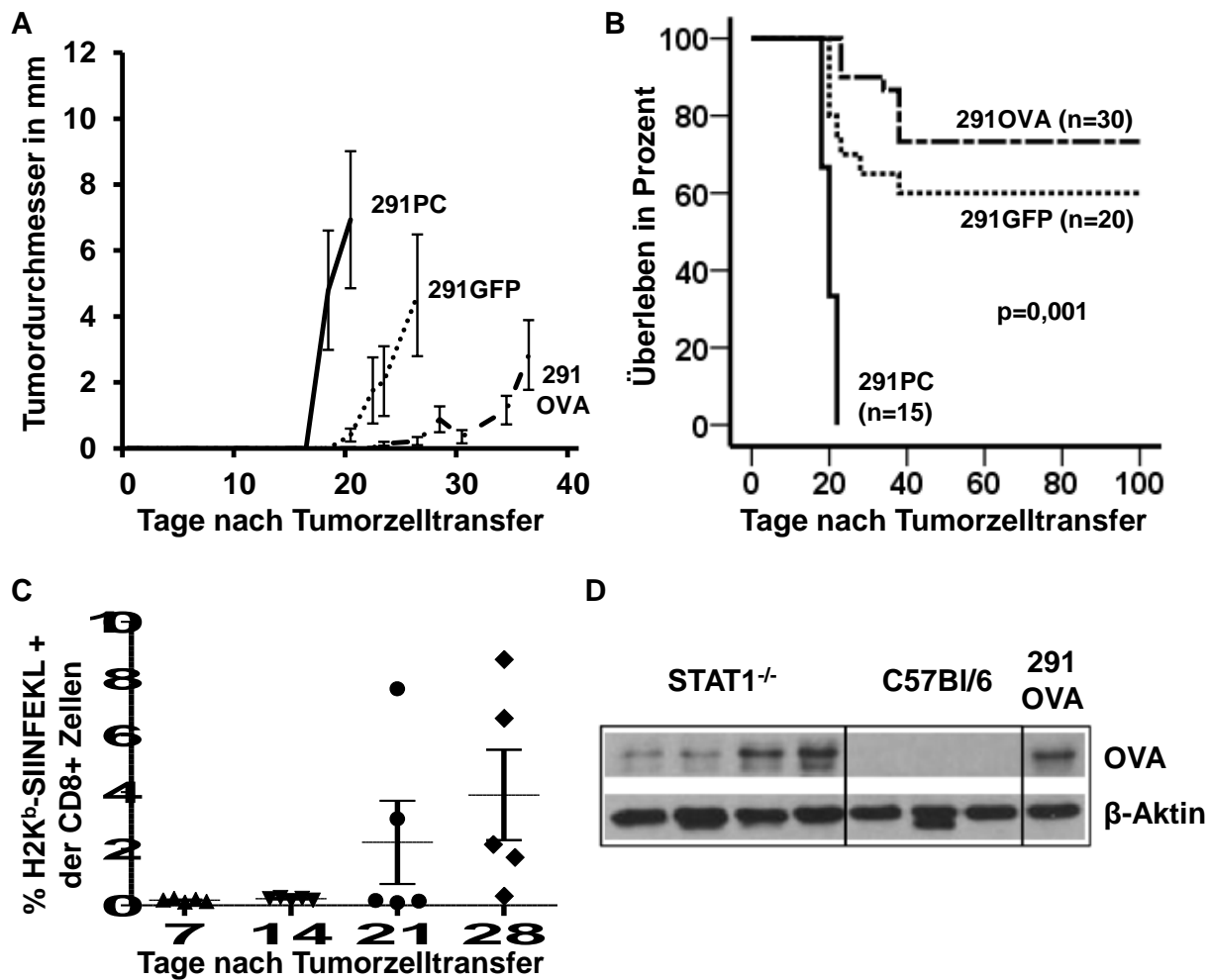


Abb. 3.1.1.2. Abstoßung von Surrogatantigen exprimierenden murinen B-Zelllymphomzelllinien.

1×10^5 Zellen der Zelllinie 291PC (ausgezogene Linie), 291GFP (gepunktete Linie) oder 291OVA (Strichpunktlinie) wurden in C57Bl/6 Mäuse injiziert und das Tumorstadium (A) und das Überleben bis zum Erreichen einer Tumorstadiumgröße von 10 mm ermittelt (B). Die Frequenz der SIINFEKL spezifischen CD8+ T-Zellen bezogen auf alle CD8+ T-Zellen wurde im Blut von 5 Mäusen 7, 14, 21 und 28 Tage nach Injektion von 291OVA Zellen bestimmt (C). Die in C57Bl/6 Mäusen ausgewachsenen Lymphome weisen einen Verlust der OVA Expression im Western Blot auf, während die *in vitro* kultivierte 291OVA Linie oder die in STAT1^{-/-} Mäusen gewachsenen Lymphome OVA exprimieren (D).

3.1.2. Lymphomabstoßung erfordert IFN γ

Da sowohl der Anstieg der antigenspezifischen T-Zellen im peripheren Blut als auch das Auftreten von Antigenverlustvarianten auf T-Zellen als Vermittler der Lymphomabstoßung hindeuten, rückte die Wirkung des Zytokins IFN γ und seine Rolle in der Lymphomabstoßung in den Fokus der Untersuchungen, da in anderen Modellsystemen IFN γ als kritische Komponente einer T-Zellvermittelten Abstoßung identifiziert wurde [143]. Die Frage, ob und wie IFN γ die Lymphomabstoßung der Zelllinie 291OVA beeinflusst, wurde durch Lymphomtransferexperimente in verschiedenen, transgenen Mauslinien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die OVA bedingte Abstoßung in IFN γ ^{-/-} (Abb. 3.1.2.1.A), STAT1^{-/-} und IFN γ R^{-/-} (Abb. 3.1.2.1.B) Mäusen nicht erfolgte. Die Überlebenskurven der 291OVA injizierten Mäuse unterschieden sich nicht signifikant von denen der 291PC inokulierten Mäuse.

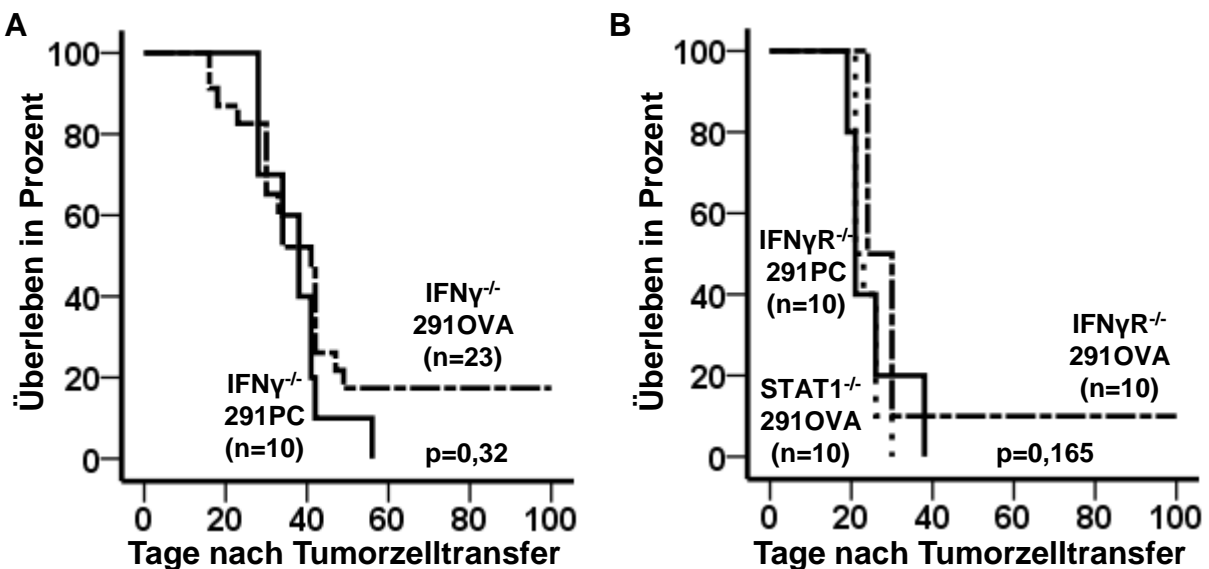


Abb. 3.1.2.1. Keine surrogatantigenvermittelte Abstoßung in STAT1^{-/-}, IFN γ ^{-/-} und IFN γ R^{-/-} Mäusen.

Die Zelllinien 291PC (ausgezogene Linie, n=10) und 291OVA (Strichpunktlinie, n=23) wurden in IFN γ ^{-/-} Mäuse injiziert und die Mäuse beim Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgroße von 10 mm Durchmesser abgetötet (A). Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mit Hilfe des Log-Rank Tests miteinander verglichen und der p Wert im Diagramm dargestellt. In B wurde die Zelllinie 291PC in IFN γ R^{-/-} Rezipienten (gepunktete Linie, n=10) injiziert und die Überlebenswahrscheinlichkeit mit IFN γ R^{-/-} Rezipienten verglichen, welche 291OVA Zellen erhalten hatten (Punktstrichlinie, n=10). 291OVA wurde zusätzlich auch in STAT1^{-/-} Rezipienten injiziert (ausgezogene Linie, n=10) und wurde in keiner der Empfängerlinien abgestoßen.

Die aus IFN γ ^{-/-} und IFN γ R^{-/-} Rezipienten isolierten 291OVA Lymphome wiesen einen Verlust der GFP Expression auf (Abb. 3.1.2.2.). Dies kann als Verlust der OVA Expression interpretiert werden kann, da für alle 291OVA Lymphome, welche aus C57Bl/6 Wildtypmäusen isoliert und im Western Blot negativ für OVA waren, keine GFP Expression im Durchflusszytometer nachgewiesen werden konnte. Dies bedeutet,

dass die antigenexprimierenden Lymphomzellen in IFN γ ^{-/-} und IFN γ R^{-/-} Rezipienten abgestoßen werden. Die Antigenverlustvarianten konnten allerdings nicht erfolgreich eliminiert werden und führten zum Auswachsen des Lymphoms. Trotz der Abstoßung der Antigen exprimierenden Tumorzellen resultierte daraus kein verbessertes Überleben im Vergleich zu C57Bl/6 Wildtyp Mäusen, die mit der Zelllinie 291PC inokuliert worden waren.

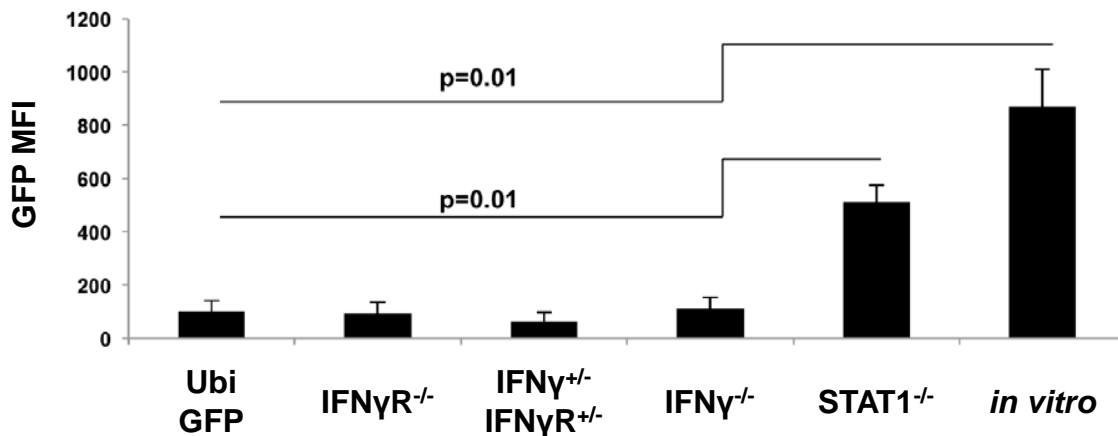


Abb. 3.1.2.2. Verlust der Surrogatantigenexpression verhindert nicht das Tumorwachstum.

Die Zelllinie 291OVA wurde parallel in verschiedene Mausstämmen injiziert, die Lymphome nach Auswachsen isoliert und im Durchflusssystem auf ihre GFP Expression im Vergleich zur *in vitro* kultivierten Zelllinie analysiert.

Dass IFN γ einen tumorprotektiven Effekt ausübt, indem es auf die Zellen des Tumorrezipienten wirkt und so das Auswachsen von Antigenverlustvarianten des Tumors verhindert, war bereits in einem Fibrosarkommodell gezeigt worden [143]. Um zu prüfen, ob IFN γ seine Wirkung auf die Tumorzellen oder die Zellen des Empfängers entfaltet, wurde eine IFN γ R defiziente Tumorzelllinie (50PC) aus einer λ -MYC und IFN γ R^{-/-} transgenen Maus generiert. Diese Zelllinie wurde anschließend mit dem gleichen OVA-IRES-GFP Expressionskonstrukt retroviral transduziert, welches für die Generierung der Zelllinie 291OVA verwendet wurde. Die so erhaltene Zelllinie 50OVA wurde in C57Bl/6 Wildtypmäuse und STAT1^{-/-} Mäuse inokuliert. Gleichzeitig wurde die Zelllinie 50PC parallel in C57Bl/6 Wildtypmäuse inokuliert und das Lymphomwachstum und Überleben mit den Rezipienten der 50OVA Linie verglichen. 92,3% der C57Bl/6 Wildtyprezipienten konnten die Zelllinie 50OVA abstoßen (Abb. 3.1.2.3.). Im Gegensatz hierzu war in STAT1^{-/-} Rezipienten keine Abstoßung beobachtbar. C57Bl/6 Wildtyprezipienten der Zelllinie 50PC wiesen keine Abstoßung auf. Dies zeigt, dass IFN γ nicht direkt auf die Tumorzellen, sondern auf die Zellen des

Empfängers wirkt, um das Auftreten von Antigenverlustvarianten zu verhindern. Gleichzeitig bedeutet dies als *proof of principle*, dass T-Zellen in der Lage sind immunogene B-Zelllymphomzellen abzustößten und dass für eine erfolgreiche Abstoßung IFN γ als Effektormolekül benötigt wird.

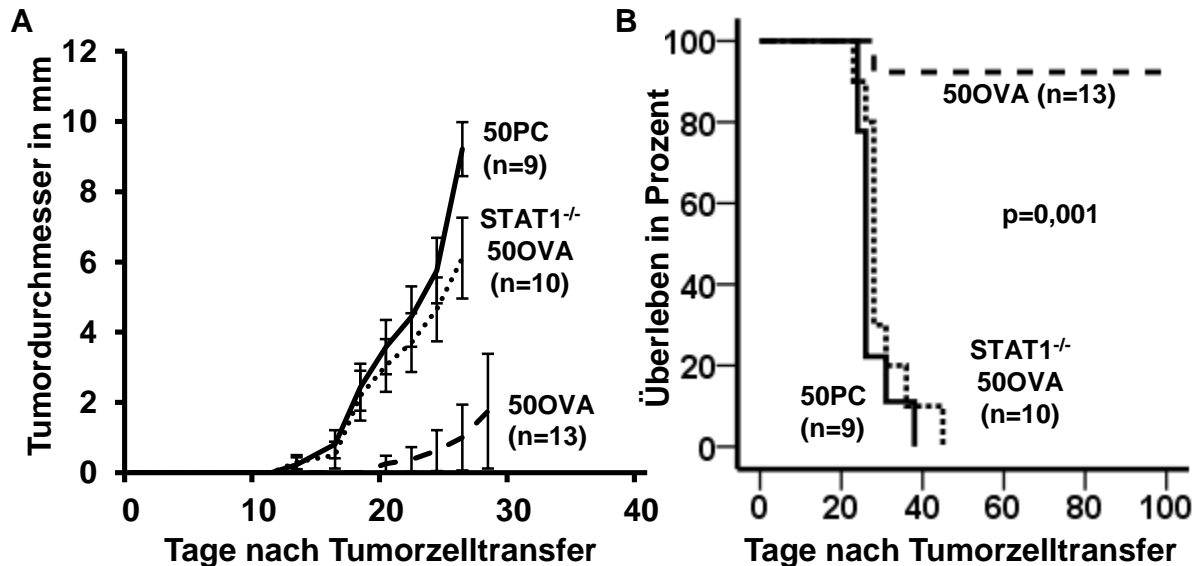


Abb. 3.1.2.3. IFN γ R-defiziente B-Zelllymphome werden antigenabhängig abgestoßen.

Die Zelllinie 50OVA wurde in C57Bl/6 Wildtyp (gestrichelte Linie) und STAT1^{-/-} (gepunktete Linie) Mäuse injiziert und das Tumorstadium (A) und Überleben (B) mit C57Bl/6 Wildtyprezipienten der Zelllinie 50PC (ausgezogene Linie) verglichen.

In den bisherigen Ergebnissen zeigte sich, dass humanes c-MYC nicht das immunogene Potential wie z.B. OVA besitzt, um eine Abstoßung der B-Zelllymphomzellen zu gewährleisten. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass humanes c-MYC im H2^b MHC-Kontext der C57Bl/6 Maus schwach oder nicht immunogen ist. Eine Möglichkeit, die Immunreaktion gegen ein Antigen zu erhöhen, besteht in der Durchführung von Immunisierungen mit dem entsprechenden Antigen in Gegenwart von Adjuvantien. Deshalb muss als nächstes untersucht werden, ob sich durch Immunisierung eine c-MYC spezifische T-Zellantwort induzieren lässt. Wenn ja, soll untersucht werden, ob diese T-Zellantwort das Lymphomwachstum in den immunisierten Tieren beeinflusst.

3.2. Humanes c-MYC als Zielantigen: Homologievergleich und Epitopvorhersage im H2^b MHC-Kontext

3.2.1. Humanes und murines c-MYC sind zu 90% homolog

Da humanes c-MYC ein Xenoantigen in der Maus ist, entgehen zumindest die nicht homologen Bereiche zwischen humanen und murinen c-MYC der zentralen Toleranz. Es stellte sich daher die Frage, ob das immunogene Potential des humanen c-MYC im H2^b MHC-Kontext eine c-MYC spezifische T-Zellantwort durch Immunisierung induzieren kann. Zur Einschätzung des immunogenen Potentials möglicher Epitope wurde die Aminosäuresequenz des humanen c-MYC (p67) mit der Sequenz des murinen c-MYC per Sequenzanalyse verglichen (Abb. 3.2.1.).

		Identische Aminosäuren = 409/455 (89,9%)			
			NHP-A		
Mensch	1	MDFFRVVENQQPPAT	TMPLNVSFTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSEIQPPAP	60	
Maus	1	...LWAL.TP.TAT.....N.....I.....H.....		60	
			NHP-E		
Mensch	61	SEDIWKKFELLPTPPLSPSRRSGLCS	PSYVAV-TPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLEMVTE	119	
Maus	61A.S..P.E.D.....N.....M..		120	
			NHP-G		
Mensch	120	LLGGDMVNQSFICDPDEETFNIKNI IQDCMWSGFSAAAKLVSEKLAS	YQAARKDSGSPNP	179	
Maus	121T.LS.		180	
			NHP-G	NHP-H	NHP-B
Mensch	180	ARGHSVCS	TSSLYLQDLSAAAASEC	IDPSVVFYPLN	DSSSPKSCASQDSSAFSPSSDSL
Maus	181T.....T.S..T.....			239
			NHP-B		NHP-C
Mensch	240	SSTESSPQGSPEPLVL	HEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVS	VEKRQAPGKRSESGSPSA	
Maus	240	..-...RA.....T.A.....SPS			299
			NHP-C		NHP-F
Mensch	300	GGHKKP	PHSPLVLKRCHVSTHQHNYAAPSTRKDY	PAAKRVKLDVVRVLRQISNNRCKTS	
Maus	300	R.....A...G...K.....S.			359
			NHP-F		NHP-D
Mensch	360	PRSSDTEENVKRRTHNV	LERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKA	TAYIL	
Maus	360D.....			419
			NHP-D		
Mensch	420	SVQAEEQKLISEEDLLRKRREQ	LKHKLEQLRN	SCA	454
Maus	420	.I..D.H..T..K.....G.			454

Abb. 3.2.1.: Gegenüberstellung der humanen und murinen Sequenz des c-MYC Proteins.

Das Ergebnis der Proteinsequenzanalyse des humanen und murinen c-MYC Proteins zeigt die Unterschiede der Sequenzen in den Zeilen der Maussequenz als fett gedruckte Buchstaben. Die Peptide (NHP-A bis NHP-H), welche die nicht homologen Bereiche überspannen und für spätere Immunisierungsexperimente genutzt wurden, sind eingerahmt. Lücken in den Sequenzen sind durch ein Minuszeichen dargestellt.

Das Ergebnis zeigt die komplette menschliche Sequenz in schwarzer Schrift im Einbuchstabencode. Sofern die korrespondierende AS an der jeweiligen Position übereinstimmt, ist die murine Sequenz in Punkten dargestellt. Falls ein Sequenzunterschied an einer Position vorhanden ist, wird anstelle des Punktes der Buchstabe der abweichenden AS dargestellt. Die Gesamtzahl der identischen AS in beiden Proteinen beträgt 409 von insgesamt 455, was einer Homologierate von 89,9% entspricht. Die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen sind über das gesamte Protein verteilt. Zur Untersuchung der Immunogenität der nicht homologen Bereiche wurden acht Peptide (nicht homologe Peptide, NHP-A bis NHP-H) synthetisiert, welche nicht homologe Abschnitte in ihrer Sequenz enthalten. Diese Peptide weisen eine Länge von 13 bis 41 AS auf und sind in Abb. 3.2.1. in Bezug auf ihre Position im Gesamtprotein dargestellt.

