

# **Charakterisierung einer hABL-spezifischen CD4<sup>+</sup>- T-Zellantwort und die Anwendung des AdEtOH als Katalysator der Peptidbeladung**

## **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  
**Sabine Höpner**

aus Berlin

Oktober 2008

**1. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann**

**2. Gutachter: Privatdozent Dr. Christian Freund**

**Disputation am: 22.01.2009**

## ***Für meine Eltern***

**Man sollte auf alles achten, denn man kann alles deuten.  
- Hermann Hesse**

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Onkogene und Tumorantigene</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Die Rolle des Immunsystems bei der Krebsentstehung</b> .....	<b>2</b>
1.2.1. „Immunosurveillance“ .....	3
<b>1.3 Formen der Leukämie und deren Entstehung</b> .....	<b>6</b>
1.3.1. Chronische myeloische (CML) und chronische lymphatische Leukämie (CLL) ....	6
1.3.2. Akute myeloische (AML) und akute lymphatische Leukämie (ALL) .....	7
<b>1.4. Das Fusionsprotein BCR-ABL</b> .....	<b>8</b>
1.4.1. Entstehung des Philadelphia Chromosoms und krankheits-bildende Faktoren .....	8
1.4.2. BCR-ABL-Variationen und deren Assoziation mit der Ausprägung der Leukämie.....	9
1.4.3. Auswirkung des Fusionsproteins BCR-ABL auf die Regulation der Zelle .....	10
<b>1.5. T-Zell-vermittelte Immunität</b> .....	<b>12</b>
1.5.1. Effektorfunktion und Effektormoleküle.....	14
1.5.2. Toleranzinduktion als Kontrollelement der Immunreaktion.....	15
<b>1.6. Tumorimmunologische Therapieansätze</b> .....	<b>18</b>
1.6.1. Behandlungsformen und therapeutische Ansätze für die CML .....	19
1.6.2. Generelle Tumor-Behandlungsstrategien .....	21
1.6.3. Die Rolle der CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen für eine Tumorbehandlung.....	23
<b>1.7. Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>28</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1. Material</b> .....	<b>31</b>
2.1.1. Zelllinien .....	31
2.1.2. Puffer und Chemikalien .....	33
2.1.3. Peptide und biologisches Material.....	36
2.1.4. Monoklonale Antikörper.....	38
2.1.5. Geräte .....	39
2.1.6. Software .....	39
<b>2.2. Methoden</b> .....	<b>40</b>
2.2.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	40
2.2.2. Agarose Gelelektrophorese, DNA Aufreinigung .....	42
2.2.3. Restriktionsspaltung, Ligation, Transformation und Plasmidaufarbeitung.....	43
2.2.4. Prokaryotische Expression und Aufreinigung von Proteinen.....	43
2.2.5. Kultivierung von Zellen und Zellpräparation .....	47
2.2.6. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	51
2.2.7. Zelloberflächlicher MHC-Beladungsassay.....	52
2.2.8. Tumorinduktion /CML-Mausmodell.....	53
2.2.9. Induktion von primären Immunantworten .....	54
2.2.10. ELISPOT-Assay .....	55
2.2.11. Proliferationsassay .....	56
2.2.12. Transfektion und retrovirale Infektion von Zellen .....	57
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>60</b>

<b>3.1. Charakterisierung des humanen Peptides ABL908-922 .....</b>	<b>60</b>
3.1.1. Identifizierung der Immunogenität verschiedener ABL- Epitope .....	60
3.1.2. Die Prozessierbarkeit des hABL908-922 Epitopes im ABL-Protein .....	65
3.1.3. BCR-ABL-transduzierte Zellen präsentieren hABL908-922 .....	70
<b>3.2. Untersuchung der hABL-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zell-antwort im BCR-ABL<sup>+</sup>- Tumormodell .....</b>	<b>74</b>
3.2.1. Modulation der Immunantwort hABL908-922 durch Inhibition der regulatorischen T-Zell-Population .....	79
<b>3.3. AdEtOH, ein allelspezifischer Katalysator .....</b>	<b>83</b>
3.3.1. Die katalytische Aktivität des AdEtOH .....	83
3.3.2. Die katalytische Aktivität des AdEtOH ist allelspezifisch .....	84
3.3.3. Anwendung des AdEtOH als Katalysator für verschiedene HLA-DR1 restringierte Peptide .....	86
3.3.4. Modulation CD4 <sup>+</sup> spezifischer T-Zellantworten <i>in vitro</i> durch den Einsatz von AdEtOH .....	89
3.3.5. Modulation CD4 <sup>+</sup> -spezifischer T-Zellantworten <i>in vivo</i> durch den Einsatz von AdEtOH .....	92
3.3.6. Die Verstärkung vom Tumorantigenen durch AdEtOH.....	94
<b>4.DISKUSSION .....</b>	<b>96</b>
4.1. Die Charakterisierung der hABL908-922-spezifischen CD4 <sup>+</sup> -Immunantwort.....	96
4.2. AdEtOH ist ein effektiver Katalysator für die Peptid-Beladung von MHC-Klasse- II-Varianten .....	103
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>106</b>
5.1. Eigene Publikationen .....	106
5.2. Publikationen .....	106
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>116</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>118</b>
<b>8. ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>120</b>
<b>9.DANKSAGUNG .....</b>	<b>122</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Onkogene und Tumorantigene

Ausgangspunkt für die Etablierung von Tumoren sind zumeist genetische Veränderungen, welche das Zellwachstum betreffen. Dabei unterscheidet man zwei Varianten, die den Kontrollverlust des Wachstums verursachen können. Eine Möglichkeit besteht in der genetischen Veränderung von Genen, die auf das Zellwachstum stimulierend einwirken. Wird durch die genetische Veränderung eine Hyperaktivierung dieser Gene erreicht, können sich die entarteten Zellen unkontrolliert vermehren und zur Tumorbildung führen. Die andere Möglichkeit des Kontrollverlustes bezieht sich auf Veränderungen von Genen, die ihrerseits regulativ auf die Proliferation einwirken. Fehlerhafte Veränderungen, die zur Inaktivierung dieser Gene führen, verursachen ebenfalls eine maligne Transformation der Zelle, die sich in unkontrolliertem Wachstum widerspiegelt.

Tumorantigene werden in zwei Gruppen unterteilt. Es gibt zum einen die spezifischen Tumorantigene, auch Neoantigene genannt, und zum anderen die tumorassoziierten Antigene. Die Neoantigene werden durch spezielle Mutationsereignisse, wie Punktmutation oder chromosomale Translokation in der Tumorzelle erzeugt, wobei Antigene generiert werden, welche vom Immunsystem als „fremd“ erkannt werden. Ein Beispiel für die chromosomale Translokation ist das Fusionsprotein BCR-ABL, welches in CML-Patienten vorkommt. Infolge der Translokation zwischen des BCR-Gens und des ABL-Gens tritt eine Sequenzfolge auf, welche in normalen Zellen nicht auftritt. Die Epitope aus der Region könnten potentiell eine Immunreaktion auslösen, da sie als „fremd“ gelten<sup>1</sup>. Einige Epitope aus der Region wurden bereits als Antigene in CML-Patienten identifiziert. Untersuchungen ergaben, dass entsprechende spezifische zytotoxische T-Lymphozyten in den Patienten existieren<sup>2,3</sup>. Ebenso können Punktmutationen, wie beispielsweise im Protein p53 zu veränderten Proteinsequenzen führen, die dann ebenfalls nur in Tumorzellen, nicht aber in normalen Zellen zu finden sind. Im Gegensatz zu den spezifischen Tumorantigenen werden die tumorassoziierten Antigene nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von gesunden Zellen exprimiert. Der Unterschied besteht dann vor allem in der Expressionsstärke, wobei die Proteine in Tumorzellen meistens überexprimiert sind. Dadurch können Peptide des verstärkt exprimierten Proteins mit erhöhter Dichte auf Tumorzellen durch MHC-Moleküle präsentiert werden. Diese erhöhte Dichte kann wiederum der Erkennung durch spezifische T-Zellen dienen. Demnach können sowohl für spezifische Tumorantigene als auch für tumorassoziierte Antigene vom Organismus spezifische T-Zellen ausgebildet werden. Ein Beispiel dafür ist das Enzym

Tyrosinase, welches in normalen Melanozyten exprimiert wird. In Melanomzellen kommt es jedoch in wesentlich stärkerem Maße vor, wobei dessen Antigene in Melanompatienten die Bildung Tyrosinase-spezifischer T-Zellen induzieren können<sup>4,5</sup>. Weiterhin konnten in Patienten mit Brust- oder Bauchspeicheldrüsentumoren autologe Lymphozyten identifiziert werden, die spezifisch gegen das Mucin-1 Protein reagierten<sup>6,7</sup>. Voraussetzung für die T-Zell-spezifische Erkennung der Fremdsequenz ist immer die Präsentation des Antigens durch den MHC-Komplex. Nur solche Antigene, welche in die Bindungstasche des MHC-Moleküls passen, können eine spezifische Immunantwort auslösen. Da die Sequenzveränderungen nur kleine Bereiche der Proteinsequenz umfassen, ist die Möglichkeit relativ gering, dass sie in individuelle MHC-Bindungsfurchen passen und präsentiert werden. Einige von den nicht nur bekannten, sondern auch präsentierten Tumorantigenen sind in der Tabelle 1.1. zusammengefasst.

**Tabelle 1.1.: Tumorantigene und ihre Eigenschaften**

Antigenklasse	Antigen	Tumortyp
embryonal	MAGE-1 MAGE-3	Melanom, Brustkrebs, Gliom
abnorme Modifikation nach Translation	MUC-1	Brustkrebs, Pankreaskrebs
Fusionsprotein	BCR-ABL	Chronische Leukämie
embryonal	NY-ESO-1	Melanoma und andere Krebsarten
Onkovirales Protein	HPV Typ-16, Proteine E6, E7	Zervixkarzinom

## 1.2. Die Rolle des Immunsystems bei der Krebsentstehung

Es besteht eine kontroverse Diskussion darüber, inwieweit das Immunsystem die Tumorentwicklung fördert oder inhibiert. Es ist beispielsweise beschrieben, dass Menschen, welche zu chronischen Krankheiten neigen ein erhöhtes Krebsrisiko besitzen<sup>8</sup>. Außerdem berichten einige Studien, dass die Stärke der Immunität einen wesentlichen Einfluss auf die Tumorprogression besitzt. Hiernach wird die Karzinogenese, zumindest in begrenztem Umfang, durch Immunreaktionen gefördert<sup>9</sup>. Andere Studien zeigen dagegen, dass eine effektive Immunantwort zur Tumorregression führen kann. Dies gilt insbesondere dann, wenn der Tumor Virus-induzierten Ursprungs ist. Zu den Viren, die zur Tumorinduktion führen können, gehören sowohl DNA- als auch RNA-Viren. In diesem Kontext sind die Pappilomaviren (DNA-Viren) sehr bekannt, die neben benignen Geschwülsten, wie Warzen, auch Gebärmutterhalskrebs verursachen.

In diesem Zusammenhang wird darüber diskutiert, welche Bedeutung Tumorantigene bei der Tumorregression besitzen. Bei Virus-induzierten Tumoren gibt es spezifische Tumorantigene, welche als fremd erkannt werden, sodass eine effektive Immunreaktion aufgebaut werden kann. Anders sieht es für spontane Tumore aus. Hier sind die Antigene körpereigenen Ursprungs, sodass für diese Autoantigene Toleranz-mechanismen existieren, welche funktionelle Immunreaktionen inhibieren.

Bei der Diskussion über die Rolle des Immunsystems bei der Tumorsuppression ist es somit äußerst wichtig zwischen spontanen und transplantierten Tumoren zu unterscheiden. Studien belegen, dass bezüglich der Interaktion von Krebszellen und Immunsystem ein wichtiger Unterschied darin besteht, ob die Krebszellen injiziert werden oder ob sich der Tumor spontan formiert. Die Applikation der Krebszellen kann zum Beispiel zu nekrotischen Reaktionen führen, während spontan auftretende Krebszellen eher apoptotische Prozesse durchlaufen. Die Aufnahme und Präsentation von Antigenen in nekrotischen Prozessen unterscheidet sich grundlegend von apoptotischen Prozessen. Zum anderen können durch Nekrosis tumorspezifische Antigene freigesetzt werden, welche die adaptive Immunantwort induzieren, während spontane Tumore eher chronische angeborene Immunantworten induzieren<sup>10</sup>. Im Gegensatz zu den spontanen Tumoren weisen transplantierte Tumore eine andere Wachstumskinetik auf, welche sich zum Beispiel darin auszeichnet, dass die Tumorzellen keine prägmaligne Phase durchlaufen, sondern schnell zu einem offensichtlichen Tumor anwachsen. Daneben bestehen auch Unterschiede in der Zusammensetzung des umliegenden Stromas. Es gibt mehrere Meinungen darüber, wie sich die Interaktion zwischen dem adaptiven Immunsystem und der Krebsentstehung gestaltet. Einige sind nachfolgend angegeben.

### **1.2.1. „Immunosurveillance“**

Die Idee, dass das Immunsystem Tumorzellen erkennt und eliminieren kann, kam bereits zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts von Paul Ehrlich. Die Hypothese der Immun-gesteuerten Tumor-Kontrolle wurde von F.M. Burnet und L.Thomas in den fünfziger Jahren aufgegriffen und in den siebziger- bzw. achtziger Jahren erneut diskutiert. F.M. Burnet und L.Thomas postulierten, dass die Generierung von malignen Tumoren weiter verbreitet war, als angenommen, da eine klinische Aufzeichnung im Zuge der frühen Eliminierung der Tumorzellen durch das Immunsystem nicht möglich wäre<sup>11</sup>. Sowohl Burnet als auch Thomas spekulierten, dass T-Zellen eine wichtige Komponente in der Tumorabwehr darstellen.

Obwohl der Organismus anscheinend die Fähigkeit besitzt, die Entwicklung von Tumoren zu minimieren, kann das Tumorwachstum dennoch nicht verhindert werden. Tumorzellen können beispielsweise Botenstoffe abgeben, die dazu führen, dass Immunzellen positiv auf das Tumorwachstum einwirken. Aufgrund der neu gewonnenen Einsichten über die Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem, erkannte man, dass der Prozess der „Immunosurveillance“ sehr vielschichtig ist und verschiedene Faktoren in das Konzept einbezogen werden müssen. Die Immun-gesteuerte Tumorabwehr ist etwa davon abhängig, welchem Zelltyp der Tumor entstammt und wo er lokalisiert ist. Das gegenwärtige Konzept beinhaltet diese neueren Aspekte und wird als „cancer immunediting“<sup>12,13</sup> bezeichnet.

Die Eliminierung der Tumorzellen erfolgt durch eine spontane Immunreaktion. Das Konzept umfasst drei Phasen. Die erste Phase wird als Eliminierung bezeichnet. Sie umfasst die Fähigkeit des Immunsystems Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Aufgrund des ungehemmten Wachstums der Tumorzellen sterben einige Zellen ab und induzieren inflammatorische Reaktionen, welche zur Aktivierung von Immunzellen und zur Produktion von IFN- $\gamma$  führen. Da die Eliminierung meist unvollständig ist, können einige Tumorzellen überleben. In der zweiten, dynamischen Phase, als Equilibrium bezeichnet, besteht eine Balance zwischen der Proliferation von Tumorzellen und der Eliminierung durch das Immunsystem. Hinsichtlich des hohen selektiven Drucks der vom Immunsystem erzeugt wird, kommt es zu einer erhöhten Mutationsrate der genetisch instabilen Tumorzellen. Damit wird die dritte Phase induziert. Diese Phase zeichnet sich durch die Widerstandsfähigkeit der Tumorzellen gegen Immunreaktionen aus. In der letzten Phase besitzen die Tumorzellen, infolge von genetischen oder epigenetischen Veränderungen die Fähigkeit, unkontrolliert zu wachsen und Resistenzen auszubilden. In dieser Phase ist der Tumor klinisch detektierbar<sup>12,14 13</sup>.

Die Hypothese scheint zumindest für viral induzierte Tumore zutreffend zu sein, da hier tumorspezifische Antigene existieren, welche aufgrund ihres viralen Ursprungs als Fremdartigen vom Körper erkannt werden. Die Vermutung, dass die oben beschriebene „Immunosurveillance“-Theorie auch bei nicht-viralen Tumoren zutreffend ist, basiert auf Untersuchungen in immunsupprimierten, transgenen Mausmodellen. Mit ihnen konnte demonstriert werden, dass sich MCA-induzierte Tumore in B- und T-Zell-defizienten Mäusen verstärkt entwickeln und diese Tiere auf Karzinogene eher reagieren, als immunkompetente Tiere<sup>12,15,16</sup>. Es ist hier jedoch anzumerken, dass es kontroverse Ergebnisse bezüglich des erwähnten Unterschiedes zwischen dem Tumorwachstum in immundefizienten Mäusen und immunkompetenten Mäusen gibt<sup>17</sup>.

Einen zusätzlichen Anhaltspunkt für die „Immunosurveillance“-Hypothese liefert die Erkenntnis, dass endogen sekretiertes IFN- $\gamma$  vor transplantierten und chemisch-

induzierten Tumoren schützen kann<sup>18-20</sup>. Die Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen ist ein weiteres Indiz für das Konzept der Immunsystem-gesteuerten Tumorkontrolle. Dennoch gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt für dieses Konzept keine konkrete klinische Evidenz.

Ein wichtiger Kritikpunkt in Bezug auf die „Immunosurveillance“-Hypothese besteht in der Auswahl der untersuchten Modelle. Da bis jetzt kaum Erkenntnisse vorliegen, welche Faktoren für die Entwicklung von spontanen Tumoren eine Rolle spielen, gibt es hierzu kontroverse Standpunkte. Studien belegen, dass spontane Tumore progressiv wachsen, unabhängig von einer tumorspezifischen humoralen oder zellulären Immunantwort<sup>21-23</sup>. Hinsichtlich spontaner Tumore ist zu bedenken, dass sie in ihrer Zusammensetzung sehr heterogen sind und hauptsächlich Autoantigene exprimieren, welche selten zu einer Aktivierung spezifischer T-Zellen führen, sodass hier gegebenenfalls andere Kontrollmechanismen greifen. Es stellt sich also die Frage, welchen Stellenwert nicht-immunologische Tumoralabwehrmechanismen einnehmen. Dazu gehören beispielsweise DNA-Reparatur-Mechanismen oder andere Signalwege, welche die Proliferation bzw. Apoptose beschädigter oder abnormaler Zellen kontrollieren. Ein wichtiger Punkt, welcher die Bedeutung einer nicht-immunologischer Tumoralabwehr unterstützt, bezieht sich auf die Tatsache, dass mit zunehmendem Alter das Risiko von Krebserkrankungen ansteigt. Dies beruht unter anderem auf der zunehmenden Instabilität der DNA und nicht durch den Verlust der normalen T-Zell-Funktion. Zudem gibt es viele Studien die belegen, dass die Toleranz eine wesentliche Rolle in der Tumoralabwehr spielt. Das lässt darauf schließen, dass im Gegensatz zu viral induzierten Tumoren hier vor allem Autoantigene generiert werden<sup>24</sup>.

Ein weiterer Anhaltspunkt für die kontroverse Diskussion über die „Immunosurveillance“-Hypothese bezüglich spontaner Tumore ergibt sich aus einer aktuellen Studie von Willimsky *et al.*<sup>21</sup> In dieser wird gezeigt, dass spontane Tumore trotz ihrer starken Immunogenität in immun-kompetenten Mäusen keine funktionellen, spezifischen CTLs induzieren können. Es konnte jedoch demonstriert werden, dass diese Tumore sehr früh in ihrer Entwicklung spezifische Toleranz induzieren. Das impliziert, dass die Theorie der „Immunosurveillance“, welche auf der Erkennung von Selbst- und Fremd-Antigen beruht, im Falle spontaner Tumore möglicherweise so doch nicht zutreffend ist<sup>21</sup>.

Dennoch konnten bisher viele neue Einsichten über die Interaktion von Tumorgewebe und Immunsystem erlangt werden, welche zu neuen therapeutischen Zielsetzungen führen. Eine davon ist die Anwendung der Erkenntnisse im Hinblick auf die Verbesserung von Immuntherapien.

Der Nachweis, dass der Körper prinzipiell tumorspezifische Effektorpopulationen generieren kann, die zumindest bei Melanoma-Patienten und bei Brustkrebs-Patienten immunogen sein können, wurde bereits in einer Studie von 1996 zusammenfassend beschrieben<sup>25,26</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass spezifische Zellpopulationen existieren, die *in vitro* durch Zugabe von IL-2 expandiert werden können. Man identifizierte in Melanoma-Patienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die spezifisch für das tumorassoziierte Antigen MART-1<sub>27-35</sub> und für die Tyrosinasesequenz 368-376 sind<sup>27</sup>. Weiterführende Experimente zeigten jedoch, dass diese Zellen keine zytolytische Aktivität besitzen und im Hinblick auf eine tumorspezifische Immunreaktion nicht funktionell sind, was möglicherweise auf immunregulatorische Mechanismen zurückzuführen ist. Neuere Studien scheinen aufzuzeigen, dass zukünftige Krebs-Therapien deshalb auf der Vakzinierung mit tumorspezifischen oder tumorassoziierten Antigenen in Kombination mit der Suppression von regulatorischen T-Zellen und der Induktion von proinflammatorischen Reaktionen, beispielsweise durch Zugabe von CpG-Oligodeoxynukleotiden, beruhen könnten<sup>28-31</sup>.

### 1.3 Formen der Leukämie und deren Entstehung

#### 1.3.1. Chronische myeloische (CML) und chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Als Leukämie wird eine überdurchschnittliche Expansion von genetisch entarteten leukozytischen Vorläuferzellen bezeichnet, deren Reifungsprozess unterbrochen ist. Die stark vermehrten malignen Zellen im Knochenmark verdrängen die gesunden Zellen und können undifferenziert in die Blutbahn übertreten. Ausgehend von ihren Vorstufen können die unausgereiften Vorläuferzellen in lymphatische oder myeloische Vorläufer unterteilt werden. Die chronischen Leukämien unterscheiden sich von den akuten Formen durch drei Phasen, die während der Krankheit durchlaufen werden. Die chronische Phase ist in ihrem Verlauf symptomlos und zeitlich unbestimmt. Sie kann über Jahre andauern und ist therapeutisch gut kontrollierbar, da sich nur wenige Blasten im Blut und im Knochenmark befinden. Die Therapiemöglichkeiten erstrecken sich von der Chemotherapie über immunologische Therapieformen, wie eine Interferon- $\alpha$ -Behandlung, bis zur Splenektomie bei symptomatischen Patienten. Seit dem Jahr 2000 bietet das Medikament Glivec (STI571, Imatinib) eine neue und hochwirksame Behandlungsmöglichkeit für die CML<sup>32</sup>. Dennoch ist eine langfristige Wirksamkeit aufgrund von Resistenzbildungen nicht möglich<sup>33,34</sup>. In den letzten Jahren konnten Nachfolgemedikamente, wie Nilotinib<sup>35,36</sup> und Dasatinib<sup>37,38</sup> entwickelt werden. Diese Nachfolgemedikamente besitzen den Vorteil, dass sie auch bei vielen BCR-ABL-Mutationen wirksam bleiben.

Die zweite Phase beschreibt einen starken Anstieg in der Leukozytenzahl und eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes des Patienten, dementsprechend wird die Phase Beschleunigungsphase oder auch Akzelerationsphase (Übergangsphase) genannt. Wann der Eintritt in diese Phase erfolgt, ist unbestimmt und kann durch äußere Faktoren beeinflusst werden. Die Blastenkrise, das letzte Stadium der chronischen Leukämie, ist ab diesem Zeitpunkt vergleichbar mit der akuten Leukämieform, und zeichnet sich durch die Überschwemmung des Körpers mit Myoblasten aus. Diese Vorläuferzellen der Blutzellen entstehen im Knochenmark und können sich nicht vollständig ausdifferenzieren. Man kann hierbei die B-Zell-Leukämie und die T-Zell-Leukämie unterscheiden, wobei es weitere Abstufungen bezüglich des Reifegrades der betroffenen Zellen gibt. Der oben genannte Übergang von der chronischen Phase zur Blastenkrise zeichnet sich unter anderem durch eine Vielzahl von Chromosomenveränderungen aus.

Myeloische Leukämien gehen von entarteten Vorstufen der Granulozyten bzw. Monozyten aus, während man die Entartung bei der lymphatischen Leukämie in den Lymphozyten findet. Die bekanntesten chronischen Leukämieformen, welche durch Bennett 1845 erstmals beschrieben wurden, sind die chronische myeloische Leukämie (CML) und die chronische lymphatische Leukämie (CLL)<sup>39,40</sup>. Etwa zehn Jahre später wurde durch Friedreich die akute Leukämie beschrieben<sup>41</sup>.

### **1.3.2. Akute myeloische (AML) und akute lymphatische Leukämie (ALL)**

Das Charakteristische an diesen Leukämien ist der schnelle und meist nicht therapeutisch kontrollierbare Verlauf der Krankheit, der schon nach wenigen Jahren tödlich enden kann. Wie bei der chronischen Leukämie unterscheidet man auch hier, welche Vorläuferzellen von der Entartung betroffen sind. Generell wird zwischen ALL und AML unterschieden. Die ALL tritt zumeist im Kindesalter auf, während die AML im höheren Lebensalter in Erscheinung tritt. Sowohl bei der ALL als auch bei der AML werden zur Behandlung in erster Linie Zytostatika eingesetzt, wobei eine sogenannte Polychemotherapie angewandt wird, bei der verschiedene Zytostatika kombiniert werden. In Verbindung mit der Chemotherapie wird die Supportivtherapie eingesetzt, bei der Blut- und Plasmabestandteile ersetzt werden, zu der aber auch eine intensive Schmerztherapie und eine Infektionsprophylaxe gehört. Eine weitere Therapiemöglichkeit bietet die allogene hämatopoetische Stammzellentransplantation, die vor allem bei der T-ALL und pro-B-ALL Verwendung findet.