3.2.2. Die Epitopvorhersage zeigt potentiell immunogene Epitope auf

Um eine T-Zellantwort zu induzieren, müssen die verwendeten NHPs von APCs aufgenommen und auf den MHC-Molekülen präsentiert werden. Eine direkte Bindung an MHC I Moleküle ist aufgrund der Länge der NHPs (>11 AS) ausgeschlossen. Für die Präsentation der Peptide durch MHC I muss daher eine Prozessierung der langen Peptide zu den endgültigen Epitopen erfolgen. Durch die Nutzung von Epitopvorhersageprogrammen wurden für jedes Peptid mögliche Epitope für die verschiedenen, in der C57Bl/6 Maus vorkommenden, MHC-Moleküle berechnet (Tabelle 1). Für MHC I sind die Epitope dargestellt, die die beste berechnete Affinität zum H2-D^b oder H2-K^b Molekül aufweisen (<500 nM). Zudem sind nur die Epitope dargestellt, die einen Unterschied in ihrer Aminosäuresequenz im Vergleich zwischen humanem und murinem c-MYC aufweisen. Die H2-IA^b restringierten Epitope sind mit der Kernsequenz der Vorhersage abgebildet. Für das H2-IA^b Molekül ist eine exakte Vorhersage bisher nicht möglich, da die Länge der Peptide im Gegensatz zu MHC I restringierten Epitopen nicht genau festgelegt ist, sondern ein variabler Peptidbestandteil aus der Bindungsstelle von Peptid und MHC II Molekül herausragen kann. Deshalb wurde für jedes NHP das Epitop dargestellt, welches die stärkste, berechnete Affinität zum H2-IA^b Molekül aufweist. Somit ergibt sich eine hohe theoretische Wahrscheinlichkeit für immunogene Epitope bei NHP-A, NHP-B und NHP-E. Für NHP-C, NHP-D, NHP-F, NHP-G und NHP-H ist das immunogene Potential in Bezug auf die Affinität des Epitops zum MHC-Molekül der Vorhersage nach gering. Alle vorhergesagten Epitope weisen eine Affinität zu ihrem jeweiligen MHC Liganden auf, die mehr als 50 nM beträgt. Dies bedeutet, dass alle Epitope als schwache Bindungspartner zu bewerten sind und ihr immunogenes Potential aufgrund der Vorhersageprogramme gering ist.

NHP	Sequenz	MHC	Kernsequenz	Unterschiede Mensch -> Maus	Affinität Peptid-MHC
A	TMPLNV <u>S</u> FTNRNYDLDYDSVQPYFY <u>C</u> DE EENFY <u>Q</u> QQQQSEL	H2-D ^b H2-K ^b H2-IA ^b	V <u>S</u> FTNRNYDL V <u>S</u> FTNRNYDL LNV <u>S</u> FTNRN	S->N S->N S->N	410 nM 82 nM 408 nM 40 AS
B	DSSSPKSCA <u>S</u> QDSSAFSPSSDLLS <u>(T)</u> ESS P <u>Q</u> GSPEPLVL	H2-D ^b H2-K ^b H2-IA ^b	SSP <u>Q</u> GSPEPL <u>S</u> AFSPSSDLL FSPSSDLL	Q->R, G->A S->T	248 nM 176 nM 458 nM 30 AS
C	VEKRO <u>A</u> P <u>G</u> KRSESGSPSAGGHSKP	H2-IA ^b	SESG <u>S</u> PSAG	P->S, S->P, A->S, G->A	>1,4 µM 24 AS
D	TAYIL <u>S</u> V <u>Q</u> A <u>E</u> E <u>Q</u> KL <u>I</u> SEEDLLRKRREQL	H2-IA ^b	YIL <u>S</u> V <u>Q</u> A <u>E</u> E	V->I, E->D	>7 µM 15 AS
E	PSYVAV(<u>I</u>) <u>T</u> PF <u>S</u> L <u>R</u> G <u>D</u> N <u>D</u> GGGG <u>S</u> FSTADQ LEM <u>V</u> TELLG	H2-K ^b H2-IA ^b	VAV(<u>I</u>) <u>T</u> PF <u>S</u> YVAV(<u>I</u>) <u>T</u> PF <u>S</u>	->A, P->S, L->P ->A, P->S, L->P	322 nM 224 nM 36 AS
F	PAAKR <u>V</u> KLDSVRVL <u>R</u> QISNNRK <u>C</u> SPRSS DTEEN <u>V</u> KRRTHNV	H2-IA ^b	RK <u>C</u> SPRSS	T->S	>2,7 µM 40 AS
G	YQAARKD <u>S</u> G <u>S</u> PNPARGHVS <u>C</u> S	H2-IA ^b	KD <u>S</u> G <u>S</u> PN <u>P</u> A	G->T, P->L, N->S	>1,2 µM 21 AS
H	LYLQDL <u>S</u> AAASEC	H2-IA ^b	YLQDL <u>S</u> AAA	S->T	>1,1 µM 13 AS

Tabelle 1: Auflistung der nicht homologen Peptide A bis H mit den darin enthaltenen Epitopen.

Die vollständige Aminosäuresequenz der einzelnen NHPs ist in Spalte zwei aufgeführt, wobei unterstrichene (AS-Austausch) und eingeklammerte (Lücke in der AS-Sequenz) Buchstaben Unterschiede zur murinen Sequenz darstellen. Für jedes der in Spalte drei enthaltenen Moleküle wurde das Epitop mit der besten Bindungsaffinität zum jeweiligen MHC-Molekül dargestellt. Die Sequenz des Epitops ist in der Spalte vier aufgelistet, gefolgt von den Unterschieden der AS-Sequenz zwischen Maus und Mensch in Spalte fünf und der vorhergesagten Affinität in der letzten Spalte. Für MHC II Epitope ist die Länge des Liganden nach der Affinität in AS angegeben.

3.3. Die Immunisierung mit humanem c-MYC Protein induziert eine T-Zellantwort in C57Bl/6 Mäusen

3.3.1. Spezifische IFN γ Sekretion nach c-MYC Immunisierung

Zur Beantwortung der Frage, ob humanes c-MYC im H2-^b Kontext eine T-Zellantwort induziert, wurden C57Bl/6 Mäuse zweimal in einem Abstand von drei Wochen immunisiert, wie in Abschnitt 2.4.1. beschrieben. Das verwendete Vakzin setzte sich aus rekombinantem humanem c-MYC Protein und den Adjuvantien CpG ODN1826 und IFA zusammen. Sieben Tage nach der zweiten Vakzinapplikation (Boost) wurden die Zellen der inguinalen Lymphknoten und der Milz entnommen, mit CD90.2 mAb immunomagnetisch angereichert und *in vitro* mit APCs inkubiert. Als Nachweis für eine spezifische Reaktion wurde die Anzahl der IFN γ sezernierenden Zellen von 1×10^5 CD90.2 selektierten Zellen 48 h später per ELISPOT bestimmt und die Ergebnisse aus vier Experimenten zusammengefasst (Abb. 3.3.1.1.A). Die Negativkontrolle, die Restimulation ohne APCs (w/o), ergab eine durchschnittliche Anzahl IFN γ sezernierender Zellen von 2 pro 1×10^5 T-Zellen. Bei Restimulation mit humanem c-MYC Protein gepulsten APCs wurden 156 IFN γ sezernierende Zellen pro 1×10^5 T-Zellen ermittelt.

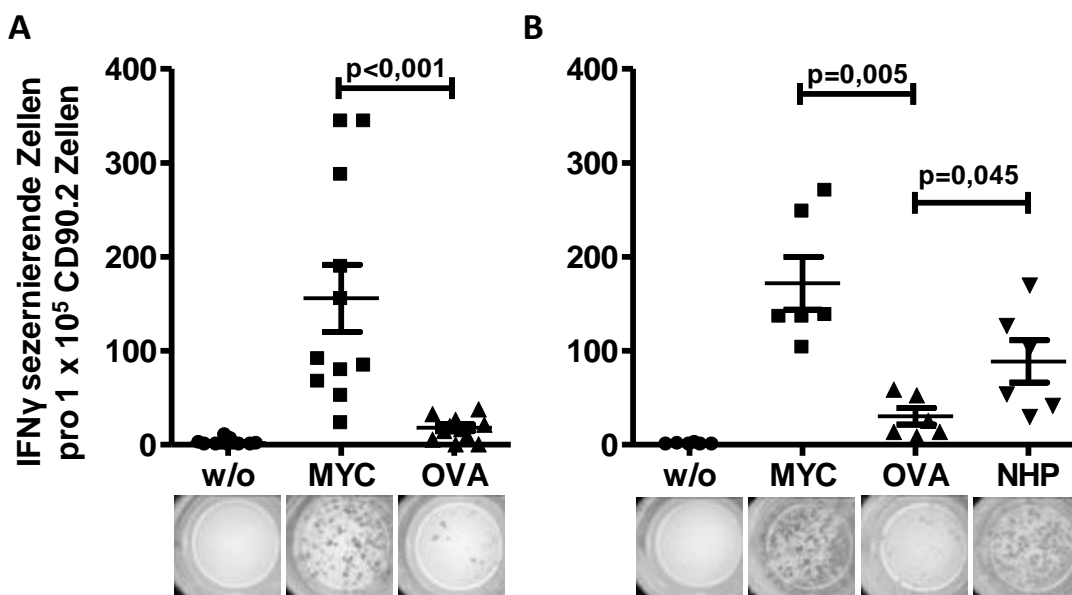


Abb. 3.3.1.1. Nachweis IFN γ sezernierender T-Zellen nach Immunisierung und *in vitro* Restimulation. C57Bl/6 Mäuse wurden mit einer doppelten Immunisierung mit MYC Protein (A) oder einem alternierenden Vakzin (Prime mit c-MYC Protein, Boost mit NHP-Pool, B) vakziniert. Sieben Tage nach Boost wurden 1×10^5 CD90.2 selektierte Milzzellen *in vitro* mit oder ohne (w/o) APCs restimuliert. Die APCs wurden 24 h zuvor mit c-MYC (MYC), OVA oder einem NHP-Pool (NHP) gepulst. Die Bestimmung der Anzahl der IFN γ sezernierenden Zellen erfolgte nach 48 h. Repräsentative Bilder des ELISPOT sind unter den zugehörigen Restimulationsbedingungen abgebildet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind als Balken dargestellt und wurden mit Hilfe des Mann-Whitney Tests miteinander verglichen.

Bei der Restimulation mit irrelevanten Kontrollprotein (OVA) gepulsten APCs wurden 18 IFN γ sezernierende Zellen pro 1×10^5 T-Zellen ermittelt. Der statistische Vergleich der Anzahl der IFN γ sezernierenden Zellen zwischen der MYC restimulierten mit der OVA restimulierten Gruppe ergibt einen stark signifikanten Unterschied (MYC vs. OVA $p < 0,001$).

Aufgrund der im Thymus stattfindenden Negativselektion sind potentiell immunogene Epitope voraussichtlich in den nicht homologen Bereichen zwischen humanem und murinem c-MYC Protein positioniert. Um das immunogene Potential nicht homologer Bereiche zu untersuchen, wurden C57Bl/6 Mäuse mit einem alternierenden heterotypischen Vakzinierungsprotokoll behandelt. Dieses bestand aus einer Immunisierung mit komplettem humanem c-MYC Protein, gefolgt von einer Boostimmunisierung nach drei Wochen mit einem Gemisch aus allen NHPs. Sieben Tage nach Boostimmunisierung wurden CD90.2 selektionierten Milzzellen *in vitro* restimuliert. Eine erhöhte IFN γ Sekretion wurde bei Restimulation mit c-MYC oder NHP gepulsten APCs im Vergleich zu mit irrelevanten Kontrollprotein (OVA) gepulsten APCs postuliert. Die Analyse der Ergebnisse von drei Experimenten (Abb. 3.3.1.1.B) ergibt eine mittlere Anzahl von IFN γ sezernierenden Zellen pro 1×10^5 T-Zellen ohne Stimulation mit APCs von 0,5. Bei Restimulation mit c-MYC gepulsten APCs stieg die Spotzahl auf 171,8, im Vergleich zu 30,2 bei Restimulation mit OVA gepulsten APCs oder 88,7 bei Restimulation mit NHP gepulsten APCs. Ein signifikanter Unterschied bei der Anzahl der IFN γ sezernierenden Zellen ergibt sich für die Restimulation mit c-MYC gepulsten APCs im Vergleich zu OVA gepulsten APCs (MYC vs. OVA $p = 0,005$), was zugleich das Ergebnis von Abb. 3.3.1.1.A reproduziert. Auch ergibt sich für die Anzahl der IFN γ sezernierenden Zellen ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Restimulation von OVA gepulsten APCs mit der Restimulation von NHP gepulsten APCs (OVA vs. NHP $p = 0,045$).

Zusätzlich zur ELISPOT-Analyse wurde die Zytokinkonzentration im Überstand durch ELISA oder CBA bestimmt. Dazu wurden die ZKÜs von CD90.2 selektionierten Milzzellen einer naiven Maus mit denen einer c-MYC-NHP und einer OVA immunisierten Maus nach 48 h Kokultivierung mit verschiedenen gepulsten APCs analysiert (Abb. 3.3.1.2.). Bei alleiniger Inkubation der CD90.2 angereicherten Milzzellen konnte kein IFN γ im Überstand nachgewiesen werden. Durch Kokultivierung von T-Zellen aus nicht immunisierten Mäusen mit den verschiedenen gepulsten APCs wurde eine IFN γ Sekretion induziert, die eine Konzentrationen bis zu 540 pg/ml erreichte. Die Restimulation der T-Zellen der OVA immunisierten Maus mit OVA gepulsten APCs induzierte eine IFN γ Konzentration im ZKÜ von 2160 pg/ml, während bei Restimulation mit c-MYC oder NHP-Pool gepulsten APCs IFN γ Konzentrationen unter 300 pg/ml gemessen wurden. Für die Zellen der c-MYC-NHP immunisierten Maus konnten die höchsten IFN γ Konzentrationen bei Restimulation mit c-MYC gepulsten APCs (1950 pg/ml) und NHP-Pool gepulsten

APCs (1610 pg/ml) gemessen werden. Zusammengefasst induziert eine Kokultivierung von gepulsten APCs mit T-Zellen nach OVA als auch nach c-MYC-NHP Immunisierung eine spezifische IFN γ Sekretion.

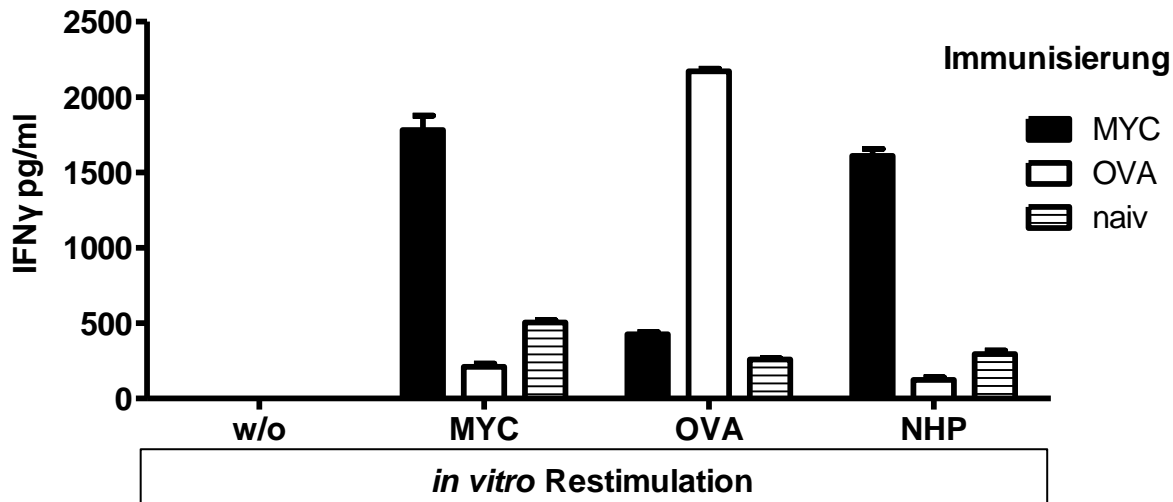


Abb. 3.3.1.2. IFN γ ELISA zeigt eine immunisierungsspezifische Sekretion nach *in vitro* Simulation.

CD90.2 selektionierte Milzzellen einer c-MYC-NHP immunisierten (MYC, schwarze Balken), einer OVA immunisierten (OVA, weiße Balken) oder einer nicht immunisierten (naiv, gestreifte Balken) Maus wurden allein (w/o) oder mit c-MYC (MYC), OVA oder NHP-Pool (NHP) gepulsten APCs *in vitro* für 48 h restimuliert. Die IFN γ Konzentrationen wurden aus dem ZKÜ mittels ELISA bestimmt. Die Standardabweichung gibt die Schwankung der Mehrfachbestimmungen des zur Zytokinbestimmung verwendeten Tests an.

3.3.2. Immunisierung mit c-MYC, CpG und IFA erzeugt eine T_H1 Antwort

Im ELISPOT und ELISA konnte eine c-MYC spezifische T-Zellantwort nach Immunisierung durch den Nachweis von IFN γ Sekretion gezeigt werden. Um diese Antwort in Hinsicht auf weitere, von den T-Zellen spezifisch gebildete, Zytokine zu charakterisieren, wurde ein CBA genutzt. Dieser Test erlaubt die simultane Bestimmung von mehreren Zytokinen. IL2, IL4, IL5, IFN γ und TNF α wurden bestimmt, um zwischen T_H1 und T_H2 Immunantworten unterscheiden zu können (Abb. 3.3.2.).

Wie in den vorherigen Experimenten konnte eine immunisierungsspezifische IFN γ Sekretion nachgewiesen werden. Die T-Zellen der c-MYC-NHP immunisierten Maus sezernierten IFN γ mit Konzentrationen von jeweils 866 und 904 pg/ml bei Restimulation mit c-MYC oder NHP-Pool gepulsten APCs im Vergleich zu 77 und 132 pg/ml bei Restimulation mit unbeladenen oder OVA gepulsten APCs. Die Zellen der OVA immunisierten Maus produzierten 519 pg/ml IFN γ bei Restimulation mit OVA gepulsten APCs und bei allen weiteren Kontrollrestimulationsansätzen von unter 21 pg/ml. Der Nachweis für eine immunisierungsspezifische TNF α Sekretion konnte nicht geführt werden, da die APCs selbst eine

Quelle für TNF α darstellten (TNF α Konzentration >1 ng/ml für alle Stimulationsbedingungen). In keinem ZKÜ ließen sich die T_H2 Zytokine IL4 und IL5 nachweisen. Für IL2 konnten Konzentrationen von 27 und 29 pg/ml gemessen werden, wenn die T-Zellen der c-MYC-NHP immunisierten Maus mit c-MYC oder NHP-Pool gepulsten APCs restimuliert wurden. Die T-Zellen der OVA immunisierten Maus sezernierten IL2 nur bei Restimulation mit OVA gepulsten APCs mit einer Konzentration von 12 pg/ml.

Zusammengefasst zeigte sich, dass die T-Zellen, die durch Immunisierung mit einer aus c-MYC (bzw. OVA), CpG ODN1826 und IFA zusammengesetzten Vakzine induzierten worden waren, einen T_H1 und nicht einen T_H2 Phänotyp aufwiesen.

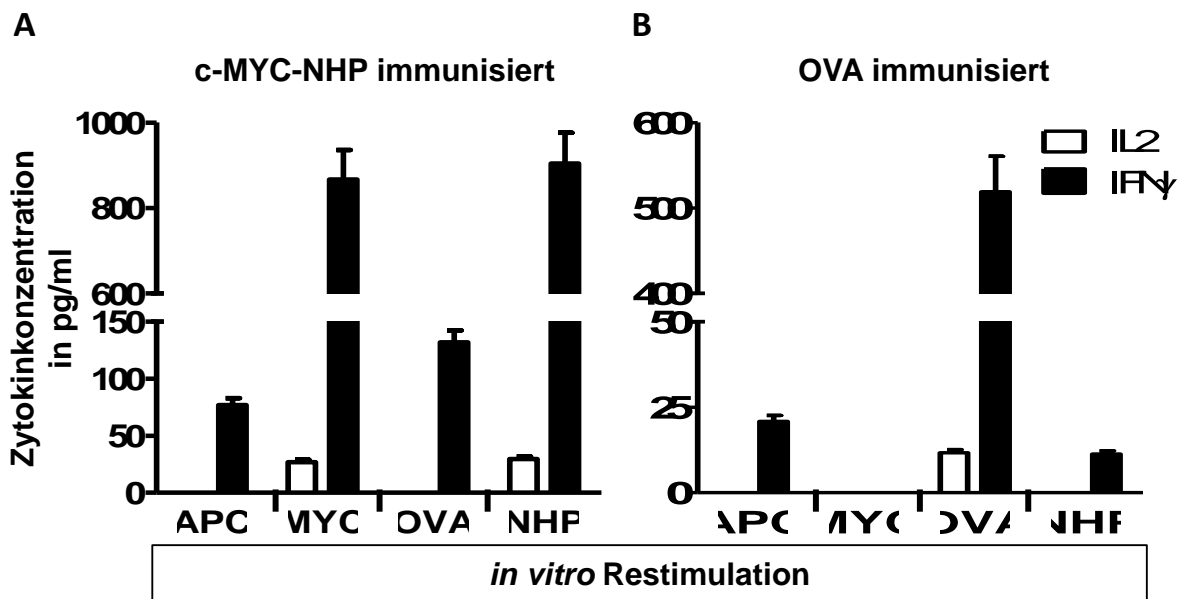


Abb. 3.3.2. CBA zeigt ein T_H1 Zytokinprofil im ZKÜ nach *in vitro* Restimulation.

CD90.2 selektionierte Milzzellen einer c-MYC-NHP (A) und einer OVA (B) immunisierten Maus wurden mit unbeladenen APCs (APC) oder mit gepulsten APCs (MYC, OVA oder NHP) kultiviert. Die Konzentrationen wurden für die Zytokine IL2 und IFN γ nach 48 h Kokultivierung mittels CBA bestimmt. Die Standardabweichung gibt die Schwankung der Mehrfachbestimmungen des zur Zytokinbestimmung verwendeten Tests an.

3.3.3. Sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen zeigen eine c-MYC spezifische Antwort

Im Weiteren sollte untersucht werden, welche T-Zellkompartimente an der Bildung der c-MYC spezifischen T-Zellantwort beteiligt sind. Hierzu wurden Milzzellen aus c-MYC immunisierten Mäusen mit c-MYC oder OVA gepulsten APCs *in vitro* restimuliert und anschließend bezüglich der intrazellulären Expression von IFN γ durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.3.3.). Die Durchflusszytometrie erlaubt

neben der Bestimmung von IFN γ die gleichzeitige Färbung der T-Zelloberflächenmarker CD4 und CD8. Um die Fähigkeit der APC zur Kreuzpräsentation von exogen zugegebenen Proteinen zu erhöhen, wurden die APCs mit einem Immunkomplex bestehend aus c-MYC spezifischem mAb (Klon 9E10, Maus IgG1) und humanem c-MYC Protein inkubiert. Der Antikörper wurde ebenfalls bei Inkubation der APCs mit OVA Protein als Kontrolle zugegeben. Die Frequenz der IFN γ positiven Zellen im CD4+ T-Zellkompartiment bei Restimulation mit c-MYC betrug 1,55% im Vergleich zu 0,19% bei Restimulation mit OVA oder 0,24% bei der Isotypenkontrollfärbung. Die Frequenz der IFN γ positiven CD8+ T-Zellen betrug nach Restimulation mit c-MYC 2,8%, nach Restimulation mit OVA 0,2% und bei Färbung mit der Isotypenkontrolle 0,22%.

Das bedeutet, dass die c-MYC reaktiven T-Zellen sowohl vom CD4+ als auch vom CD8+ T-Zellkompartiment gebildet werden.

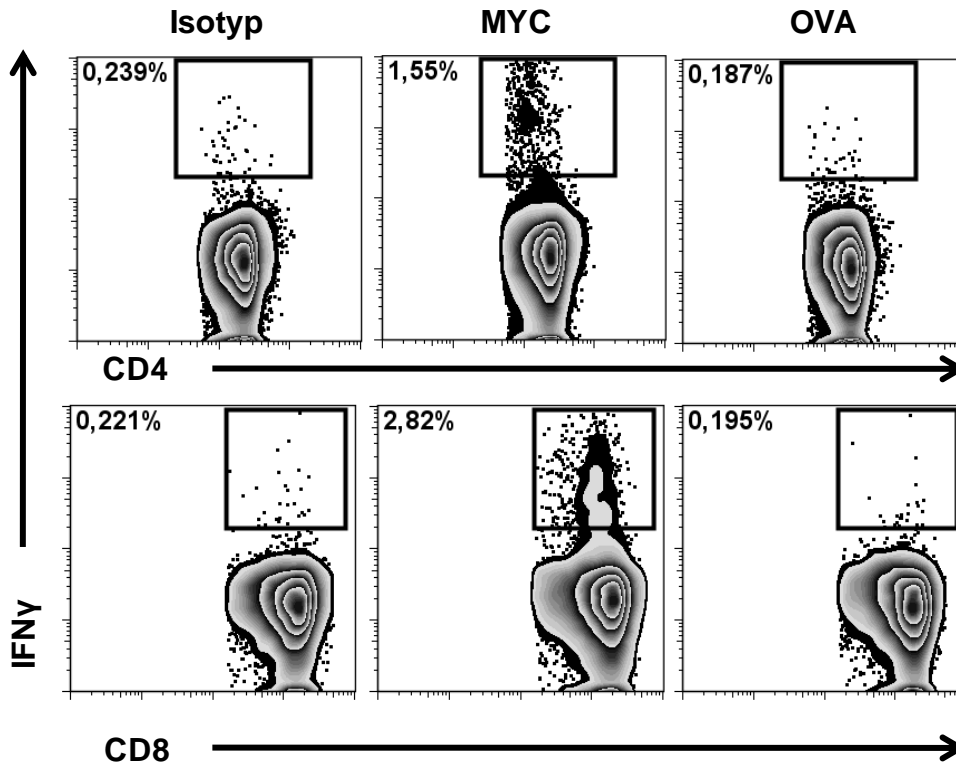


Abb. 3.3.3. c-MYC spezifische T-Zellen exprimieren nach *in vitro* Restimulation intrazellulär IFN γ .

Milzzellen von zwei c-MYC immunisierten Mäusen wurden vereint und *in vitro* mit c-MYC (mittlere Spalte) oder OVA (rechte Spalte) gepulsten APCs 12 h restimuliert. Nach Färbung der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 mit spezifischem mAb wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem IFN γ spezifischen Antikörper oder einer Isotypenkontrolle (linke Spalte) gefärbt. Die Zellen wurden per FSC / SSC aufgetrennt. Die CD4+ T-Zellen sind in der oberen und die CD8+ T-Zellen in der unteren Reihe dargestellt.

3.4. Identifizierung immunogener Epitope des humanen c-MYC Proteins im H2^b Kontext

3.4.1. NHP-A, NHP-B und NHP-E induzieren eine CD4 Antwort

Aufgrund der Beobachtung, dass die durch c-MYC Immunisierung induzierte T-Zellantwort sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen umfasst, stellte sich die Frage welche NHPs diese Antworten induzieren. Dazu wurden mit jedem NHP Immunisierungen in Analogie zu den c-MYC Proteinimmunisierungen durchgeführt, wobei der Proteinbestandteil der Vakzine durch ein individuelles NHP ersetzt wurde. Sieben Tage nach Boostimmunisierung wurden die Zellen der Milz und inguinalen Lymphknoten von identisch immunisierten Mauspaaren isoliert. Von jeder Gruppe wurden die T-Zellen separat einer CD4 oder CD8 Negativselektion unterzogen, um die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulation getrennt mit NHP gepulsten APCs zu stimulieren. Nach 48 h Kokultivierung wurde die IFN γ Konzentration im ZKÜ per ELISA bestimmt. Für NHP-A, NHP-B und NHP-E konnte in drei unabhängigen Experimenten eine höhere IFN γ Konzentration im CD4 Kompartiment bei Stimulierung mit dem zur Immunisierung verwendeten NHP im Vergleich zu irrelevanten NHPs oder unbeladenen APCs gemessen werden (Abb. 3.4.1.). Die NHPs (C, D, F, G und H) ergaben keine oder nicht reproduzierbare Unterschiede in der IFN γ Sekretion nach *in vitro* Restimulation mit spezifischem NHP im Vergleich zu den Kontrollstimulationen (nicht gezeigt).

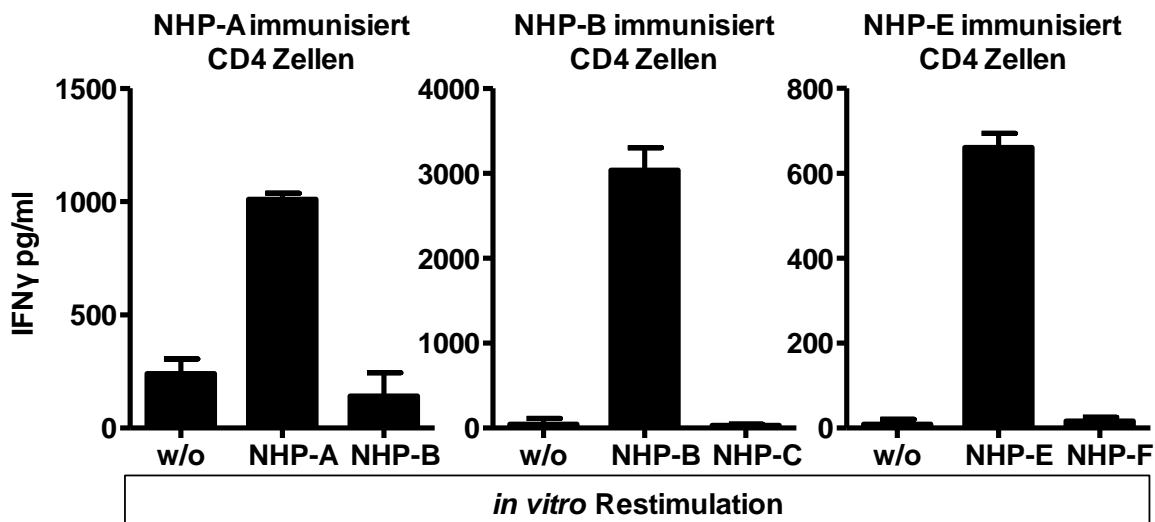


Abb. 3.4.1. IFN γ Sekretion nach Einzelpeptidimmunisierung und *in vitro* Restimulation

Selektionierte CD4⁺ T-Zellen wurden *in vitro* mit APCs restimuliert, die unbeladen (w/o) oder mit dem für die Immunisierung verwendeten NHP oder mit einem irrelevanten Kontroll-NHP gepulst wurden. Repräsentative Ergebnisse der IFN γ Sekretion aus drei unabhängigen Experimenten sind für die Immunisierung mit NHP-A, NHP-B und NHP-E dargestellt. Die Standardabweichung gibt die Schwankung der Mehrfachbestimmungen des zur Zytokinbestimmung verwendeten Tests an.

3.4.2. Ausschließlich NHP-B induziert eine CD8+ T-Zellantwort

Nachdem drei für die CD4 Antwort verantwortlichen NHPs identifiziert worden waren, stellte sich die Frage, welche NHPs die in Abschnitt 3.3.3. beobachtete CD8+ T-Zellantwort induzieren.

Bei *in vitro* Restimulation der CD8 negativ selektionierten T-Zellen aus Milz und inguinalen Lymphknoten von NHP immunisierten Tieren konnte in zwei von fünf Experimenten eine spezifische IFN γ Sekretion für NHP-B im ELISA gemessen werden (Abb. 3.4.2.A). Die Höhe der IFN γ Konzentration betrug 130 pg/ml bei spezifischer Stimulation im Vergleich zu 33 pg/ml bei unspezifischer Stimulation. Die Höhe der IFN γ Konzentration und der Nachweis in nur zwei von fünf Experimenten wichen von den in Abschnitt 3.3.3. erhaltenen Ergebnissen ab, welche eine starke CD8+ T-Zellantwort zeigten (IFN γ +, CD8+ > 1%, Abb. 3.3.3.). Um einen ineffizienten Kreuzpräsentationsprozess in den verwendeten APCs zu umgehen, wurde zur Stimulation der CD8+ T-Zellen ein 10 AS langes Peptid aus der Epitopvorhersage für NHP-B mit der Sequenz SSPQGSPEPL (NHP-B2, Tabelle 1) eingesetzt. Dieses Peptid weist Unterschiede in der AS-Sequenz im Vergleich zum murinen c-MYC auf und kann mit einer vorhergesagten Affinität von 248 nM an H2-D^b binden. Bei der Analyse des ZKÜ von Milzzellen aus NHP-B immunisierten Mäusen (Abb. 3.3.2.B), konnte eine IFN γ Sekretion als Reaktion auf Stimulation mit NHP-B (1324 pg/ml) und NHP-B2 (779 pg/ml) im Vergleich zu Stimulation mit irrelevanten NHP-A (70 pg/ml) und NHP-E (40 pg/ml) im CBA gemessen werden. Dies bedeutet, dass NHP-B sowohl eine CD4 Antwort (siehe 3.4.1.) als auch eine für das Epitop SSPQGSPEPL spezifische CD8 Antwort induziert. Die Höhe der IFN γ Konzentration unterlag bei verschiedenen analysierten Tieren deutlichen Schwankungen (nicht gezeigt). Neben der Restimulation der Milzzellen aus NHP-B immunisierten Tieren mit synthetisch hergestellten NHPs erfolgte eine IFN γ Sekretion auch bei Kokultivierung mit der Zelllinie MCA-205 Myc-tet, welche stabil mit einem Expressionskonstrukt für humanes c-MYC transfiziert wurde, um dieses zu exprimieren (Abb. 3.4.2.). Im Vergleich dazu war die IFN γ Sekretion bei Restimulation mit der nicht transfizierten, parentalen Zelllinie MCA-205 nicht erhöht.

Diese Resultate zeigen zum einen, dass NHP-B2 spezifische CD8+ T-Zellen durch Immunisierung mit NHP-B induziert werden können. Zum anderen zeigt sich eine Varianz im Nachweis der Höhe der IFN γ Bildung nach spezifischer *in vitro* Restimulation. Es stellt sich somit die Frage, ob diese Zellen *in vivo* nachgewiesen werden können und ob die Frequenz dieser Zellen Schwankungen in den immunisierten Mäusen aufweist.

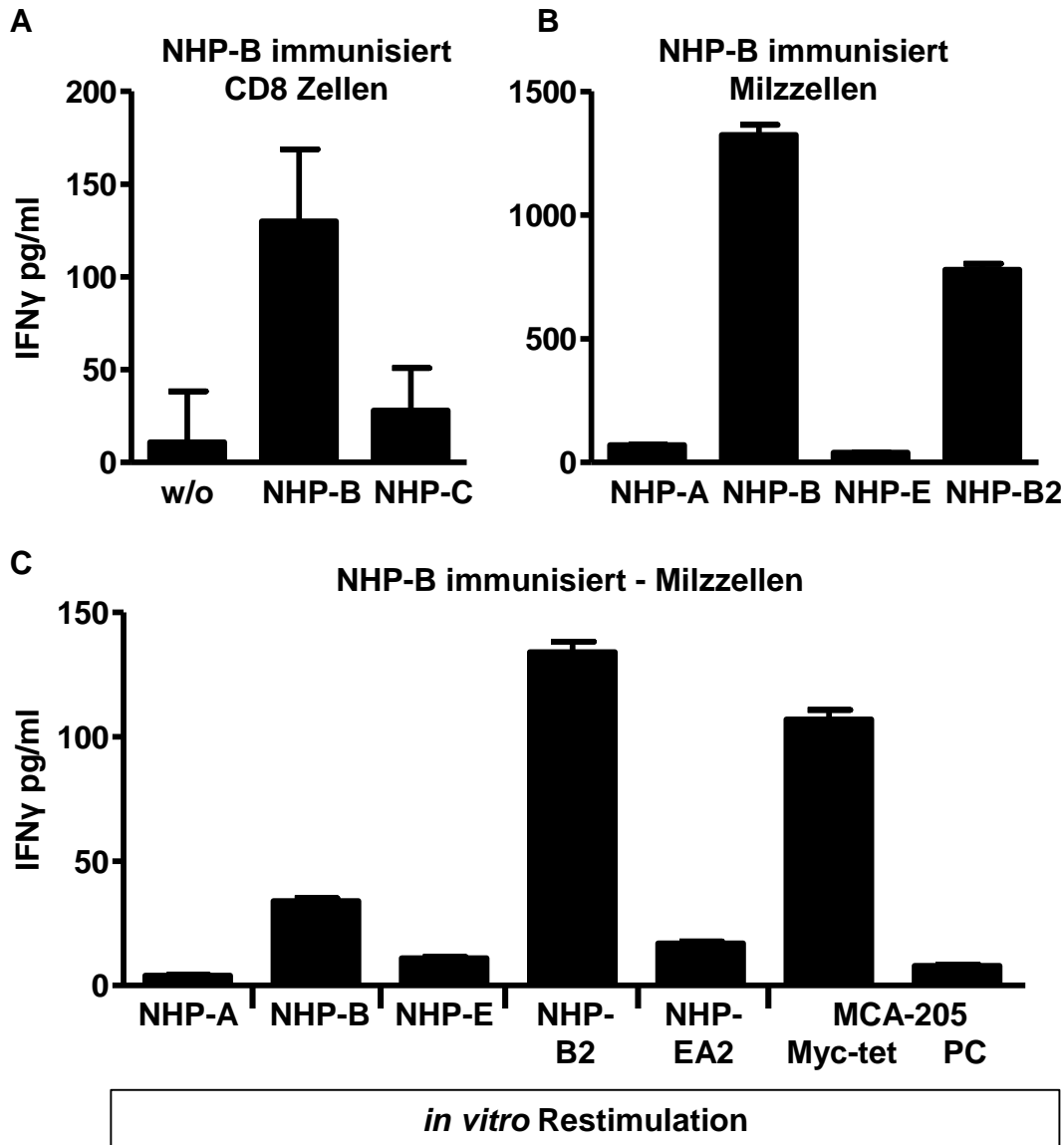


Abb. 3.4.2. IFN γ Sekretion nach NHP-B Immunisierung und *in vitro* Restimulation

Die IFN γ Konzentration wurde durch ELISA im ZKÜ von CD8 negativ selektionierten T-Zellen von NHP-B immunisierten Mäusen nach *in vitro* Restimulation mit unbeladenen (w/o) oder NHP gepulsten APCs bestimmt (A). Die Milzzellen aus NHP-B immunisierten Mäusen wurden *in vitro* mit NHPs (A, B, E, B2, EA2) und der humanes c-MYC exprimierenden Zelllinie MCA-205 Myc-tet und der nicht transfizierten Zelllinie MCA-205 PC restimuliert (B, C). Die IFN γ Konzentration im ZKÜ wurden nach 48 h Kokultivierung per CBA bestimmt. Die Standardabweichung gibt die Schwankung der Mehrfachbestimmungen des zur Zytokinbestimmung verwendeten Tests an.

3.4.3. Nachweis NHP-B2 spezifischer CD8+ T-Zellen *in vivo*

Zum Nachweis epitopspezifischer T-Zellen werden peptidbeladene MHC-Multimere in der Durchflusszytometrie genutzt. In diesem Fall wurden NHP-B2 beladene H2-D^b Multimere und SIINFEKL beladene H2-k^b Multimere genutzt, um Zellen des peripheren Blutes in Kombination mit CD8

spezifischen mAb durchflusszytometrisch zu untersuchen. Im Blut von NHP-B immunisierten Mäusen konnten CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden, welche das NHP-B2 beladene Multimer binden und somit Spezifität für dieses Epitop besitzen (Abb. 3.4.3.A). Diese CD8+ T-Zellpopulation konnte nicht in OVA immunisierten Mäusen nachgewiesen werden. In diesen Mäusen wurden jedoch wie erwartet SIINFEKL spezifische CD8+ T-Zellen beobachtet. Die Frequenz der NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen stieg nach Prime-Boost-Immunsierung signifikant an (Abb. 3.4.3.B).

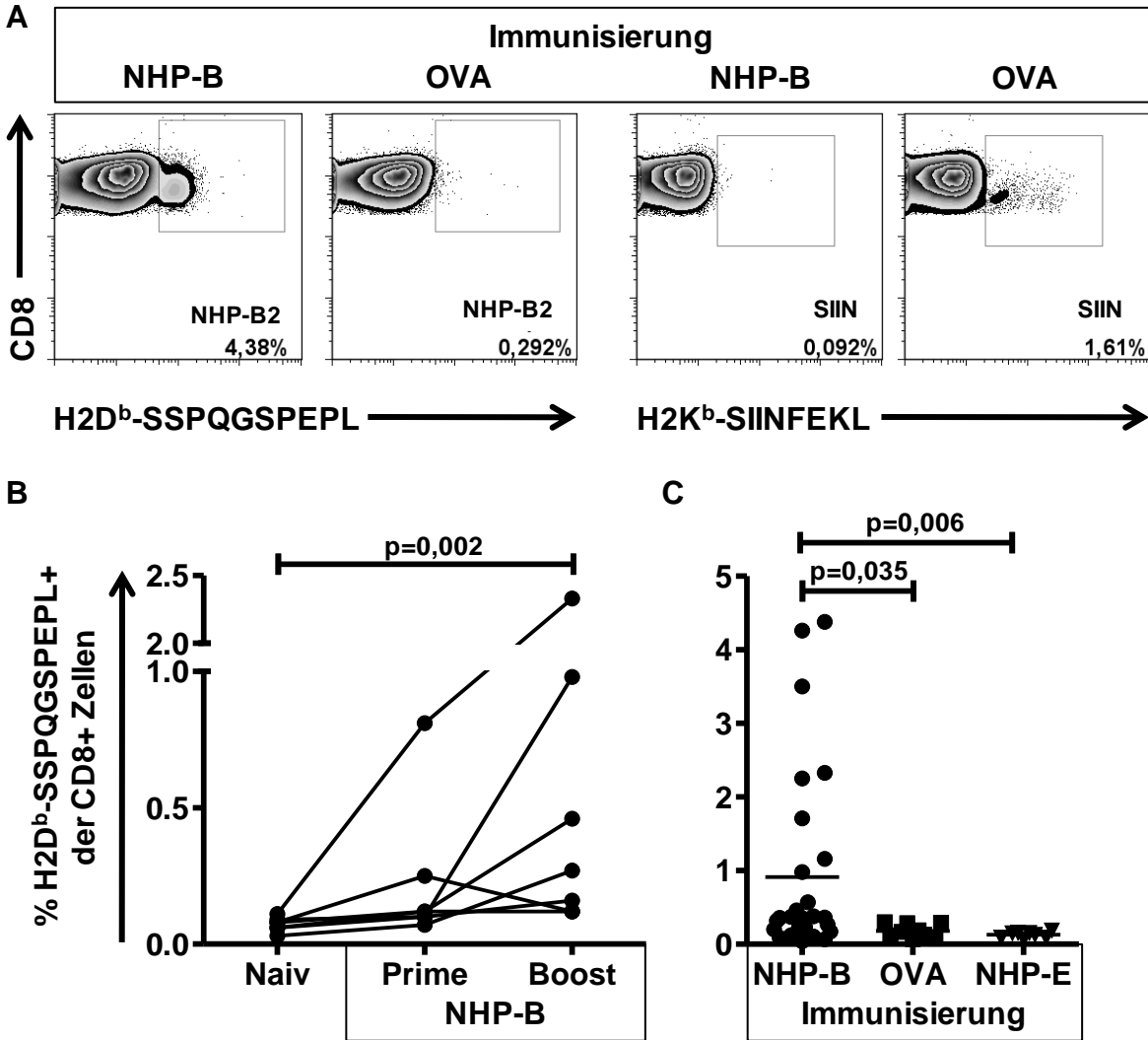


Abb. 3.4.3. Nachweis und Frequenz von NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen *in vivo*

In A sind die NHP-B2 und SIINFEKL spezifischen CD8+ T-Zellen im peripheren Blut nach Prime-Boostimmunsierung mit NHP-B oder OVA und Immunfluoreszenzmarkierung mit Hilfe von H2D^b-SSPQGSPEPL bzw. H2K^b-SIINFEKL-Multimeren repräsentativ dargestellt. In B ist die Frequenz der NHP-B2-spezifischen CD8+ T-Zellen im Blut vor, sieben Tage nach Prime- und sieben Tage nach Boostimmunsierung (n=7) abgebildet. In C ist die Frequenz der NHP-B2-spezifischen CD8+T- Zellen im Blut von NHP-B- (n=28) immunisierten Tieren im Vergleich zu der von OVA- (n=9) und NHP-E- (n=8) immunisierten Tieren gezeigt.