## 1.4. Das Fusionsprotein BCR-ABL

### 1.4.1. Entstehung des Philadelphia Chromosoms und krankheitsbildende Faktoren

1960 entdeckten Peter Nowell und David Hungerford einen spezifischen Chromosomendefekt in leukämischen Zellen<sup>42</sup>. Der Chromosomendefekt wurde nach dem Entdeckungsort bezeichnet und trägt den Namen „Philadelphia Chromosom“ (Ph). Die chronische lymphatische Leukämie war die erste humane Erkrankung, welche mit einer spezifischen Abnormalität im Karyotyp verknüpft werden konnte. Weiterführende Untersuchungen ließen die Schlussfolgerung zu, dass das Philadelphia Chromosom ein Fusionsprotein beinhaltet, welches in malignen Zellen exprimiert wird<sup>43,44</sup>. Zudem wurde festgestellt, dass die ABL-Tyrosinkinase innerhalb des Fusionsproteins, verglichen mit der Expression in normalen Zellen, überexprimiert ist<sup>45</sup>.

Die Philadelphia-Chromosom-positiven Leukämien treten in rund 90 % der chronischen myeloischen Leukämien und in rund 20-30% der akuten lymphatischen Leukämien auf. Sporadisch findet man Ph<sup>+</sup> Leukämien auch in der akuten myeloischen Leukämie. Alle Philadelphia-Chromosom positiven Formen sind durch das Auftreten des Fusionsgens BCR-ABL charakterisiert, welches transkriptionell aktiv ist. Das Fusionsgen entsteht durch die reziproke Translokation des BCR-Gens (Breakpoint Cluster Region) lokalisiert auf dem Chromosom 22q11, mit dem Gen c-ABL auf dem Chromosom 9q34 (Abb.1.1.)<sup>46</sup>.

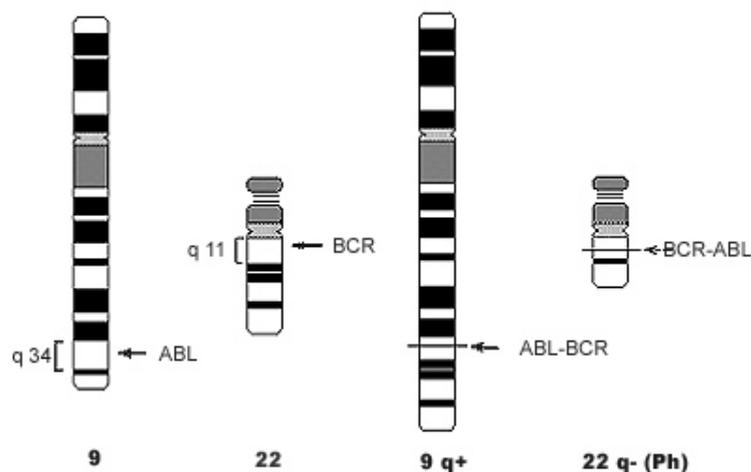


Abb.1.1.: Schematische Darstellung der Entstehung des Philadelphia Chromosoms <sup>42</sup>

Basierend auf Ergebnissen von Chromosomenproben von CML-Patienten konnte innerhalb der leukämischen Population eine Subpopulation von Zellen ausfindig gemacht werden, die gesondert die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erneuern und Vorläuferzellen zu generieren, welche die Tumormasse bilden. Diese Zellen werden heute als Tumor-Stammzellen bezeichnet und konnten ebenfalls in einigen soliden Tumoren identifiziert werden<sup>47-51</sup>. Bezüglich dieser Kenntnisse ergab sich für die Entdeckung des Fusionsproteins eine zentrale Frage. Ist das Fusionsprotein ursächlich für die Leukämie oder bedarf es zusätzlicher genetischer Veränderungen, damit sich Krankheitssymptome ausbilden? Es konnte festgestellt werden, dass die alleinige Existenz von BCR-ABL nicht ursächlich für die klinische Leukämie ist und zusätzliche Ereignisse mitbestimmend für den Ausbruch der Krankheit sind. So wurde mittels sensitiver Untersuchungsmethoden gezeigt, dass auch im Blut gesunder Probanden BCR-ABL-tragende Zellen detektiert werden können, jedoch in sehr geringer Frequenz<sup>52-55</sup>.

Dennoch konnte anhand von *in vitro* Experimenten mit retroviralen BCR-ABL-Vektoren und murinen transgenen Modellen gezeigt werden, dass die Expression des BCR-ABL-Onkogens im Tiermodell ein sehr CML-ähnliches Krankheitsbild verursacht<sup>56</sup>. Es konnten weiterhin zusätzliche chromosomale Veränderungen im murinen Modell beobachtet werden, analog zum Verlauf von der chronischen Phase zur Blastenkrise im Patienten. Hierzu zählen beispielsweise zusätzliche Translokationsereignisse<sup>57-59</sup>. Zusammenfassend scheint die Expression des BCR-ABL-Proteins ausschlaggebend für die chronische Phase zu sein, jedoch sind weitere genetische Veränderungen notwendig, damit sich eine Leukämie bis zur endgültigen Blastenkrise ausweiten kann.

### **1.4.2. BCR-ABL-Variationen und deren Assoziation mit der Ausprägung der Leukämie**

Das humane c-ABL-Gen besteht aus 11 Exons, wobei für das erste zwei alternative Spleißvarianten (1a,1b) existieren, die sich in ihrer aminoterminalen Sequenz unterscheiden. Die Bruchstelle im c-ABL liegt fast immer im Intron 1, sodass bei allen BCR-ABL Varianten das gleiche ABL-Protein translatiert wird, was in Abb.1.2. verdeutlicht ist. Exon 2-11 des c-ABL-Gens werden in die „major cluster region“ des BCR-Gens transponiert. Das BCR-Gen weist im Gegensatz zum c-ABL-Gen drei verschiedene Bruchpunkte in der Sequenz auf, die zu unterschiedlich großen BCR-ABL Transkripten führen<sup>60</sup>. Die bisher beschriebenen Bruchpunktregionen werden als M-bcr (major-), m-bcr (minor-) und  $\mu$ -bcr (micro-) bezeichnet, wobei der Bruchpunkt in der M-bcr Region bei 95 % der Ph<sup>+</sup> CML-Patienten und etwa 1/3 der ALL-Patienten vorkommt und damit am häufigsten auftritt. Es gibt zwei Hauptbruchpunkte in dieser Region. Zum einen existiert ein Bruchpunkt nach dem dreizehnten Exon des BCR-Gens (e13/a2) und zum anderen

nach dem vierzehnten Exon (e14/a2). Daraus resultieren die zwei Transkripte b2a2 oder b3a2, die jedoch beide zur Expression eines 210 kDa großen Fusionsproteins führen, welches hauptsächlich mit der CML assoziiert ist. Aus der Fusion des Bruchpunktes in der minor-bcr Region mit dem zweiten Exon des c-ABL-Gens resultiert ein BCR-ABL Transkript (e1/a2 bzw. b1a2) mit einem Molekulargewicht von 190 kDa (oftmals auch als 185 kDa beschrieben), das in den meisten Fällen mit der akuten lymphatischen Leukämie assoziiert ist<sup>61</sup>, manchmal jedoch auch in CML Patienten nachgewiesen werden kann<sup>62</sup>. Die Fusionsvariante  $\mu$ -bcr mit c-ABL ist sehr selten und führt zur Expression eines 230 kDa großen Proteins, welches man geringfügig bei CML-Patienten und öfter bei Patienten mit chronisch neutrophiler Leukämie vorfindet<sup>63</sup> (Abb. 1.2.).

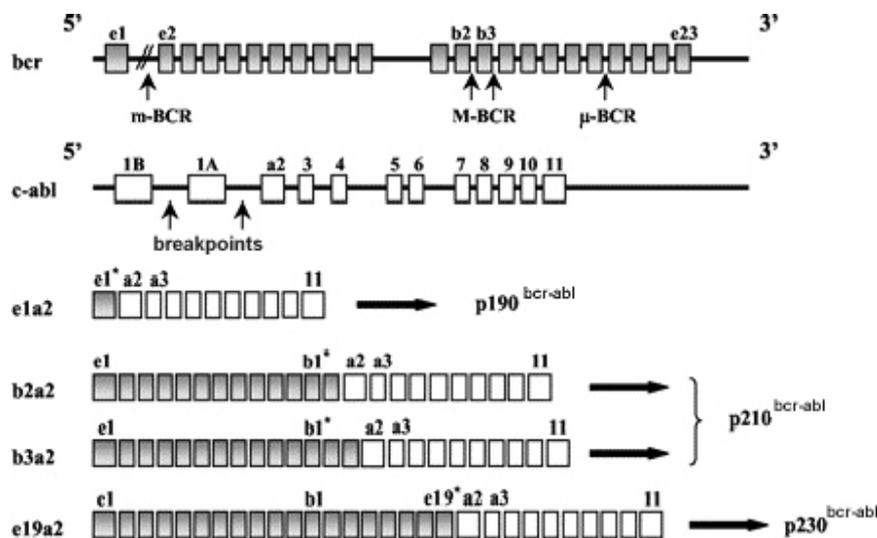


Abb. 1.2.: Entstehung der verschiedenen bcr-abl Transkripte und deren Bezeichnungen auf Proteinebene<sup>64</sup>.

### 1.4.3. Auswirkung des Fusionsproteins BCR-ABL auf die Regulation der Zelle

Das ABL-Gen kodiert für eine „non-receptor“ Tyrosinkinase mit einer molekularen Masse von 145 kDa (p145<sup>ABL</sup>), die ubiquitär exprimiert wird. Das Protein kann sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma und in anderen subzellularen Regionen lokalisiert sein<sup>65</sup>. Die starke räumliche und zeitliche Regulation der Kinase ist für die Zelle essentiell, da diese an der Steuerung vieler Signalwege beteiligt ist. Das beinhaltet Signalwege, die das Wachstum und die Proliferation regulieren, aber auch für DNA-Reparatur, oxidativen

Stress, Zelladhäsion und Zellmigration wichtig sind. Während die Expression im Zytoplasma zur Proliferation und dem Überleben der Zelle führt, kann eine Aktivierung im Kern Apoptose auslösen. Die Aktivierung erfolgt zumeist durch genotoxische Stresssignale, wie beispielsweise ultraviolettes Licht und  $\gamma$ -Strahlung. Entsprechend der Eigenschaften ist c-ABL aus verschiedenen Domänen aufgebaut (Abb.1.3.). Im C-terminalen Bereich ist die DNA-bindende Domäne lokalisiert, um auf DNA-Ebene regulatorisch einzugreifen. ABL kann zudem im Kern auch mit Promotorregionen der Zellzyklus-Regulatoren CREB und E2F-1 interagieren<sup>66</sup>. Aufgrund der Actin-Bindungsdomänen im C-terminalen Bereich kann das ABL-Protein mit G- und F-Actin in Kontakt treten und dadurch die Zelladhäsionseigenschaften verändern. Der Import und Export des c-ABL Proteins aus dem Kern wird über Kernlokalisierungssignal-Domänen und Kernexportsignal-Domänen gesteuert, welche ebenfalls im C-terminalen Bereich lokalisiert sind<sup>67</sup>. Im N-terminalen Bereich des ABL-Gens befinden sich Src-homologe Domänen. Diese Domänen (SH3, SH2) sind für die Regulation der Tyrosinkinase wesentlich.

Durch die Fusionierung des ABL-Gens mit BCR verändert sich die Regulationsmöglichkeit der Tyrosinkinase. Das chimäre BCR-ABL-Protein besitzt eine konstitutiv aktive und überexprimierte Tyrosinkinase<sup>68</sup>. Dadurch werden c-ABL regulierte und assoziierte Signalkaskaden soweit verändert, dass die Zelle maligne Eigenschaften erhält. Dabei spielt die SH2-Domäne in c-ABL eine wichtige Rolle. An SH2 binden spezifisch BCR-Sequenzen, die im ersten Exon des BCR lokalisiert sind. Die Interaktion zwischen der BCR-Sequenz und der SH2-Domäne ist entscheidend für die zelluläre Transformationsfähigkeit des Fusionsproteins<sup>69</sup>, da dadurch die aktive Konformation der c-ABL Kinase beibehalten wird.

Eine weitere wichtige Rolle für die zelluläre Transformation übernimmt die Coiled-Coil Oligomerisationsdomäne im BCR-Gen. Die Oligomerisation scheint ein wesentlicher Mechanismus in der generellen Aktivierung der ABL-Kinase zu sein, da Experimente mit alternativen Oligomerisationsmotiven eine ähnliche Kinase-Aktivierung aufweisen. Die Deletion des Oligomerisationsmotives bewirkt eine verringerte Transformationskapazität und eine stark zurückgesetzte Aktivität der Tyrosinkinase<sup>70</sup>. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass sich aufgrund der Fusion mit BCR die Lokalisierung des Fusionsproduktes auf das Zytoplasma beschränkt, womit die regulatorische Fähigkeit von c-ABL, apoptotische Vorgänge im Zellkern zu aktivieren, verloren geht. Insgesamt verändert die BCR-ABL Expression in den Zellen eine Vielzahl von Signalkaskaden involvierten Molekülen, antiapoptotischen Proteinen, hämatopoetischen Faktoren und Komponenten des Zytoskeletts.

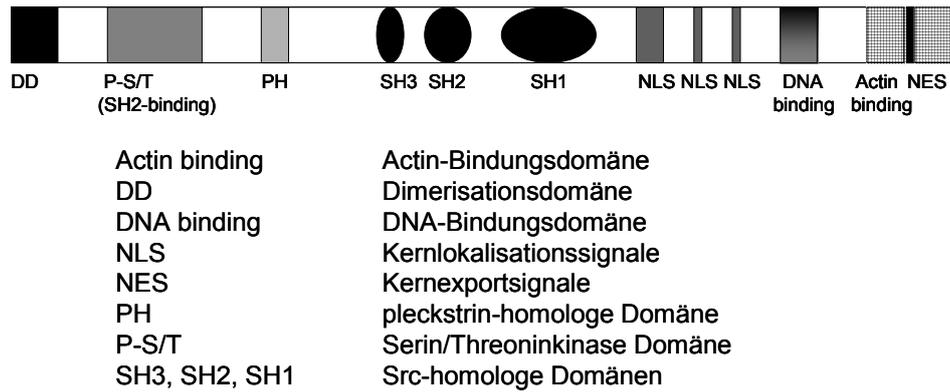


Abb.1.3.: Domänen des BCR-ABL Proteins

## 1.5. T-Zell-vermittelte Immunität

Aufgrund der Erkenntnisse, dass T-Zellen eine außerordentlich wichtige Rolle in der Tumorabwehr spielen, wird in diesem Kapitel auf die unterschiedlichen Subtypen näher eingegangen.

Die CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten wandern in die Peripherie, wo sie auf Antigen-präsentierende Zellen treffen. Während T-Zellen, die den Corezeptor CD4 exprimieren, Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, die MHC-Klasse-II-gebundene Peptide erkennen, reagieren CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten auf Antigene, welche an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden sind. Letztere Zellen werden als zytotoxische Effektorzellen bezeichnet.

Solange die T-Zellen kein Antigen treffen, welches die jeweilige T-Zelle aktiviert, werden die T-Zellen als „naive T-Zellen“ bezeichnet. Erkennt die naive T-Zelle mittels des T-Zell-Rezeptors (TCR) das spezifische Antigen auf einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC), wird sie aktiviert und angeregt zu proliferieren. APC sind neben den dendritischen Zellen sowohl Makrophagen als auch B-Zellen. Hierbei ist jedoch eine vorherige Stimulation über TLRs (*Toll-like* Rezeptoren) durch entsprechende Liganden (pathogene Strukturen, wie Lipopolysaccharide) erforderlich. Antigene werden je nach Herkunft unterschiedlich prozessiert und auf MHC-Klasse-I- oder -II- Molekülen präsentiert. Peptide von Pathogenen, die sich innerhalb der Zelle im Zytoplasma vermehren, wie Viren, werden von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert. Hingegen werden auf MHC-Klasse-II-Molekülen vorrangig exogen aufgenommene Antigene präsentiert. Aufgrund der durch APC sekretierten Zytokine kann eine Polarisierung der aktivierten Effektorzellen zu unterschiedlichen Subtypen erfolgen. Zu ihnen zählen beispielsweise die T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2-T-Zellen.

Die Polarisation zu  $T_H1$  Zellen wird durch eine hohe Konzentration von Interleukin-12 (IL-12) erzeugt.  $T_H1$ -Zellen sekretieren proinflammatorische Zytokine, wie IL-2 und IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , was zu einer Aktivierung der Makrophagen einerseits und andererseits zu einer Aktivierung der zytotoxischen  $CD8^+$ T-Zellen führt. Durch eine niedrigere Konzentration von IL-12 bzw. eine hohe Konzentration von IL-4 erfolgt die Differenzierung zu  $T_H2$ -T-Zellen, welche IL-5, IL-4, IL-13 und IL-10 sekretieren. Die  $T_H2$ -Zellen regen B-Zellen an, sich in Plasmazellen auszudifferenzieren und Antikörper zu sezernieren.

Ein weiterer Subtyp der T-Zellen, der in den vergangenen Jahren entdeckt wurde, wird als  $T_H17$  bezeichnet<sup>71</sup>.  $T_H17$ -Zellen sezernieren IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$  und GM-CSF. Hierbei sind TGF- $\beta$  und IL-6 für die Differenzierung dieser Zellen entscheidend. Die Abb. 1.4. gibt einen Überblick über die Diversität der T-Zellen.

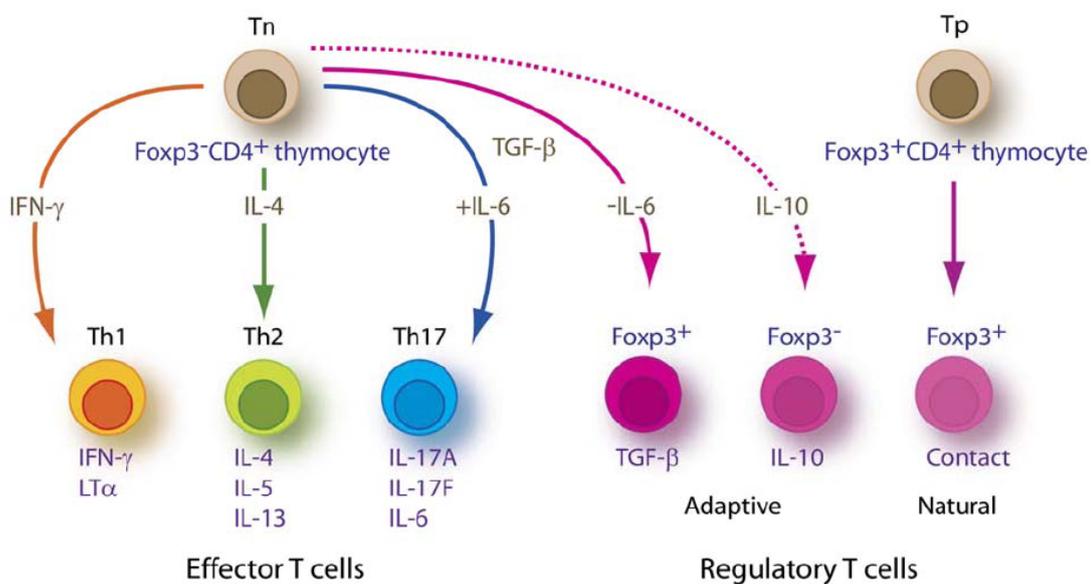


Abb.1.4.: Schematische Darstellung der Diversität von  $CD4^+$ -T-Zellpopulationen <sup>71</sup>

Tn: naive post-thymale  $CD4^+$ -Vorläuferzelle, Tp : thymale Vorläuferzelle

Für die Aktivierung von T-Effektorzellen sind neben der TCR-Erkennung des spezifischen Antigen:MHC-Liganden auch kostimulatorische Signale derselben Antigen-präsentierenden Zelle wesentlich. Die bekanntesten kostimulatorischen Moleküle sind die strukturverwandten Glykoproteine auf den APC. Dazu zählen B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Der dazugehörige Rezeptor auf den naiven T-Zellen ist CD28. Nach Aktivierung der T-Zellen exprimieren sie neben CD28 auch CTLA-4, welches ebenfalls mit B7-Molekülen interagiert und als Rückkopplung des Aktivierungssignals dient. Die CTLA-4-Interaktion mit B7-Molekülen limitiert die Produktion von IL-2 und reguliert somit die

Proliferation der T-Zellen in einer Immunreaktion. Die Notwendigkeit eines zusätzlichen kostimulatorischen Signals neben der spezifischen Antigenbindung unterstützt einerseits die Synthese von IL-2 und dient andererseits als Kontrollmechanismus für potentielle autoreaktive Zellen in der Peripherie.

### 1.5.1. Effektorfunktion und Effektormoleküle

Nach erfolgter Aktivierung durch MHC-Peptid-Komplexe und die zusätzliche Stimulierung durch kostimulatorische Signale sekretieren die zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen Zytotoxine. Die Zytotoxine können in Perforine und Granzyme eingeteilt werden. Granzyme gehören zur Klasse der Serin-Proteasen. Durch das Wechselspiel beider Zytotoxine wird in den Zielzellen der programmierte Zelltod eingeleitet. Perforine polymerisieren und bilden in den Membranen der Zielzelle Poren, durch die caspasespaltende Granzyme in die Zelle einströmen und die Apoptose einleiten können. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen exprimieren aber auch Moleküle, welche zur TNF-Familie gehören, wie TNF-β und TNF-α. Die CD4<sup>+</sup>-T-Effektorzellen produzieren Zytokine und membrangebundene Proteine, welche an spezifische Rezeptoren der Zielzelle binden. Von T<sub>H</sub>1-Zellen werden Zytokine, wie IFN-γ, TNF-α und TNF-β exprimiert. T<sub>H</sub>2-T-Zellen exprimieren beispielsweise IL-4, IL-5 oder IL-10. Sie können jedoch auch TNF-β exprimieren. Weiterhin exprimieren T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen nach Aktivierung neben einigen anderen den CD40-Liganden (CD154), der ebenfalls zur TNF-Familie gehört. Dieser Ligand übermittelt nach Bindung an den entsprechenden Rezeptor (CD40) auf Makrophagen, DCs und B-Zellen aktivierende Signale. Ein weiteres, der TNF-Familie angehörendes, Effektormolekül ist FAS-Ligand (CD95-L). CD95-L wird sowohl von T<sub>H</sub>1 als auch von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen exprimiert. Die Interaktion des Liganden CD95-L mit dem spezifischen Rezeptor CD95 auf den Zielzellen induziert in diesen Zellen Apoptose. Des Weiteren ist für die Effektorfunktion von T-Zellen die Zell-Zell-Interaktion durch sogenannte Adhäsionsmoleküle entscheidend, die gleichfalls eine wichtige Rolle in der Migration von T-Zellen spielen. Adhäsionsmoleküle werden aber nicht nur von Endothelzellen exprimiert, sondern auch von Antigen-präsentierenden Zellen. Dazu zählen beispielsweise ICAM-1 und ICAM-2. Aufgrund von LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*)<sup>72,73</sup>, welches von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, kann die Interaktion zwischen T-Zelle und APC koordiniert werden. LFA-1 ist für die Aktivierung der T-Zellen eines der wichtigsten Adhäsionsmoleküle.

### **1.5.2. Toleranzinduktion als Kontrollelement der Immunreaktion**

Toleranz bezeichnet den Zustand des Immunsystems körpereigenes als solches zu erkennen und dagegen nicht zu reagieren. Die zentrale Toleranz steuert die Eliminierung von autoreaktiven T- und B-Zellen<sup>74</sup>.

Während der thymalen Selektion werden als Erstes die Zellen positiv selektioniert, welche die eigenen MHC-Moleküle erkennen (positive Selektion). Dies geschieht, indem der TCR der T-Lymphozyten mit den MHC-Molekülen der Thymusepithelzellen interagiert und alle Zellen eliminiert werden, welche keine Interaktion mit den MHC-Molekülen zeigen. Es schließt sich der Prozess der negativen Selektion an<sup>75</sup>. Hier werden alle Zellen aussortiert und eliminiert, die auf körpereigene, sogenannte Autoantigene, reagieren. Diese Selektion ist jedoch unvollständig. So kann es passieren, dass autoreaktive Zellen in die Peripherie einwandern. Daher sind weitere Kontrollmechanismen in der Peripherie angeschlossen, die man als periphere Toleranz bezeichnet.

Die periphere Toleranz dient dazu, eine potentielle Autoimmunreaktion durch autoreaktive T-Zellen in der Peripherie zu verhindern und eine überschießende Immunreaktion zu unterbinden. Dabei spielen insbesondere regulatorische T-Zellen eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz.