Tiere, die mit NHP-E oder OVA immunisiert wurden, wiesen dagegen eine signifikant niedrigere Frequenz von NHP-B2 spezifischen CD8+ Zellen im Blut auf (Abb. 3.4.3.C). Die Frequenz der NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen weist innerhalb der Gruppe eine hohe Variabilität auf. Von 28 immunisierten Mäusen wurde bei acht eine Frequenz von NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen von $\geq 1\%$ gemessen. Das bedeutet, dass 28,5% der immunisierten Mäuse gut auf die Vakzine angesprochen haben, während 71,5% eine schwache Antwort zeigten, die z.T. nicht von irrelevant immunisierten Kontrollen unterscheidbar war. Dieses Ergebnis erklärt die Varianz in der IFN γ Bildung nach *in vitro* Restimulation der CD8+ T-Zellen aus NHP-B immunisierten Tieren.

3.4.4. NHP-B Immunisierung induziert Zytotoxizität im *in vivo kill* Assay

Die Funktionalität der durch c-MYC Immunisierung induzierten c-MYC spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen wurde in den vorherigen Abschnitten vor allem durch Sekretion von IFN γ bestätigt. Um zu prüfen, ob diese Zellen antigenspezifische, lytische Aktivität besitzen, wurde ein *in vivo kill* Assay mit NHP-B und NHP-E immunisierten Mäusen im Vergleich zu OVA immunisierten Mäusen durchgeführt. Alle Mäuse wurden mehrfach immunisiert, um die verschiedene Immunisierungseffizienz bei den individuellen Immunisierungen zu verringern. Anschließend wurden den Mäusen zwei mit unterschiedlichen CFSE Konzentrationen fluoreszenzmarkierte Milzzellpopulationen im Verhältnis 1:1 injiziert. Von diesen zwei Populationen wurde eine mit dem zu testenden Peptid gepulst und fungierte somit als Zielpopulation, während die syngene Kontrollzellpopulation zur Bestimmung der unspezifischen Toxizität diente. 18 h nach Injektion beider Zellpopulationen wurde den Tieren Blut entnommen. Nach Aufreinigung des Blutes durch Dichtegradientenzentrifugation wurden die CFSE positiven Zellen per Durchflusszytometrie erfasst und das Verhältnis der beiden CFSE positiven Zellpopulationen bestimmt. In nicht immunisierten Tieren ist dieses Verhältnis unverändert 1:1, verglichen zum Zeitpunkt der Injektion, während immunisierte Mäuse eine gerichtete Aktivität gegen das zur Immunisierung verwendete Antigen zeigen und so die Zellen der Zielpopulation lysieren. Dadurch ergibt sich ein verändertes Verhältnis der CFSE positiven Zellpopulationen. Die Änderung dieses Verhältnisses im Vergleich zu naiven Kontrollmäusen ermöglicht somit die Berechnung der spezifischen zytotoxischen Aktivität gegen das untersuchte Epitop. Die NHP-B immunisierten Mäuse zeigten eine robuste *in vivo kill* Aktivität gegen NHP-B2 gepulste, aber nicht gegen unbeladene Milzzellen, während irrelevant immunisierte (OVA) Mäuse NHP-B2 gepulste Zellen nicht abtöteten (Abb. 3.4.4.). NHP-E immunisierte Mäuse wiesen keine direkte Zytotoxizität im Vergleich zu naiven Kontrollen auf, obwohl das Peptid IFN γ Sekretion im CD4+ T-Zellkompartiment *in vitro* induziert.

Die OVA immunisierten Mäuse zeigten *in vivo kill* Aktivität gegen SIINFEKL gepulste Milzzellen und dienten als Positivkontrolle.

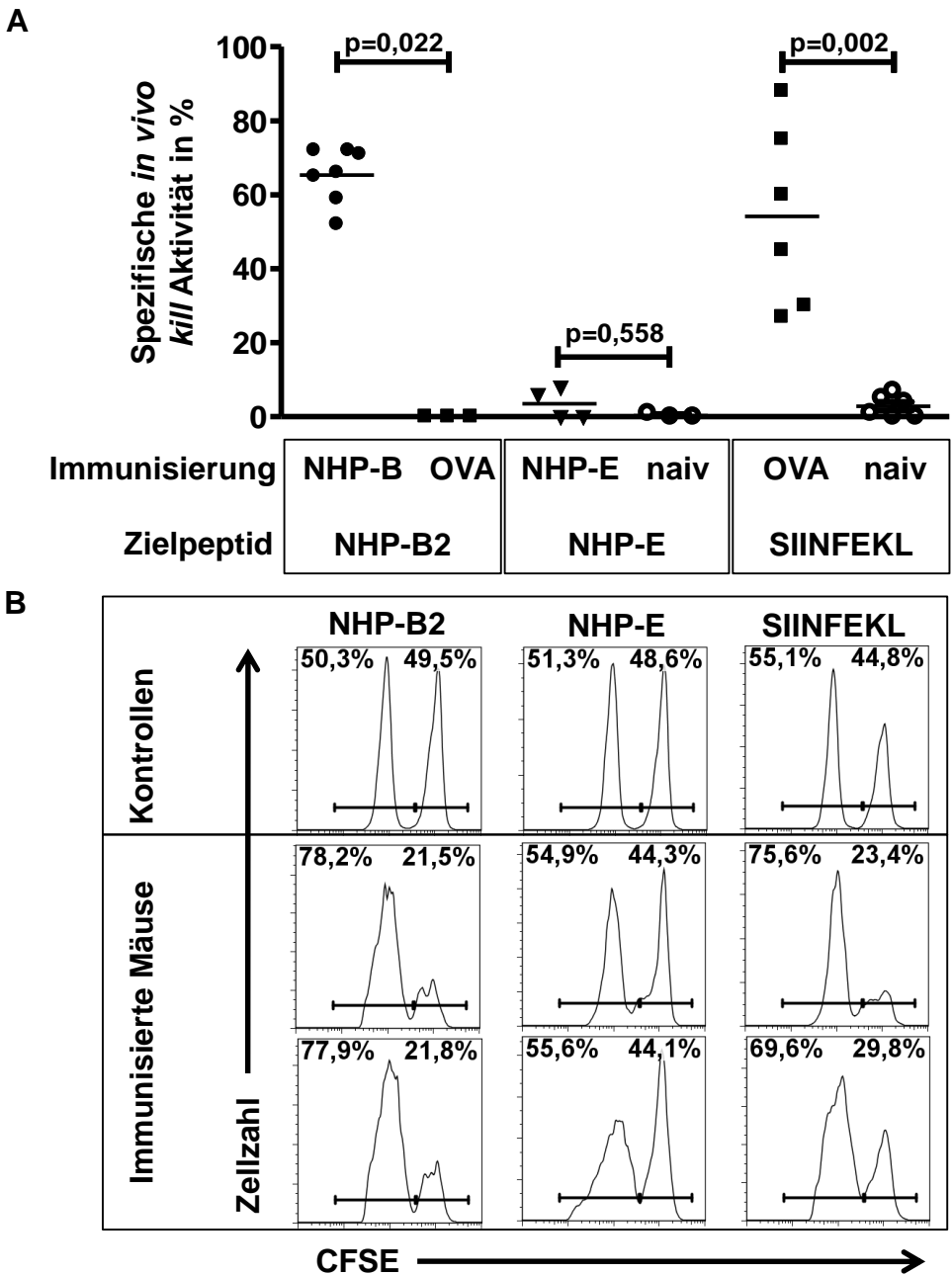


Abb. 3.4.4. *In vivo kill* Kapazität nach Immunisierung mit NHP-B im Vergleich zu NHP-E und OVA

Den verschiedenen immunisierten Gruppen wurden unbeladene, mit niedriger CFSE Konzentration markierte sowie mit dem unter Zielpeptid angegebenen Peptid gepulste, mit hoher CFSE Konzentration markierte Milzzellen i.v. im Verhältnis 1:1 injiziert. Nach 18 h wurde den Mäusen Blut entnommen und das Verhältnis der gepulsten zu unbeladenen CFSE markierten Zellen ermittelt und mit dem Verhältnis in naiven, bzw. irrelevant immunisierten Mäusen verglichen. Die spezifische *in vivo kill* Aktivität (A) ergibt sich aus dem veränderten Verhältnis der CFSE markierten Populationen in den immunisierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Beispiele für das Verhältnis der CFSE markierten Zellpopulationen mit und ohne entsprechendes Zielpeptid nach dem *in vivo kill* sind in B dargestellt.

3.5. c-MYC als Zielantigen im c-MYC-getriebenen B-Zelllymphommodell der Maus

3.5.1. Immunisierung mit c-MYC Gesamtprotein führt nicht zur Lymphomabstoßung

Da humanes c-MYC im H2^b MHC-Kontext der C57Bl/6 Maus eine T-Zellantwort induziert, stellte sich die Frage, ob die durch Immunisierung erzeugte T-Zellantwort eine humanes c-MYC überexprimierende Lymphomzelllinie abstoßen kann. Die B-Zelllymphomlinie 291PC wurde aus einem Lymphom der λ-MYC Maus isoliert. Diese Zelllinie besitzt einen Tumorprogressorphenotyp, das heißt sie wächst in immunkompetenten C57Bl/6 Mäusen bei subkutaner ($0,1 \times 10^6$ Zellen) oder i.v. (1×10^6 Zellen) Injektion und führt zum Tod der Rezipienten. Die mittlere Überlebenszeit bei subkutaner Injektion beträgt 34 Tage. Die Zelllinie kann somit als schwach oder nicht immunogen eingestuft werden, obwohl sie humanes c-MYC als Fremdanigen exprimiert. Die Expression von weiteren Fremdanigenen wie GFP oder OVA führt zu einer Erhöhung der Immunogenität und einer Abstoßungswahrscheinlichkeit von 70% im Falle der Injektion von 291OVA, wie im Abschnitt 3.1.1. dargestellt. Dies klassifiziert humanes c-MYC im H2^b Kontext als schwaches oder nicht immunogenes Antigen. Für die Beantwortung der Frage, ob eine Immunisierung mit humanem c-MYC zur Tumorabstoßung führt und die Überlebenswahrscheinlichkeit erhöht, wurden c-MYC oder OVA immunisierte Mäuse mit 1×10^5 Zellen der Zelllinie 291PC subkutan inokuliert. Die subkutane Inokulation wurde gewählt, da sie das Monitoring des lokalen Tumorwachstums ermöglicht und so *in vivo* Wachstumskinetiken erstellt werden können. Als Wachstumskontrolle wurden STAT1^{-/-} Mäuse verwendet, die einen Defekt im IFN γ Signalweg aufweisen und 291PC nicht abstoßen können, auch wenn die Immunogenität durch das Einbringen von zusätzlichen Fremdanigenen (291OVA) erhöht ist. Das durchschnittliche Tumorwachstum pro Zeit wies im Vergleich der MYC zu der OVA immunisierten Gruppe keinen Unterschied auf (Abb. 3.5.1.). Ein beschleunigtes Wachstum des Lymphoms erfolgte in der STAT1^{-/-} Gruppe im Vergleich zu der MYC Gruppe ($p=0,008$ am Tag 18) und der OVA Gruppe ($p=0,01$ am Tag 18). Die Anzahl der Mäuse, welche 20 Tage nach Tumorzellinokulation ein tastbares Lymphom aufwiesen, betrug 10 von 10 in der STAT1^{-/-}, 35 von 45 in der MYC und 19 von 30 in der OVA Gruppe. Die Überlebenskurve der MYC immunisierten Mäuse (mittleres Überleben bei 29 Tagen) unterschied sich nicht signifikant von der der OVA immunisierten Mäuse (mittleres Überleben bei 35 Tagen). Die STAT1^{-/-} Mäuse wiesen eine signifikant geringere Überlebenszeit (mittleres Überleben bei 22,5 Tagen) im Vergleich mit den OVA und MYC immunisierten Gruppen auf. Dieses Ergebnis bedeutet, dass eine prophylaktische Immunisierung mit dem humanen c-

MYC Protein das Wachstum eines humanen c-MYC überexprimierenden Lymphoms weder verhindern noch verlangsamen kann.

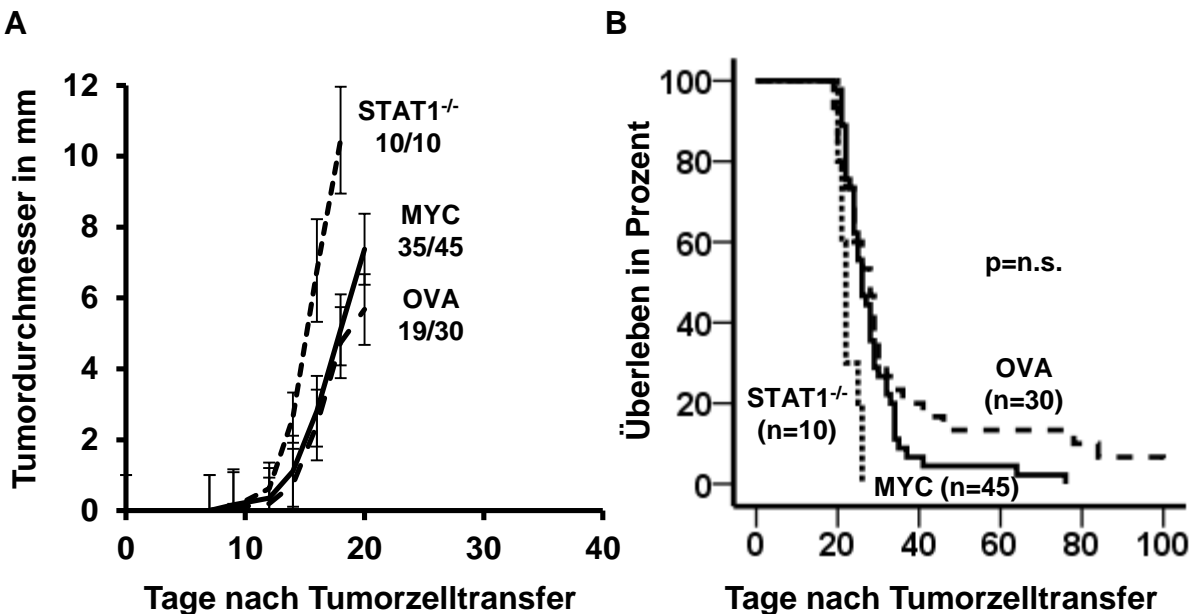


Abb. 3.5.1. Prophylaktische c-MYC Immunisierung erzeugt keinen Überlebensvorteil

Die murine Lymphomzelllinie 291PC wurde Mäusen, die mit c-MYC (ausgezogene Linie) und OVA (gestrichelte Linie) immunisiert worden waren, subkutan injiziert (1×10^5 Zellen) und das lokale Tumorstadium gemessen. STAT1^{-/-} Mäuse (gepunktete Linie) dienen als Wachstumskontrolle. Bei einer durchschnittlichen Tumorstadium von 10 mm wurden die Mäuse abgetötet. Das Tumorstadium (A) ist bis zu dem Tag abgebildet, an dem die erste Maus der Gruppe abgetötet werden musste. Die Zahlen unter den Gruppennamen geben die Frequenz der Mäuse an, welche bis Tag 20 ein messbares Lymphom entwickelten. Die Überlebenskurve für den Zeitraum von 100 Tagen nach Tumorzellinjektion ist in B abgebildet.

3.5.2. NHP-B immunisierte Mäuse zeigen verzögertes Lymphomwachstum und Abstoßung in 25% der Fälle

Die Beobachtung, dass die Lymphomzellen trotz prophylaktischer Immunisierung mit c-MYC Protein nicht abgestoßen wurden, warf die Frage auf, ob eine Immunisierung mit den NHPs, welche nachgewiesenermaßen eine T-Zellantwort erzeugten, eine Abstoßung nach Tumorzellinjektion induzieren kann. Da die Immundominanz einzelner Epitope bei Immunisierung mit komplettem Protein nicht ausgeschlossen werden kann und antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen in einigen Modellsystemen Tumorstadium sogar fördern können [144-146], wurden NHP-A, NHP-B und NHP-E getrennt zur prophylaktischen Immunisierung vor Tumorzelltransfer eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass Immunisierung mit NHP-A oder NHP-E im Vergleich zu c-MYC immunisierten Tieren keine Verzögerung im

Tumorstadium erzeugte (Abb. 3.5.2.). Die mittlere Überlebenszeit für NHP-A immunisierte Tiere betrug 30 Tage, während NHP-E-immunisierte Tiere durchschnittlich 27 Tage überlebten. Im Gegensatz dazu wiesen NHP-B-immunisierte Tiere ein mittleres Überleben von 48 Tagen auf. Dieser Unterschied ist signifikant im Vergleich zu NHP-A ($p=0,002$) und NHP-E ($p=0,001$) immunisierten Tieren. Es zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied im Tumorstadium, ermittelt durch den Vergleich des durchschnittlichen Tumordurchmessers zwischen diesen Gruppen am Tag 20 ($p=0,0012$ für NHP-B vs. NHP-A und $p=0,0054$ für NHP-B vs. NHP-E). Die Beobachtung, dass die Immunisierungseffizienz mit NHP-B Schwankungen unterworfen ist, weist auf eine schwache Immunantwort hin. Deshalb wurde die Depletion von CD25 hoch exprimierenden Zellen vor Immunisierung mit NHP-B mit Hilfe eines CD25 depletierenden mAb durchgeführt, um die Immunisierungsantwort zu verbessern. CD25 depletierte, NHP-B immunisierte Mäuse wiesen ein mittleres Überleben von 74 Tagen auf und unterschieden sich signifikant sowohl in der Kinetik des Lymphomwachstums als auch in der Überlebensdauer von denen NHP-A- und NHP-E-immunisierter Mäuse. Im Vergleich zu NHP-B-immunisierten Tieren ohne vorherige CD25 Depletion waren die Unterschiede im Lymphomwachstum am Tag 20 ($p=0,185$) und im Überleben nach Tumorzelltransfer ($p=0,12$) nicht groß genug, um statistische Signifikanz zu erreichen.

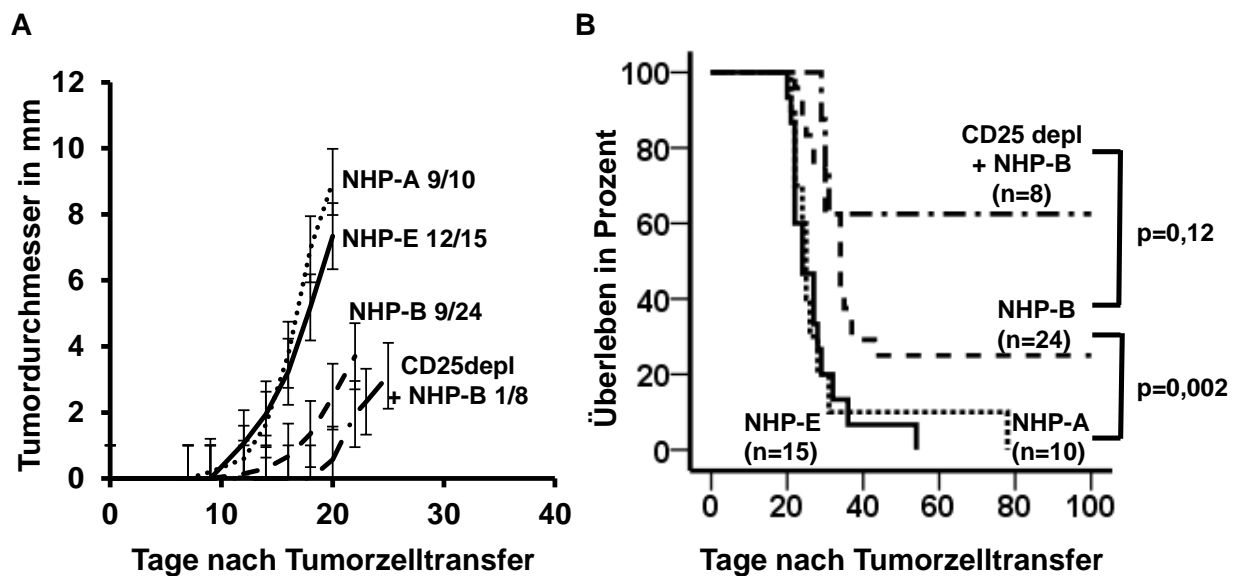


Abb. 3.5.2. NHP-B immunisierte Mäuse zeigen verzögertes Lymphomwachstum und verbessertes Langzeitüberleben

Mäusen, die mit NHP-A (gepunktete Linie), NHP-E (ausgezogene Linie), NHP-B (gestrichelte Linie) und NHP-B nach CD25 Depletion (Punkt-Strich-Linie) immunisiert worden waren, wurde die Lymphomzelllinie 291PC subkutan injiziert und das lokale Tumorstadium gemessen (A). Die Tumorstadien wurden am Tag 20 mit dem Mann-Whitney Test verglichen. Die Zahlen neben den Gruppennamen geben die Frequenz der Mäuse an, welche bis Tag 20 ein messbares Lymphom entwickelt hatten. Die Überlebenskurven der jeweiligen Gruppen sind in B dargestellt und per Log-Rank Test verglichen.

3.5.3. Mäuse, die nach NHP-B Immunisierung Lymphomzellen abstoßen, weisen ein immunologisches Gedächtnis auf

Mäuse, welche die inokulierten Lymphomzellen nach Immunisierung erfolgreich abgestoßen haben, wurden auf eine Gedächtnisantwort bezüglich NHP-B2 untersucht. 100 bzw. 400 Tage nach Injektion der Zelllinie 291PC wurden die Mäuse mit NHP-B geboostet und ihre *in vivo kill* Aktivität im Vergleich zu naiven, jungen Kontrollmäusen ermittelt. Während naive Mäuse keine zytotoxische Reaktion gegen NHP-B2 gepulste Milzzellen aufwiesen, betrug die spezifische *in vivo kill* Aktivität bei den Langzeitüberlebenden 50 bis 96% (Abb. 3.5.3.). Diese *in vivo kill* Aktivität weist auf eine NHP-B2 spezifische Gedächtnis-T-Zellpopulation hin.

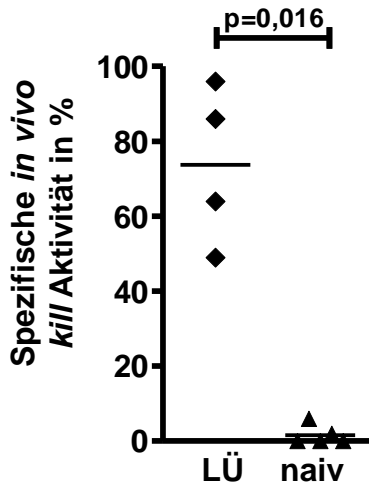


Abb. 3.5.3. Immunologisches Gedächtnis in NHP-B immunisierten Mäusen nach Lymphomabstoßung

Nach Immunisierung und Lymphomabstoßung weisen die überlebenden Mäuse (LÜ) im Vergleich zu naiven Kontrollen (naiv) eine hohe *in vivo kill* Aktivität gegen NHP-B2 gepulste Milzzellen auf.

3.5.4. Die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen nach Immunisierung beeinflusst das Lymphomwachstum

Unter 3.4.3. konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen nach Immunisierung von C57Bl/6 Mäusen variieren kann. Es ergab sich daher die Frage, ob die Frequenz NHP-B2 spezifischer CD8+ T-Zellen das Lymphomwachstum beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurden die Tiere viermal im Abstand von jeweils drei Wochen immunisiert. Die Analyse der CD8+ T-Zellen im Blut ergab, dass die Frequenz der NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen auch nach multipler Immunisierung variiert (Abb.3.5.4.1.) und eine Einteilung der Tiere in Tiere mit hoher Frequenz an NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen (>1% der CD8+ T-Zellen, n=4) und niedriger Frequenz (<1% der CD8+ T-Zellen, n=8) erlaubt. Während in der Gruppe >1% NHP-B2 spezifischer CD8+ T-Zellen diese als deutlich abgrenzbare

Population erscheinen, trifft dies in der Gruppe mit niedriger Frequenz nur bedingt zu (Abb. 3.5.4.1.A). Beide Gruppen unterschieden sich untereinander und im Vergleich zu naiven Mäusen signifikant in Bezug auf die Frequenz der NHP-B2 spezifischen CD8 + T-Zellen (Abb.3.5.4.1.B).

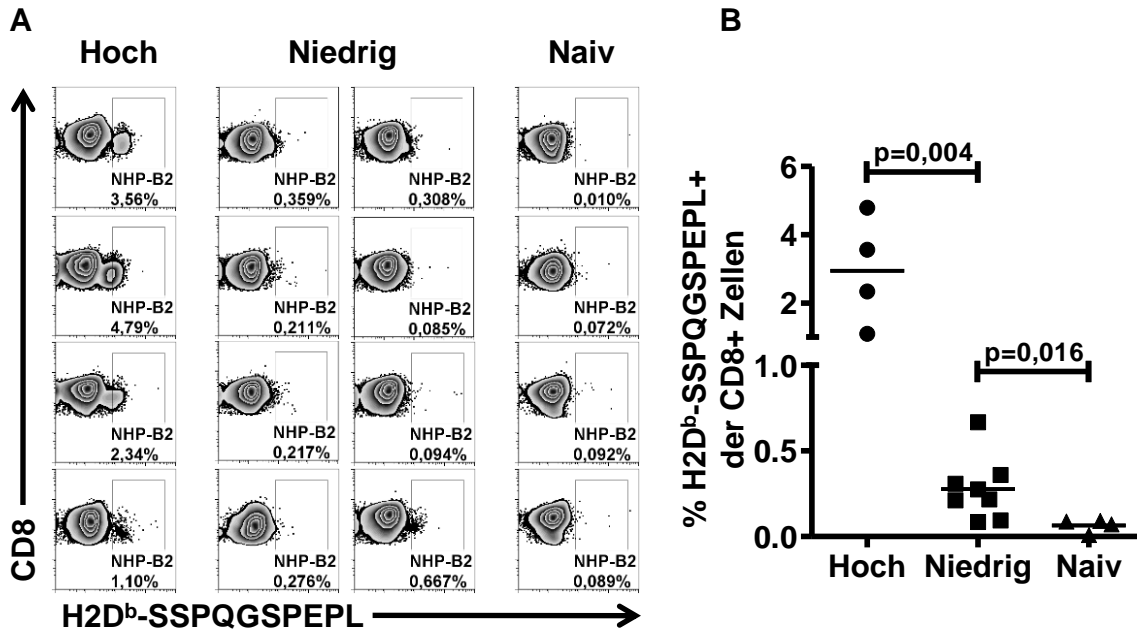


Abb. 3.5.4.1. Frequenz und Einteilung NHP-B2 spezifischer CD8+ T-Zellen

C57Bl/6 Mäuse wurden viermal mit NHP-B Vakzine im Abstand von jeweils drei Wochen immunisiert. Blut aus immunisierten und naiven Tieren wurde bezüglich der Frequenz von CD8+ und H2D^b-SSPQGSPEPL Multimer positiven Zellen durchflusszytometrisch untersucht (A). Die immunisierten Mäuse wurden in zwei Gruppen (hohe Frequenz >1% und niedrige Frequenz <1%) eingeteilt, wobei sich die Frequenzen zwischen den Gruppen signifikant unterscheiden (B), Mann-Whitney Test.

Um zu überprüfen, ob die Frequenz der NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen das Überleben der Mäuse bei Tumorzelltransplantation beeinflusst, wurden 291PC Lymphomzellen subkutan injiziert und das Lymphomwachstum mit den Ergebnissen der Inokulation von 291PC Zellen in naive Mäuse verglichen. Das Lymphom zeigte in naiven Rezipienten ein ähnliches Wachstum wie in c-MYC- oder OVA-immunisierten Mäusen, wobei die naive Gruppe eine mittlere Überlebensdauer von 34,5 Tagen aufwies. Eine signifikante Wachstumsverzögerung (p=0,008 am Tag 20) war bereits im Vergleich naiver Tiere mit der Gruppe mit niedriger Frequenz NHP-B2-spezifischer CD8+ T-Zellen zu beobachten (Abb. 3.5.4.2.) Das Überleben war in dieser Gruppe (Median 54 Tage) im Vergleich zur Gruppe naiver Tiere signifikant verlängert (p=0,044). In der Gruppe mit hoher Frequenz NHP-B2-spezifischer CD8+ T-Zellen war am Tag 20 kein Lymphomwachstum zu beobachten. Das Lymphomwachstum setzte im Vergleich zur Gruppe mit niedriger Frequenz NHP-B2-spezifischer CD8+ T-Zellen verzögert ein und unterschied sich in Bezug auf

den durchschnittlichen Tumordurchmesser signifikant am Tag 28 ($p=0,046$). Obwohl das Überleben in der Gruppe mit hoher Frequenz doppelt so hoch war wie in der Gruppe mit niedriger Frequenz (50% gegenüber 25% Überlebensrate bis Tag 100), war dieser Unterschied aufgrund der geringen Fallzahl nicht signifikant ($p=0,23$). Dies bedeutet, dass eine höhere Frequenz an NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen die Wahrscheinlichkeit auf Wachstumsverzögerung und Langzeitüberleben erhöht, allerdings kein allein entscheidendes Kriterium für die Lymphomzellabstoßung ist.

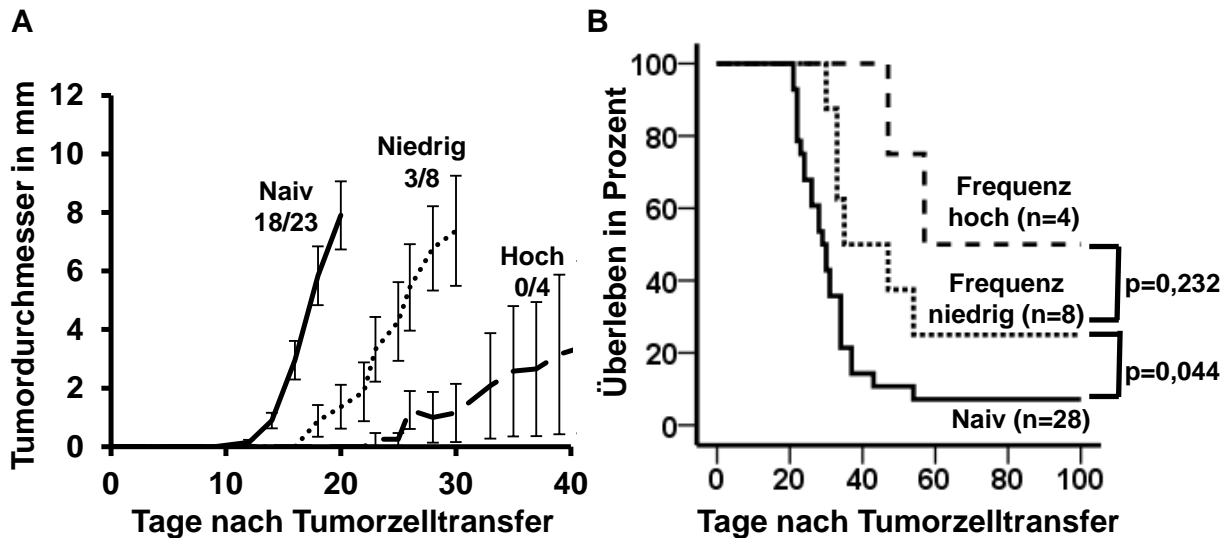


Abb. 3.5.4.2. Einfluss der Frequenz NHP-B2 spezifischer CD8+ T-Zellen auf das Lymphomwachstum

Naiven (ausgezogene Linie) oder NHP-B-immunisierten Mäusen (gestrichelte Linie für Mäuse mit hoher und gepunktete Linie für Mäuse mit niedriger Frequenz NHP-B2-spezifischer CD8+ T-Zellen) wurde die Lymphomzelllinie 291PC subkutan injiziert (1×10^5 Zellen) und das lokale Tumorstadium gemessen (A). Die Zahlen unter den Gruppennamen geben die Frequenz der Mäuse an, welche bis Tag 20 ein messbares Lymphom entwickelten. Die Überlebenskurve für den Zeitraum von 100 Tagen nach Tumorzellinjektion ist in B abgebildet. Die statistische Analyse der Überlebenskurve erfolgte mit dem Log-Rank Test.

Antigenspezifische T-Zellen können zu ihren Zielzellen unterschiedliche Aviditäten aufweisen, welche eine erfolgreiche Tumorabstoßung beeinflussen können. Davon ausgehend wurde die MFI der NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen analysiert. Die Fluoreszenzintensität und die Art der Bindungskinetik, mit der T-Zellen peptidbeladene MHC-Multimere binden, kann als Ausdruck der T-Zellavidität zu dem spezifischen Epitop interpretiert werden [147]. Somit binden T-Zellen mit hoher Avidität über die Zeit mehr Peptid-MHC-Multimere und weisen eine höhere Fluoreszenzintensität auf als T-Zellen mit geringerer Avidität für ihr spezifisches Epitop. Beim Vergleich der MFI der NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen vor Lymphominjektion zeigte sich, dass Mäuse mit hoher MFI für das NHP-B2 beladene H2D^b-Multimer der Gruppe der Langzeitüberlebenden zugeordnet werden konnten (Abb. 3.5.4.3.), während

Mäuse mit einer niedrigen MFI das Lymphomwachstum zwar verzögern (im Vergleich zu naiven Rezipienten) aber nicht verhindern konnten. In diese Analyse wurden die Tiere einbezogen, welche nach mehrfacher Immunisierung eine Population von NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen von >0,2% der CD8+ T-Zellen aufwiesen. Somit ist die Avidität der durch Immunisierung induzierten T-Zellen ein entscheidendes Merkmal für die Abstoßung von humanes c-MYC überexprimierenden Lymphomzellen durch NHP-B2 spezifische CD8+ T-Zellen.

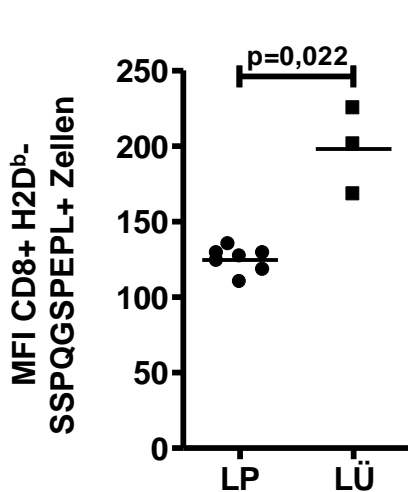


Abb. 3.5.4.3. T-Zellavidität korreliert mit Lymphomzellabstoßung

Die MFI für das H2D^b-SSPQGSPEPL Multimer der CD8+ und H2D^b-SSPQGSPEPL Multimer doppelt positiven T-Zellen des peripheren Blutes wurde vor dem Lymphomzelltransfer ermittelt. Die Mäuse, welche später die 291PC Zellen abgestoßen haben, sind der Gruppe der Langzeitüberlebenden (LÜ) zugeordnet. Tiere, welche auf Grund progredienten Lymphomwachstums abgetötet wurden, sind der Gruppe der Lymphomprogressoren (LP) zugeordnet. Der Mann-Whitney Test wurde zur statistischen Analyse eingesetzt.

3.5.5. NHP-B spezifische T-Zellen vermitteln Anti-Tumoreffekte bei subkutanen und bei i.v. Lymphomzelltransfer

Die subkutane Inokulation von 291PC Zellen führt zu lokalem Wachstum unter der Haut, gefolgt von systemischer Infiltration vor allem von lymphatischen Organen [128]. Durch die Injektion selbst entsteht ein Entzündungsreiz, der eine effektivere Abstoßung bewirkt als zum Beispiel bei i.v. Applikation der Lymphomzellen. Um eine lokale Entzündung zu umgehen und die Verteilung der Lymphomzellen im Gesamtorganismus zu simulieren, wurden die 291PC Zellen i.v. injiziert. Um das Wachstum und Überleben antigenexprimierender Tumoren nach i.v. Injektion einzuschätzen, wurden die Surrogatantigen exprimierenden Zelllinien (291OVA und 291GFP) verwendet. Bei der Analyse des Wachstumsverlaufs nach i.v. Injektion im Vergleich zur subkutanen Inokulation zeigten sich Unterschiede in der Immunogenität der Lymphomzellen. Während bei subkutaner Inokulation das Einbringen der Fremddantigene OVA und GFP oder GFP allein zu einer Wachstumsverzögerung und verbessertem Überleben im Vergleich zur parentalen Zelllinie führte, war diese Beobachtung für i.v. injizierte 291GFP Zellen nicht zutreffend (Abb. 3.5.5.1.). Das bedeutet, dass subkutane Injektion die Immunogenität der injizierten Zellen im Vergleich zur i.v. Applikation erhöht.

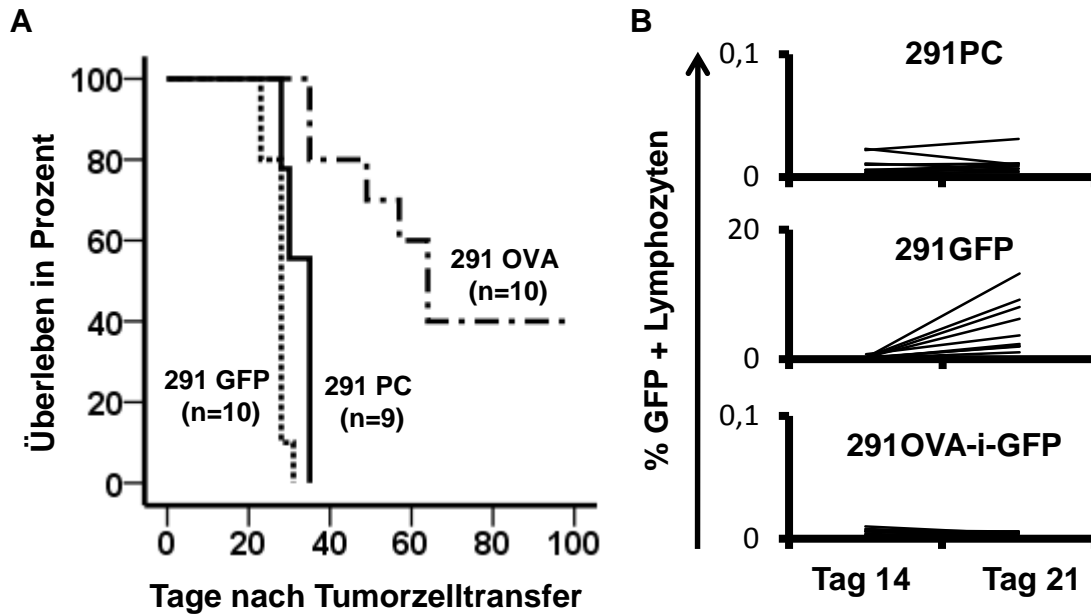


Abb. 3.5.5.1. Nur 291OVA Zellen können nach i.v. Injektion abgestoßen werden

1×10^6 Lymphomzellen der Linien 291PC (ausgezogene Linie), 291GFP (gepunktete Linie) oder 291OVA (Strich-Punkt-Linie) wurden C57Bl/6 Mäusen i.v. injiziert. Das Überleben der Gruppen ist in A abgebildet. Die Detektion GFP positiver Zellen im peripheren Blut, und damit die Entwicklung der Leukämie 14 und 21 Tage nach Injektion, ist in B abgebildet.

Ab Tag 14 nach Injektion konnten CD19+ GFP exprimierende Zellen im peripheren Blut der Tiere nachgewiesen werden und erreichten am Tag 21 eine durchschnittliche Frequenz von 5% der peripheren Lymphozyten. Das bedeutet, dass i.v. injizierte Lymphomzellen abgestoßen werden können. Allerdings muss die Immunogenität der Zellen für eine erfolgreiche Abstoßung hoch sein, da nur die OVA exprimierende Lymphomzellen abgestoßen werden konnten. Daraus ergibt sich die Frage, ob NHP-B spezifische Zellen auch in diesem Modell effektiv sind.

Um zu analysieren, ob NHP-B2 spezifische CD8+ T-Zellen auch bei i.v. Injektion 291PC Zellen abstoßen können, wurden C57Bl/6 Mäuse immunisiert und ihre Immunantwort in Bezug auf NHP-B2 spezifische *in vivo kill* Aktivität und Multimerfrequenz charakterisiert. Die Untersuchung der *in vivo kill* Aktivität zeigte, dass nicht alle Tiere nach Immunisierung eine NHP-B2-spezifische *in vivo kill* Aktivität aufwiesen (Abb.3.5.5.2.A), dass aber eine NHP-B2 spezifische *in vivo kill* Aktivität bei den Tieren mit der höchsten Frequenz an NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen im Blut beobachtet werden konnte (Abb.3.4.4.2.B). Dies ermöglichte die Einteilung der Tiere in eine Gruppe mit und eine Gruppe ohne *in vivo kill* Aktivität nach Immunisierung mit NHP-B.

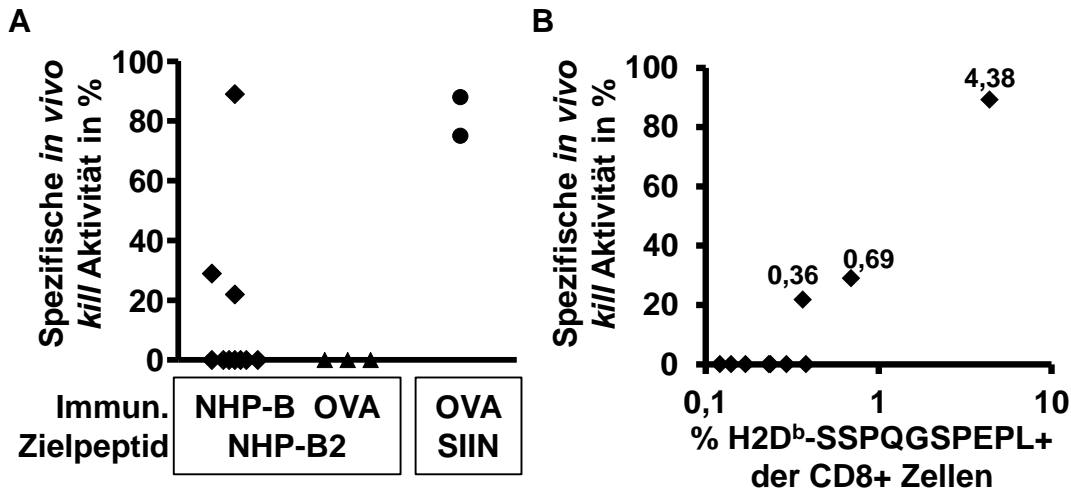


Abb. 3.5.5.2. *In vivo* kill Aktivität und Multimerfrequenz

Die *in vivo* kill Aktivität von NHP-B oder OVA immunisierten C57Bl/6 Mäusen wurde gegen NHP-B2 gepulste Milzzellen ermittelt (A). SIINFEKL gepulste Milzzellen dienen als Positivkontrolle für die OVA Immunisierung. In (B) wurde die lytische Aktivität der mit NHP-B immunisierten Mäuse gegen die Frequenz der NHP-B2 Multimerpositiven CD8+ T-Zellen aufgetragen. Die *in vivo* kill Aktivität korreliert mit der Frequenz der NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen.