Die Toleranzinduktion wird in der Peripherie in zwei grundsätzliche Mechanismen eingeteilt. Zum einen gibt es passive Mechanismen und zum anderen aktive Mechanismen. Zu ersteren gehört die Kontrolle der Aktivierung von T-Zellen über kostimulatorische Signale. T-Zellen können nur dann eine funktionelle Aktivierung erreichen, wenn zusätzlich zur Bindung des TCRs mit dem entsprechenden MHC-Peptid-Komplex die T-Zelle ein zweites kostimulatorisches Signal erhält. Die Induktion dieses Signals über dieselbe Zelle, die das spezifische Antigen präsentiert, erfolgt nur dann, wenn das Umfeld ein proinflammatorisches Zytokin-Milieu aufweist. Unreife dendritische Zellen beispielsweise exprimieren die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nur in geringem Maße, sodass ein Kontakt ihrerseits mit T-Zellen nicht zur Aktivierung, sondern zur Anergie führt. Dieser Zustand beschreibt eine T-Zelle, die nicht aktiviert werden kann beziehungsweise nicht auf eine Aktivierung reagiert.

Weiterhin wird die Aktivierung der T-Zellen in der Peripherie durch die Dauer und die Stärke des Signals bestimmt und kontrolliert. So führt eine zu starke Stimulation oder eine andauernde und sich wiederholende Stimulation mit Selbst-Antigen zum AICD (*activated induced cell death*). Einige Selbst-Antigene können über ein kurzes und schwaches Signal über den TCR zur sogenannten Ignoranz führen.

Der aktive Mechanismus der peripheren Toleranz wird von sogenannten Suppressorzellen ausgeübt. So unterscheidet man zwischen den natürlichen

regulatorischen T-Zellen, die im folgenden näher beschrieben werden, Antigen-induzierten  $T_{reg}$ , wie Tr1- und Th3-Zellen, adaptiv induzierte  $CD4^+ T_{reg}$ ,  $CD8^+ T_{reg}$  und CD1d-abhängige NKT  $T_{reg}$ <sup>76</sup>, auch B-Zell-Populationen und dendritische Zellen können suppressive Eigenschaften besitzen. Die natürlichen  $T_{reg}$  und einige adaptiv induzierte  $CD4^+ T_{reg}$  können über den Mechanismus des Zell-Zell-Kontaktes suppressiv wirken<sup>77,78</sup>, wohingegen Antigen-induzierte  $T_{reg}$  nach erfolgter MHC-Peptid-Stimulation, große Mengen an Interleukin-10 (IL-10) und TGF- $\beta$  sekretieren und dadurch das Zytokin-Milieu suppressiven Charakter erhält.

Die hier aufgeführten Punkte geben jedoch nur einen Einblick in die Komplexität der suppressiven Mechanismen und deren Interaktionspartner. Bis jetzt ist noch nicht genau geklärt, wie die Suppression gesteuert wird und welche verschiedenen Mechanismen relevant sind.

#### **1.5.2.1. Die Rolle regulatorischer T-Zellen (Treg)**

Die natürlichen regulatorischen T-Zellen, repräsentieren ungefähr 5-6% der menschlichen  $CD4^+$ -T-Zellen und rund 10% der  $CD4^+$ -T-Zellen im murinen Organismus. Sie wurden erstmals von Sakaguchi und Kollegen 1995 näher charakterisiert. Man beschrieb die negativ regulierenden Zellen als  $CD4^+$  Subpopulation der Lymphozyten, welche die IL-2 Rezeptor- $\alpha$ -Kette (CD25) konstitutiv exprimieren (natürliche  $T_{reg}$ -Zellen)<sup>79</sup>. Die natürlichen  $T_{reg}$ -Zellen werden neben den Effektor-T-Zellen im Thymus als funktionelle und ausdifferenzierte T-Lymphozyten Subpopulation generiert. Sie benötigen in ihrer Entwicklung im Thymus den Kontakt zu MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche von kortikalen Epithelzellen. Ein Beleg dafür ergab sich aus der Studie von Bensinger *et al.*<sup>80</sup>. Hier wurde beschrieben, dass  $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen aus MHC-Klasse-II-defizienten Mäusen keine suppressorische Aktivität bezüglich entsprechender  $CD4^+$ -T-Zellen besitzen, *in vitro* als auch *in vivo*.

Im Gegensatz zu den natürlichen  $T_{reg}$  ist der Ursprung der in der Peripherie generierten Antigen-induzierten Regulatoren noch weitestgehend unklar. Man nimmt an, dass sie ihren Ursprung in der  $CD4^+CD25^-$ -T-Zell-Population besitzen, welche zuvor Antigen-Kontakt besaß. Es konnte gezeigt werden, dass suppressive Zytokine wie TGF- $\beta$  für die Konvertierung eine wichtige Rolle spielen<sup>76</sup>.

Mit der Entdeckung des Transkriptionsfaktors FOXP3 im Jahr 2003 gelang ein Durchbruch in der Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen<sup>81</sup>. Dieser Transkriptionsfaktor wird spezifisch von  $T_{reg}$ -Zellen exprimiert. FOXP3 dient als

Kontrollelement für die Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen<sup>82</sup>. Untersuchungen im Mausmodell mit FOXP3-Mutationen ergaben einen Verlust in der Entwicklung regulatorischer T-Zellen. Daraus resultierend zeigten die Mäuse lymphoproliferative Autoimmun-Syndrome. Ebenfalls zeigen sich im humanen Organismus aggressive Auto-Immunreaktionen, als IPEX-Syndrom (*immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*) bezeichnet, wenn das FOXP3-Gen fehlerhaft vorliegt. Dass die T<sub>reg</sub>-Population tatsächlich negativ kontrollierend in die Immunantwort eingreift und autoreaktive T-Zellen aktiv supprimiert, konnte anhand von verschiedenen Experimenten abgesichert werden. T<sub>reg</sub>-Transfer-Experimente mit syngenetischen T-Zell-defizienten Nude-Mäusen zeigten beispielsweise, dass Autoimmunreaktionen in diesen Tieren generiert werden konnten, sofern man CD25<sup>+</sup>-depletierte T-Zellen transferierte, während man durch den zusätzlichen Transfer von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen solche Autoimmunreaktionen wiederum unterbinden konnte<sup>79</sup>. Des Weiteren ist nicht nur FOXP3, sondern auch IL-2 für die Entwicklung, Funktionalität und Überleben von natürlichen T<sub>reg</sub>-Zellen in den sekundären lymphoiden Organen von entscheidender Bedeutung. Studien zeigten, dass IL-2-defiziente Mäuse Reaktionen mit autoimmunologischem Charakter aufwiesen. Dabei waren jedoch nur die CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen selektiv betroffen. Es gab keine Auswirkungen auf die normale Zellanzahl und Funktionalität der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Populationen<sup>83</sup>. Darüber hinaus konnte durch eine exogene Zugabe von einer hohen Dosis IL-2 das anergische Verhalten von regulatorischen T-Zellen *in vitro* unterbunden werden. Dies wird ebenfalls durch Zugabe von anti-CD28 oder maturen dendritischen Zellen als APC erreicht<sup>84</sup>.

Generell weisen humane und murine regulatorische T-Zellen ähnliche Charakteristika auf. Dennoch gibt es nennenswerte Unterschiede. Einer zeigt sich beispielsweise bei der Expression des FOXP3. Während in humanen T<sub>reg</sub> zwei FOXP3-Isoformen existieren, treten in murinen T<sub>reg</sub> keine FOXP3-Splice-Varianten auf. Es ist noch unklar, welche Rolle die kleinere Splice-Variante des FOXP3 spielt. Im Gegensatz zu den murinen T<sub>reg</sub>, welche durch die Expression von FOXP3 charakterisiert sind, gibt es im humanen System noch keine eindeutigen T<sub>reg</sub>-Marker.

### **1.5.2.2. Tumorimmunologische Relevanz von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen**

Neben der Induktion von spezifischen zytotoxischen T-Zellen zur optimalen Immunantwort gegen Tumorzellen spielt auch die Kontrolle regulatorischer T-Zellen eine wesentliche Rolle in der Tumorabwehr. Entgegen ihrer Funktion zur Vermeidung oder Unterdrückung einer Autoimmunreaktion zeigen regulatorische Zellen einen begünstigenden Einfluss auf

das Tumorwachstum. Die Präsenz von T<sub>reg</sub>-Zellen scheint eine wirksame Immunreaktion gegen tumorassoziierte Antigene zu unterbinden. Die Arbeiten von Berendt und North gaben erste Hinweise auf die Bedeutsamkeit regulatorischer T-Zellen bezüglich der Induktion anti-tumoraler Immunreaktionen<sup>85</sup>. Dabei konnte in einem Meth-A-Fibrosarcoma-Maus-Modell gezeigt werden, dass ein etablierter Tumor durch den Transfer von Meth-A spezifischen T-Zellen zur Regression gebracht werden konnte, jedoch nur, wenn der Tumor in T-Zell-defizienten Mäusen wuchs. Die Regression des Tumors wurde verhindert, sobald zuvor T-Zellen appliziert wurden, die aus Tumor-tragenden Donoren stammten.

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass sich regulatorische T-Zellen in den Lymphknoten und in der Umgebung des Tumors anreichern. Dies betrifft eine ganze Reihe von unterschiedlichen Tumoren. Es gibt Studien, die beispielsweise von erhöhten T<sub>reg</sub>-Zellzahlen in Brustkrebs-, Lungenkrebs-, Darmkrebs-, Melanoma- sowie Lymphoma-Patienten berichten<sup>86-91</sup>.

Das Einwandern in den Tumor wird durch dessen Milieu begünstigt<sup>92</sup>. Durch die Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  wird beispielsweise ein Zytokin-Milieu aufgebaut, das zur lokalen Expansion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen und zur Induktion von Tr1-Zellen führt<sup>93,94</sup>. Aufgrund der Bedeutung der T<sub>regs</sub> in der Tumorbilogie beschäftigen sich neuere Studien mit der Manipulation der T<sub>reg</sub>-Populationen, mit dem Ziel einer Verschiebung in Richtung proinflammatorischer Immunantwort und Expansion autologer T-Zell-Effektor-Populationen. Die Therapien stützen sich auf Untersuchungen in Mäusen, bei denen die Depletion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-Zellen zu Tumorregressionen führte<sup>95-97</sup>.

## 1.6. Tumormunologische Therapieansätze

Im Zuge neuer Erkenntnisse über die Ursachen der Krebsentstehung unter Berücksichtigung des Einflusses verschiedenster Zellpopulationen, wie beispielsweise regulatorischer T-Zellen und deren Interaktionen mit Tumorzellen und T-Effektorzellen, haben sich auch die Therapieformen verändert. In früheren Behandlungen spielte oftmals die Operation oder die Bestrahlung eine entscheidende Rolle in der Tumorbehandlung, vor allem bei soliden Tumoren. Dabei ist Metastasierung der Tumore ein wichtiges Kriterium für den operativen Erfolg oder Misserfolg. Bei der Bestrahlung können zwar Metastasen ebenfalls behandelt werden, nur werden damit auch die körpereigenen Abwehrkräfte äußerst geschwächt. Eine weitere Möglichkeit der Behandlung bietet die

Chemotherapie. Hierbei werden Medikamente verabreicht, die über die Blutbahn im gesamten Körper verteilt werden. Auch dadurch kann eine Bekämpfung der Metastasen erfolgen. Hierbei sind aber schwere Nebenwirkungen nicht auszuschließen. Die Medikamente für die Chemotherapie umfassen beispielsweise Antimetaboliten, Topoisomerase-Hemmer und alkylierende Wirkstoffe, wie das bekannte Cyclophosphamid, das bereits seit den fünfziger Jahren Anwendung findet<sup>98,99</sup>. Mittlerweile werden viele Therapieformen kombiniert angewendet. Dies gilt auch für die Kombination verschiedener Präparate. Dennoch ist der Erfolg einer Chemotherapie durch die mögliche Ausbildung von Resistenzen gegenüber den jeweiligen Medikamenten begrenzt. Gezielte Therapien, wie beispielsweise spezifische Inhibitoren oder Antikörper und die Einbeziehung eigener Abwehrkräfte gegen entartetes Gewebe aktiv zu werden, scheinen zukünftige Bestandteile neuerer Therapieformen zu sein.

### **1.6.1. Behandlungsformen und therapeutische Ansätze für die CML**

Die nach aktuellem Stand benutzte CML-Behandlung erfolgt individuell, nach Stadium der Krankheit, Alter des Patienten und Krankengeschichte. Man unterscheidet zwischen medikamentöser Behandlung und Stammzell-Transplantation. Das Therapieziel ist generell die Reduktion der Leukozytose und die Unterdrückung der BCR-ABL positiven Zellen. Die Verbesserung der Überlebenschancen richtet sich hauptsächlich nach der zytogenetischen Remission, die im Gegensatz zu der hämatologischen Remission eine Signifikanz zur Überlebensrate aufweist. Eine Therapie, die generell Anwendung findet, ist die allogene Stammzelltransplantation (SCT). Die langfristige leukämiefreie Überlebensrate liegt hier bei 50 % und ist somit bis heute die potentiell beste kurative Therapie. Dennoch kann die Transplantation bei 20-40 % der Patienten tödlich verlaufen. Die Hauptkomplikation liegt hierbei in der möglichen Ausprägung der Graft-versus-Host Erkrankung, wobei Immunzellen des Donors patienteneigene Zellen angreifen und zerstören. Der kontrollierte Verlauf der Krankheit ist ein wesentlicher Bestandteil in der Therapie.

Einen dramatischen Durchbruch in der Behandlung der CML und dessen Kontrolle wurde durch das Medikament Glivec® erbracht.

Das in 2001 zugelassene Medikament Glivec® (2-Phenylaminopyrimidinderivat, STI 571) ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, welcher selektiv an die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase bindet und damit zur Blockade der Aktivierung führt. Im Fall der Ph<sup>+</sup>-CML blockiert STI571 die Bindungsstelle in der c-ABL-Kinase und unterbindet damit deren

Überexpression. Die Anwendung von Glivec® erfolgt in der Therapie kontinuierlich über Jahre. Hinsichtlich der Wirksamkeit des Medikaments auf längere Sicht zeigten Studien jedoch, dass erneute spontane Mutationen im Bereich der ATP-Bindungsstelle und BCR-ABL-unabhängige Mechanismen zu einer Glivec®-Resistenz führen können<sup>100,101</sup>.

Deshalb basieren weitere Therapieansätze auf der Kombination verschiedener Inhibitoren und Immunmodulatoren, um Resistenzen zu minimieren. Zur Glivec®-Standardtherapie wird beispielsweise zusätzlich IFN- $\alpha$  verabreicht, welches in den achtziger Jahren zur hauptsächlichen CML-Therapie gehörte<sup>102</sup>. Entscheidende Verbesserungen wurden durch die Entwicklung von neuen Inhibitoren erzielt. Zu den neu entwickelten Inhibitoren gehören beispielsweise Dasatinib<sup>103</sup> und Nilotinib<sup>104</sup>, welche die Glivec-Resistenz durch veränderte Interaktionsprofile umgehen können.

Dennoch werden auf lange Sicht nicht alle Tumorzellen abgetötet, sodass weitere Strategien benötigt werden, um zurückbleibende Tumorzellen zu bekämpfen. Man spricht hierbei auch von der „minimal residual disease (MRD)“. Dabei könnte die gezielte Immuntherapie von Vorteil sein. Bei dieser Therapieform wird auf das Immunsystem des Patienten zurückgegriffen, welches prinzipiell tumorspezifische zytotoxische Immunzellen bilden kann. Bereits in den siebziger Jahren wurden AML-Patienten mit einer Kombination aus „bacille Calmette-Guérin (BCG)“ und bestrahlten leukämischen Zellen vakziniert. Man erkannte jedoch, dass die vakzinierten Patienten keinen entscheidenden Vorteil in der Überlebensrate aufwiesen. Das Interesse für diese Art der Therapie schwand, als die allogene Stammzelltransplantation erfolgversprechende Ergebnisse erzielte. Aufgrund des hierbei erzielten T-Zell-vermittelten Graft-*versus*-leukemia Effekts, der zur Remission der Tumorzellen führt, erkannte man das Potential von allogenen leukämie-spezifischen T-Zellen<sup>105,106</sup>.

Aktuelle Untersuchungen auf diesem Gebiet beziehen sich auf die *ex vivo* Expansion von spezifischen T-Zellen und deren Kultivierung für einen adoptiven T-Zell-Transfer. Zudem wird versucht, diese T-Zellen gezielt zu modifizieren, um eine verbesserte Funktionalität zu erreichen. Dies geschieht beispielsweise durch die genetische Modifikation von T-Zell-Rezeptoren<sup>107-109</sup>. Einige Studien zeigen bereits, dass durch den adoptiven T-Zell-Transfer eine verbesserte anti-tumorale Immunreaktion induziert wird<sup>110,111</sup>. Die *in vitro* Generation von spezifischen T-Zellen und deren adoptive Transfer in Stammzellentransplantierte scheint zwar durchaus eine erfolgreiche Behandlungsmaßnahme, dennoch muss auch hier die generelle klinische Anwendbarkeit weiter überprüft werden.

### **1.6.2. Generelle Tumor-Behandlungsstrategien**

Aktuellere Therapieformen beziehen sich auf die Modulation des Immunsystems des Patienten. In neueren Studien werden neben der Wirksamkeit von Immunmodulatoren, wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren, auch immer häufiger untersucht, in welchem Rahmen modifizierte Immunzellen, wie beispielsweise dendritische Zellen<sup>112</sup> und autologe modulierte T-Zellen<sup>113</sup> eingesetzt werden können und inwieweit die Immunisierung mit tumorspezifischen bzw. tumorassoziierten Antigenen Anwendung finden kann<sup>3,114</sup>. Hinweise auf klinische Anwendbarkeit von Tumor-reaktiven T-Zellen und tumorspezifischen Antigenen zeigten sich in Studien mit Melanoma Patienten. Dabei wurden PBMCs von Patienten mit Melan-A Peptiden stimuliert und Melan-A spezifische T-Zellklone generiert. Der adoptive Transfer dieser Zellen führte in 9 von 10 Patienten zu einer erhöhten Frequenz von Melan-A spezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen<sup>115</sup>. Weiterhin untersuchten andere Studien, inwieweit parentale Tumorantigene eine spezifische Immunantwort auslösen können. Hierbei wurde gezeigt, dass eine optimale Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen durch analoge Peptide erzielt wurde<sup>116,117</sup>.

In den letzten 15 Jahren wurde eine Vielzahl Leukämie-spezifischer Antigene identifiziert. Dabei sind viele dieser Antigene MHC-Klasse-I-Epitope. Die leukämie-spezifischen Antigene stammen von überexprimierten oder abweichend exprimierten Selbst-Proteinen beziehungsweise Neoantigenen. Die Neoantigene entstehen aus leukämie-spezifischen chromosomalen Rekombinationen. Zu diesen gehören beispielsweise die Epitope aus der Fusionsregion des BCR-ABL.

Durch diese Fusionierung ist eine neue Aminosäuresequenz entstanden, welche nur in leukämischen Zellen präsent ist, sodass sie als „fremd“ vom Immunsystem erkannt werden kann. Die Präsentation dieser Neoantigene über MHC-Klasse-I-Moleküle und deren prinzipielle therapeutische Relevanz konnte bereits 1995 in einer Studie belegt werden<sup>118</sup>. Im Hinblick auf die Anwendbarkeit in Vakzinierungsstrategien konnte weiterhin gezeigt werden, dass Leukämie-Patienten durchaus spezifischen Lymphozyten gegen Epitope aus der Fusionsregion bilden können, welche in *in vitro* Experimenten lytische Aktivität besitzen<sup>119</sup>.

Im Jahr 2004 entwickelten Kathleen Cathcart, Javier Pinilla-Ibarz und Kollegen die erste Peptid-Vakzinierung aus einem Mix von sechs BCR-ABL-Fusionsepitopen, welche in einer klinischen Phase-II Studie an 14 CML-Patienten getestet wurde. Die Mehrzahl der Patienten in dieser Studie zeigten eine BCR-ABL-Peptid-spezifische CD4<sup>+</sup>-Immunantwort, einhergehend mit der Sekretion von IFN- $\gamma$ . Einige Patienten zeigten eine hämatologische Remission in der Anzahl von Ph<sup>+</sup>-Zellen, während andere nach SCT-Therapie und anschließender Vakzinierung sogar BCR-ABL-negativ in der PCR getestet wurden<sup>120,121</sup>. Dennoch konnte diese Studie keine eindeutigen Ergebnisse erzielen. Weiterführende

Untersuchungen durch Boccia *et al.* in Patienten mit stabilem und milderem Krankheitsbild bestätigten jedoch die Induktion einer BCR-ABL-spezifischen Immunantwort durch eine Peptid-Vakzinierung, und damit auch eine klinische Bedeutung. Im Hinblick auf eine wirklich erfolgreiche Behandlung kann eine spezifische Immunantwort in Leukämiepatienten jedoch nur unzureichend induziert werden.

Neben den BCR-ABL-Fusionspeptiden finden auch andere tumorspezifische Epitope ihren Einsatz in klinischen Studien. Dazu gehören Epitope, die dem Wilms tumour-1 Antigen (WT1) entstammen. WT-1 wird sowohl in Stammzellen und gonadalen Zellen als auch in leukämischen Zellen exprimiert, wobei es nur in diesen Zellen überexprimiert wird. Dementsprechend kann es als Angriffsziel für tumorspezifische T-Zellen angesehen werden. Auf WT-1 basierende Immuntherapien weisen erste Erfolge bei Brustkrebs-Patienten, Lungenkrebs-Patienten und auch bei AML-Patienten auf. In den Studien zeigte sich, dass 12 von 20 Patienten eine klinische Antwort auf die Vakzinierung mit WT-1-Peptid zeigten, wobei sich diese auch im Anstieg der Frequenz der WT-1 spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten bemerkbar machte<sup>122,123</sup>. Eine Kombination aus WT-1 und einem Leukämie-assoziierten Proteinase-3-basierenden Epitop (PR-1) führt ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der IFN- $\gamma$  Produktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und zu einer Verringerung des WT-1-Expressionsgrades, was als Marker für die MRD gilt<sup>124</sup>.

Zusammenfassend zeigen erste Erfahrungen in der Vakzinierungstherapie jedoch, dass eine alleinige Peptid-Vakzinierung keine etablierte Leukämie eliminieren kann und nur in Kombination mit zusätzlichen Behandlungsformen, wie beispielsweise Chemotherapie, Medikamente oder allogene SCT einen positiven Einfluss auf die Remission bewirken kann. Zukünftige Therapieformen werden unter anderem sowohl auf die Aktivierung von Effektor-T-Zellen als auch auf die Suppression von regulatorischen T-Zellen abzielen. Hierbei könnten womöglich auch kleine organische Moleküle, sogenannte MLEs (MHC-loading enhancer) insofern eine Rolle spielen, indem sie die Immunantwort proinflammatorisch begünstigend beeinflussen (1.6.3.2). Weiterhin beschäftigen sich Studien mit der gezielten Eliminierung von Tumor-Stammzellen, denn diese scheinen ursächlich für die Remission der Patienten nach verschiedenen therapeutischen Behandlungsmaßnahmen zu sein. Es wurden erste Oberflächenmarker für leukämische Stammzellen charakterisiert, beispielsweise das Oberflächenmolekül CD123, das scheinbar exklusiv von diesen Stammzellen exprimiert wird und damit zukünftig einen potentiellen Angriffspunkt in der Behandlung von AML darstellen könnte<sup>125</sup>.

### **1.6.3. Die Rolle der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen für eine Tumorbehandlung**

Obwohl eine eindeutige Evidenz besteht, dass Tumorantigene existieren, fehlt die Induktion spezifischer CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>-Immunreaktionen, welche eine effiziente Tumorabwehr bewirken könnten. Die Gründe dafür sind vielfältig. Ein wesentlicher Grund hierfür ist die Suppression der Funktionalität spezifischer T-Zellen, beispielsweise durch die Sekretion von supprimierenden Faktoren und die Attraktion von Suppressoren in das Tumorgewebe. Ein weiterer Grund besteht in der ineffizienten Aktivierung spezifischer T-Zellen. Dies geschieht einerseits durch die funktionelle Inaktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen, beispielsweise durch Herabregulierung von MHC-Molekülen<sup>126</sup>. Andererseits kann die Expression spezifischer Tumorantigene minimiert werden. Ein Ansatzpunkt, um die Aktivität und Funktionalität der Effektorzellen zu erreichen, liegt in der Verbesserung der Antigenstimulation. Mit Hilfe von zusätzlich zugeführten Gefahrensignalen im Vakzinierungsprozess wie beispielsweise der Zugabe von bakterieller DNA (CpG-Oligodesoxynukleotide) oder Zytokinen (GM-CSF) wird versucht, die Immunreaktion zu maximieren<sup>127,128</sup>. Eine weitere Möglichkeit eine effektivere Stimulation der spezifischen T-Zellen zu gewährleisten, liegt in der verbesserten Funktionalität Antigen-präsentierender Zellen. Eine Strategie könnte in einer Steigerung der Peptid-Beladungseffizienz resultieren. So könnte eine bessere Beladung spezifischer Antigene auch zu einer verbesserten Aktivierung der spezifischen T-Zellen führen.

#### **1.6.3.1. Peptid-MHC-Klasse-II-Interaktion**

Ein wichtiger Rezeptor für die Aktivierung von spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Antworten ist das MHC-Klasse-II-Molekül, welches von APC exprimiert wird.