Die in Abb. 3.5.5.2. gezeigten Tiere wurden mit 1×10^6 291PC Zellen i.v. inokuliert wurden. Das mediane Überleben betrug für irrelevant (OVA) immunisierte Tiere 31,6 und für Tiere ohne NHP-B2 spezifische *in vivo* kill Aktivität 32,7 Tage (Abb. 3.5.5.3.). Für Tiere mit NHP-B2 spezifischer *in vivo* kill Aktivität betrug die durchschnittliche Überlebenszeit 50,3 Tage und war somit trotz der geringen Fallzahl signifikant unterschiedlich ($p=0,025$). Da das Lymphomwachstum systemisch erfolgte, sind die Orte der Lymphomansiedlung im Vergleich zu subkutaner Injektion bei i.v. Injektion nicht direkt vorhersagbar. Allerdings gibt es Präferenzen für lymphatische Organe wie Milz und Lymphknoten. Symptome für ein sich entwickelndes Lymphom sind Kachexie und vor allem die Paralyse der Hinterbeine. Während die Ursachen der Kachexie multifaktoriell sein können (Infiltration des Verdauungstrakts, Knochenmarks, Pankreas oder der Niere bzw. Nebenniere), ist die Paralyse der Hinterbeine auf eine Infiltration der Lymphknoten entlang der Wirbelsäule zurückzuführen. Bei OVA immunisierten Mäusen oder Mäusen ohne nachweisbare *in vivo* kill Aktivität gegen NHP-B2 gepulste Milzzellen wurde das Lymphomwachstum präferenziell in den lymphatischen Organen beobachtet. Zum Teil erfolgte auch ein systemischer Befall von anderen Organen. Ein Wachstum in den Ovarien erfolgte bei diesen Rezipienten selten ($n=2$ von 12, 16,6%). Bei den Mäusen mit NHP-B2 *in vivo* kill Aktivität erfolgte die Lymphomentwicklung häufiger in den Ovarien ($n=2$ von 3, 66%), während Milz und Lymphknoten eine

normale Größe aufwiesen. Dies deutet auf Einschränkungen in der Ausbreitung von Lymphomen in Mäusen mit NHP-B2 spezifischer *in vivo kill* Aktivität hin.

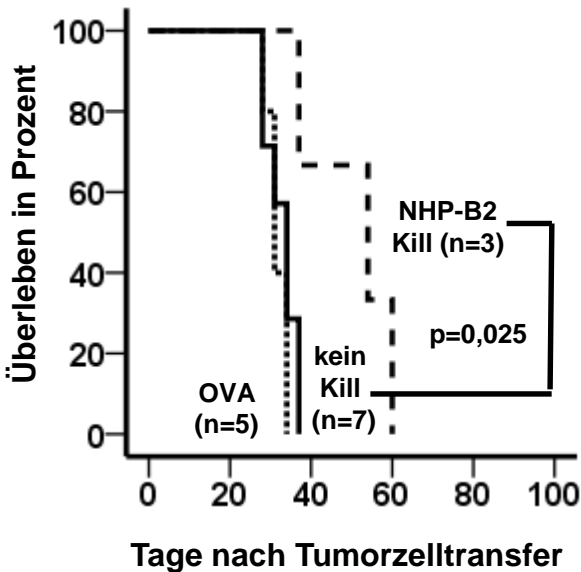


Abb. 3.5.5.3. Verbessertes Überleben bei NHP-B2 immunisierten Mäusen mit *in vivo kill* Aktivität

C57Bl/6 Mäuse wurden nach Immunisierung und *in vivo kill* mit der Lymphomzelllinie 291PC i.v. injiziert. Dazu wurden die Mäuse in drei Gruppen eingeteilt: OVA immunisierte Mäuse (gepunktete Linie, n=5), Mäuse ohne *in vivo kill* Aktivität gegen NHP-B2 (ausgezogene Linie, n=7) und Mäuse mit nachweisbarer *in vivo kill* Aktivität gegen NHP-B2 gepulsten Milzzellen (gestrichelte Linie, n=3).

3.5.6. Adoptiver T-Zelltransfer aus NHP-B immunisierten Spendern verzögert das Lymphomwachstum

Prophylaktische Immunisierung dient der Entstehung einer adaptiven Immunantwort, welche ein immunologisches Gedächtnis beinhaltet. Dieses Gedächtnis ermöglicht ein schnelles Einsetzen des adaptiven Immunsystems bei Kontakt mit dem spezifischen Pathogen und erhöht die Überlebenschancen im Vergleich zu nicht immunisierten Individuen. Krebserkrankungen sind allerdings nicht durch prophylaktische Immunisierung behandelbar. Die erste Ausnahme bildet hier die Immunisierung gegen das humane Papillomvirus (HPV) 16 und HPV18 zur Prävention des Zervixkarzinoms der Frau [148]. Der adoptive Transfer von tumorantigen-spezifischen T-Zellen hat vielversprechende Ergebnisse bei immunogenen Tumoren wie dem malignen Melanom erzielt. In den bisherigen Ergebnissen konnte die Entwicklung einer c-MYC spezifischen Immunantwort durch Immunisierung beschrieben und die Wirkung dieser Immunantwort im Tumorzelltransfermodell gezeigt werden. Es ergab sich somit die Frage, ob sich die c-MYC spezifische Immunität durch adoptiven T-

Zelltransfer übertragen lässt und ob die transferierten T-Zellen einem bereits initiierten Lymphomwachstum entgegenwirken können. Dazu wurden T-Zell defizienten RAG1^{-/-} Mäusen 1 x 10⁶ 291PC Zellen i.v. injiziert. Um den Lymphomzellen Anwachsen und Proliferation zu ermöglichen, wurden die T-Zellen, welche aus GFP-transgenen, NHP-B oder NHP-E immunisierten Mäusen isoliert wurden, sieben Tage später adoptiv transferiert. Zum Nachweis der Antigenpezifität wurden die Milzzellen der T-Zellspender *in vitro* mit verschiedenen NHPs restimuliert (Abb. 3.5.6.A und B). Die IFN γ Konzentration betrug nach Restimulation der Milzzellen der NHP-B immunisierten Tiere 73 pg/ml (NHP-B) bzw. 123 pg/ml (NHP-B2) im Vergleich zu 10 pg/ml (NHP-E) und 8 pg/ml (NHP-A). Bei Restimulation der Milzzellen der NHP-E immunisierten Tieren mit NHP-E wurden 328 pg/ml IFN γ sekretiert, während die IFN γ Konzentrationen bei Restimulation mit NHP-B, NHP-B2 oder NHP-A unter 6 pg/ml lagen. Die T-Zellen wurden für den adoptiven T-Zelltransfer immunomagnetisch negativ selektioniert und die Frequenz der NHP-B2 spezifischen CD8⁺ Zellen in der zu transplantierenden Zellpopulation bestimmt (0,2% für NHP-B immunisiert vs. 0,06% für NHP-E immunisiert). Anschließend wurden 1 x 10⁶ Zellen in die RAG1^{-/-} Mäuse transferiert und die Lymphomentwicklung in den Mäusen beobachtet (Abb. 3.5.6.D). Das mittlere Überleben der RAG1^{-/-} Mäuse nach Transfer der T-Zellen aus NHP-E immunisierten Spendern betrug 34 Tage. Bei Transfer von T-Zellen aus NHP-B immunisierten Spendern erhöhte sich die mittlere Überlebenszeit auf 50 Tage (p=0,036).

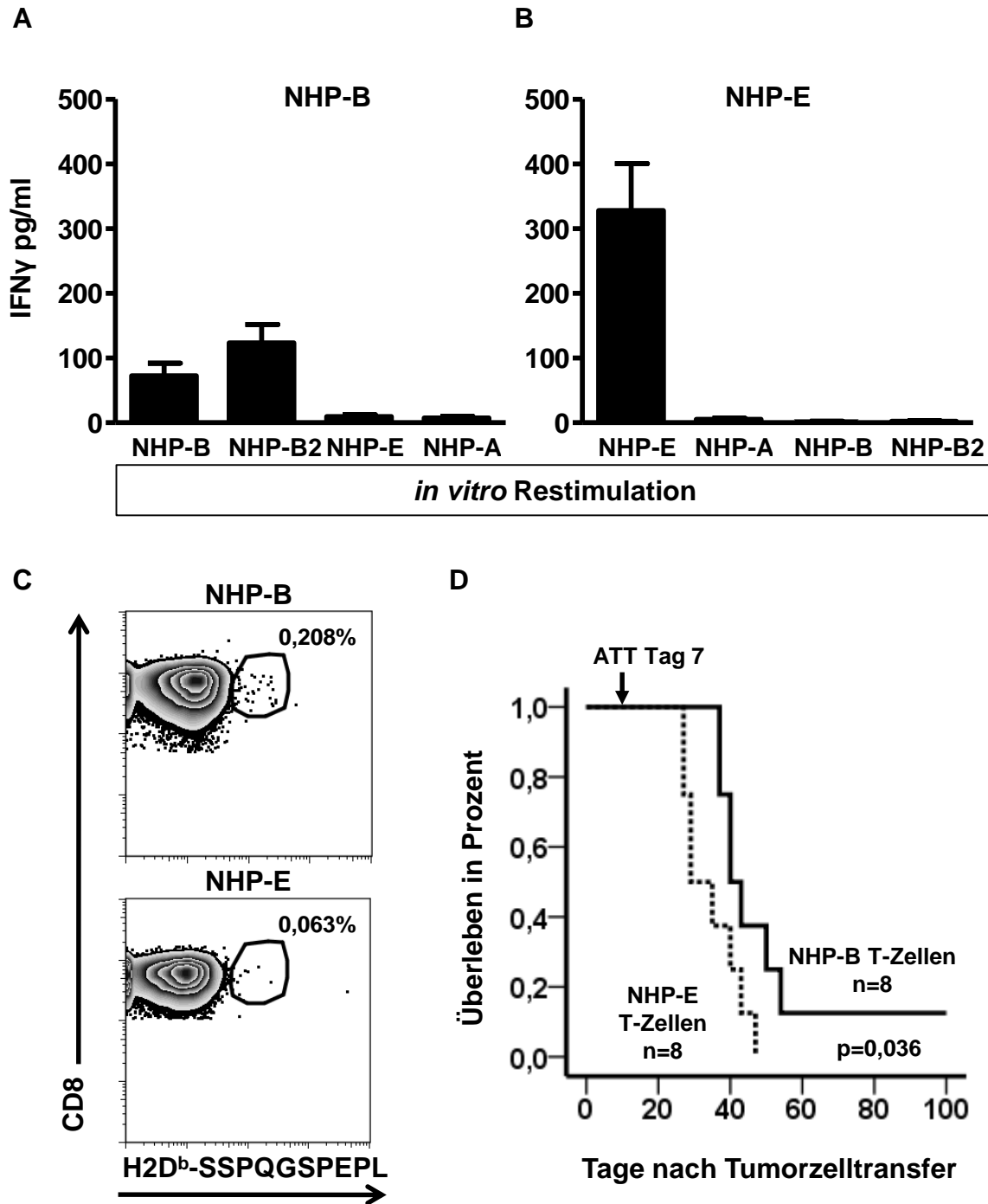


Abb. 3.5.6. Adoptiver T-Zelltransfer NHP-B spezifischer T-Zellen verzögert Lymphomwachstum

Milzzellen von NHP-B (A) und NHP-E (B) immunisierten Mäusen wurden *in vitro* mit verschiedenen NHPs restimuliert und die IFN γ Konzentration im ZKÜ nach 48 h Restimulationsdauer bestimmt. Die T-Zellen wurden für den adoptiven T-Zelltransfer (ATT) immunomagnetisch angereichert und die Frequenz der NHP-B2 spezifischen CD8+ T-Zellen in der zu transplantierenden T-Zellpopulation durchflusszytometrisch ermittelt (C). Das Überleben nach B-Zelllymphominjektion in RAG1^{-/-} Mäusen und ATT am Tag 7 ist in D dargestellt. Die Gruppe, welche T-Zellen aus NHP-B-immunisierten Spendern erhielt, ist mit einer ausgezogenen Linie und die Gruppe, die T-Zellen aus NHP-E immunisierten Spendern erhielt, mit einer gepunkteten Linie dargestellt.

4. Diskussion

4.1. Kriterien und Überlegungen zur Wahl des T-Zellantigens

Die Nutzung von adoptiv transferierten T-Zellen zur Tumorbehandlung wurde sowohl in diversen Mausmodellen [54, 143], als auch ersten klinischen Studien [47, 59, 149] erfolgreich angewandt. Die Effektivität dieses T-Zell basierenden Ansatzes ist von mehreren Faktoren abhängig. Einerseits gibt es wichtige Faktoren auf der T-Zellseite. So ist zum Beispiel die T-Zellfunktionalität (z.B. IFN γ -Bildung durch die T-Zellen) und T-Zellqualität sehr wichtig [143, 150]. Gleichzeitig ist die T-Zellavidität für das Zielantigen ein kritischer Faktor [151]. Etliche Strategien wurden entwickelt, um hoch affine T-Zellen oder TZR für eine verbesserte adoptive T-Zelltherapie zu gewinnen [23-25]. Andererseits gibt es zahlreiche Faktoren auf Seiten des Tumors, die einen kritischen Einfluss auf die Effektivität der adoptiv transferierten T-Zellen haben. Dazu gehören z.B. die Immunogenität des Tumors [152] und die immunsuppressive Tumorumgebung [153, 154].

Trotz der Vielzahl der aufgeführten Argumente ist der wohl entscheidendste Punkt für eine erfolgreiche T-Zelltherapie die Wahl des Zielantigens für die T-Zellen: das Tumorantigen. Für diese Wahl müssen mehrere Faktoren in Betracht gezogen werden.

- 1.) Dieses Antigen muss im Tumor in einer Menge gebildet werden, die eine Erkennung im MHC-Kontext ermöglicht.
- 2.) Die Antigenprozessions- und Präsentationskaskade muss intakt sein und es müssen genügend MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche erscheinen.
- 3.) Das Antigen sollte idealerweise tumorspezifisch exprimiert werden, um das Risiko von Autoimmunität zu vermeiden.
- 4.) Des Weiteren sollte der Tumor von der fortgesetzten Antigenexpression abhängig sein, um das Risiko der Akkumulation von Antigenverlustvarianten im Tumor zu reduzieren. (Es konnte in diversen Tumormodellen gezeigt werden, dass auch hoch averse T-Zellen Antigenverlustvarianten erzeugen können, wenn das Zielantigen für die Aufrechterhaltung des Tumors nicht notwendig ist [155-157].)

Aus Mangel an Antigenen, die diese Voraussetzungen erfüllen, werden zurzeit tumorassoziierte Antigene als Zielantigene in der adoptiven T-Zelltherapie genutzt [45-47].

4.2. OVA als T-Zellantigen

OVA wird in vielen Modellsystemen als Antigen verwendet, da es im H2^b MHC-Kontext immunogen ist und die OVA spezifische T-Zellantwort gut charakterisiert ist [142]. In den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen, in denen OVA als Antigen genutzt wurde, wurde dadurch die Immunogenität der 291PC Lymphomzellen erhöht. Während die schwach oder nicht immunogenen 291PC Zellen einen Progressorphänotyp in der C57Bl/6 Maus aufweisen, bewirkt die Expression von OVA in der Zelllinie 291OVA die Umwandlung in einen Regressorphänotyps. Für eine erfolgreiche T-Zell vermittelte Abstoßung der 291OVA Zellen war IFN γ und dessen Wirkung auf die Zellen des Tumorrezipienten ein kritischer Faktor. Allerdings kam es zum Auftreten von Antigenverlustvarianten bei 25% der Tumorrezipienten [128]. Das Auswachsen der 291OVA Zellen erfolgte mit einer Verzögerung und mit deutlich geringerer Wahrscheinlichkeit als das Auswachsen von 291PC Zellen, wobei aus immunkompetenten Empfängern nur OVA negative Lymphome isoliert werden konnten. Dies verdeutlicht das Problem einer erfolgreichen T-Zelltherapie in Hinsicht auf das Auftreten von Antigenverlustvarianten, wenn die Expression des Antigens für den Tumor keine physiologische Bedeutung hat.

4.3. Das immunogene Potential von c-MYC in der C57Bl/6 Maus

Für c-MYC konnte gezeigt werden, dass verschiedene Tumoren von der fortgesetzten c-MYC Aktivität abhängig sind [62, 63, 110, 112, 114]. c-MYC wird in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert [64] und ist kein tumorspezifisches, sondern ein tumorassoziiertes Antigen. Dabei handelt es sich bei c-MYC um ein Autoantigen, das der negativen Selektion im Thymus unterliegt und die Generierung von c-MYC spezifischen T-Zellen erschwert. Um eine Immunantwort gegen c-MYC zu induzieren, wurde ein xenogener Immunisierungsansatz gewählt: C57Bl/6 Mäuse wurden gegen das humane c-MYC Genprodukt immunisiert. Auf diese Weise wurden in der Maus T-Zellen generiert, die das humane c-MYC im H2^b MHC-Kontext der Maus erkennen.

Die *in silico* Analyse des immunogenen Potentials von humanem c-MYC in der C57Bl/6 Maus ergab keine Vorhersage über mögliche hoch affine Epitope ($K_d < 50$ nM), was sicher auf die hohe Homologie zwischen murinen und humanen c-MYC zurückzuführen ist. Es konnten aber Voraussagen für einige Epitope mit mittlerer Affinität ($K_d < 500$ nM) getroffen werden, welche im experimentellen Nachweis eine T-Zellantwort induzierten.

Ein Hinweis darauf, dass das humane c-MYC Genprodukt in der C57Bl/6 Maus nur schwach immunogen ist, ergab sich aus dem Vergleich des Lymphomwachstums von 291PC Zellen in STAT1^{-/-} und Wildtypmäusen. Die das humane c-MYC Protein exprimierenden 291PC Zellen zeigten bei Inokulation in STAT1^{-/-} Rezipienten, welche einen schweren T-Zelldefekt aufweisen, ein schnelleres Wachstum als in C57Bl/6 Rezipienten. Man kann vermuten, dass das verzögerte Auswachsen in immunkompetenten Mäusen auf die Expression des humanen c-MYC auf Seiten der Lymphomzellen zurückzuführen ist, welches als mögliches T-Zell Ziel die 291PC Zellen zu immunogenen Zielen macht. Im Gegensatz zu OVA und GFP wirkte jedoch das humane c-MYC Genprodukt bei Inokulation in Wildtyp Mäuse nicht als Abstoßungsantigen. Die erwartete niedrige Immunogenität von c-MYC selbst in xenogenen Organismen stellt deshalb eine schwierige Hürde für eine c-MYC spezifische T-Zelltherapie dar.

Allerdings machen einige Eigenschaften das c-MYC Protein auch zu einem interessanten Kandidaten als Zielantigen für die adoptive T-Zelltherapie für die es sich lohnt TZR aus einem nicht toleranten Repertoire zu identifizieren und später für einen adoptiven T-Zelltransfer zu nutzen:

- 1.) Es wird in hoher Menge in vielen Tumoren gebildet und somit ergibt sich eine breite Anwendungsmöglichkeit für c-MYC spezifische TZR [64].
- 2.) Das maligne Wachstum ist von der Überexpression abhängig, wie in vielen Modellen gezeigt wurde, und deshalb ist die Bildung von Antigenverlustvarianten unwahrscheinlich [119].
- 3.) Verschiedene Onkogen Signalwege führen zur c-MYC Aktivierung und sind von kontinuierlicher c-MYC Expression abhängig, was c-MYC zu dem vielleicht am weitesten verbreiteten Tumorantigen macht, das von vielen verschiedenen Lymphomen und Karzinomen gebildet wird [62, 116].

4.4. Einfluss des Immunisierungsprotokolls auf das Lymphomwachstum

In dieser Arbeit wurden für humanes c-MYC spezifische T-Zellen generiert, um diese gegen schwach immunogene, humanes c-MYC überexprimierende Lymphomzellen der Maus zu richten. Im Gegensatz zu anderen Studien, die die adoptive T-Zelltherapie erfolgreich nutzten, um solide Tumoren von klinisch relevanter Größe abzustößen und dabei hoch immunogene Tumoren mit einem Regressorphenotyp nutzten [53, 54], zeigen die 291PC Zellen keinen Regressorphenotyp. Deshalb wurde ein prophylaktisches Immunisierungsprotokoll vor Lymphomtransfer gewählt. Überraschenderweise wurden keine Unterschiede im Lymphomwachstum beobachtet, wenn die Lymphomrezipienten vor Inokulation

mit humanem c-MYC Protein immunisiert wurden, obwohl diese Immunisierung eine *in vitro* Reaktivität, nachgewiesen durch IFN γ sezernierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, induzierte. Für dieses Ergebnis gibt es zwei sich nicht gegenseitig ausschließende Erklärungsmöglichkeiten:

- 1.) Das Immunisierungsprotokoll war suboptimal und die induzierten T-Zellen hatten keine hohe Avidität.
- 2.) Parallel wurden regulatorische T-Zellen induziert, welche eine Lymphomabstoßung unterdrückten.

Als Alternative zur Immunisierung mit dem kompletten Protein wurden Peptidvakzinen eingesetzt [158]. Diese enthielten lange, synthetische Peptide, die die potentiell immunogenen Regionen des humanen c-MYC im murinen H2^b MHC-Kontext umfassten. Die Peptidimmunisierung kann aber auch problematisch sein und unerwünschte Effekte zur Folge haben, wie am Beispiel eines MHC II restringierten Epitops des onkogenen Ha-Ras gezeigt wurde. Anstatt einen tumorprotektiven Effekt zu induzieren, wurde das Tumorstadium durch die Ha-Ras spezifischen CD4⁺ T-Zellen beschleunigt [146]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Wahl eines optimalen Vakzins nicht vorhersagen lässt und experimentell ermittelt werden muss.