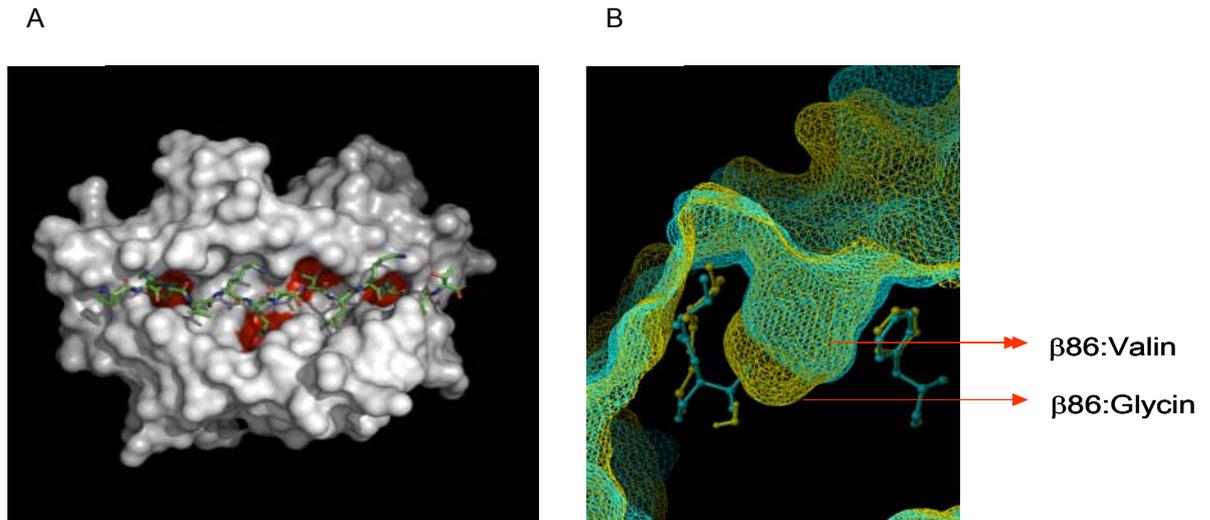
Die Gene der MHC-Klasse-II-Moleküle sind DP, DQ und DR. Das MHC-Klasse-II-Molekül besteht aus einem nicht-kovalent gebundenen Komplex, der zwei  $\alpha$ -Ketten und zwei  $\beta$ -Ketten beinhaltet. Die  $\alpha$ -Ketten werden durch die Gene DRA, DQA und DPA kodiert, während die  $\beta$ -Ketten durch die Gene DRB1, DQB und DPB kodiert werden. Beide Ketten besitzen Transmembranregionen und sind in der Zellmembran verankert. Die Peptid-Bindungstasche wird hier durch die  $\alpha_1$  und die  $\beta_1$  Untereinheiten ausgebildet. Im Unterschied zu der MHC-Klasse-I-Bindungstasche ist diese offener, sodass keine Längenbegrenzung existiert<sup>129</sup>.

MHC-Klasse-II-Moleküle binden allgemein Liganden von exogen aufgenommenen Proteinen, die intrazellulär in membrangebundenen Vesikeln proteolytisch abgebaut werden. Die Aufnahme erfolgt generell durch Endozytose. An die MHC-Klasse-II-Moleküle wird während ihrer Synthese im ER gleichzeitig ein Chaperon-ähnliches Molekül assoziiert (invariante Kette, I<sub>c</sub>), welches mit dem mittleren Segment in die Bindungstasche

des neu synthetisierten MHC-Moleküls eingelagert ist, und damit die Bindungstasche für andere Peptide verschließt. Somit kann eine unbeabsichtigte Beladung von neusynthetisierten Polypeptiden verhindert werden<sup>130</sup>. Eine zusätzliche Funktion der Ic-Kette ist der Transport des MHC-Moleküls aus dem ER durch den Golgi-Komplex zu Endosomen<sup>131</sup>. Alternativ kann der Transportweg der neusynthetisierten Ic-assoziierten MHC-II-Komplexe direkt zur Zelloberfläche führen, wobei die Komplexe nur kurzfristig an der Oberfläche verbleiben. Nach anschließender Internalisierung werden die Komplexe in Endosomen mit extrazellulären Partikeln in Kontakt gebracht und beladen<sup>132-134</sup>.

Die Internalisierung der oberflächlichen MHC-II:Li-Komplexe erfolgt über AP-2-abhängige Endozytose<sup>135</sup>. Die entstandenen Endosomen fusionieren mit Protease tragenden Vesikeln, wobei Lysosomen entstehen, in denen die Proteine proteolytisch gespalten werden. Zudem wird die Ic-Kette ebenfalls durch Cathepsin S proteolytisch gespalten<sup>136</sup>, sodass in der Bindungstasche ein kleines Fragment verbleibt, welches als CLIP-Fragment bezeichnet wird (*class II associated invariant chain peptide*)<sup>137</sup>. Um das CLIP-Fragment mit einem immunogenen Peptid auszutauschen, wird das Chaperon HLA-DM benötigt<sup>138</sup>, welches den Peptid:MHC-Komplex im sauren Milieu stabilisiert<sup>139</sup>.

Die Peptide für die MHC-Klasse-II-Beladung können in ihrer Länge variieren. Die terminalen Aminosäuren sind nicht in der Bindungstasche durch konservierte Wasserstoffbrückenbindungen fixiert und können somit außen auch degradiert werden. Innerhalb der Bindungsfurche werden neun Aminosäuren des Peptides durch diese Wasserstoffbrücken positioniert. Die Peptid-Bindungsstelle des MHC-Klasse-II-Moleküls weist Bindungstaschen auf, die als Ankerpositionen für den Liganden dienen. Typischerweise gibt es fünf charakteristische Peptid-Ankerpositionen (P1, P4, P6, P7 und P9). Es konnte gezeigt werden, dass die Tiefe der P1-Tasche im DR-Molekül durch den Dimorphismus des Aminosäurerestes 86 der  $\beta$ -Kette beeinflusst wird (Abb. 1.5.). An dieser Position treten entweder Glycin (Gly) oder Valin auf (Val). Der Polymorphismus befähigt dazu, auf ein großes Spektrum an Antigenen reagieren zu können.



**Abb. 1.5.: Schematische Darstellung der MHC-II-Bindungsfurche und des Dimorphismus der P1-Tasche bei HLA-DR Molekülen**

A) schematische Darstellung der Bindungsfurche mit den verschiedenen Bindungstaschen, hier rot hervorgehoben. Innerhalb der Bindungsfurche befindet sich exemplarisch das Peptid HA306-318 (von Sebastian Günther). B) schematische Darstellung der P1-Tasche und deren Tiefe, abhängig von der Aminosäure Glycin oder Valin an der Position  $\beta 86$ . Im Vergleich zu Glycin bildet Valin eine flachere Tasche aus.

Glycin an der Position  $\beta 86$  in der Bindungstasche führt zur begünstigten Bindung von Peptiden, die Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan an dieser Position aufweisen. Valin dagegen, dessen Seitenkette größer ist, benötigt mehr Platz, sodass die Vertiefung kleiner ausfällt. Dementsprechend können Peptide mit großen Seitenketten an der P1 Position schlechter binden, und es kommt zu einer Präferenz für Peptide mit kleineren aliphatischen Gruppen. Die Interaktion zwischen den Aminosäuren der Peptide und der Bindungsfurche muss nicht alle Ankerpositionen betreffen. Aufgrund von Bindungsanalysen synthetischer Peptid-Bibliotheken konnten Ankerpositionen und Bindungseigenschaften von Peptid-Motiven identifiziert werden<sup>140</sup>.

Experimente mit eluierten Peptiden aus dem MHC-II-Komplex scheinen zu belegen, dass drei bis vier Aminosäuren der Peptide nicht in der Bindungsfurche lokalisiert sind und die erste Verankerung in der Position vier oder fünf der Aminosäuresequenz des Epitopes liegt. Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass es sogenannte „*processing motifs*“ in den Peptidsequenzen gibt, wodurch die Peptide zuerst in der Bindungsfurche fixiert werden, bevor die überhängenden Enden durch Exopeptidasen getrimmt werden<sup>141</sup>. Gebundene Aminosäuresequenzen sind vor Exopeptidasen geschützt. Dementsprechend scheint, neben der Aktivität der Endopeptidasen, die Bindungsweise des Peptides in die MHC-II-Bindungsstelle für die Prozessierung mitbestimmend zu sein. Diese Erkenntnisse spielen

eine wichtige Rolle bei der Vorhersage von MHC-Klasse-II-restringierten T-Zell-Epitopen. Die heutigen Vorhersageprogramme, wie beispielsweise SYFEITHI, basieren auf Algorithmen, welche die wahrscheinlichsten Bindungsmöglichkeiten unbekannter Epitope aufgrund von Berechnungen identifizierter Peptid-Datenbanken darlegen. Damit ergeben sich erste Hinweise auf neue T-Zell-Epitope, die möglicherweise medizinisch interessant sein könnten.

In diesem Zusammenhang wurde auch die Sequenz für das in dieser Arbeit näher untersuchte hABL-Epitop 9088-922 näher betrachtet. Unter der Annahme, dass die Aminosäure Leucin in der Sequenz des ABL-Epitopes 908-922 als mögliche Ankerposition für die P1-Tasche dient, würden die nachfolgenden Ankerpositionen für die Taschen P4 bis P9 wie in Abbildung 1.6. dargestellt, entsprechend aussehen. Die fünf Proline am C-terminalen Bereich dieses ABL-Peptides ermöglichen eine flexible Einlagerung in die MHC-Klasse-II Bindungsfurche, da sie die Ausbildung der für die Liganden typischen Polyprolinhelix begünstigen.



**Abb.1.6.: Darstellung des durch das SYFEITHI-Programm als optimal vorhergesagten, HLA-DR1-bindenden ABL-Peptids 908-922 und dessen mögliche Ankerpositionen in der Bindungsfurche**

Die blau umrandeten Aminosäuren sind mögliche Ankerpositionen in den Bindungstaschen P1, P4; P6 und P9.

### **1.6.3.2. Der Einfluss niedermolekularer Verbindungen auf die Beladung des MHC-II**

Wie oben beschrieben, muss das CLIP-Fragment für eine Beladung mit entsprechenden Antigenen entfernt werden. Dieser Prozess, welcher im sauren Milieu stattfindet, wird durch das Chaperon HLA-DM katalysiert. Bei dieser Katalyse spielt die intermolekulare Wechselwirkung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und Bindungsfurche sowie das Aufbrechen dieser H-Bindungen eine entscheidende Rolle<sup>142</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die Konformation des MHC-Klasse-II-Moleküls variabel ist. So kann zwischen einer aktiven (offenen) und einer nicht aktiven (geschlossenen) Konformation unterschieden werden<sup>143</sup>. Weiterhin zeigen Studien, dass sich die Konformation durch

verschiedene Einflüsse ändern kann. So spielen beispielsweise der lokale pH-Wert oder niedermolekulare Verbindungen eine gewisse Rolle<sup>144,145</sup>. Die Umwandlung von der rezeptiven (aktive) in die nicht-rezeptive (inaktive) Konformation gestaltet sich als schneller Prozess, da die rezeptive Konformation instabil ist. Eine wichtige Funktion in der Konformationsänderung des MHC-Klasse-II-Moleküls spielt das oben erwähnte Chaperon HLA-DM. Durch die Interaktion mit HLA-DM wird die rezeptive bzw. offene Konformation stabilisiert<sup>146</sup>. Neuere Studien der Arbeitsgruppe des MDC und eigene Studien konnten demonstrieren, dass es auch niedermolekulare Verbindungen gibt, welche die Fähigkeit besitzen, die rezeptive Konformation zu induzieren und den Austausch von Peptiden an der Zelloberfläche zu katalysieren<sup>145,147</sup>. Eine Studie von Falk *et al.* zeigte, dass diese Kleinmoleküle auch unter neutralen pH-Bedingungen die Beladung der MHC Moleküle katalysieren. Das ist beispielsweise für die Beladung von Antigen-präsentierenden Zellen bedeutungsvoll, da es den Transfer von Antigenen an deren Oberfläche ermöglicht. In diesem Zusammenhang konnten nachfolgende Studien belegen, dass die Präsenz der niedermolekularen Verbindungen die Komposition der an der Zelloberfläche befindlichen Antigen:MHC-Komplexe bestimmt und dadurch spezifische Immunantworten verstärkt werden<sup>148</sup>. Mittlerweile konnte eine größere Zahl von Kleinmolekülen identifiziert werden, welche katalytische Aktivität aufweisen. Neben aromatischen und heteroaromatischen Verbindungen sind dies insbesondere Adamantan-haltige Strukturen. Letztere weisen dabei eine Allel-Spezifität auf, welche mit dem Dimorphismus der P1 Tasche korreliert<sup>149</sup>. Der Mechanismus mit dem diese Moleküle vermutlich die Beladung katalysieren ist in Abb.1.7. gezeigt.

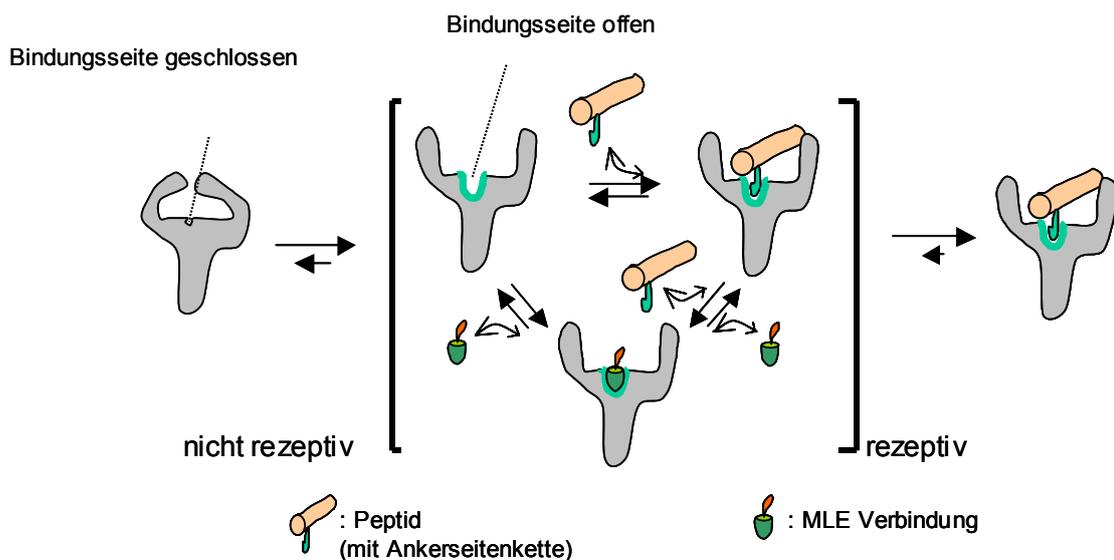


Abb. 1.7: schematische Darstellung des mutmaßlichen Mechanismus der chemischen Verbindungen<sup>149</sup>

Chemische Verbindungen können also die *On-* und *Off-rate* beeinflussen, indem sie durch Interaktion mit Aminosäuregruppen der Bindungsfurche die rezeptive Konformation des MHC-II-Moleküls stabilisieren und damit den Austausch der Peptidliganden katalysieren. Aktuelle Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen zudem, dass nicht nur oben genannte Verbindungen, sondern auch Aminosäureseitenketten von kurzen Dipeptiden den Ligandenaustausch an der Zelloberfläche auslösen können<sup>150</sup>. Die Untersuchungen von natürlichen und synthetischen chemischen Verbindungen mit katalytischer Funktion sind z.Zt. jedoch noch nicht abgeschlossen.

Die katalytische Wirkung der ‚MLE‘ Verbindungen ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Zum einen wird infolge des Ligandenaustausches an der Zelloberfläche ein Schutzmechanismus unterlaufen, welcher verhindert, dass Antigene außerhalb des dafür vorgesehenen Beladungsweges auf die MHC-Moleküle gelangen. Daher kann die Existenz von natürlichen oder synthetischen Kleinmolekülen das Risiko von Autoimmunreaktionen erhöhen. Andererseits könnten diese Kleinmoleküle aber auch als Katalysatoren für die Beladung von Tumorantigenen oder tumorassoziierten Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen dienen. Somit bestünde die Möglichkeit diese Kleinmoleküle als Vakzinierungszusätze, beispielsweise in Immuntherapien, einzusetzen.

### 1.7. Zielsetzung der Arbeit

Die Behandlung von etablierten Tumoren erscheint durch die Komplexität der Interaktionen zwischen Tumor und Immunsystem, sowie durch verschiedenste supprimierende immunregulatorische Faktoren konzeptionell sehr schwierig. Dennoch ist die Einbeziehung des Immunsystems Voraussetzung für eine langfristige kurative Behandlung, denn nur dann, wenn das immunologische Gedächtnis genutzt wird, kann das Risiko einer erneuten Erkrankung langfristig minimiert werden. Daher beschäftigt sich eine Vielzahl von Studien mit der Identifizierung von tumorspezifischen oder tumorassoziierten Antigenen (TAA), um diese therapeutisch in der Tumorbekämpfung einsetzen zu können<sup>151,152</sup>. Es wurde bereits demonstriert, dass tumorassoziierte Antigene, wie beispielsweise Epitope von Ep-CAM oder Her-2/neu eine spontane Immunantwort in Darmkrebspatienten induzieren können. Die klinische Relevanz dieser Epitope konnte aber noch nicht nachgewiesen werden<sup>153</sup>. Jedoch scheinen anderen Studien Hinweise darauf zu geben, dass die Induktion tumorspezifischer Immunreaktionen durchaus wirksam sein kann<sup>152,154,155</sup>. So vermag beispielsweise der

adoptive Transfer von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten einen positiven Einfluss auf die Tumorregression auszuüben<sup>156</sup>.

Die meisten TAA, welche bisher identifiziert und auf ihre therapeutische Wirksamkeit untersucht wurden, sind MHC-Klasse-I restringiert. Dazu gehören auch HLA-A2-restringierte tumorassoziierte Antigene, wie Survivin und CD229, welche in CML- bzw. B-CLL-Patienten charakterisiert wurden<sup>157,158</sup>. Die Identifizierung neuer Antigene ist dabei sowohl für die Peptid-Vakzinierung von Bedeutung als auch für die Entwicklung genetisch modifizierter, spezifischer TCRs, welche nach Transfektion in adoptiven T Zelltransfers verwendet werden könnten. Neben den genannten Antigenen entstammt eine Vielzahl der bisher für BCR-ABL identifizierten Epitope der Fusionsregion. Aufgrund der Kenntnis, dass die ABL-Kinase in BCR-ABL-positiven Tumorzellen überexprimiert ist, könnten aber auch Epitope aus dieser Region als tumorassoziierte Antigene therapeutisch relevant sein. Da die ABL-Sequenz in allen Ph<sup>+</sup>-Leukämieformen, bis auf individuelle Abweichungen gleich ist, scheint ABL als Quelle für die Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen in Ph<sup>+</sup>-Leukämien sogar besonders geeignet zu sein. Klinische Studien machen jedoch deutlich, dass eine Induktion CD8<sup>+</sup>-spezifischer T-Zellen allein nicht unbedingt ausreicht, um eine wirkungsvolle Immunantwort zu erzeugen. Zumindest in Tiermodellen konnte belegt werden, dass das Zusammenspiel zwischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und zytotoxischen T-Zellen entscheidenden Einfluss auf die Effektivität der Immunreaktion besitzt<sup>159,160,161</sup>.

In dieser Arbeit wird mit ABL ein tumorassoziiertes Antigen untersucht, welches bei CML und AML aufgrund der BCR-Fusion überexprimiert wird. Das Auftreten dieses Antigens ist dabei sogar funktionell mit der Transformation der Zelle verbunden. Als Autoantigen besteht zwar prinzipiell die Gefahr einer destruktiven Autoreaktivität, allerdings ist die Expression in nicht-transformierten Zellen äußerst niedrig und zudem zeitlich begrenzt. Dennoch besteht grundsätzlich das Problem, dass der TCR autoreaktiver T-Zellen für solche Tumorantigene zumeist eher schwach- oder mittel-affin als hoch-affin ist. Eine Untersuchung der dadurch ausgelösten CD4<sup>+</sup>-Antwort erscheint trotzdem lohnend, da zum einen nicht klar ist, inwieweit mittel-affine T Zellen zur Immunantwort beitragen und zudem durch *in vitro* Modulation des TCRs die Affinität für dieses Tumorantigen erhöht werden kann, was zumindest seinen Einsatz in adoptiven T-Zell-Transfers ermöglicht. Aufgrund der oben dargestellten Situation bestand die Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit

1) in der Untersuchung, ob eine tumorspezifische CD4<sup>+</sup>-Immunantwort gegen das hABL908-922-Antigen des humanen ABL-Proteins ausgelöst werden kann.

- In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, ob das ABL-Epitop908-922 von Antigen-präsentierenden Zellen aus dem Protein korrekt prozessiert, und über deren MHC-Klasse-II-Molekül präsentiert wird.

2) Es sollte ferner ein prä-klinisches BCR-ABL<sup>+</sup>-Modell etabliert werden, mit dessen Hilfe untersucht werden sollte, ob die Vakzinierung mit dem Peptid hABL908-922 ausreicht, um eine gezielte Tumorabwehr hervorzurufen.

- In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, welchen Einfluss regulatorische T-Zellen in diesem Modell besitzen.

3) Es sollte auch geklärt werden, ob unter Verwendung von niedermolekularen „MHC-loading-enhancer (MLE)“ CD4<sup>+</sup>-Immunantworten *in vitro* und *in vivo* verstärkt werden können.

- Unter diesem Gesichtspunkt wurde die organische Verbindung 2-(1-adamantyl)ethanol näher charakterisiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Zelllinien

BW1100:

Diese Zelllinie dient zur Herstellung von Hybridomzellen. Die BW1100-Linie ist eine Thymoma-Zelllinie, welche eine Variante der BW5147<sup>162</sup> ist. Die Zelllinie BW1100 ist  $\alpha$ -T-Zellrezeptor und  $\beta$ -T-Zellrezeptor negativ<sup>163</sup>. Die Zellen werden in RPMI/ 5 % FKS bei 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Peptid-spezifische T-Zelllinien:

Die hier verwendeten T-Zelllinien wurden aus Lymphknoten bzw. Milz generiert, welche von Peptid- immunisierten HLA-DR1tg Mäusen stammen. Es handelt sich um T-Zelllinien, welche HA306-318-spezifische Zellrezeptoren (EVHax16)<sup>150</sup> oder hABL908-922-spezifische Zellrezeptoren (Sa/ABL)<sup>150</sup> exprimieren. Die murinen T-Zellen werden mit DMEM/ 10 % FKS bei 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

SaABL/G2 Hybridom:

Diese Linie entstand aus der Fusionierung hABL908-922-spezifischer CD4<sup>+</sup>-T Zellen mit der BW1100 Zelllinie. Dadurch wurde eine Zelllinie etabliert, welche an ihrer Oberfläche hABL908-922 spezifische T-Zellrezeptoren trägt. Die Zelllinie kann ohne Zugabe von Zytokinen, wie IL-2 oder anderen Wachstumsfaktoren proliferieren. Die Zelllinie wird in DMEM/ 10 % FKS gehalten bei 10 % CO<sub>2</sub>.

EVHA/x5:

EVHA/x5 ist ein Hybridom, welches aus der Fusion von murinen T-Zellen, die spezifisch für das HA-Peptid 306-318 und DRB1\*0101 restringiert sind, mit der BW1100 Zelllinie entstanden ist. Kultiviert werden die Zellen in DMEM/ 10 % FKS bei 10 % CO<sub>2</sub>.

8475/94:

Dieses T-Zell-Hybridom ist spezifisch für das Peptid HA306-318 und ist DRB1\*0401 restringiert. Die Zellen wurden von L. Fugger bereitgestellt.

### 2E12

Diese Zellen sind T-Zell-Rezeptor transfizierte murine BW-Zellen. Diese Zellen sind spezifisch für MBP86-100 und besitzen die Restriktionen DRB1\*1501 und DRB1\*1502. Die Zellen wurden von L. Fugger bereitgestellt.

### L1501/L1502

Diese Zellen generierte man, indem L929-Zellen stabil mit den Ketten DRBA\*10101 und DRB1\*1501 oder DRB1\*1501 (Mutagenese:  $\beta$ 86Valin zu Glycin) transfiziert wurden<sup>149</sup>.

### 12B1:

Die Zelllinie zeichnet sich durch die Expression des Fusions-Proteins BCR-ABL-p210 aus, welches durch retrovirale Infektion in die Zelle eingebracht wurde. Sie wird bei 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI/ 5 % FKS kultiviert<sup>164</sup>.

### CTLL-2:

CTLL-2 ist eine zytotoxische T-Zell-Lymphoma-Linie, deren Proliferation IL-2-abhängig ist<sup>165</sup>. Diese Zelllinie wurde von ATCC bezogen (TIB-214™). Man kultiviert die Zellen in DMEM/ 5% FKS mit 10% C63-Überstand (IL-2 –Produzenten). Der C63-Überstand wird zuvor jeweils auf Aktivität bestimmt, und je nach Aktivität prozentual eingesetzt.

### dendritische Zellen (DC):

Die Zellen werden aus Knochenmarkzellen, gemäß 2.2.5.6. bzw. 2.2.5.7. beschrieben, generiert und in DC-Medium bei 5 % CO<sub>2</sub> gehalten ( 2.1.5.1.).

### 721.221:

721.221 ist eine Epstein-Barr Virus-transformierte B-Zelllinie, welche HLA-DR1 exprimiert (DRB1\*0101). Die Zellen wurden von JL. Strominger bereitgestellt.

### L57.23:

Diese Fibroblastenzellen exprimieren ebenfalls HLA-DR1 (HLA-DRB1\*0101). Die Zellen wachsen in DMEM/ 5 % FKS bei 10 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden von JL. Strominger bereitgestellt.

### TSA

Diese Tumorzelllinie entstammt humanen Brustdrüsenkrebszellen. Diese Zelllinie wurde von Prof. Dr. Blankenstein bereitgestellt.

L929 wt :

Die originale Zelllinie L929 (ATCC-Nr-CCL-1<sup>TM</sup>) wurde mit DRA-0101 des MHC-Klasse-II-Moleküls und mit DRB1\*0101 (G86) transfiziert.

L929 mut (G<sup>β</sup>86→V) :

Die Zelllinie L929 (ATCC-Nr CCL-1<sup>TM</sup>) wurde mit DRA-0101 des MHC-Klasse-II-Moleküls und mit der mutierten Sequenz DRB1\*0101 (G<sup>β</sup>86→V)<sup>149</sup> transfiziert. Die Zellen werden mittels 1 mg/ml G418 auf Selektion gehalten.

MGAR-Zellen

MGAR-Zellen sind Epstein-Barr-Virus transformierte B-Zellen, welche DRB1\*1501 und DRB5\*0101 exprimieren. Diese Zellen wurden von K. Wucherpfennig bereitgestellt.

PLAT/E:

PLAT/E ist die Abkürzung für Platinum-E. Die Zelllinie basiert auf der humanen 293T Zelllinie. Die Zellen werden als „packaging cells“ bezeichnet, da sie virale Strukturproteine stabil exprimieren und damit nach Transfektion mit retroviralen Plasmiden das genetische Material verpacken können und ekothrophe Retroviren produzieren<sup>166</sup>. Diese Zellen werden unter Selektion gehalten. Dazu wird dem DMEM/ 5 % FKS 10 µg/ml Blasticidin und 1 µg/ml Puromycin zugesetzt. Diese Zellen wurden von Prof. Dr. Blankenstein bereitgestellt.

### 2.1.2. Puffer und Chemikalien

Alle hier verwendeten Chemikalien oder Lösungen werden, wenn nicht anders angegeben bei folgenden Herstellern bestellt:

Sigma (Seelze, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), Invitrogen (Karlsruhe, D) Gibco (Karlsruhe, D).

Die Zellkultur-Verbrauchsmaterialien werden von Costar (Bodenheim, D), sowie TPP AG (Transadingen, CH) bezogen. Alle weiteren Plastikmaterialien werden von Eppendorf (Hamburg, D), Becton Dickinson (BD) (Heidelberg, D), BD Falcon (Heidelberg, D), Fluka (Taufkirchen, D), Roth (Karlsruhe, D) oder Greiner (Solingen, D) bezogen. Die Spritzen und Kanülen sind von der Firma Braun (Melsungen, D). Die Multi-Screen-HTS-IP Filtrationsplatten für die Elispot bezogene Anwendung werden von Millipore (Schwalbach, D) bezogen. Die P30-Filtermatten, die für den Gebrauch des Harvesters benötigt werden,

sind von der Firma Wallac Oy, (Turku, Finnland). Die Puffer, Lösungen und Chemikalien sind in den Tabellen 2.1. und 2.2. aufgeführt.

Die Puffer und Lösungen werden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Soweit nicht anders angegeben werden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

**Tabelle 2.1: Puffer und Lösungen**

<b><i>Puffer, Lösung</i></b>	<b><i>Zusammensetzung</i></b>
NaCl	5 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 M
EDTA	0,5 M; pH 8,0
Tris-HCL	1 M, pH 6,8
Tris-HCL	1,5 M, pH 8,0
Erythrozyten-Lyse-Puffer	10 mM Tris-HCL ; 0,165 M NH <sub>4</sub> CL ; pH 7,2
TE-Puffer	10 mM Tris-HCL ; 1 mM EDTA; pH 8,0
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat ; 1 mM EDTA; pH 8,0
Saponin-Puffer	PBS +0,5% (w/v) Saponin (Calbiochem) mit 5% FKS steril filtriert
Ficoll	GE Healthcare
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	137,0 (mit HCL)
FACS-Puffer	PBS + 2 % FKS
ELISPOT-Wasch-Puffer	PBS + 0,05% Tween 20
Bakterien-Medium (2xYT) für 5 L	80 g Tryptone 50 g Bacto™ Yeast Extract 25 g NaCl (für Agarplatten: 7,5 g auf 500 ml)
Selektionsmedium	2xYT-Medium mit entsprechenden Antibiotika 200 µg/ml Ampicillin 34 µg/ml Chloramphenicol

**Tabelle 2.2. Chemikalien**

<b><i>Chemikalien</i></b>	<b><i>Hersteller</i></b>
BD Cytotfix/Cytoperm™	BD Bioscience
Blasticidin	Invitrogen
Natriumpyruvat	Invitrogen
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)	Invitrogen

---

Dulbecco`s PBS (1x) without Ca&Mg Kommerzielles RPMI 1640 Medium kommerzielles DMEM-Medium RPMI-, DMEM-Pulver OptiMem Bacto™ Yeast Extract Tryptone Polyacrylamid Puromycin PeqGold Protein- Marker IV Magermilchpulver Natriumdodecylsulfat (SDS) Salzsäure HCL Scintillator-Flüssigkeit Tris (hydroxymethyl) Aminomethan (Tris) Tween 20 [6- <sup>3</sup> H]-Thymidin ( <sup>3</sup> H) (in Benutzung 0,35µCi/ml) Trypanblau N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) ECL-Reagenz „western lightning“ Trizol 3,3 Diaminobenzidine Tablets Set (DAB-Peroxidase-Substrat) Freund`sches Adjuvant CGP 57148B STI571 Diethylether 2-Mercaptoethanol RetroNectin™ FuGENE HD Transfection Reagent Polybrene	PAA Laboratories GmbH A-4061 Pasching Invitrogen Invitrogen Invitrogen Invitrogen Becton Dickinson, USA Becton Dickinson, USA Acrylamid ProtoGel, national diagnostics, USA Sigma Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D Merck Roth Roth Wallac Roth Roth Amersham Pharmacia biotech Invitrogen Bio Rad, D Perkin Elmer, Boston, USA Invitrogen Sigma Fast™ Sigma Norvatis Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, D Merck, Darmstadt, D Bio Whittaker/Cambrex Bio Science Rockland, USA Roche Sigma
---	--

---

Ampicillin	Roth
Chloramphenicol	Roth
IPTG	Bioline GmbH
p-Chlorophenol	Fluka
2-(1-adamantyl)ethanol	Sigma
Ammoniumperoxodisulfant (APS)	Roth
CpG1826 (5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3')	BioTeZ GmbH
PFU-Polymerase und Buffer	Stratagene
pet-Vektoren (pet22b(+), pet28c(+))	Novagen
Restriktionsenzyme	BioLabs
Primer	Invitrogen
Agarose (low melting)	Cambrex

### 2.1.3. Peptide und biologisches Material

Neben den kommerziell bezogenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren werden einige auch im eigenen Labor produziert. Dazu gehören GM-CSF und IL-2. Die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine sind in Tabelle 2.3. aufgelistet.

**Tabelle 2.3: Übersicht Zytokine**

<b>Produkt</b>	<b>Zelllinie</b>
IL-2	Überstand von C63 Zellen (erhalten von JL. Strominger, für die Kultivierung von CTLL-2-Zellen)
GM-CSF	NIH3T3 transduzierte GM-CSF Zelllinie (Produktion von 3895 ng/ml GM-CSF, bereitgestellt von Prof. Dr. Blankenstein)
Rekombinantes IL-2	Roche (Basel, CH)
m-SCF	PeptoTech Housse, London UK
Rekombinantes IL-3	PeptoTech Housse, London UK
Rekombinantes IL-6	PeptoTech Housse, London UK

Die hier verwendeten Peptide des BCR-ABL-Proteins werden von der Firma Jerini AG (Berlin, D) synthetisch produziert. Alle anderen synthetisch hergestellten Peptide, wie beispielsweise Hämagglutinin 306-318, PLP139-15, CLIP106-120 und auch ABL908-922 werden von der Firma EMC microcollections GmbH bezogen (Tabelle 2.4.).

Des Weiteren wird mit ABL-Domänen gearbeitet, die aus dem Fusionsprotein mittels spezifischer Primer amplifiziert worden sind. Die Bezeichnungen, die Sequenz und die Größe der Domänen sind aus der Tabelle 2.13. zu entnehmen (siehe 2.2.4.). Die Basis der Domänen und des Peptides p889 (hABL908-922) stellt die Abl-Sequenz der Version GI:125135 dar. Die Peptide und Domänen werden je nach ihrer Löslichkeit in PBS, PBS/DMSO oder nur in DMSO aufgenommen. Die Endkonzentration beträgt 1 mg/ml.

**Tabelle 2.4.: Eingesetzten Peptide und ihre Aminosäuresequenz**

<b>Peptide</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>	<b>bezogen von:</b>
HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	aus dem Hämagglutininprotein des Influenza-Virus <sup>167,142</sup> EMC microcollections GmbH, Research Genetics
PLP139-151 (C140S)	HSLGKWLGHDPKF	aus dem murinen Proteolipidprotein des Myelins <sup>168</sup> EMC microcollections GmbH, Research Genetics
biotinyliertes CLIP 106-120	KMRMATPLLMQLPM	EMC microcollections GmbH, Research Genetics
CLIP 106-120	KMRMATPLLMQLPM	EMC microcollections GmbH, Research Genetics
HABL 889 (908-922)	KGKLSRLKPAPPPPP	Jerini, EMC microcollections GmbH
mABL 883 (883-897)	KGRLAKLKPAPPPPP	Jerini
MBP86-100	NPVVHFFKNIVTPRT	EMC microcollections GmbH, Research Genetics
NY-ESO87-111	LLEFYLAMPFATPMEAE LARRSLAQ	P. Romero (Ludwig-Institute Lausanne), EMC microcollections GmbH, Research Genetics
NY-ESO119-143	PGVLLKEFTVSGNILTIR LTAADHR	P. Romero (Ludwig-Institute Lausanne) , EMC microcollections GmbH, Research Genetics
NY-ESO89-101	EFYLAMPFATPME	EMC microcollections GmbH, Research Genetics

**2.1.4. Monoklonale Antikörper**

Für die hier vorliegende Arbeit werden die in Tabelle 2.5. aufgeführten Antikörper verwendet, die jeweils an die hier beschriebenen Fluorochrome gekoppelt sein können oder biotinyliert vorliegen:

FITC (Fluoresceinisothiocyanat), PE (Phycoerythrin), APC (Allophycocyanin), PerCP-Cy5.5. Die sekundären Antikörper, die ebenfalls mit den angegebenen Fluorochromen gekoppelt sind, werden über BD Pharmingen (San Diego, USA) bzw. Miltenyi-Biotec (Bergisch Gladbach, D) oder Caltag (Burlingame, USA) bezogen.

**Tabelle 2.5: monoklonale Antikörper**

<i>Spezifität</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Maus-Antikörper		
$\alpha$ CD3	145-2C11	MDC, eigene Herstellung
$\alpha$ CD4	GK 1.5	MDC, eigene Herstellung
$\alpha$ CD11c	N418	Caltag, MDC, eigene Herstellung
$\alpha$ CD11b	M1/70	MDC, eigene Herstellung
$\alpha$ CD154	MR1	Miltenyi Biotec
$\alpha$ IFN- $\gamma$	AN18.17.2	Miltenyi Biotec
	4	
$\alpha$ IFN- $\gamma$	AN18.17.2	MDC, eigene Herstellung
	4	
$\alpha$ IFN- $\gamma$	R4-6A2	MDC, eigene Herstellung
$\alpha$ CD86	GL-1	MDC, eigene Herstellung
$\alpha$ CD80	16-10A1	MDC, eigene Herstellung
$\alpha$ CD25	7D4	BD Pharmingen
$\alpha$ CD25	PC61	MDC, eigene Herstellung
$\alpha$ CD28	37.51	MDC, eigene Herstellung

### 2.1.5. Geräte

Aus Tabelle 2.6 kann entnommen werden, welche Geräte für diese Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 2.6.: Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Harvester	Tomtec (New Heaven, USA)
<sup>3</sup> H-Thymidin-Reader	1450 Wallac (Turku, FIN)
Microbeta	
Ultrazentrifuge	Beckmann (USA)
SorvallRC3C plus	Beckmann (USA)
FACSCalibur	BD Bioscience (San Jose, USA)
Impulse Sealer	TEW, Electric Heating Equipment CO, Taiwan
PCR-Thermocycler (Mastercycler gradient)	Eppendorf (Deutschland)
Zentrifuge, Megafuge 3.OR	HERAEUS Instruments GmbH, Berlin
ELISpot Reader	Cellular Technology LTd. Cleveland, USA
S4 Core Analyser	
LSR-II	BD Bioscience (San Jose, USA)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Deutschland)

### 2.1.6. Software

Die in Tabelle 2.7. aufgeführte Software wurde zur Erstellung dieser Arbeit genutzt.

**Tabelle 2.7: Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
ImmunoSpot ® 4.0 Professional Software	Cellular Technology LTd. Cleveland, USA
Microsoft Office	Microsoft (Redmont, USA)
Sigma Plot	SPSS (Chicago, USA)
CellQuest pro	BD Bioscience ( San Jose, USA)
BD FacsDiva	BD Bioscience ( San Jose, USA)
Flowjo	TreeStar Inc. (Ashland, Oregon, USA)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die DNA verschiedener BCR-ABL-Domänen wird vervielfältigt, und anschließend in entsprechende Vektoren kloniert. Als Matrize für die Amplifikation des BCR-ABL-Fragments wurde hier der pCDNA3.1hp185-Vektor von C. Miething benutzt. Das Fragment wurde mit den Schnittstellen BamHI und EcoRI in den pet28c(+) kloniert. Dieser diente wiederum als Matrize für die verschiedenen Domänen-Konstrukte. Die Konstrukte wurden in den pet22b(+)-Vektor kloniert. Der Expressionsvektor pet28c(+) besitzt den His-Tag zur Aufreinigung N-terminal, während sich beim pet22b(+) der His-Tag C-terminal befindet. Alle hier aufgelisteten Domänen wurden in den pet22b(+) mit NdeI und XhoI kloniert. Die Aufarbeitung der Domänen erfolgt wie in 2.2.16. geschildert.

Die Oligonukleotide werden vor der Benutzung in destilliertem (dest-) H<sub>2</sub>O aufgenommen und über Eintrocknung, mittels Vakuumzentrifuge, von möglichen Restinhaltsstoffen gereinigt. Die eingetrockneten Primer werden mit sterilem dest-H<sub>2</sub>O auf 25 µM eingestellt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C. Stocklösungen werden bei -80°C in DEPC-H<sub>2</sub>O gelagert. Die spezifischen Oligonukleotide für die Bereiche wurden ausgehend von der publizierten Sequenz (GI:125135) ausgewählt und sind in der Tabelle 2.8. aufgelistet. Alle Vektoren und deren Inserts sind in Tabelle 2.9. aufgeführt.

**Tabelle 2.8.: synthetische Oligonukleotide**

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>Spezifität</b>
bcr-abl fwd für pet28c(+)	5'-CAGGATCCGACAGATCTGGCCCAACGAT-3'	homo sapiens
c-abl rev für pet28c(+)	5'-CCGAATTCCTACCTCTGCACTATCTCACTG-3'	homo sapiens
Bcr-Abl Rt-pcr fwd	5'-AACGGCAAGAGTTACACGTT-3'	homo sapiens
Bcr-Abl Rt-pcr rev	5'-AGACCCTGAGGCTCAAAGTC-3'	homo sapiens
SH2-Domäne rev für pet22b(+)	5'-AGACTCGAGGACAGTGGGCTTGTTGCGCTT-3'	homo sapiens
SH3-Domäne rev für pet22b(+)	5'-ACTCTCGAGTTTCTCCAGACTGTTGACTGG-3'	homo sapiens
Tyrosin-Domäne rev für pet22b(+)	5'-ACCCTCGAGCAGCTCCTTTTCCAATTTCGTC-3'	homo sapiens

Domäne 5 rev für pet22b(+)	5'-GAACTCGAGCCTGGACAATTTCCCCTTGTC-3'	homo sapiens
Domäne 6 fwd für pet22b(+)	5'-CAATAATCATATGGAGTCCAGAGTGAGGAG-3'	homo sapiens
SH2-Domäne fwd für pet22b(+)	5'-ACCCTTCCATATGACGCCAGTCAACAGTCT-3'	homo sapiens
SH3-Domäne fwd für pet22b(+)	5'-ACACATCCATATGGAAGCCCTTCAGCGGCC-3'	homo sapiens
Tyrosin-Domäne fwd für pet22b(+)	5'-AACACTCCATATGCCAAAGCGCAACAAGCC-3'	homo sapiens
Domäne 5 fwd für pet22b(+)	5'-ACTCTTCCATATGCAAGCCTTTGAAACAAT-3'	homo sapiens
Bcr-Abl rev Xhol für pet22b(+)	5'-GAACTCGAGCCTCTGCACTATGTCAGTACTGAT-3'	homo sapiens

**Tabelle 2.9.: Vektoren und Konstrukte**

<b>Vektor</b>	<b>Konstrukt</b>	<b>Schnittstellen/ Referenzen</b>
pet28c+	BCR-ABL	5'BamHI, 3'ECORI
pet22b+	Domäne 5	5'NdeI, 3'XhoI
pet22b+	Domäne 6	5'NdeI, 3'XhoI
pet22b+	Tyrosine-Domäne	5'NdeI, 3'XhoI
pet22b+	SH2-Domäne	5'NdeI, 3'XhoI
pet22b+	SH3-Domäne	5'NdeI, 3'XhoI
MIG-R1	leerer retroviraler Vektor mit GFP	
MIG-p210	vollständige Sequenz des BCR- ABL-p210 (Ursprung K562 Zellen) mit GFP	Dr. C.Miehting
MIG-p185	Hybridsequenz; humane BCR- Sequenz, murine ABL-Sequenz	Dr. C. Miehting

Nach Optimierung der Bedingungen erfolgte die PCR über 40 Zyklen. Die Anlagerungstemperatur (*annealing*) liegt hier zwischen 55 und 58°C. Die Temperatur für die Elongation beträgt 72°C. Das Protokoll ist aus der Tabelle 2.10. zu entnehmen. Der Reaktionsansatz wurde in einem Volumen von 50 µl bzw. 100 µl angesetzt. Exemplarisch für die Klonierung der Domänen in den Vektor pet22(+) wurde die PCR-Komponenten wie folgt angesetzt:

forward-Primer (fwd) 2 µl, reverse-Primer (rev) 2 µl, 10fach PCR-Puffer 10 µl, DNA-Template (pcDNA3.1-p210, Cornelius Miehting) 2 µl, Oligonukleotide (Mix) 4 µl, PFU-Polymerase 2 µl, Formamid 2 µl, DMSO 2 µl und H<sub>2</sub>O 74 µl.

**Tabelle 2.10. PCR-Protokoll**

Zeit	Temperatur
2 min	96°C
1 min	96°C
1 min	55°C bzw. bis zu 58°C
10 min	72 °C
	40 Zyklen
10 min	72°C
∞	4°C

### 2.2.2. Agarose Gelelektrophorese, DNA Aufreinigung

Zunächst wird ein 1%iges Agarosegel gegossen. Dazu wird 1g Agarose abgewogen und in 100 ml H<sub>2</sub>O aufgelöst. Außerdem werden 2 ml 50xTAE und 5µl Ethidiumbromid zugesetzt. Die zu analysierende DNA wird mit der entsprechenden Menge 10x Ladepuffer versetzt (Orange G, Sigma) und anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer dient 1xTAE. Nach der Elektrophorese wird die entsprechende DNA unter UV-Licht (254 nm) visualisiert und ausgeschnitten. Danach erfolgt die Aufreinigung aus dem Gel, wobei das Gel bei 65°C aufgelöst und die DNA mittels Resin (Qiagen) über eine Säule aufgereinigt wird.

### 2.2.3. Restriktionsspaltung, Ligation, Transformation und Plasmidaufarbeitung

Die aufgereinigte DNA wird, je nachdem, welche Schnittstellen für die Ligation in den entsprechenden Vektor gebraucht werden, mittels Enzymen verdaut. Das Volumen des Reaktionsgemisches liegt bei 10-20 µl. Zu der DNA werden die Enzyme, der entsprechende Puffer und H<sub>2</sub>O zugegeben. BSA (Rinderserumalbumin) ist im Reaktionsgemisch optional. Einige Restriktionsenzyme benötigen BSA für ihre optimale Aktivität. Der Verdau wird bei 37°C für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgt die Hitzeinaktivierung der Enzyme. Vor der Ligation des gewünschten DNA-Fragments mit dem Vektor, wird der linearisierte Vektor mit hitzeinaktivierbarer alkalischer Phosphatase behandelt. Ziel des Vorganges ist die Entfernung des 5'-Phosphates, damit eine Religation des Vektors verhindert wird. Die Dephosphorylierung erfolgt laut Protokoll des Herstellers (Roche, Boehringer Mannheim). DNA-Fragment und Vektor werden mittels T4-Ligation-kit (New England Biolabs) zusammengefügt. Die Inkubation erfolgt bei 16°C für mindestens 4h. Anschließend wird das Ligationsprodukt in die Transformation eingesetzt. Dazu werden kompetente Bakterien und das Ligationsprodukt auf Eis ca. 40 min und danach bei 42°C für 80 Sekunden inkubiert. Schließlich werden die Bakterien auf entsprechenden Agar-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Klone werden am nächsten Tag von der Platte gepickt und eine Flüssigkultur wird angeimpft (24 h 37°C, 1200 rpm). Die Flüssigkultur wird später geerntet und laut Jetstar-Plasmid-Purification-kit-Protokoll aufgearbeitet.

### 2.2.4. Prokaryotische Expression und Aufreinigung von Proteinen

Als Erstes erfolgt die Transformation der ABL-Domänen-Konstrukte (siehe Tabelle 2.9.) in die dafür geeigneten Bakterien und das Ausplattieren auf den Selektionsagarplatten. Hier werden Rosetta blue/DE3pLysS von Novagen verwendet. Diese Bakterien sind für die Expression von eukaryotischen Proteinen modifiziert. Die Zellen enthalten extra Kopien von seltenen *E.coli* tRNA-Genen, was ihnen eine Expression von Proteinen ermöglicht, die durch seltene Triplets kodiert werden (für konventionelle Bakterien). Die Modifikation beinhaltet zum Beispiel zusätzliche Kopien von argU, und proL tRNAs. Zu den schwer zu exprimierenden Codons zählen unter anderem AGA/AGG/AUG/CUA und das Prolin-Codon CCC.

Am nächsten Tag wird eine Vorkultur angeimpft. Dazu werden ca. 5 Kolonien von der Platte gepickt und in 100 ml entsprechendem Selektionsmedium über Nacht bei 37°C ohne zu schütteln inkubiert. Das für die Expression benötigte Medium wird vortemperiert,

sodass das Medium ebenfalls eine Temperatur von 37°C besitzt, wenn die Expression gestartet wird. Am Tag der Expression werden die 100 ml bei 3500 rpm für 10 min bei RT abzentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und das Pellet in 20 ml Medium aufgenommen. Jeweils ein Liter Selektionsmedium wird mit dem gelösten Pellet von 50 ml Vorkultur angeimpft. Die Bakterien wachsen für ca. 2h im Schüttler bei 37°C. Nach 2 h wird getestet, ob die optische Dichte (OD) von 0,55-0,65 erreicht wurde. Ist dies der Fall werden die Bakterienkolben mit 800 µl/Liter IPTG (250 mg/ml) induziert. Wenn der Expressionsvektor eine Ampicillin-Resistenz besitzt, wird zum Zeitpunkt der Induktion erneut Ampicillin (200 µg/ml) zugegeben. Nach der Induktion wachsen die Bakterien für 4 weitere Stunden unter angegebenen Bedingungen. Es erfolgt die Ernte der Bakterien. Dafür werden die Zellen in einem Zentrifugenbecher für 15 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Dem Pellet (von 1L) wird in 9 ml Lösung 1 (siehe Tabelle 2.11.) zugesetzt. Im Bakterien-schüttler erfolgt eine 10 min Inkubation bei 200rpm. Anschließend wird das Lysat in ein 50 ml Falcon überführt und man wäscht mit 2 ml Lösung 1 nach. Nun kann das Lysat bei -70°C weggefroren werden. Nachdem die Bakterien lysiert wurden, müssen sie anschließend sonifiziert werden. Sind die Lysate flüssig, werden diese 30 min bei 37°C im Bakterien-schüttler (200 rpm) inkubiert. Anschließend müssen die Bakterienreste durch Ultrazentrifugation von den Proteinen im Überstand getrennt werden. Die Ultrazentrifugation findet bei RT für 20 min bei 40000 rpm (Rotor: Ti60) statt. Die in 20 % Ethanol gelagerten Ni-NTA-Agarose-Beads (Qiagen) müssen vor Gebrauch mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen werden. Alle Schritte erfolgen in Säulen (Midi-Columns, Promega, Wizard), die an eine Vakuum-Pumpe angeschlossen sind. Nach dem Waschschrift werden die Beads mit Ni-Ionen beladen. Es werden ca. 7,5 ml 200 mM NiSO<sub>2</sub> Lösung mit den Beads gut resuspendiert, für 2 min inkubiert und dann abgesaugt. Nach einem weiteren Waschvorgang wird die Säule mit 7,5 ml Lösung 1 befüllt, sodass eine 1:1 Suspension entsteht. 5 ml der Suspension wird auf den Protein-Überstand pipettiert. Das Gemisch wird für 2 Stunden bei RT auf einem Rotor bei mittlerer Geschwindigkeit inkubiert. Nach der Abzentrifugation der Beads (1000 rpm, 5 min, RT, ohne Bremse) werden diese mit 10 ml Lösung 1 gewaschen und aufgenommen. Die gut resuspendierten Beads werden auf Säulen überführt. Folgende Waschschriffe schließen sich nun an:

1. 2x mit 10 ml Lösung 1
2. 2x mit 10 ml Lösung 2
3. 2x mit 10 ml Lösung 3
4. 2x mit 10 ml Lösung 4
5. 1x mit 10 ml Lösung 5  
(hier schnell arbeiten, kurz resuspendieren, schnell absaugen)
6. 1x mit 10 ml Lösung 6 (Säule gut trocken saugen)

Danach wird die Säule bei 2000 rpm bei RT für 2 min trocken zentrifugiert. Die trockenen Beads können nun auf Bindung des Proteins getestet werden. Dazu wird ein Teil der Beads in ein Gefäß mit 50 µl gewähltem Elutionspuffer überführt und für 30 min geschüttelt. Anschließend werden die Beads abzentrifugiert ( 5000 rpm, 3 min) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Beads und Überstand werden mit SDS-Ladenbuffer versetzt, gevortext und für zwei Minuten bei 60-70°C inkubiert. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt werden ca. 15 µl des jeweiligen Überstands auf ein 12 %iges SDS-Gel geladen. Erhält man das gewünschte Eluat mit dem gewählten Elutionspuffer, werden die restlichen Beads damit inkubiert (10 ml) und die oben aufgeführten Waschschrte wiederholt. Nach der Elution werden die Eluate über die HPLC gereinigt. Hierzu wird eine C4-RP-Säule (Vydoc) verwendet. Die Proteine werden mittels TFA-Acetonitril-Gradienten aufgereinigt und von Endotoxin befreit. Die Sequenzen der hergestellten ABL-Domänen und deren Größe sind der Tabelle 2.13. zu entnehmen.