Deshalb wurden für die Immunisierung lange Peptide genutzt, die die Regionen mit der höchsten Divergenz in der Aminosäuresequenz zwischen humanem und murinem c-MYC überspannen. Während die meisten der verwendeten Peptide eine CD4⁺ T-Zell- oder keine Antwort induzierten, konnte bei Nutzung des 40 AS langen NHP-B, welches einen Unterschied von fünf AS zur Mausequenz aufweist, sowohl eine CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellantwort nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Experimenten, in denen OVA als Abstoßungsantigen genutzt wurde, war NHP-B weniger effektiv, da sich bei Nutzung von NHP-B reaktiven T-Zellen in einem adoptiven T-Zelltransfermodell nur eine geringe Verzögerung im Tumorstadium ergab. Eine Ursache für diese geringe Wirksamkeit dürfte die vorhergesagte schwache Affinität der Peptide zum MHC der Maus sein.

Ein weiterer Grund für das Versagen der c-MYC Proteinvakzine und der geringen Effektivität der NHP-B Vakzine kann die Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen sein [154]. Wie in der Literatur gezeigt, erhöht die Depletion von regulatorischen T-Zellen die T-Zellreaktivität gegen Autoantigene nach Immunisierung [159]. Proteine wie c-MYC, die eine hohe Homologie von 90% identischen und 94% ähnlichen AS zu der murinen Aminosäuresequenz aufweisen, könnten eine Aktivierung von regulatorischen T-Zellen induzieren. In der Tat zeigte sich eine wichtige Rolle der regulatorischen Zellen in der Beeinflussung der Immunantwort gegen humanes c-MYC, da eine Depletion mit Anti-CD25 mAb des Klons PC61 [137] vor der Immunisierung das Überleben der NHP-B immunisierten Tiere von 25% auf 62,5% erhöhte. Dieses Experiment lieferte den Beweis, dass die gegen NHP-B induzierte T-Zellantwort

zumindest teilweise protektiv sein kann. Es scheint, dass besonders die CD8+ T-Zellen mit Spezifität für das Epitop SSPQGSPEPL, ein kurzes Peptid innerhalb von NHP-B, protektives Potential haben, da die *in vivo kill* Aktivität und die Multimerfrequenz dieser Zellen mit verbesserter Überlebenswahrscheinlichkeit im Tumortransferexperiment einhergingen.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal in einem xenogenen Ansatz als *proof of principle* gezeigt, dass die Nutzung des Protoonkogens c-MYC als T-Zell Ziel eine Anti-Tumor Aktivität bewirkt.

4.5. Kritische Aspekte zu c-MYC als T-Zellantigen

Es bestehen etliche Probleme, die in Zukunft untersucht werden müssen, bevor c-MYC als interessantes Ziel für eine adoptive T-Zelltherapie genutzt werden kann. Der wohl wichtigste Punkt ist die Frage der Autoimmunität, da c-MYC in normal proliferierendem Gewebe exprimiert wird [70]. Das Expressionsprofil von c-MYC variiert stark, wenn man die Expression in gesundem Gewebe mit der in Lymphomen und anderen Tumoren vergleicht. Während c-MYC in gesundem Gewebe einer engen Regulation unterworfen ist [70], ist diese Kontrolle in den Lymphomen und Tumoren verloren gegangen und durch eine konstitutive Aktivierung ersetzt. Das hämatopoetische und gastrointestinale System sind von c-MYC zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase abhängig und können als die kritischsten Gewebeorte für eine gezielte Anti-c-MYC Therapie betrachtet werden [62]. In einem K-RAS induzierten Lungenkrebsmodell in der Maus konnten durch induzierbare c-MYC Inhibierung mit Hilfe eines dominant negativen c-MYC Inhibitors (Omu-Myc) die entwickelten Tumoren zur Regression gezwungen werden [62]. Allerdings zeigten sich auch deutliche Nebenwirkungen in dem sich ständig regenerierendem Gewebe, wie den Darmzotten, die stark degenerierten. Diese Effekte waren aber vorübergehend und bildeten sich innerhalb von 60 Tagen nach Ende der Therapie zurück. Dies ist ermutigend und lässt die Vermutung zu, dass die möglichen Nebenwirkungen einer T-Zell vermittelten Anti-c-MYC Therapie tolerierbar sein könnten. Allerdings sind T-Zellen nicht einfach ein- und abschaltbar, wie die in diesem Modell genutzten Expressionskonstrukte [62].

Um den Punkt zu untersuchen, ob es ein therapeutisches Fenster zwischen Anti-Tumor Immunität und Autoimmunität der c-MYC spezifischen T-Zellen gibt, wurde eine humanisierte c-MYC Maus generiert [160]. In dieser transgenen Maus ist das endogene murine *c-Myc* Gen durch ein humanes *c-myc* ersetzt. Diese Maus bildet das humane c-MYC unter physiologischen Bedingungen, ist lebensfähig und zeigt keine Anzeichen eines auffälligen Phänotyps. Mit dieser Maus ist es möglich zu untersuchen, ob die Expression des Antigens in den Geweben Autoimmunität verursacht, wenn die c-MYC spezifischen T-Zellen in einer

für humanes c-MYC nicht toleranten Maus induziert und anschließend in diese Maus transferiert werden.

Ein weiteres Problem für eine c-MYC spezifische T-Zelltherapie ist ein eventuelles Auftreten eines *fratricide* genannten Phänomens, bei dem es auf Grund der hohen c-MYC Expression in den T-Zellen zur gegenseitigen Abtötung der c-MYC-spezifischen T-Zellen kommt [161, 162]. Dieses Phänomen wurde bei Survivin spezifischen T-Zellen beobachtet [161].

Vorausgesetzt, dass keine grundsätzlichen Probleme dieser Art den Einsatz von c-MYC spezifischen T-Zellen unmöglich machen, wird die gegen c-MYC als Zielantigen gerichtete T-Zelltherapie nur dann klinisch anwendbar, wenn es gelingt, die T-Zellantwort zu verbessern. Offensichtlich schränkt die hohe Homologie zwischen humanem und murinem c-MYC die Anzahl der möglichen immunogenen Epitope sehr stark ein, gegen welche eine starke, MHC I restringierte T-Zellantwort induziert werden kann. Für die Anti-c-MYC spezifische T-Zelltherapie wird es entscheidend sein, ob eine potente T-Zellantwort in HLA-A2 transgenen Mäusen induziert werden kann [25, 163]. Eine noch größere Herausforderung wird es sein, neue transgene Mausmodelle zu schaffen, in denen eine breiter angelegte T-Zellantwort gegen humanes c-MYC induziert werden kann. Dass dies grundsätzlich möglich sein könnte, ergibt sich aus der Tatsache, dass es lebens- und fortpflanzungsfähige Mäuse gibt, in denen das endogene *c-myc* Gen durch ein murines *N-myc* ersetzt wurde [164]. Die Homologie der Aminosäuresequenz zwischen humanem c-MYC und murinem N-MYC liegt bei 37% und lässt vermuten, dass eine viel breitere, mehrere Epitope umfassende T-Zellantwort gegen humanes c-MYC in diesen Mäusen generiert werden könnte. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass sich in diesen Mäusen eine effiziente T-Zellantwort induzieren lässt. In der Tat scheint in diesen transgenen Mäusen die Antwort der Lymphozyten gegen Mitogene nicht behindert zu sein [164], was die Schlussfolgerung zulässt, dass diese Strategie in der Tat durchführbar sein könnte.

Die Vorteile einer c-MYC spezifischen T-Zelltherapie wurden bereits in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich betrachtet. Zusammengefasst gibt es zwei große Vorteile, die c-MYC zu dem vielleicht besten Antigen für eine adoptive Tumorthherapie machen könnten. Dies sind die Konvergenz vieler oder vielleicht sogar aller onkogener Signalwege bei MYC, die mit einer c-MYC Überexpression in vielen verschiedenen Tumoren verbunden ist, sowie die damit verbundene Abhängigkeit der Tumorzellen von c-MYC. Die wichtigsten Hürden, die eine c-MYC spezifische T-Zelltherapie meistern muss, sind die niedrige Immunogenität, die möglichen Nebenwirkungen in Form von Autoimmunität und eine mögliche Unwirksamkeit oder Einschränkung der Therapie auf Grund des gegenseitigen Abtötens der c-MYC-spezifischen T-Zellen. Die Vor- und Nachteile sind nachfolgend in einer Tabelle zusammengefasst.

Pro	Contra
Weit verbreitet in vielen verschiedenen Tumoren, Konvergenz vieler onkogener Signalwege bei c-MYC	Mögliche Autoimmunität durch die Expression in sich teilenden Zellen, möglicher <i>fratricide</i> c-MYC spezifischer T-Zellen
Abhängigkeit der Tumorzellen von fortlaufender c-MYC Aktivität	Niedrige Immunogenität da Autoantigen, zudem hohe Homologie in Xenoorganismen

Tabelle 2: Vor- und Nachteile einer c-MYC spezifischen T-Zelltherapie

4.6. c-MYC im Vergleich zu anderen Antigenen

Das große Potential einer c-MYC spezifischen T-Zelltherapie wird deutlich, muss man c-MYC mit anderen Zielantigenen vergleichen. Dabei wird vorausgesetzt, dass es gelingt, die c-MYC spezifischen T-Zellen mit einer ähnlichen Effektivität auszustatten wie T-Zellen, die für andere Antigene verfügbar sind.

Virale Antigene sind im Vergleich zu c-MYC sicher bessere T-Zell Antigene [165]. Durch ihre hohe Immunogenität sollten T-Zellen mit hoher Avidität gegen viral transformierte Tumorzellen zur Verfügung stehen oder generiert werden können [165]. Zudem sind diese Antigene Fremdartig und das Auslösen einer Autoimmunitätsreaktion gegen nicht transformierte Zellen ist (außer durch *bystander killing*) nicht möglich. Allerdings treten viele viral induzierte Tumoren bei immunsuprimierten Patienten auf, die eine Minderheit in der Gruppe der Tumorpatienten darstellen.

Tumorassoziierte Antigene werden zurzeit am häufigsten als Antigene für die T-Zelltherapie im Menschen genutzt. Tyrosinase und MART1 finden als Antigene in der Behandlung von malignen Melanomen Anwendung [45, 166]. Sie sind zwar Autoantigene, aber dennoch relativ stark immunogen. Tyrosinase und MART1 spezifische T-Zellen können in der Tat in Melanompatienten identifiziert werden [167]. Durch die Anwendung von Tyrosinase und MART1 spezifischen T-Zellen kommt es zu Nebenwirkungen, die die Melanozyten im gesunden Gewebe betreffen, und Uveitis, Vitiligo und vorübergehenden Hörverlust bewirken können [45, 168]. Zudem ist das Auftreten von Antigenverlustvarianten beschrieben [155]. Im Vergleich zu Tyrosinase und MART1 könnten c-MYC-spezifische T-Zellen einen breiteren Einsatz finden. Das Auftreten von Antigenverlustvarianten ist für c-MYC weniger wahrscheinlich [119] und es könnten Patienten mit vielen Tumorentitäten behandelt werden. Allerdings ist es sehr viel einfacher, gegen Tyrosinase und MART1 gerichtete T-Zellen zu generieren. Das wichtigste Kriterium im Vergleich verschiedener Antigene ist sicher die mit der Therapie verbundene Autoimmunität. Während bei Tyrosinase und MART1 zwar schwere Nebenwirkungen auftreten können, sind diese auf bestimmte Organe beschränkt und klinisch auf Grund der bereits

gemachten Erfahrungen einigermaßen gut einschätzbar [157]. Für c-MYC und die mögliche Einschränkung der Therapie durch Autoimmunität liegen bisher keinerlei Erfahrungen vor. Mehrere Szenarien kommen in Betracht:

- 1) Es treten keine Nebenwirkungen auf, da die T-Zellen nur die c-MYC hoch exprimierenden Tumorzellen erkennen, während die Menge des c-MYC Proteins in den anderen Zellen keine Präsentation im MHC-Komplex erlaubt.
- 2) Die T-Zellen erkennen auch teilende Zellen in normalem Gewebe. Es gibt jedoch ein therapeutisches Fenster zwischen c-MYC spezifischer Tumormunität und Autoimmunität. Im Falle schwerer Nebenwirkungen muss die Behandlung abgebrochen werden.
- 3) Die durch die T-Zellen induzierte Toxizität ist nicht tolerierbar und eine darauf basierende Therapie somit nicht durchführbar.
- 4) Auf Grund des Phänomens des *fratricide* entfalten die c-MYC-spezifischen T-Zellen *in vivo* keine ausreichende antitumorale Wirksamkeit, weil sie sich selbst gegenseitig abtöten.

Ein weiteres tumorassoziiertes Antigen ist NY-ESO 1 [169]. Es gleicht in vielen Eigenschaften MART 1, nur wurden bei einer ersten Studie keine toxischen Nebenwirkungen beobachtet [46]. Damit wäre c-MYC nur dann besser geeignet, wenn die möglichen Nebenwirkungen gering ausfallen oder wenn keine Nebenwirkungen auftreten würden. Vermutlich können auch bei NY-ESO 1 Antigenverlustvarianten auftreten.

Ein tumorassoziiertes Antigen, welches sehr erfolgreich als T-Zell Ziel eingesetzt werden konnte, ist CD19 [48, 170]. Der große Vorteil dieses Antigens ist, dass die Autoimmunitätsreaktion gegen normale CD19 exprimierende B-Zellen zur vorübergehenden B-Zelldepletion führt, was als Nebenwirkung in Kauf genommen wird. Die Immunogenität ist mit der von c-MYC vergleichbar. Da es als Oberflächenprotein gebildet wird, ist der Einsatz von CARs möglich [171]. Ob eine CAR- basierte einer TZR-basierten adoptiven T-Zelltherapie überlegen ist, ist eine interessante Frage, jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Ein wichtiger Punkt im Vergleich von CD19 und c-MYC als Zielantigene ist die Möglichkeit des Antigenverlusts. CD19 als Teil des B-Zellrezeptors vermittelt den B-Zellen Überlebenssignale, wird jedoch nicht zwingend für das Überleben der Tumorzellen gebraucht [172]. Somit ist das Auftreten von Antigenverlustvarianten im Falle von CD19 zwar unwahrscheinlicher als im Fall von Tyrosinase, MART1 oder NY-ESO, aber doch nicht ausgeschlossen. Ob sich in den Patienten, die mit CD19-spezifischen T-Zellen behandelt wurden, Rezidive oder CD19-negative Antigenverlustvarianten des Tumors bilden, muss die Zukunft zeigen

Nicht virale, tumorspezifische Antigene wären die idealen Kandidaten als Zielantigene. Fusionsproteine wie Tel-AML 1 [173] oder BcrAbl [174] sind tumorspezifische Marker für bestimmte Tumoren und echte Neoantigene. Sie haben sich jedoch in bisherigen Versuchen als nicht ausreichend immunogen erwiesen, um als Abstoßungsantigene fungieren zu können [175]. Fusionsproteine sind nicht die einzigen nicht viralen, tumorspezifischen Antigene. Somatische Mutationen treten in allen Tumoren auf und können die Aminosäuresequenz von Proteinen verändern. Ein neuer Ansatz der Immuntherapie beruht darin, alle tumorspezifischen Mutationen durch genomweite Sequenzierung des individuellen Tumors zu erfassen und in dem individuellen Patienten eine Immunantwort gegen die mutierten Bereiche der Proteine zu induzieren [176, 177]. Während Fusionsproteine meist als Onkogenprodukte wirken und eine vitale Rolle für das Tumorstadium haben, können somatische Mutationen auch in physiologisch irrelevanten Bereichen der Proteine auftreten. Für diese ist die Entstehung von Antigenverlustvarianten möglich. Ob bei der genomweiten Sequenzierung zahlreicher Tumoren der gleichen Entität die gleichen wiederkehrenden Mutationen auftreten, die als generische Antigene für diese Tumoren in Frage kommen, wird ebenfalls die Zukunft zeigen müssen. Solche generischen und dazu vermutlich onkogenen Mutationen könnten auch für eine TZR-basierte ATCT von großem Interesse sein. Durch den Einsatz von hoch affinen TZRs und der gleichzeitigen Nutzung von mehreren Epitopen könnte die Entstehung von Antigenverlustvarianten eventuell minimiert werden.

Abschluss

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass humanes c-MYC im murinen H2^b MHC-Kontext immunogen ist. Die c-MYC spezifische T-Zellantwort ist allerdings von niedriger Affinität, da humanes c-MYC überexprimierende murine B-Lymphomzellen, anders als OVA exprimierende B-Lymphomzellen in C57Bl/6 Rezipienten nicht abgestoßen werden. Von den verschiedenen identifizierten immunogenen Peptiden zeigte nur NHP-B, das Peptid welches als einziges ein immunogenes CD8⁺ T-Zell restringiertes Epitop enthielt, eine Antitumoraktivität. Diese Aktivität korrelierte mit der *in vivo kill* Aktivität, der Frequenz und der Multimerbindungskapazität der NHP-B2 spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Auch wenn die Ergebnisse im i.v. Lymphommodell und im adoptiven Transfermodell nur eine signifikante Verzögerung des Tumorstadiums erzeugten, so ist c-MYC als T-Zellantigen doch ein attraktives Ziel, welches auf lange Sicht erfolgversprechender ist als viele andere, für das Überleben oder das Wachstum des Tumors nicht relevante Antigene.

5. Literaturverzeichnis

1. Murphy, K.P., *Janeway's Immunobiology 8th Edition*. 8th ed. Janeway's Immunobiology, ed. K. Murphy. Vol. 8th Edition. 2012, USA: Garland Science. 868.
2. Rudolph, M.G., R.L. Stanfield, and I.A. Wilson, *How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 419-66.
3. Garboczi, D.N., et al., *Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2*. *Nature*, 1996. **384**(6605): p. 134-41.
4. Garcia, K.C., et al., *An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex*. *Science*, 1996. **274**(5285): p. 209-19.
5. Fremont, D.H., et al., *Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb*. *Science*, 1992. **257**(5072): p. 919-27.
6. Garboczi, D.N., D.T. Hung, and D.C. Wiley, *HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in Escherichia coli and complexed with single antigenic peptides*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(8): p. 3429-33.
7. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, *Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis*. *Nature*, 1974. **251**(5475): p. 547-8.
8. Matzinger, P. and T. Kamala, *Tissue-based class control: the other side of tolerance*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(3): p. 221-30.
9. Fink, P.J. and M.J. Bevan, *H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity*. *J Exp Med*, 1978. **148**(3): p. 766-75.
10. Murphy, K.M., A.B. Heimberger, and D.Y. Loh, *Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo*. *Science*, 1990. **250**(4988): p. 1720-3.
11. Walker, L.S. and A.K. Abbas, *The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(1): p. 11-9.
12. Yin, Y., et al., *Structure of a TCR with high affinity for self-antigen reveals basis for escape from negative selection*. *EMBO J*, 2011. **30**(6): p. 1137-48.
13. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 305-34.
14. Kurts, C., et al., *CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(22): p. 12703-7.
15. Asano, M., et al., *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. *J Exp Med*, 1996. **184**(2): p. 387-96.
16. Parker, K.C., et al., *Sequence motifs important for peptide binding to the human MHC class I molecule, HLA-A2*. *J Immunol*, 1992. **149**(11): p. 3580-7.
17. Parker, K.C., M.A. Bednarek, and J.E. Coligan, *Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains*. *J Immunol*, 1994. **152**(1): p. 163-75.
18. Trautwein, N. and S. Stevanovic, *Establishing MHC class I Peptide motifs*. *Methods Mol Biol*, 2013. **960**: p. 159-68.
19. Saunders, P.M. and P. van Endert, *Running the gauntlet: from peptide generation to antigen presentation by MHC class I*. *Tissue Antigens*, 2011. **78**(3): p. 161-70.
20. Harndahl, M., et al., *Peptide-MHC class I stability is a better predictor than peptide affinity of CTL immunogenicity*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(6): p. 1405-16.
21. Kieback, E. and W. Uckert, *Enhanced T cell receptor gene therapy for cancer*. *Expert Opin Biol Ther*, 2010. **10**(5): p. 749-62.
22. Stone, J.D., A.S. Chervin, and D.M. Kranz, *T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity*. *Immunology*, 2009. **126**(2): p. 165-76.

23. Li, Y., et al., *Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(3): p. 349-54.
24. Wilde, S., et al., *Dendritic cells pulsed with RNA encoding allogeneic MHC and antigen induce T cells with superior antitumor activity and higher TCR functional avidity*. Blood, 2009. **114**(10): p. 2131-9.
25. Li, L.P., et al., *Transgenic mice with a diverse human T cell antigen receptor repertoire*. Nat Med, 2010. **16**(9): p. 1029-34.
26. Schmid, D.A., et al., *Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 4936-46.
27. Soto, C.M., et al., *MHC-class I-restricted CD4 T cells: a nanomolar affinity TCR has improved anti-tumor efficacy in vivo compared to the micromolar wild-type TCR*. Cancer Immunol Immunother, 2012.
28. Larsen, M.V., et al., *Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction*. BMC Bioinformatics, 2007. **8**: p. 424.
29. Nielsen, M., et al., *The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage*. Immunogenetics, 2005. **57**(1-2): p. 33-41.
30. Stranzl, T., et al., *NetCTLpan: pan-specific MHC class I pathway epitope predictions*. Immunogenetics, 2010. **62**(6): p. 357-68.
31. Nielsen, M. and O. Lund, *NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction*. BMC Bioinformatics, 2009. **10**: p. 296.
32. Cheever, M.A., P.D. Greenberg, and A. Fefer, *Tumor neutralization, immunotherapy, and chemoimmunotherapy of a Friend leukemia with cells secondarily sensitized in vitro: II. Comparison of cells cultured with and without tumor to noncultured immune cells*. J Immunol, 1978. **121**(6): p. 2220-7.
33. Rooney, C.M., et al., *Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation*. Lancet, 1995. **345**(8941): p. 9-13.
34. Bollard, C.M., C.M. Rooney, and H.E. Heslop, *T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease*. Nat Rev Clin Oncol, 2012. **9**(9): p. 510-9.
35. Fujita, Y., C.M. Rooney, and H.E. Heslop, *Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases*. Bone Marrow Transplant, 2008. **41**(2): p. 193-8.
36. Willimsky, G. and T. Blankenstein, *Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance*. Nature, 2005. **437**(7055): p. 141-6.
37. Pavlu, J., et al., *Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned?* Blood, 2011. **117**(3): p. 755-63.
38. Rosenberg, S.A., P. Spiess, and R. Lafreniere, *A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes*. Science, 1986. **233**(4770): p. 1318-21.
39. Dudley, M.E., et al., *Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens*. J Clin Oncol, 2008. **26**(32): p. 5233-9.
40. Coulie, P.G., et al., *A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 35-42.
41. Kawakami, Y., et al., *Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3515-9.
42. Clay, T.M., et al., *Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity*. J Immunol, 1999. **163**(1): p. 507-13.
43. Engels, B. and W. Uckert, *Redirecting T lymphocyte specificity by T cell receptor gene transfer--a new era for immunotherapy*. Mol Aspects Med, 2007. **28**(1): p. 115-42.

44. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*. Science, 2006. **314**(5796): p. 126-9.
45. Johnson, L.A., et al., *Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen*. Blood, 2009. **114**(3): p. 535-46.
46. Robbins, P.F., et al., *Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1*. J Clin Oncol, 2011. **29**(7): p. 917-24.
47. Porter, D.L., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia*. N Engl J Med, 2011. **365**(8): p. 725-33.
48. Kalos, M., et al., *T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia*. Sci Transl Med, 2011. **3**(95): p. 95ra73.
49. Milone, M.C., et al., *Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo*. Mol Ther, 2009. **17**(8): p. 1453-64.
50. Yee, C., et al., *Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16168-73.
51. Mahon, F.X., et al., *Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance*. Blood, 2000. **96**(3): p. 1070-9.
52. Schietinger, A., et al., *Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4(+) and CD8(+) T cells during the effector phase*. J Exp Med, 2010. **207**(11): p. 2469-77.
53. Spiotto, M.T., D.A. Rowley, and H. Schreiber, *Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors*. Nat Med, 2004. **10**(3): p. 294-8.
54. Anders, K., et al., *Oncogene-targeting T cells reject large tumors while oncogene inactivation selects escape variants in mouse models of cancer*. Cancer Cell, 2011. **20**(6): p. 755-67.
55. Kammertoens, T., T. Schuler, and T. Blankenstein, *Immunotherapy: target the stroma to hit the tumor*. Trends Mol Med, 2005. **11**(5): p. 225-31.
56. Briesemeister, D., et al., *Tumor rejection by local interferon gamma induction in established tumors is associated with blood vessel destruction and necrosis*. Int J Cancer, 2011. **128**(2): p. 371-8.
57. Engels, B., D.A. Rowley, and H. Schreiber, *Targeting stroma to treat cancers*. Semin Cancer Biol, 2012. **22**(1): p. 41-9.
58. Kammertoens, T. and T. Blankenstein, *Making and circumventing tolerance to cancer*. Eur J Immunol, 2009. **39**(9): p. 2345-53.
59. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 269-81.
60. Offringa, R., *Antigen choice in adoptive T-cell therapy of cancer*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(2): p. 190-9.
61. Schietinger, A., M. Philip, and H. Schreiber, *Specificity in cancer immunotherapy*. Semin Immunol, 2008. **20**(5): p. 276-85.
62. Soucek, L., et al., *Modelling Myc inhibition as a cancer therapy*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 679-83.
63. Felsher, D.W. and J.M. Bishop, *Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages*. Mol Cell, 1999. **4**(2): p. 199-207.
64. Albiñ, A., J.I. Johnsen, and M.A. Henriksson, *MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies*. Adv Cancer Res, 2010. **107**: p. 163-224.

65. Meyer, N. and L.Z. Penn, *Reflecting on 25 years with MYC*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(12): p. 976-90.
66. Wasylshen, A.R. and L.Z. Penn, *Myc: the beauty and the beast*. Genes Cancer, 2010. **1**(6): p. 532-41.
67. Prochownik, E.V. and P.K. Vogt, *Therapeutic Targeting of Myc*. Genes Cancer, 2010. **1**(6): p. 650-659.
68. Sheiness, D. and J.M. Bishop, *DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus*. J Virol, 1979. **31**(2): p. 514-21.
69. Vennstrom, B., et al., *Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29*. J Virol, 1982. **42**(3): p. 773-9.
70. Henriksson, M. and B. Luscher, *Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation*. Adv Cancer Res, 1996. **68**: p. 109-82.
71. Gregory, M.A. and S.R. Hann, *c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(7): p. 2423-35.
72. Hann, S.R., et al., *The alternatively initiated c-Myc proteins differentially regulate transcription through a noncanonical DNA-binding site*. Genes Dev, 1994. **8**(20): p. 2441-52.
73. Oster, S.K., et al., *The myc oncogene: Marvelously Complex*. Adv Cancer Res, 2002. **84**: p. 81-154.
74. Moshier, J.A., et al., *Transformation of NIH/3T3 cells by ornithine decarboxylase overexpression*. Cancer Res, 1993. **53**(11): p. 2618-22.
75. Bush, A., et al., *c-myc null cells misregulate cad and gadd45 but not other proposed c-Myc targets*. Genes Dev, 1998. **12**(24): p. 3797-802.
76. Wu, K.J., et al., *Direct activation of TERT transcription by c-MYC*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 220-4.
77. Hermeking, H., et al., *Identification of CDK4 as a target of c-MYC*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(5): p. 2229-34.
78. Hermeking, H. and D. Eick, *Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53*. Science, 1994. **265**(5181): p. 2091-3.
79. Neel, B.G., et al., *Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion*. Cell, 1981. **23**(2): p. 323-34.
80. Payne, G.S., et al., *Analysis of avian leukosis virus DNA and RNA in bursal tumours: viral gene expression is not required for maintenance of the tumor state*. Cell, 1981. **23**(2): p. 311-22.
81. Shen-Ong, G.L., et al., *Novel myc oncogene RNA from abortive immunoglobulin-gene recombination in mouse plasmacytomas*. Cell, 1982. **31**(2 Pt 1): p. 443-52.
82. Crews, S., et al., *Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmacytomas*. Science, 1982. **218**(4579): p. 1319-21.
83. Dalla-Favera, R., et al., *Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(24): p. 7824-7.
84. Alitalo, K., et al., *Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(6): p. 1707-11.
85. Dalla-Favera, R., F. Wong-Staal, and R.C. Gallo, *Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient*. Nature, 1982. **299**(5878): p. 61-3.
86. Collins, S. and M. Groudine, *Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line*. Nature, 1982. **298**(5875): p. 679-81.
87. Schwab, M., et al., *Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour*. Nature, 1983. **305**(5931): p. 245-8.

88. Kohl, N.E., et al., *Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas*. Cell, 1983. **35**(2 Pt 1): p. 359-67.
89. Henriksson, M., et al., *Phosphorylation sites mapping in the N-terminal domain of c-myc modulate its transforming potential*. Oncogene, 1993. **8**(12): p. 3199-209.
90. Bahram, F., et al., *c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover*. Blood, 2000. **95**(6): p. 2104-10.
91. Rajagopalan, H., et al., *Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability*. Nature, 2004. **428**(6978): p. 77-81.
92. Popov, N., et al., *The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(7): p. 765-74.
93. Arnold, H.K., et al., *The Axin1 scaffold protein promotes formation of a degradation complex for c-Myc*. EMBO J, 2009. **28**(5): p. 500-12.
94. Junttila, M.R. and J. Westermarck, *Mechanisms of MYC stabilization in human malignancies*. Cell Cycle, 2008. **7**(5): p. 592-6.
95. von der Lehr, N., et al., *The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteasomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription*. Mol Cell, 2003. **11**(5): p. 1189-200.
96. Adhikary, S., et al., *The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation*. Cell, 2005. **123**(3): p. 409-21.
97. Knoepfler, P.S. and A.M. Kenney, *Neural precursor cycling at sonic speed: N-Myc pedals, GSK-3 brakes*. Cell Cycle, 2006. **5**(1): p. 47-52.
98. Sears, R., et al., *Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability*. Genes Dev, 2000. **14**(19): p. 2501-14.
99. Chen, Y. and O.I. Olopade, *MYC in breast tumor progression*. Expert Rev Anticancer Ther, 2008. **8**(10): p. 1689-98.
100. Pelengaris, S. and M. Khan, *The c-MYC oncoprotein as a treatment target in cancer and other disorders of cell growth*. Expert Opin Ther Targets, 2003. **7**(5): p. 623-42.
101. Adams, J.M., et al., *The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice*. Nature, 1985. **318**(6046): p. 533-8.
102. Schmidt, E.V., et al., *Transgenic mice bearing the human c-myc gene activated by an immunoglobulin enhancer: a pre-B-cell lymphoma model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(16): p. 6047-51.
103. Speth, C., et al., *Akv murine leukemia virus enhances lymphomagenesis in myc-kappa transgenic and in wild-type mice*. Virology, 1995. **206**(1): p. 93-9.
104. Kovalchuk, A.L., et al., *Burkitt lymphoma in the mouse*. J Exp Med, 2000. **192**(8): p. 1183-90.
105. Stewart, T.A., P.K. Pattengale, and P. Leder, *Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes*. Cell, 1984. **38**(3): p. 627-37.
106. Ellwood-Yen, K., et al., *Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors*. Cancer Cell, 2003. **4**(3): p. 223-38.
107. Ehrhardt, A., et al., *Development of pulmonary bronchiolo-alveolar adenocarcinomas in transgenic mice overexpressing murine c-myc and epidermal growth factor in alveolar type II pneumocytes*. Br J Cancer, 2001. **84**(6): p. 813-8.
108. Jensen, N.A., et al., *Astroglial c-Myc overexpression predisposes mice to primary malignant gliomas*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8300-8.
109. Davis, A.C., et al., *A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice*. Genes Dev, 1993. **7**(4): p. 671-82.
110. Jain, M., et al., *Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC*. Science, 2002. **297**(5578): p. 102-4.

111. D'Cruz, C.M., et al., *c-MYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous Kras2 mutations*. *Nat Med*, 2001. **7**(2): p. 235-9.
112. Shachaf, C.M., et al., *MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer*. *Nature*, 2004. **431**(7012): p. 1112-7.
113. Pelengaris, S., M. Khan, and G.I. Evan, *Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression*. *Cell*, 2002. **109**(3): p. 321-34.
114. Pelengaris, S., et al., *Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion*. *Mol Cell*, 1999. **3**(5): p. 565-77.
115. Flores, I., et al., *Defining the temporal requirements for Myc in the progression and maintenance of skin neoplasia*. *Oncogene*, 2004. **23**(35): p. 5923-30.
116. Sansom, O.J., et al., *Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine*. *Nature*, 2007. **446**(7136): p. 676-9.
117. Weinstein, I.B., *Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer*. *Science*, 2002. **297**(5578): p. 63-4.
118. Shachaf, C.M., et al., *Genomic and proteomic analysis reveals a threshold level of MYC required for tumor maintenance*. *Cancer Res*, 2008. **68**(13): p. 5132-42.
119. Choi, P.S., et al., *Lymphomas that recur after MYC suppression continue to exhibit oncogene addiction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(42): p. 17432-7.
120. Lee, J.W., et al., *Mutational analysis of MYC in common epithelial cancers and acute leukemias*. *APMIS*, 2006. **114**(6): p. 436-9.
121. Druker, B.J., et al., *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells*. *Nat Med*, 1996. **2**(5): p. 561-6.
122. Guo, J., et al., *Efficacy, pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of the Myc-Max disruptor, 10058-F4 [Z,E]-5-[4-ethylbenzylidene]-2-thioxothiazolidin-4-one, in mice*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009. **63**(4): p. 615-25.
123. Dawson, M.A., et al., *Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia*. *Nature*, 2011. **478**(7370): p. 529-33.
124. Mertz, J.A., et al., *Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(40): p. 16669-74.
125. Kessler, J.D., et al., *A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis*. *Science*, 2012. **335**(6066): p. 348-53.
126. Sarkar, A.K. and J.G. Nuchtern, *Lysis of MYCN-amplified neuroblastoma cells by MYCN peptide-specific cytotoxic T lymphocytes*. *Cancer Res*, 2000. **60**(7): p. 1908-13.
127. Gerbitz, A., et al., *Deregulation of the proto-oncogene c-myc through t(8;22) translocation in Burkitt's lymphoma*. *Oncogene*, 1999. **18**(9): p. 1745-53.
128. Gerbitz, A., et al., *Stromal interferon-gamma signaling and cross-presentation are required to eliminate antigen-loss variants of B cell lymphomas in mice*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e34552.
129. Barth, R.J., Jr., et al., *Unique murine tumor-associated antigens identified by tumor infiltrating lymphocytes*. *J Immunol*, 1990. **144**(4): p. 1531-7.
130. Pajic, A., et al., *Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line*. *Int J Cancer*, 2000. **87**(6): p. 787-93.
131. Ohl, L., et al., *CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 279-88.
132. Morita, S., T. Kojima, and T. Kitamura, *Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses*. *Gene Ther*, 2000. **7**(12): p. 1063-6.
133. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(17): p. 3389-402.

134. Erup Larsen, M., et al., *HLA restrictor--a tool for patient-specific predictions of HLA restriction elements and optimal epitopes within peptides*. Immunogenetics, 2011. **63**(1): p. 43-55.
135. Durbin, J.E., et al., *Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease*. Cell, 1996. **84**(3): p. 443-50.
136. Schaefer, B.C., et al., *Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/ dendritic cell interactions in vivo*. Cell Immunol, 2001. **214**(2): p. 110-22.
137. Setiady, Y.Y., J.A. Coccia, and P.U. Park, *In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by Fcγ3+ phagocytes*. Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 780-6.
138. Schuler, T. and T. Blankenstein, *Naive CD8(+) but not CD4(+) T cells induce maturation of dendritic cells*. J Mol Med (Berl), 2002. **80**(8): p. 533-41.
139. Hengen, P., *Purification of His-Tag fusion proteins from Escherichia coli*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(7): p. 285-6.
140. Staeger, M.S., et al., *MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4550-5.
141. Bathe, O.F., N. Dalyot-Herman, and T.R. Malek, *Therapeutic limitations in tumor-specific CD8+ memory T cell engraftment*. BMC Cancer, 2003. **3**: p. 21.
142. Shastri, N. and F. Gonzalez, *Endogenous generation and presentation of the ovalbumin peptide/Kb complex to T cells*. J Immunol, 1993. **150**(7): p. 2724-36.
143. Zhang, B., et al., *IFN-γ- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1398-404.
144. Daniel, D., et al., *Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4+ T cells*. J Exp Med, 2003. **197**(8): p. 1017-28.
145. DeNardo, D.G., et al., *CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages*. Cancer Cell, 2009. **16**(2): p. 91-102.
146. Siegel, C.T., et al., *Enhanced growth of primary tumors in cancer-prone mice after immunization against the mutant region of an inherited oncoprotein*. J Exp Med, 2000. **191**(11): p. 1945-56.
147. Dutoit, V., et al., *Functional avidity of tumor antigen-specific CTL recognition directly correlates with the stability of MHC/peptide multimer binding to TCR*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1167-71.
148. Harper, D.M., et al., *Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial*. Lancet, 2004. **364**(9447): p. 1757-65.
149. Rosenberg, S.A., M.E. Dudley, and N.P. Restifo, *Cancer immunotherapy*. N Engl J Med, 2008. **359**(10): p. 1072.
150. Hinrichs, C.S., et al., *Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy*. Blood, 2011. **117**(3): p. 808-14.
151. Wilde, S. and D.J. Schendel, *High-quality and high-avidity T cell clones specific for tumor-associated antigens and how to find them*. Oncoimmunology, 2012. **1**(9): p. 1643-1644.
152. Blankenstein, T., et al., *The determinants of tumour immunogenicity*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 307-13.
153. von Bergwelt-Baildon, M.S., et al., *CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition*. Blood, 2006. **108**(1): p. 228-37.
154. Wang, H.Y., et al., *Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy*. Immunity, 2004. **20**(1): p. 107-18.
155. Mackensen, A., et al., *Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(31): p. 5060-9.
156. Restifo, N.P., et al., *Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(2): p. 100-8.

157. Yee, C., et al., *Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1637-44.
158. Bijker, M.S., et al., *Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation*. Eur J Immunol, 2008. **38**(4): p. 1033-42.
159. Yan, X., et al., *Regulatory T-cell depletion synergizes with gp96-mediated cellular responses and antitumor activity*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(12): p. 1763-74.
160. Lehmann, F.M., et al., *Humanized c-Myc mouse*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e42021.
161. Leisegang, M., et al., *MHC-restricted fratricide of human lymphocytes expressing survivin-specific transgenic T cell receptors*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 3869-77.
162. Wang, R., et al., *The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation*. Immunity, 2011. **35**(6): p. 871-82.
163. Pascolo, S., et al., *HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2043-51.
164. Malynn, B.A., et al., *N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation*. Genes Dev, 2000. **14**(11): p. 1390-9.
165. Leen, A.M., et al., *Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals*. Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1160-6.
166. Frankel, T.L., et al., *Both CD4 and CD8 T cells mediate equally effective in vivo tumor treatment when engineered with a highly avid TCR targeting tyrosinase*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 5988-98.
167. Spagnoli, G.C., et al., *Peptide-specific CTL in tumor infiltrating lymphocytes from metastatic melanomas expressing MART-1/Melan-A, gp100 and Tyrosinase genes: a study in an unselected group of HLA-A2.1-positive patients*. Int J Cancer, 1995. **64**(5): p. 309-15.
168. Jacobs, J.F., et al., *Vaccine-specific local T cell reactivity in immunotherapy-associated vitiligo in melanoma patients*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(1): p. 145-51.
169. Kirkin, A.F., K. Dzhandzhugazyan, and J. Zeuthen, *Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes*. APMIS, 1998. **106**(7): p. 665-79.
170. Porter, D.L., et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for B-cell Malignancies*. J Cancer, 2011. **2**: p. 331-2.
171. Gilham, D.E., et al., *CAR-T cells and solid tumors: tuning T cells to challenge an inveterate foe*. Trends Mol Med, 2012. **18**(7): p. 377-84.
172. Masir, N., et al., *Loss of CD19 expression in B-cell neoplasms*. Histopathology, 2006. **48**(3): p. 239-46.
173. Zelent, A., M. Greaves, and T. Enver, *Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4275-83.
174. Chandra, H.S., et al., *Philadelphia Chromosome Symposium: commemoration of the 50th anniversary of the discovery of the Ph chromosome*. Cancer Genet, 2011. **204**(4): p. 171-9.
175. Popovic, J., et al., *The only proposed T-cell epitope derived from the TEL-AML1 translocation is not naturally processed*. Blood, 2011. **118**(4): p. 946-54.
176. Cronin, M. and J.S. Ross, *Comprehensive next-generation cancer genome sequencing in the era of targeted therapy and personalized oncology*. Biomark Med, 2011. **5**(3): p. 293-305.
177. Charoentong, P., et al., *Bioinformatics for cancer immunology and immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(11): p. 1885-903.

6. Abkürzungen

APCs	Antigen präsentierende Zellen, <i>antigen presenting cells</i>
AS	Aminosäure
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CD	Oberflächenmarker, <i>cluster of differentiation</i>
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CML	chronisch myeloische Leukämie
CT	<i>cancer testis</i>
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EBV	Epstein-Barr-Virus
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSK3b	Glykogen Synthese Kinase 3b
GvHD	<i>graft vs. host disease</i>
HLHZip	<i>Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper</i>
HPV	humanes Papillomvirus
IFA	inkomplettes Freund'sches Adjuvants
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
i.v.	intravenös
mAb	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>major histocompatibility complex</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität

NHP	nicht homologes Peptid
OVA	Ovalbumin
RT	Raumtemperatur
TIL	tumorinfiltrierender Lymphozyt
TZR	T-Zellrezeptor
ZKÜ	Zellkulturüberstand

7. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Vor allem möchte ich mich bei meinen Betreuern Prof. Armin Gerbitz und Prof. Thomas Blankenstein bedanken, die mir die Möglichkeit zur Anfertigung einer Doktorarbeit im immunologischen Forschungsgebiet ermöglichten. Prof. Gerbitz für seine diplomatisch geschickten Motivationstricks, seine nette Art, sowie seine Diskussionsfreudigkeit und Unterstützung mir gegenüber. Prof. Blankenstein vor allem für seine schonungslose Kritik, der allerdings immer Hilfe in Form von konstruktiven Ratschlägen folgte.

Desweiteren natürlich allen Mitarbeitern der AG Gerbitz, Schüler, Blankenstein, Uckert und Sieper, die immer mit Rat und Tat zur Seite standen, sobald sich ein Problem auftat. Insbesondere war die Hilfe von Frau Wilke unschätzbar wertvoll, da sie die Durchführung vieler Experimente durch ihre Kompetenz möglich machte. Zudem wäre die Arbeit ohne ihr nettes Lachen und ihr angenehmes Wesen nur halb so schön gewesen. Bei Frau Fahrenwaldt und Herrn Lieske möchte ich mich auch für ihre Hilfe und die freudigen Diskussionen mit mir bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Kammertöns, welcher mit großem Interesse das MYC Projekt verfolgte, immer nach Möglichkeiten zur Verbesserung der wissenschaftlichen Arbeit suchte und immer Spaß in die „ernste“ Wissenschaft brachte 😊

Auch den „Münchener“ Frank Lehmann, Josef Mautner und Georg Bornkamm möchte ich für die gute Zusammenarbeit und vor allem für das Näherbringen der bayrischen Lebensart danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich immer motivierten und unterstützten, wenn ich Unterstützung brauchte.

Danke, *thank you*, merci ;-)

8. Anhang