**Tabelle 2.11.: Lösungen zur Aufbereitung von Proteinen**

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Verhältnis</b>	<b>Zusammensetzung Stocklösung (4L)</b>
Lösung 1	1% Triton in Gua-HCL Stock (oder in Urea-HCL Stock)	50 ml 10% Triton Stock ( oder Urea)	Gua-HCL-Stock: Guanidin-HCL 6,0M Tris Base 0,1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +2H <sub>2</sub> O 0,1M NaCl 0,5M  pH-Wert: 8,0 Ansatz filtern!
Lösung 2	0,1% Triton in Gua-HCL Stock (oder Urea-HCL Stock)	5 ml 10% Triton Stock (oder Urea)	Triton-Stock: 10% Triton-x 100 (v/v) in Gua-Stock oder in Urea Stock
Lösung 3	Gua-HCL Stock (oder Urea-HCL Stock) ohne Triton		Urea-HCL Stock: Urea 8,0M Tris Base 0,1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +2H <sub>2</sub> O 0,1M NaCl 0,5M  pH-Wert: 8,0
Lösung 4	Urea-HCL Stock, pH:8,0		
Lösung 5	Urea-HCL Stock, pH:6,7		
Lösung 6	20mM Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH:6,7		

**Tabelle 2.12: Elutionspuffer**

<b>Name/Zusammensetzung</b>	
Urea-Puffer 1:	8 M Urea-Stock pH 4,5
Urea-Puffer 2:	8 M Urea-Stock pH 8,0+12,5 mM EDTA pH 8,0
Phosphat-Puffer:	20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2+12,5 mM EDTA pH 8,0
A1 Puffer :	0,1% TFA in dest H <sub>2</sub> O

Tabelle 2.13: in *E.coli* hergestellte ABL-Domänen

Domäne	Größe kDa	Sequenz
SH3 Domäne	11	EALQRPVASFDFEPQGLSEAARWNSKENLLAG PSENDPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLR VLGYNHNGEWCEAQTKNQGQGWVPSNYITPV NSLEK
SH2- Domäne	12	TPVNSLEKHSWYHGPVSRNAAEYLLSSGING SFLVRESESSPGQRSISLRYEGRVYHYRINTA SDGKLYVSSESRFNTLAELVHHHSTVADGLIT TLHYPAPKRNKPTV
Tyrosin- kinase Domäne	30	QEVNAVLLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDLA ARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHA GAKFPIKWTAPESLAYNKFSIKSDVWAFGVLLW EIATYGMSPYPGIDLSQVYELLEKDYRMERPEG CPEKVYELMRACWQWNPSDRPSFAEIHQAFET MFQESSISDEVEKEL
Domäne 5	46	QAFETMFQESSISDEVEKELGKQGVARGAVSTL LQAPELPTKTRTSRRAAEHRDTTDVPMPHSHK GQGNSDPLDHEPAVSPLLPRKERGPPEGGLN EDERLLPKDKKTNLFSALIKKTKKKTAPTPPKRS S SFREMDGQPE RRGLRLL EKRSIS PWGSRLP AGEEEGRDISNGAL AFTPLD TADPAKSPKPSN GAGVPNGALRES GSGFRSPHL WKK SST LTS SRLATGEEEGG GSS SKR FLRSCSA SCV PHGA KDT EWR SVTL PRD LQS TGRQ FDSSTF GGHS EK PAL PRKRAGE NRS DQVT RGT VTPPPRL VK KNEE AADE VFKDIM ESSP GSS PPNLTPKPLRR QV TVAP ASG LPHKEEA GKG SAL GTPA AAEPV TPTSK AGS GAP GGTSKGP AEE SRVR RHK HSS ESPG RDK GKL
Domäne 6	28	ESRVR RHK HSSESPGRDK GKL SRLK PAPP PAAS AGK AGG KPSQSPS QEA AGEA VLG AKTK ATSLVD AVN SDAA KPSQPG EGLK KPVLPA TPK

---

PQSAKPSGTPISPAPVSTLPSASSALAGDQPS  
STAFIPLISTRVSLRKTRQPPERIASGAITKGV  
VLDSTEALCLAISRNSEQMASHSAVLEAGKNL  
YSFCVSYVDSIQQMRNKFAFREAINKLENNLR  
ELQICPATAGSGPAATQDFSKLLSSVKEISDI  
VQR\*

---

### 2.2.5. Kultivierung von Zellen und Zellpräparation

#### 2.2.5.1. Zellmedien

Die hier verwendeten Zellen werden je nach Haltungsbedingungen in folgenden Medien kultiviert:

DMEM (DULBECCO'S Modified Eagle Medium)

1 Einheit DMEM in 10 L pyrogenfreiem H<sub>2</sub>O gelöst, mit folgenden Zusätzen

20g NaHCO<sub>3</sub>

30g Hepes

1,1g Natriumpyruvat

RPMI

1 Einheit RPMI 1640 Medium in 10 l pyrogenfreiem H<sub>2</sub>O gelöst, mit folgenden Zusätzen

20g NaHCO<sub>3</sub>

30g Hepes

1,1g Natriumpyruvat

Einige Zelllinien, wie Stammzellen oder T-Zellen werden in kommerziellen Medien kultiviert. Diese Medien enthalten ebenfalls alle unten beschriebenen Zusätze, sofern nicht anders erläutert.

Die Medien werden sterilfiltriert und es wird vor Gebrauch für die Zellkultivierung 10 ml 100x Penicillin-Streptomycin, 10 ml 100x L-Glutamin (200 mM), 10 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) MEM und 1 ml β-Mercaptoethanol (50 mM) zugesetzt. Zur Kultivierung von Zellen und zum Ansatz von Proliferationsassays, werden die Medien mit 5-10 % Hitze-inaktiviertem FKS versetzt. Die Hitze-Inaktivierung erfolgt bei 56°C im Wasserbad für 30 min. In Einzelfällen wird 1 % Maus-Serum zugesetzt.

Stammzellen-Medium (kommerzielles RPMI):

Stammzellen-Medium besteht aus fertigem RPMI/ 10 % FKS mit folgenden Zusätzen:

50 ng/ml mouse-SCF

10 ng/ml IL-3

10 ng/ml IL-6

DC-Medium (kommerzielles RPMI):

DC-Medium besteht aus fertigem RPMI/ 10 % FKS mit folgenden Zusätzen:

15 ng/ml GM-CSF (Überstand von GM-CSF produzierenden NIH3T3, erhalten von Prof Dr. Blankenstein)

T-Zell-Medium:

T-Zell-Medium besteht aus kommerziellem DMEM-Medium, welchem 10% FKS zugesetzt und IL-2 (10 Units /ml) wurde.

### **2.2.5.2. Einfrieren und Lagerung von Zellen**

Zur Kryolagerung werden ca.  $5 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert und in 1 ml FKS/ 10 % DMSO (Einfriermedium) aufgenommen. Anschließend werden die Zellen für ein bis zwei Tage bei  $-80^\circ\text{C}$  zwischengelagert und kommen danach zur Endlagerung in flüssigen Stickstoff. Tiefgefrorene Zellen werden bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen werden anschließend in das entsprechende Medium überführt und abzentrifugiert, um sie vom restlichen DMSO zu befreien. Zur Kultivierung werden die Zellen dann in frischem Medium aufgenommen.

### **2.2.5.3. Zellzahlbestimmung**

Zur Bestimmung der lebenden Zellen in einer Suspension wird diese 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Von lebenden Zellen wird dieser Farbstoff ausgeschlossen, während er in tote Zellen gelangen kann und sie blau anfärbt. Die gefärbten Zellen werden dann von der Zählung ausgeschlossen. Es werden 10  $\mu\text{l}$  der Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und anschließend die Zellzahl/ml berechnet.

### **2.2.5.4. Gewinnung von Maus-Serum**

Zur Gewinnung des Serums werden die entsprechenden Mäuse mit Ether betäubt und aus den Augen geblutet. Dabei wird mit einer Glaspipette die hinter dem Glaskörper liegende Arterie angeritzt. Durch die Kapillarkräfte füllt sich die Glaspipette mit Blut. Es kann etwa 1 ml Blut aus den Augen entnommen werden. Das Blut wird zur Koagulation bei 4°C über Nacht gelagert. Nach anschließender Zentrifugation (1300 rpm, 30 min) kann das Serum vom abgesetzten Koagulat getrennt und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

### **2.2.5.5. Einzelzellsuspension aus Milz und lateralen Lymphknoten**

Man entnimmt den Tieren sowohl die Achsellymphknoten (Lymphonodus axillaris lateralis und LN.profundus) als auch die Kniefaltenlymphknoten (LN.inguinalis) und die Milz. Die Organe werden anschließend in DMEM weiterverarbeitet. Dazu werden die Organe mit dem Stempel einer Spritze auf einem 70 µm Nylon Zellsieb zerdrückt und in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Nach mehrmaligem Spülen des Zellsiebs werden die Zellen abzentrifugiert. Die in der Milzsuspension vorkommenden Erythrozyten werden mittels Lysispuffer zerstört. Dabei werden die Zellen in ca. 5 ml Lysispuffer resuspendiert und für 2 min bei 37°C inkubiert. Abgestoppt wird die Lyse durch Zugabe von DMEM 5 % FKS oder PBS und anschließender Zentrifugation bei 1300 rpm für 10 min. Die Zellpellets der Lymphknoten und Milz werden nochmals gewaschen und in ausreichend DMEM 5 % FKS bzw. DMEM 1 % Mausserum aufgenommen. Es erfolgt die Zellzahlbestimmung und die Einstellung auf die gewünschte Zellzahl.

### **2.2.5.6. Stammzellen-Präparation und Kultivierung dendritischer Zellen**

Zur Präparation von Stammzellen, die später zu murinen dendritischen Zellen (DCs) ausgereift werden können, werden die Mäuse getötet und Femur bzw. Tibia der Hinterbeine präpariert. Die Knochen werden kurz in Ethanol gewaschen und bis zur Aufarbeitung in RPMI-Medium gelagert. Zur Weiterverarbeitung werden Femur und Tibia mit einer Schere getrennt. Die Knochen schneidet man am oberen und am unteren Ende mit der Schere auf, sodass die Kanüle einer mit RPMI gefüllten Spritze in den Knochen eingeführt werden kann. Das Knochenmark wird nun aus den Knochen herausgespült und in einer mit RPMI-Medium gefüllten Petrischale aufgefangen. Das Knochenmark wird mehrmals mit der Spritze aufgezogen und zurückgespritzt, sodass sich der Verband der Knochenmarkzellen löst und man eine Einzelzellsuspension erhält. Man überführt die

Zellen nun von der Petrischale in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen und zentrifugiert sie bei 1400 rpm für 10 min ab. Danach nimmt man die Zellen in Stammzellen-Medium (2.2.5.1.) auf. Für die Kultivierung von dendritischen Zellen aus Stammzellen wird DC-Medium verwendet (2.2.5.1.). Die Zellen werden nun in 24-Flachboden-Platten ( $1-2 \times 10^6$ ) ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Kultivierung von Stammzellen zur späteren retroviralen Infektion (2.2.12.) werden die Tiere drei Tage vor Stammzellen-Präparation mit dem Zytostatika 5-Fluoracil behandelt (60 µl/Maus, intraperitoneale Injektion).

### **2.2.5.7. Generierung von murinen dendritischen Zellen aus Stammzellen**

Am Präparationstag, den man als Tag 0 bezeichnet, werden die Stammzellen in 24-Flachboden- oder in 12-Flachboden-Platten mit DC-Medium (siehe 2.2.5.1) ausplattiert und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am Tag 1 der DC-Kultivierung wird das Medium gewechselt. Hierfür werden die Zellen gut resuspendiert und das gesamte Medium abgezogen. In dieser Phase sind die Vorläuferzellen adhärent, sodass nur Zellen abgezogen werden, aus denen keine DCs entstehen. Es wird neues DC-Medium auf die Zellen gegeben.

Am Tag 3 wird das Medium wiederum vollständig abgezogen, nachdem gut resuspendiert wurde. Zu diesem Zeitpunkt haben sich bereits Cluster von Granulozyten gebildet, die nicht adhärent sind. Die DC-Vorläuferzellen sind adhärent.

An den Tagen 4-7 proliferieren die dendritischen Zellen und es bilden sich Cluster. Die Zellen sind nicht mehr adhärent, sodass am Tag 5 nur noch frisches DC-Medium hinzugegeben wird. Die Zellen werden gut resuspendiert damit sich die Cluster lösen.

Am Tag 7 sind die kultivierten Zellen zu immaturren dendritischen Zellen gereift, welche sich nun in Suspension befinden und nicht mehr adhärent sind. Um die Maturierung der DCs zu induzieren, resuspendiert man die Zellen und zentrifugiert sie bei 1400 rpm für 10 min ab. Danach werden die Zellen in RPMI Medium aufgenommen, dem 10 ng/ml LPS zugesetzt wurde und in 12-Flachboden-Platten ausgesät. Ein bis zwei Tage nach der LPS-Zugabe können die nun zu maturierten Dendriten ausgereiften Zellen für weitere Experimente genutzt werden.

## **2.2.6. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

### **2.2.6.1. Färben von oberflächengebundenen Molekülen**

Die Messungen zur Analyse von Zellpopulationen wurden an einem FACS-Calibur oder am FACS-LSRII durchgeführt.

Die Oberflächenmoleküle von Zellen können durch Fluoreszenzfarbstoff markierter Antikörper detektiert werden. Dazu werden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, und mit den jeweiligen Antikörpern bei 4°C für ca. 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Das Reaktionsvolumen beträgt 30 µl. Alle hier verwendeten Antikörper werden in ihren optimalen Verdünnungen verwendet, welche zuvor ausgetestet wurden. Nach der Inkubation werden die Zellen bei 1300 rpm für 4 min abzentrifugiert und zweimal gewaschen. Nun können die sedimentierten Zellen in 200 µl resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und gemessen werden. Je nach Experiment werden 5000-200000 Zellen zur FACS Analyse eingesetzt. Bei der Verwendung von ungekoppelten bzw. biotinylierten Antikörpern oder biotinylierten Fusionsproteinen wird an die erste Färbung eine sekundäre Färbung angeschlossen, wobei die biotinylierten Gruppen mit Streptavidin gekoppelten Fluorochromen ebenfalls für 30 min unter Lichtausschluss bei 4°C inkubiert werden. Es erfolgt mehrmaliges Waschen und die Aufnahme der nach Zentrifugation sedimentierten Zellen in 200 µl FACS-Puffer.

### **2.2.6.2. Intrazelluläre Färbung**

Die intrazelluläre Färbung wird zur Analyse von nicht Oberflächen-gebundenen Molekülen durchgeführt. So werden in dieser Arbeit Zytokine, wie Interferon- $\gamma$  oder Marker wie CD154 intrazellulär gefärbt. Bevor man dies tut, sollte sichergestellt werden, dass alle gewünschten Oberflächenfärbungen durchgeführt wurden. Im Anschluss daran werden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden anschließend permeabilisiert und fixiert. Dazu resuspendiert man die Zellen in 100 µl BD Cytfix/Cytoperm<sup>TM</sup> und inkubiert sie für 30 min bei 4°C. Eine weitere Möglichkeit der Fixierung von Zellen bietet die Behandlung mit 2%iger Paraformaldehyd-Lösung für 40 min auf Eis. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgt danach durch eine zwanzigminütige Inkubation der Zellen in 0,5%iger Saponinlösung bei 4°C unter Lichtausschluss. Saponin vermittelt die Porenbildung in der Zellmembran und ermöglicht dadurch die Bindung der Antikörper an intrazelluläre Moleküle. Danach erfolgt ein Waschschrift mit 0,5%iger Saponinlösung.

Nachdem die Zellen fixiert und permeabilisiert sind, können sie mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern angefärbt werden. Damit die Permeabilität der Membran erhalten

bleibt, werden die Antikörper in 0,5%iger Saponinlösung verdünnt. Die Inkubation beträgt ca. 30 min bei 4°C unter Lichtausschluss. Die zwei darauffolgenden Waschschrte werden ebenfalls mit der Saponinlösung durchgeführt. Abschließend werden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und zur FACS- Analyse herangezogen.

### **2.2.6.3. Zellaufarbeitung zum Nachweis von intrazellulären Molekülen**

In dieser Arbeit wird neben dem Zytokin IFN- $\gamma$  auch der zum CD40 korrespondierende Rezeptor CD154 anhand intrazellulärer Anfärbung analysiert. Dazu werden die Lymphozyten primär immunisierter Mäuse in einer 96-Rundboden-Platte ausplattiert und mit dem jeweiligen Peptid *ex vivo* stimuliert. Je nach Peptid wird eine Konzentration von 5-10 µg/ml gewählt. Ferner erfolgt die Zugabe von anti-mCD28 (5 ng/ml), um kostimulatorische Signalwege zu aktivieren. Die Zellen werden mit den stimulatorischen Faktoren für sechs Stunden inkubiert. Innerhalb der Inkubationszeit wird nach zwei Stunden Brefeldin A (BFA) in einer Konzentration von 2 µg/ml zugegeben, sodass die Inkubation der Zellen mit BFA vier Stunden beträgt. Als positive Kontrolle für den Nachweis von Aktivierungssignalen werden einige T-Zellen mit mCD3 (9 µg/ml) und mCD28 (2 µg/ml) stimuliert. Eine weitere Möglichkeit bietet die zweistündige Inkubation der Zellen mit PMA (*para*-Methoxy-amphetamin) in einer Konzentration von 50 ng/ml in Kombination mit Ionomycin in einer Konzentration von 1 µM. Nach der gesamten Inkubationszeit werden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen und können anschließend oberflächlich und intrazellulär gefärbt werden (siehe 2.2.6.1. und 2.2.6.2.).

### **2.2.7. Zelloberflächlicher MHC-Beladungsassay**

Diese Art der Bindungsanalyse von biotinylierten Peptiden oder Proteinen auf unterschiedlichen Zelltypen erfolgt mittels FACS Analyse. Es werden hauptsächlich die HLA-DR1-exprimierende L721.221 und L57.23, sowie die HLA-DR4-exprimierende L243.6 Zellen und HLA-DR1/HLA-DR4- exprimierende DCs für diese Beladungsassays verwendet. Die Verdünnungsreihe der jeweilig zu testenden Kleinmoleküle (MLEs) wird in 96-Rundboden- Platten erstellt. Die Verdünnung erfolgt 1:2 im DMEM/ 5 % FKS Medium. Anschließend werden die Zellen ( $1 \times 10^5$ / 50 µl) zugegeben. Danach erfolgt die Zugabe des jeweiligen biotinylierten Peptides oder Proteins in einer bestimmten Konzentration in 50 µl. Als Kontrolle der Bindungsfähigkeit der Peptide oder Proteine an den Zellen werden diese in einer extra Reihe titriert (1:3 in DMEM/ 5% FKS Medium). Als Kontrollwert dienen

Zellen mit Peptid oder Protein. Anhand dessen kann die spontane Beladung der Zellen analysiert werden. Der Hintergrundwert ergibt sich aus der Messung der alleinigen Zellen. Die Zellen werden für den Beladungsassay 4 h bei 37°C 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 4 Stunden werden die niedrigsten Titrationsstufen einiger Kleinmoleküle für die Zellen toxisch. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen mit PBS 2% FKS mindestens 2 x gewaschen (1450 rpm 5 min). Bei der anschließenden Färbung werden die Zellen mit ca. 1,6 µg/ml Streptavidin-APC (30 µl/Vertiefung) für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit werden die Zellen nochmals mit PBS 2 % FKS gewaschen. In FACS-Glasröhrchen werden 100 µl einer Propidiumiodid-Lösung vorgelegt (0,1 µg/ml). Danach erfolgt die Zugabe der gewaschenen und in 100 µl mit PBS 2% FKS aufgenommenen Zellen. Nun kann die FACS-Analyse erfolgen.

## **2.2.8. Tumorinduktion /CML-Mausmodell**

### **2.2.8.1. Tierhaltung und Versuchstiere**

Alle verwendeten Mäuse werden in den Tierhaltungseinrichtungen des MDC's Berlin-Buch unter folgenden Bedingungen gehalten:

Raumtemperatur 21°C± 2°C

-unbegrenzte Versorgung mit Futter und Wasser

-Haltung von bis zu sechs Tieren in einem 700 cm<sup>2</sup> Käfig

-künstlicher 24 h Tag-Nacht-Zyklus

Alle Tierversuche werden in Übereinstimmung mit den Deutschen Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

Die Mausstämme, die für die Anfertigung dieser Arbeit zur Verwendung kommen, sind in Tabelle 2.14. aufgeführt. Es werden im Versuchsablauf möglichst Geschwister aus einem Wurf, immer gleichen Geschlechts, 2-6 Monate alt, verwendet.

**Tabelle 2.14.: Versuchstiere und Herkunft**

<b><i>Versuchstiere</i></b>	<b><i>Herkunft</i></b>
HLA-DR1-transgene B10.M	aus eigener Zucht stammend (Ausgangspaar von Dennis Zaller) 169
Balb/c × HLA-DR1/B10.M (F1)	aus eigener Zucht stammend
Balb/c	Charles River (Sulzfeld, D)

### **2.2.8.2. Tumorzelllinie und Induktion des Tumors**

Zur Induktion des Tumors werden in dieser Arbeit 12B1 Zellen verwendet. Diese Zelllinie entstand aus der Infektion von Balb/c Knochenmarkzellen mit einem BCR-ABL-tragenden Retrovirus<sup>164</sup>. Die transformierten Zellen zeichnen sich durch ihren immaturren B-lymphoiden Charakter aus. Die 12B1-Zelllinie exprimiert dauerhaft das BCR-ABL-Protein p210. Die 12B1-Zellen sind tumorigen und führen nach Inokulation zur Tumorbildung mit einer Latenzzeit von 2-3 Wochen.

Vorbereitend werden die Zellen mit PBS mindestens zweimal gewaschen, um jegliche Mediumreste zu entfernen. Dies ist erforderlich, da sich im Medium FKS befindet, was zu unspezifischen Reaktionen in der Maus führen kann. Die Zellen werden gezählt und auf  $3 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS eingestellt. Die Viabilität der Zellen wird mittels Trypanblaufärbung festgestellt und sollte am Tag der Injektion bei über 95% liegen. Die Applikation der Zellen erfolgt subkutan in die rechte Kniefalte. Die Mäuse werden ab dem achten Tag der Inokulation der Zellen auf Tumorwachstum beobachtet. Die hier verwendete F1 Generation entstand aus der Kreuzung zwischen männlichen B10.M HLA-DR1 Mäusen und weiblichen Balb/c Mäusen.

### **2.2.8.3. Messung des Tumors**

Der Tumor wird mittels eines digitalen Messschiebers vermessen, wobei die Breite und die Länge des Tumors ermittelt wird. Bei einer Tumorgröße von 2 x 2 cm müssen die Mäuse abgetötet werden. Die Auswertung des Tumorwachstums erfolgt über die Analyse der gemessenen  $\text{mm}^2$ .

### **2.2.9. Induktion von primären Immunantworten**

Es werden sowohl HLA-DR1/B10.M Mäuse, als auch Mäuse aus der F1 Generation (siehe 2.2.8.1.) primär mit verschiedenen Peptiden immunisiert. Dazu werden die Peptide entweder in kompletten Freund'schen Adjuvans oder inkompletten Freund'schen Adjuvans mit Zusatz von CpG1826 (50  $\mu$ g/Maus) aufgenommen. Ein Beispiel der Ansätze ist der Tabelle 2.15. zu entnehmen. Das Peptid/PBS-Gemisch mit oder ohne Zusatz von CpG1826 wird tropfenweise in das Freund'sche Adjuvans pipettiert, wobei das Adjuvans auf dem Vortexer in ständiger Bewegung ist. Das milchige Gemisch wird bis zur Applikation auf Eis gelagert. Es werden je 100  $\mu$ l der Emulsion subkutan in den *dorsocranialen* Bereich und 100  $\mu$ l in den *dorsocaudalen* Bereich injiziert. Damit soll gewährleistet werden, dass das Antigen die Achsel- und Kniefaltenlymphknoten möglichst

gut erreicht. In dieser Arbeit wird außerdem mit einem Peptid-Adamanthanethanol Emulsion immunisiert, wobei das Adamanthanethanol (AdEtOH) bei jeder Applikation frisch eingewogen und gleich in IFA gelöst wird. Das Kleinmolekül wird für *in vivo* - Anwendungen in einer Konzentration von 10 mM appliziert.

**Tabelle 2.15.: Ansatz für die Injektion (berechnet für 1 ml)**

<i>Peptid</i>	<i>PBS</i>	<i>CPG</i>	<i>AdEtOH</i>	<i>Freund'sches Adjuvans</i>
HA : 50 µl (Stock: 1 mg/ml)	450 µl	-----	-----	CFA: 500 µl
HA : 50 µl (Stock: 1 mg/ml)	437,5 µl	12,5 µl (Stock: 20 mg/ml)	-----	IFA: 500 µl
HA : 50 µl (Stock: 1 mg/ml)	437,5 µl	12,5 µl (Stock: 20 mg/ml)	100 µl (Stock: 100 mM)	IFA: 400 µl

### 2.2.10. ELISPOT-Assay

Das Beschichten der MultiScreen-Nitrozellulose-Platte (Millipore) mit dem anti-IFN- $\gamma$  Antikörper (7,5 µg/ml) erfolgt unter sterilen Bedingungen. Die Platte wird bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Antikörper wird durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Platte kann entweder mit 150 µl DMEM-Medium/ 5% FKS oder mit DMEM/ 1% Mausserum geblockt werden. Das Blocken dient der Vermeidung von unspezifischen Antikörperbindungen. Nach zweistündiger Inkubationszeit wird das Medium dekantiert und die Titrationsreihe der zu untersuchenden Peptide erstellt. Danach erfolgt die Zugabe der Zellsuspension (1x10<sup>6</sup>/Vertiefung). Als Positiv-Kontrolle werden die Zellen mit 500 µg/µl PHA oder mit anti-mCD3 (9 µg/ml) und anti-mCD28 (5 µg/ml) stimuliert. Als Negativ-Kontrolle dienen Zellen ohne Stimulierung.

Die Zellen werden für 24-48 h bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nachfolgend werden die Zellen verworfen und die Platte gewaschen. Das an den ersten Antikörper gebundene IFN- $\gamma$  wird durch Zugabe eines zweiten biotinylierten anti-IFN- $\gamma$ -Antikörpers markiert. Die Inkubation erfolgt für 2 h bei 37°C. Das Biotin wird wiederum von dem Avidin gekoppelten Enzym HRP (2 µg/ml, Inkubationszeit 1 h) gebunden. Es schließen sich mehrere Waschschrte an, wobei die ersten drei mit PBS/0,05%Tween® 20 und die letzten drei mit PBS durchgeführt werden. Das ist wichtig, da Tween® 20 die Spot-Entwicklung behindert. Danach werden die Spots durch Zugabe des SigmaFAST™-Entwicklungsreagenz sichtbar gemacht. Die Entwicklungsdauer variiert und kann durch

dest.-H<sub>2</sub>O abgestoppt werden. Die entwickelten Platten werden zum Trocknen dunkel gelagert. Abschließend werden die Spots mit Hilfe des ImmunoSpot® S4 Core Analyzer detektiert und mit der ImmunoSpot® software analysiert.

### 2.2.11. Proliferationsassay

#### 2.2.11.1. Proliferationsassay mit T-Zell-Hybridoma

Der Assay dient der Bestimmung der spezifischen Antwort von CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Hybridomen auf entsprechende Peptide. Die Peptide werden auf der Oberfläche von dendritischen Zellen präsentiert. Es können jedoch auch andere MHC-Klasse-II-tragende Zelllinien als Antigen-präsentierende Zellen (APC) benutzt werden, wie zum Beispiel die 721.221 Linie. Zumeist wird mit APC gearbeitet, die HLA-DR1 exprimieren. In einigen Assays, die in dieser Arbeit gemacht wurden, werden BCR-ABL-infizierte dendritische Zellen eingesetzt (2.2.5.7.), die dann prozessierte Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Der Assay wird in einer 96-Rundboden-Platte durchgeführt. Die Titration erfolgt in 1:2 oder 1:5 Schritten, wobei die Anfangskonzentration meistens 10 µg/ml beträgt. Es werden Duplikate angefertigt. Das entsprechende Peptid wird für die Titration in DMEM/ 5 % FKS verdünnt. Zu der Antigen-Verdünnung werden je nach verwendeter Antigen-präsentierender Zelllinie ca. 5000-8000 (DCs) oder 300000-500000 Zellen (andere APC) in Medium zu einem Endvolumen von 200 µl zugegeben. Die Platte wird 4 Stunden bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 1400 rpm. Um toxische Reaktionen zu vermeiden, werden die Zellen bei Verwendung von organischen Kleinmolekülen (MHC-loading-enhancer, MLE) im Assay mehrmals mit PBS gewaschen. Dann werden zwischen 20000 und 50000 Hybridom-Zellen in 150 µl DMEM/ 5 % FKS zu den beladenen APC pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt 24 Stunden bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub>. Nach der Inkubation wird der Überstand der Kulturen abgenommen und auf seinen Interleukin-2 (IL-2)-Gehalt im Sekundärassay getestet. Dafür benutzt man CTLL-2-Zellen, die in ihrer Proliferation IL-2-abhängig sind. Die eingesetzten Zellen haben mindestens 24 h vorher kein IL-2 erhalten und wurden einmal mit DMEM gewaschen. Zur Berechnung des sekretierten IL-2 wird eine IL-2- Standardkurve angelegt. Beginnend mit einer Ausgangskonzentration von 3,3 U/ml IL-2 in einem Volumen von 30 µl erfolgt eine 1:3 Titration.

Vom Überstand des Hybridom-Assays werden dann jeweils 30 µl im Sekundär-Assay getestet. Es werden 50000 CTLL-2 Zellen in 50 µl zugegeben, unter Standardbedingungen 24 h inkubiert, wobei zu den letzten 12 h 35 µCi/ml <sup>3</sup>H-Tymidin zugesetzt wird. Die Bestimmung des IL-2-Gehaltes durch die Proliferationsrate erfolgt durch die Messung der inkorporierten Radioaktivität. Dazu werden die Zellen mit dem

Harvester geerntet. Die Zellen werden mit diesem System auf Filter überführt, die im getrockneten Zustand mit der Scintillations-Flüssigkeit behandelt und in Folie eingeschweißt werden. Die Menge an inkorporiertem  $H^3$ -Thymidin der auf diesen Filtern befindlichen Zellen wird durch Lumineszenz-Reaktionen im entsprechenden  $^3H$ -Thymidin-Reader 1450 Microbeta quantifiziert, und als Proliferationsrate (cpm) bestimmt. Anhand der IL-2-Standardkurve können die entsprechenden Proliferationswerte in die IL-2-Produktion der Hybridomzellen umgerechnet werden.

### **2.2.11.2. Proliferationsassay mit T-Zellen**

Für diesen Assay werden ca. 50000 T-Zellen mit ca. 2000000 Antigen-präsentierenden Zellen in 96-Rundboden-Platten für drei Tage bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub> kokultiviert. Wenn dendritische Zellen als APC genutzt werden, reichen 5000 bis 8000 Zellen. Die Antigen-Stimulation erfolgt Peptid-abhängig in Konzentrationen von 5-10 µg/ml. Die Peptide werden meistens 1:2; 1:5 oder 1:10 titriert. Als negative Kontrolle erhält die Ko-Kultur kein Peptid. Die Zellen werden unter Standardbedingungen für vier Tage inkubiert. Für die letzten 24 h ,zur Messung der Proliferationsrate mittels Radioaktivität, wird  $^3H$ -Thymidin (35 µCi/ml) zugegeben. Nach erfolgter Inkubationszeit werden die Zellen geerntet und die  $^3H$ -Inkorporation entsprechend gemessen (siehe 2.2.11.1.).

### **2.2.12. Transfektion und retrovirale Infektion von Zellen**

#### **2.2.12.1. Transfektion von PLAT-E Zellen**

Am Tag vor der Transfektion werden die Zellen in DMEM-Medium ohne Selektionszusätze in einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  / 2 ml in 6-Flachboden-Platten ausplattiert. Am nächsten Tag wird die Konfluenz untersucht. Die Zellen lassen sich am besten transfizieren, wenn sie 80% konfluent sind. Bevor die Zellen transfiziert werden, erhalten sie frisches Medium. Zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen wurde zuvor das Verhältnis von Fugene (µl) und DNA (µg) jeweils mit den entsprechenden Vektoren ausgetestet. Bei den hier verwendeten Vektoren stellte sich ein Verhältnis von 3:1 als optimal heraus. Es werden für die Transfektion von  $1 \times 10^5$  Zellen mit den retroviralen Plasmiden MIG-R1<sup>170</sup> und MIG-p210<sup>170</sup> bzw. MIG-p185 je 4 µg DNA eingesetzt, welche in 50 µl OptiMem verdünnt werden. In einem anderen Reaktionsgefäß werden für jede Transfektion 250 µl OptiMem vorgelegt, in das dann 12 µl Fugene hinein pipettiert werden. Es ist darauf zu achten, dass in das Medium und nicht an die Wand des Gefäßes pipettiert wird, da Fugene mit Plastik reagiert. Zur Durchmischung der Reagenzien wird das Gefäß leicht geschüttelt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird das

Fugene/Medium-Gemisch in die verdünnte DNA tropfenweise hineingegeben und anschließend leicht geschüttelt. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur für ca. 30 Minuten stehen gelassen. Danach wird das Gemisch tropfenweise den Zellen zugeführt. Es erfolgt eine Inkubation von ca. 12 h in 10% CO<sub>2</sub> bei 37°C. Danach wird das Medium durch frisches DMEM/ 5% FKS ersetzt. Da hier PLAT-E Zellen mit retroviraler DNA transfiziert werden, produzieren die Zellen Virus, der dann im Überstand verbleibt. Der Virusüberstand kann nach 48-72 Stunden geerntet und für die Infektion verwendet werden. Die Überprüfung der Transfektionsrate erfolgt mittels GFP-Messung im FACS.

### **2.2.12.2. Infektion von Zellen**

Zur Infektion mit Retroviren müssen sich die Zellen in starker Proliferation befinden, da nur sich teilende Zellen infiziert werden können. Demnach werden die zu infizierenden Zellen einen Tag vor Infektion in 24-Flachboden-Platten oder in 12-Flachboden-Platten ausgesät. Knochenmarkzellen werden in Stammzellen-Medium und T-Zellen in T-Zell-Medium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bzw. 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Tag der Infektion sollten sich Proliferationscluster gebildet haben.

Da Knochenmarkzellen auf Retronectin-beschichteten Platten infiziert werden, müssen diese vorbereitet sein. Die Vorbereitung umfasst die Beschichtung von non-tissue-Platten mit 400 µl Retronectin für 2 h, bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation wird das Retronectin verworfen und die beschichteten Vertiefungen mit 500-800 µl Virusüberstand befüllt. Zur Entfernung von Zellresten wird der Überstand der transfizierten PLAT-E Zellen zuvor durch einen 45 µm Filter filtriert. Der Virusüberstand verbleibt bei 32°C ca. 5-10 Stunden in der Platte. Anschließend wird der Überstand verworfen und es werden 1x10<sup>6</sup> Zellen in jede Vertiefung ausgesät (Stammzellen-Medium). Nach zwölfstündiger Inkubation bei 32°C wird das alte Medium durch den neuen Virusüberstand ersetzt. Damit die Proliferation nicht beeinträchtigt wird, setzt man dem Virusüberstand die entsprechende Menge an Zytokinen zu (siehe 2.2.5.1.). Des Weiteren erfolgt die Zugabe von 6 µg/ml Polybrene oder Protaminsulfat.

T-Zellen werden in 24-Flachboden-Platten infiziert. Hier erfolgt die Aussaat von 2x10<sup>6</sup> Zellen pro Vertiefung in 2 ml T-Zell-Medium. Zur Gewährleistung einer guten Proliferationsrate werden die T-Zellen einen Tag vor Infektion mit 100 U/ml IL-2 und anti-CD3 (9 µg/ml) stimuliert, zum Teil werden auch APC zugegeben<sup>81</sup>. Am Tag der Infektion wird 1 ml des T-Zell-Mediums durch gefilterten Virusüberstand mit 6 µg/ml Polybrene ersetzt. Die Zellen werden bei 1880 rpm für 2 Stunden zentrifugiert und danach bei 32°C über Nacht inkubiert. Damit die Zellen für weitere Infektionen im Wachstum verbleiben, wird ihnen nach jeder Infektion IL-2 (5 U/ml) zugeführt.

Sowohl bei den Stammzellen als auch bei den T-Zellen wird die Infektion mit frischem Virusüberstand bis zu dreimal wiederholt. Abschließend werden die Zellen mit Medium gewaschen und im Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Aus den infizierten Stammzellen werden in dieser Arbeit unter anderem DCs generiert (2.2.5.6.).

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Charakterisierung des humanen Peptides ABL908-922

#### 3.1.1. Identifizierung der Immunogenität verschiedener ABL-Epitope

Die Charakterisierung des ABL-Epitopes baut auf den Ergebnissen, meiner im Jahr 2003 angefertigten Diplomarbeit auf. Aufgrund der damals durchgeführten Bindungsanalysen verschiedener Epitope der ABL-Sequenz wurde das Epitop 908-922 ausgewählt, um dessen immunologische Eigenschaften näher zu charakterisieren. Ausgangspunkt für die Auswahl der analysierten Peptide war die Bestimmung der Bindungswahrscheinlichkeit an das MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR1 mit Hilfe des Vorhersageprogramms SYFPEITHI<sup>171</sup>. Grundlage solcher Vorhersageprogramme sind Sequenzen natürlich vorkommender MHC-Klasse-II-Liganden.

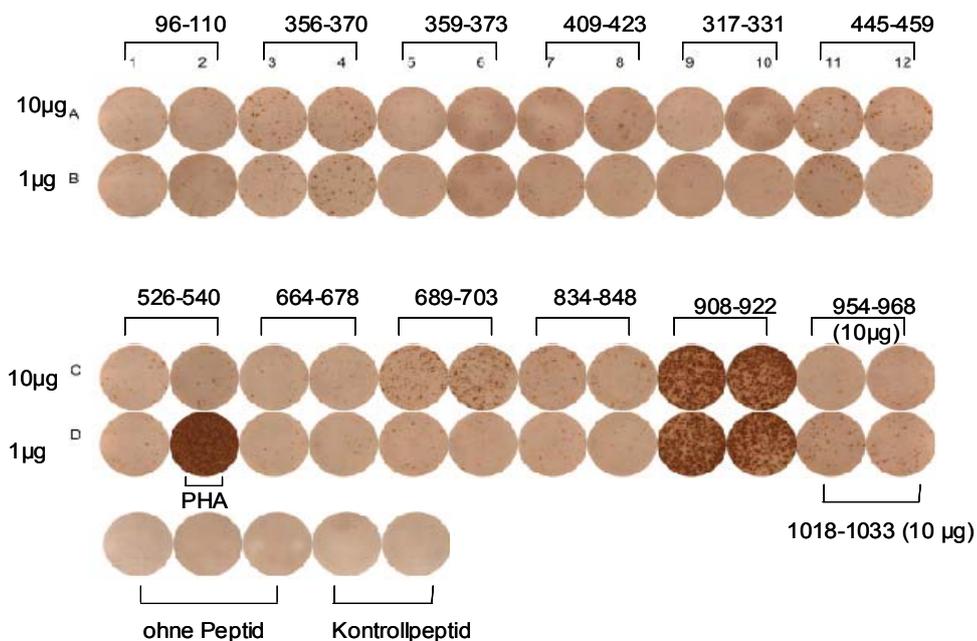
Wie in der Diplomarbeit bereits gezeigt wurde, ist das ABL-Epitop 908-922 eines der dreizehn vorhergesagten Peptide, welches auch in der experimentellen Bindungsanalyse eine hohe Bindungsaffinität zum MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR1 aufweist. Die Affinität ist vergleichbar mit der des immundominanten HA306-318 Peptides aus der Sequenz des dem Influenza Virus entstammenden Hämagglutinins<sup>142</sup>. Dieses Antigen wird in den nachfolgenden Experimenten zumeist als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

Zur Bestimmung der Immunogenität *in vivo* wurde ABL908-922 zusammen mit 12 weiteren ABL-Peptiden als Peptid-Gemisch in HLA-DR1-transgene Mäuse injiziert (siehe 2.2.6.). In Abbildung 3.1. A sind die zur Immunisierung verwendeten Peptide und deren vorhergesagten MHC-Bindungseigenschaften, eingestuft nach sogenannten *scores*, tabellarisch aufgeführt. In einer vergleichenden Analyse der vorhergesagten und experimentell ermittelten Bindungseigenschaften von Peptiden konnte festgestellt werden, dass erst ab einem *score* von über 25 die Vorhersage mit den experimentell erfassten Bindungseigenschaften korreliert (Hoepner et al. eingereicht). Der angegebene *score* der *in vivo* untersuchten ABL-Peptide liegt zwischen 28 und 33.

Die zur Immunisierung verwendeten transgenen Tiere (B10.M-HLA-DR1) tragen neben dem eigenen MHC-II (H-2<sup>f</sup>-I-A<sup>f</sup>) auch das HLA-DR1 auf der Zelloberfläche, welches als Chimär ausgebildet wird. Während sich die Peptid-Bindungstasche durch die humane  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1-Kette ausbildet, wird die restliche Struktur des MHC-II-Moleküls aus der murinen

E $\alpha$ 2- und E $\beta$ <sup>d</sup>2-Kette geformt<sup>169 172</sup>. Aufgrund dieser Beschaffenheit können für das humane System relevante HLA-DR1-restringierte Antigene an das MHC-Klasse-II-Molekül binden und zugleich wird die Bindung des murinen CD4-Moleküls der T-Zellen ermöglicht. Die Injektion der Antigene erfolgt mit Hilfe von Substanzen (Adjuvansen), welche die immunogene Wirkung der Epitope verstärken, sowie als Depotbildner fungieren. Dadurch kann das Peptid nach und nach in den Organismus diffundieren. In den hier durchgeführten Tier-Experimenten wurde *Freund's adjuvant incomplete* entweder in Verbindung mit Mykobakterien, als komplettes *Freund's adjuvant*, oder mit dem TLR-9-Agonisten CpG1826<sup>127,173,174</sup> verwendet (siehe 2.2.9.).

Zwölf Tage nach Immunisierung der Tiere mit dem Peptid-Gemisch wurden die Lymphozyten isoliert und auf ihre Immunantwort gegen die jeweiligen Epitope getestet. Die Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-Sekretion der *ex vivo* stimulierten T-Zellen, wurde mittels IFN- $\gamma$  Eilspot bestimmt und die Immunogenität der jeweiligen Peptide ermittelt. Als Kontrollen für die durchgeführten Experimente diente zum einen Phytohämagglutinin (PHA) und zum anderen das Peptid HA306-318. Die Restimulation erfolgte mit je 10  $\mu$ g/ml des jeweiligen Peptides und mit 0,5  $\mu$ g/ml PHA. Die in Abbildung 3.1. und 3.2. dargestellten Daten zeigen für die *ex vivo* Stimulation mit ABL-Peptid 908-922 im Vergleich zu den anderen Peptiden eine überaus starke IFN- $\gamma$ -Sekretion. Dementsprechend scheint dieses Peptid als HLA-DR1-restringiertes Antigen sehr wirksam zu sein. Drei weitere Peptide zeigten eine schwächere IFN- $\gamma$ -Sekretion.



**Abb.3.1.: fotografische Darstellung der IFN- $\gamma$  Sekretion *ex vivo* stimulierter Lymphozyten**

Die IFN- $\gamma$  -Sekretion *ex vivo* stimulierter T-Zellen wurde als primärer Datensatz fotografisch festgehalten und in Abb.3.2. ausgewertet.

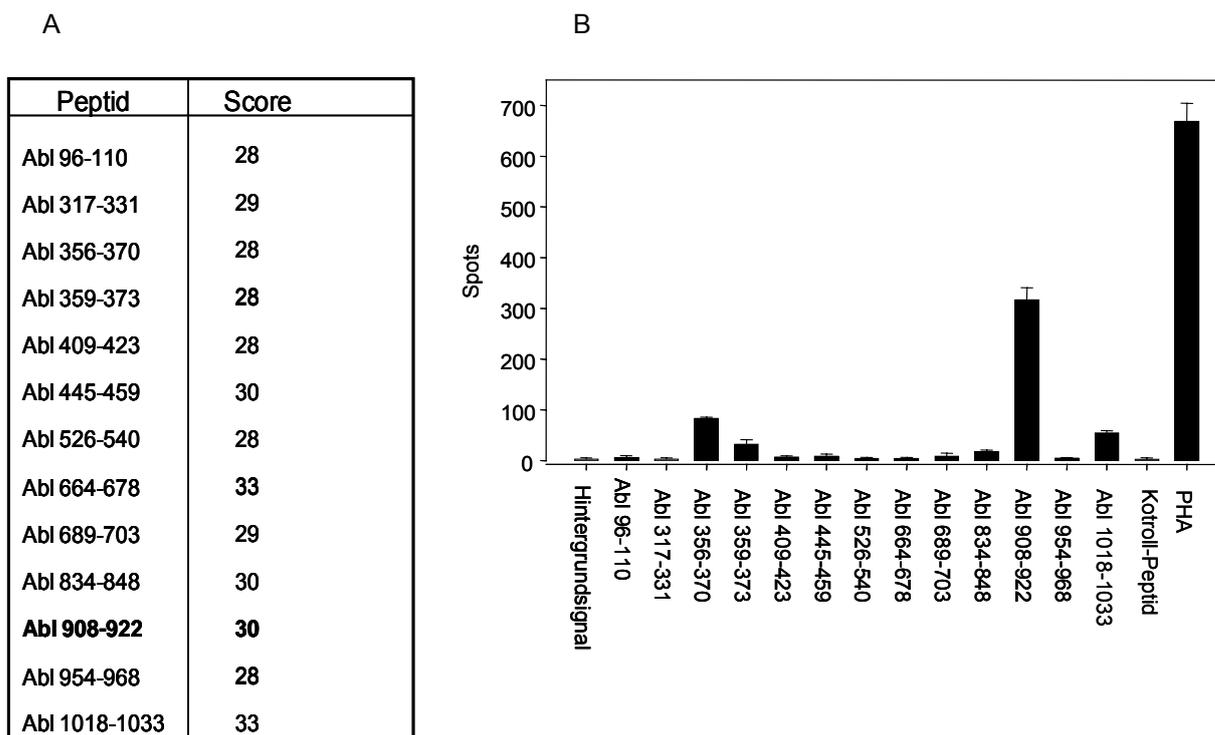


Abb.3.2.: Tabellarische Darstellung der immunisierten ABL-Peptide und deren Scores; IFN- $\gamma$  Sekretion *ex vivo* stimulierter Lymphozyten

A) Die tabellarische Darstellung der verwendeten ABL-Peptide und deren vorhergesagte Bindungswahrscheinlichkeit an das MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR1, angegeben durch den theoretischen Score des SYFPEITHI Vorhersageprogramms. Das in dieser Arbeit näher untersuchte Peptid ist hervorgehoben. B) Gezeigt ist ein IFN- $\gamma$  Elispot von Lymphozyten HLA-DR1tg Mäuse, welche primär mit in 3.2.A angegebenen Peptiden in einem Peptid-Mix von je 10  $\mu$ g Peptid pro Maus immunisiert wurden. Die Lymphozyten wurden am Tag 12 isoliert und mit 10  $\mu$ g des jeweiligen Peptides in DMEM/1 % Mausserum stimuliert. Nach 24 h Inkubation wurde die Elispotplatte entwickelt und die Spots ausgelesen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Spots verzeichnet und auf der X-Achse die jeweiligen ABL-Peptide, die zur Stimulation benutzt wurden. Als Positivkontrolle dient PHA. Das Hintergrundsignal bezeichnet die IFN- $\gamma$ -Sekretion unstimulierter Zellen. Als unspezifisches Kontroll-Peptid wurde HA306-318 verwendet.

Anhand der starken IFN- $\gamma$  Sekretion konnte gezeigt werden, dass hABL908-922 eine gezielte Immunantwort induziert. Zusätzlich wurde die immunogene Wirkung des Epitopes mittels FACS- Analyse von CD154- und IFN- $\gamma$ -Expression verifiziert. CD154 wird von aktivierten, aber nicht von ruhenden T-Zellen exprimiert<sup>175</sup>. Dies gilt insbesondere für die CD4<sup>+</sup>-aktivierten T-Zellen<sup>176,177</sup>.

Die Induktion der CD40-L-Expression erfolgt fünf bis sechs Stunden nach der Aktivierung, wobei man nach dieser Zeit die Expression hauptsächlich nur intrazellulär detektieren kann. Da in seltenen Fällen auch eine unspezifische Expression des CD40-Liganden auftreten kann, wurde die Färbung mit der Analyse der IFN- $\gamma$ -Produktion kombiniert. Wie

zuvor schon erwähnt, sekretieren  $T_H1$ -Zellen nach der Erkennung ihres spezifischen Antigens  $IFN-\gamma$ . Durch die gemeinsame Analyse beider Aktivierungsmarker kann sichergestellt werden, dass die Untersuchung sich tatsächlich nur auf spezifisch aktivierte T-Zellen bezieht.

Die Immunisierung erfolgte mit 5  $\mu\text{g}$  per Maus in Kombination mit IFA/CpG (siehe 2.2.9.) Nach 12 Tagen wurden die T-Lymphozyten isoliert. Die fünfständige Inkubation der Zellen erfolgte laut Protokoll 2.2.6.2. mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Peptid und dem CD28-Antikörper als zusätzliches kostimulatorisches Signal. Die FACS-Profilen in Abb. 3.3. stellen ausschließlich  $CD4$ -positive T-Zellen dar. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, sind doppelt angefärbte  $CD4^+$ -T-Zellen nur in jenem Profil eindeutig erkennbar, dessen T-Zellen mit dem zur Immunisierung korrespondierenden hABL908-922-Peptid *ex vivo* stimuliert wurden. Hier liegt der Anteil der  $IFN-\gamma^+$   $CD154^+$  Zellen bei 0,4 % der Gesamtpopulation der  $CD4^+$ -T-Zellen. Die Lymphozyten, die das Kontroll-Peptid HA306-318 erhielten, zeigen keine doppelt positiv angefärbten  $CD4^+$ -T-Zellen. Das Hintergrundsignal für die FACS-Analyse bezieht sich auf die Färbung naiver T-Zellen. In beiden Profilen liegt der Anteil an  $IFN-\gamma^+$   $CD154^+$ -Zellen bei 0,0 %. Aus dieser Abbildung geht weiterhin hervor, dass die mit ABL908-922 immunisierten Mäuse eine gezielte Immunreaktion gegen das Peptid aufbauen können. Nur die mit ABL908-922 aktivierten  $CD4^+$ -T-Zellen sind in der Lage den CD40-Liganden zu exprimieren und zusätzlich  $IFN-\gamma$  auszuschütten.

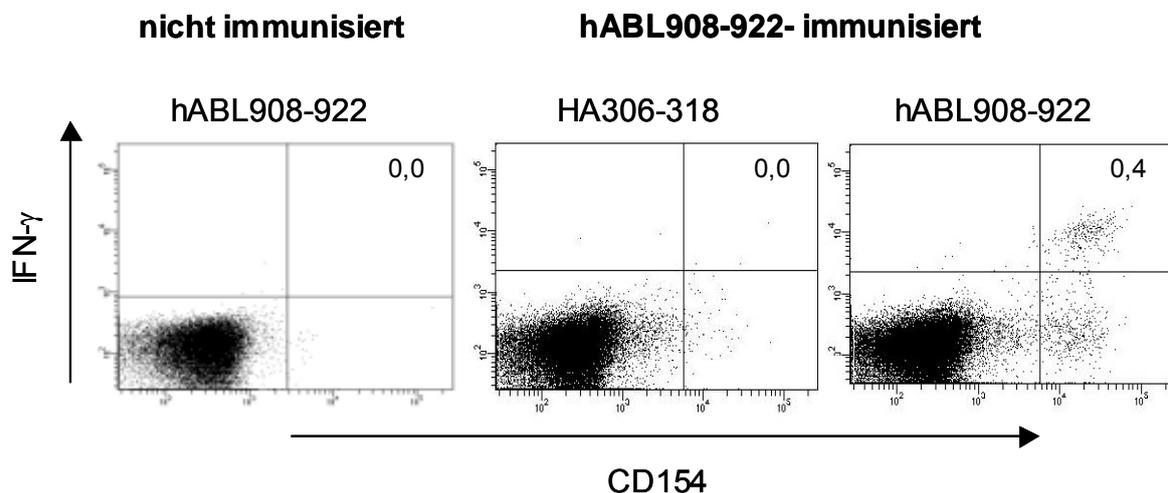


Abb.3.3.:  $IFN-\gamma$  /  $CD154$ -Expression *ex vivo* stimulierter T-Lymphozyten

T-Lymphozyten aus ABL908-922 immunisierten B10M.-HLA-DR1 Mäusen wurden für fünf Stunden in Gegenwart von murinem anti-CD28 und 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ABL908-922 bzw. HA306-318 inkubiert. Es erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mittels intrazellulärer  $CD154/IFN-\gamma$  Färbung. Als Hintergrundsignal dient die Färbung naiver T-Lymphozyten. Die Zellen wurden zuvor auf  $CD4^+$ -T-Zellen selektioniert. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Versuchen. X-Achse:  $CD154$ -Expression, Y-Achse:  $IFN-\gamma$

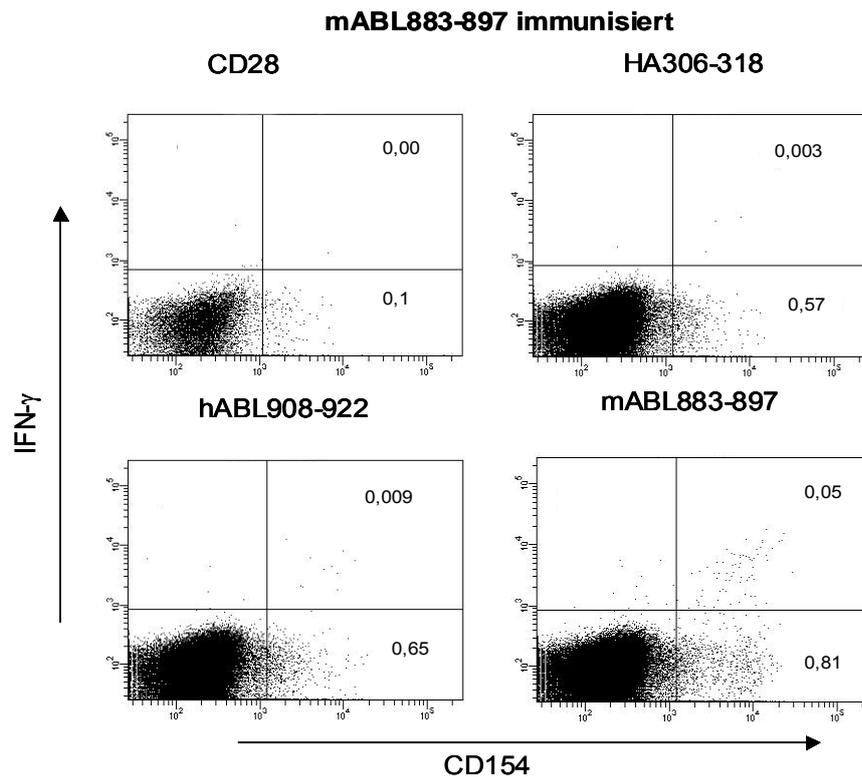
Offensichtlich besitzt das humane ABL-Epitop 908-922 eine deutliche immunogene Wirkung in HLA-DR1-transgenen Mäusen. Da es sich bei dem humanen ABL-Epitop 908-922 im Mausmodell um ein Xenoantigen handelt, sollte untersucht werden, welche Immunreaktion mit dem Autoantigen mABL883-897 erzeugt werden kann. Das homologe, murine ABL-Epitop unterscheidet sich in drei Aminosäuren von dem humanen Epitop (Abb.3.4. A). Ferner wurde untersucht, ob mABL883-897-spezifische T-Zellen auch durch die Immunisierung mit hABL908-922 aktiviert werden können und somit kreuzreagieren. Um die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität zwischen beiden Epitopen in den HLA-DR1 transgenen Mäusen auszuschließen, wurden die Immunreaktionen mittels FACS analysiert.

HLA-DR1tg Mäuse wurden mit 10 µg/ml mABL883-897 in IFA/CpG laut Protokoll (2.2.9.) immunisiert. Die T-Lymphozyten wurden 12 Tage nach Immunisierung isoliert und mit 10 µg des jeweiligen Peptides restimuliert. Die Spezifität der Reaktion wurde anhand des Aktivierungsmarkers CD154 (CD40L) unter Einbeziehung der IFN- $\gamma$  Sekretion ermittelt. Das Fluoreszenzprofil in 3.4. veranschaulicht die Sekretion von IFN- $\gamma$  und die entsprechende Expression des CD40-Liganden der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Anteil doppelt positiver Zellen (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD154<sup>+</sup>) nur in dem Profil eindeutig erhöht ist, dessen Zellen mit dem murinen ABL-Epitop 883-897 inkubiert wurden. Hier liegt die Anzahl der spezifisch aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bei 0,05 %, im Gegensatz zu den mit hABL908-922 restimulierten T-Zellen, deren Anteil bei 0,009 % liegt. Zur Kontrolle der spezifischen Reaktion wurden die T-Zellen in Gegenwart von HA306-318 inkubiert. Das hier ermittelte Hintergrundsignal liegt bei 0,003 % der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Dies bedeutet, dass sowohl das Kontroll-Peptid, als auch das humane ABL-Epitop keine spezifische Immunreaktion in den mit murinem ABL-Epitop m883-897 stimulierten T-Lymphozyten hervorrufen. Es ist folglich keine Interferenz der beiden ABL-Epitope erkennbar.

A

Peptid	Sequenz
hABL	KGKLSRLKPAPPPPP
mABL	KGRLAKLKPAPPPPP

B



**Abb.3.4.: CD154 und IFN- $\gamma$  Expression HLA-DR1tg T-Lymphozyten aus mABL883-897 immunisierten B10M.-HLA-DR1tg Mäusen**

A) Abgebildet sind die Sequenzen der homologen ABL-Epitope (human ABL908-922, murin ABL883-897). Die dick gedruckten Aminosäuren entsprechen dem Aminosäureaustausch zwischen beiden Sequenzen. B) Die T-Lymphozyten aus mABL883-897 immunisierten HLA-DR1tg Mäusen wurden mit dem jeweiligen ABL-Peptid und dem Kontroll-Peptid in Verbindung mit anti-CD28 oder mit anti-CD28 allein für fünf Stunden inkubiert. Danach erfolgte die FACS-Analyse mittels CD4-Färbung und intrazellulärer IFN- $\gamma$  / CD154-Färbung. Auf der X-Achse ist die CD154-Expression und auf der Y-Achse die IFN- $\gamma$ -Produktion graphisch aufgetragen. Die hier dargestellten Profile beziehen sich auf CD4<sup>+</sup>-angefärbte T-Zellen. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten.

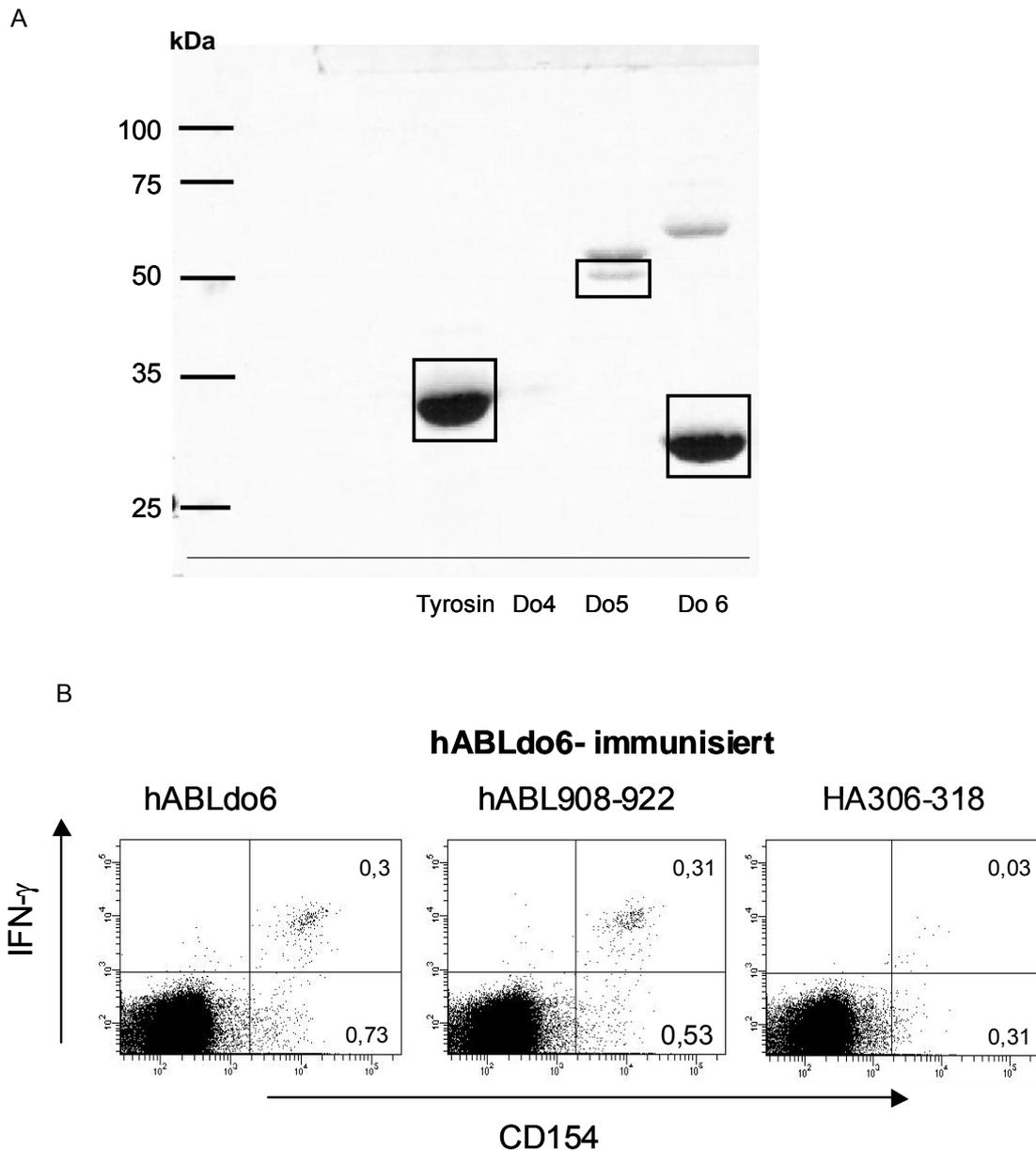
### 3.1.2. Die Prozessierbarkeit des hABL908-922 Epitopes im ABL-Protein

In den nachfolgenden Experimenten sollte die Frage geklärt werden, ob das ABL-Epitop 908-922 auch natürlicherweise prozessiert werden kann. In den vorangegangenen Experimenten wurde zwar gezeigt, dass das synthetisch hergestellte Epitop 908-922 immunogen und HLA-DR1-restringiert ist, es konnte aber keine Aussage darüber gemacht werden, ob auch nach Internalisierung des Proteins im MHC-Klasse-II-Prozessierungsweg genau diese Sequenzfolge von den entsprechenden Enzymen getrimmt und an der Oberfläche professioneller APC präsentiert wird. Um diese Frage zu

beantwortet wurde versucht, das gesamte BCR-ABL-Protein im *E.coli* System zu exprimieren. Dies gelang aufgrund der anscheinend vorliegenden Toxizität des BCR-ABL-Proteins im Hinblick auf das *E.coli* System nicht. Demzufolge wurde das gesamte BCR-ABL-Protein in Domänen unterschiedlicher Größe und Funktionalität unterteilt, die ihrerseits im *E.coli* System exprimiert werden konnten (2.2.4.). Neben den SH2-, SH3-Domänen und der Tyrosindomäne wurde auch der C-terminale Bereich des Proteins exprimiert. Hier wurde das Protein in die Domänen 5 und 6 untergliedert. In Abb. 3.5. A. sind beispielhaft einige der exprimierten Proteine nach der Elution mit Urea-Puffer 2 nach Größe getrennt im SDS-Gel dargestellt. Je nach verwendeten Elutionspuffern konnten die Proteine eluiert werden. Anhand der Abbildung ergibt sich beispielsweise, dass der Elutionspuffer Urea-Puffer 2 zwar für die Tyrosindomäne und die Domäne 5 bzw. Domäne 6 eingesetzt werden kann, jedoch nicht um die Domäne 4 zu eluieren. Hierzu wurde dann ein anderer Elutionspuffer (A1-Puffer) verwendet. Wie man sehen kann, stimmen die Größenverhältnisse der im Gel aufgetrennten Domänen mit den berechneten Größenverhältnissen weitgehend überein. Die Domäne 6 besitzt eine Größe von 28 kDa. Die Tyrosindomäne mit 30 kDa ist etwas größer. Die Domäne 5 besitzt eine Größe von 46 kDa (Tabelle 2.13.). Es ist aus der Abbildung ebenfalls ersichtlich, dass anscheinend auch unspezifische Proteinfragmente im *E.coli* System exprimiert wurden, wie beispielsweise bei der Expression der Domäne 5. Um die unspezifischen Banden von den richtigen Proteinfragmenten abzutrennen, wurden deshalb alle Domänen über die HPLC aufgereinigt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit erfolgte eine nähere Untersuchung der Domäne 6 (Do6), da innerhalb dieser Aminosäuresequenz das hABL908-922-Epitop enthalten ist. Zur experimentellen Analyse wurden HLA-DR1tg Mäuse mit Do6 (50 µg/Maus) in Kombination mit IFA/CpG subkutan immunisiert. 12 Tage nach Immunisierung wurden den Tieren die Lymphknoten entnommen und die Lymphozyten isoliert. Einige der Zellen wurden mit 10 µg/ml Domäne 6 restimuliert. Zusätzlich wurden Zellen jeweils mit hABL908-922 und zur Kontrolle mit HA306-318 restimuliert (10 µg/ml). Nach fünf Stunden Inkubation wurden die Zellen intrazellulär mit monoklonalen CD154- und IFN- $\gamma$ -Antikörpern angefärbt und im FACS analysiert. Wie sich in der Abbildung 3.5. B abzeichnet, reagieren die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowohl auf das Proteinfragment Do6, als auch auf das hABL-Epitop 908-922, nicht aber auf das Kontroll-Peptid. Anscheinend reagieren praktisch alle CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die durch die Immunisierung mit Domäne 6 stimuliert wurden, auf das Epitop 908-922. Der Anteil CD154/IFN- $\gamma$ -positiver CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten beträgt sowohl bei den Do6- als auch bei den Peptid-stimulierten Zellen 0,3 % der Gesamtpopulation. Zum Vergleich reagierten nur 0,03 % der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen unspezifisch auf das Kontroll-Peptid HA306-318. Somit

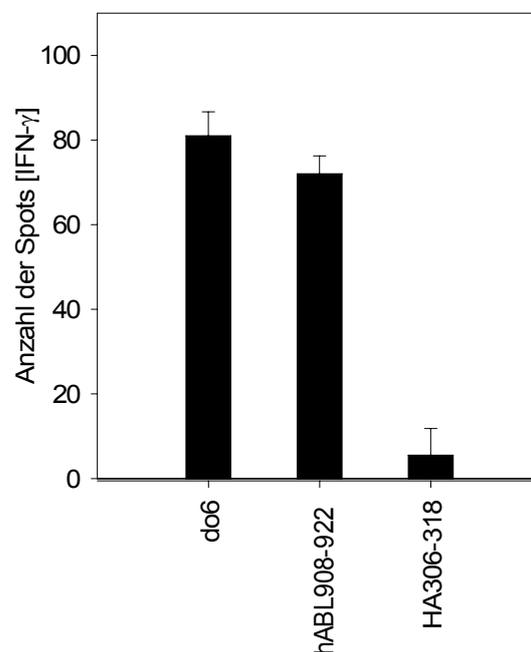
kann davon ausgegangen werden, dass das Epitop 908-922 auch natürlicherweise prozessiert und präsentiert wird. Zudem zeigen die Beobachtungen, dass hABL908-922 das immundominante Epitop dieser ABL-Region ist. Das in dieser Arbeit näher untersuchte ABL-Epitop könnte somit als potentielles tumorassoziiertes Antigen des ABL-Proteins interessant sein.



**Abb.3.5.: Generierung und Immunisierung von ABL-Domänen**

A) Dargestellt ist das SDS-Gel der im *E. coli*-System exprimierten ABL-Domänen. Die Proteine sind nach ihrer Größe aufgetrennt. Die mit einem Kästchen umrandeten Proteinfragmente besitzen die korrekte Größe. B) Die Prozessierung des ABL-Epitop 908-922 aus dem Protein. Durchflusszytometrische Analyse von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus *ex vivo* isolierten Lymphknotenzellen mit Domäne 6 immunisierter HLA-DR1tg Mäuse anhand einer intrazellulären CD154/IFN- $\gamma$ -Färbung. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. Dargestellt ist eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. X-Achse: CD154-Expression, Y-Achse: IFN- $\gamma$

Die Untersuchungen mittels IFN- $\gamma$ -Elispot bestätigen ebenfalls die Immundominanz des ABL-Epitopes 908-922. In der Abbildung 3.6. ist die IFN- $\gamma$ -Sekretion von Lymphozyten dargestellt, welche zuvor durch die Immunisierung mit Domäne 6 aktiviert wurden. Die *ex vivo* Stimulation der Zellen erfolgte mit ABL-908-922 oder Do6. Man erkennt hier ebenfalls eindeutig, dass fast alle Domäne 6-spezifischen T-Lymphozyten auch das ABL-Epitop 908-922 erkennen und darüber stimuliert werden. Während die Spotanzahl nach spezifischer *ex vivo* Aktivierung (Do6 oder ABL-Peptid) zwischen 70 und 80 Spots liegt, ist die Anzahl der IFN- $\gamma$ -Spots bei nicht aktivierten T-Zellen, beispielsweise durch Zugabe von HA306-318, weitaus geringer (ca. 10 Spots).



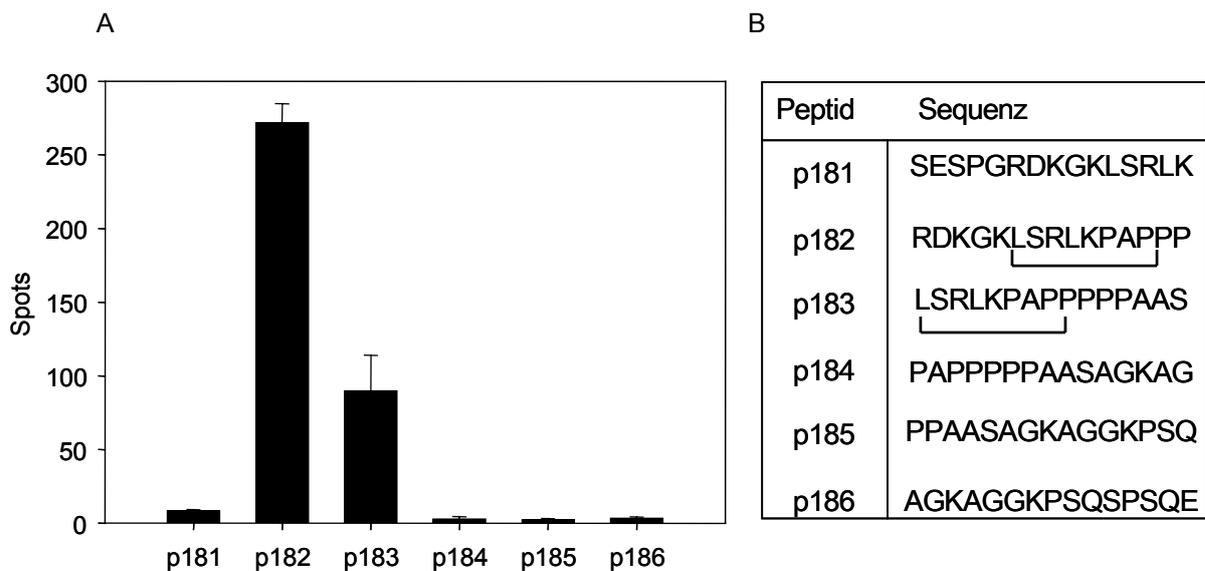
**Abb.3.6.: IFN- $\gamma$ -Sekretion Domäne 6 primär immunisierter Lymphozyten**

Die Zytokin-Sekretion wurde anhand der Spotanzahl im IFN- $\gamma$ -Elispot ermittelt. T-Lymphozyten Do6-immunisierter HLA-DR1tg Mäuse wurden entweder mit Kontroll-Peptid HA306-318 oder mit Domäne 6 bzw. hABL-Epitop 908-922 *ex vivo* stimuliert. Nach 24stündiger Inkubation wurde der Elispot entwickelt und die Anzahl der Spots detektiert. X-Achse: Angabe der Peptide bzw. Proteinfragmente, welche *ex vivo* eingesetzt wurden, Y-Achse Spotanzahl

Dieses Ergebnis wurde auch mit Peptiden aus der ABL-Bibliothek bestätigt. Die ABL-Bibliothek besteht aus 15mer Peptiden, welche sich jeweils in zehn Aminosäuren überlappen. In der nachfolgenden Analyse wurden die Peptide p181-p186 aus der ABL-Bibliothek zur *ex vivo* Restimulierung der Lymphozyten verwendet. Die ausgewählten Epitope decken die Sequenzregion des ABL-Proteins 901-940 ab. Die Immunogenität wurde anhand der IFN- $\gamma$ -Produktion der stimulierten T-Zellen bestimmt. Durch die *ex vivo*

Restimulierung Do6-immunisierter T-Lymphozyten mit dem Peptid p182 der ABL-Bibliothek wird im Vergleich zur Restimulierung mit den anderen Peptiden aus der ABL-Bibliothek eine deutlich erhöhte IFN- $\gamma$ -Ausschüttung der Zellen bewirkt (Abb.3.7. A). Der Grund hierfür besteht offensichtlich darin, dass nur das Peptid p182 bis auf zwei am C-Terminus fehlende Proline, die komplette Sequenz des ABL-Epitopes 908-922 beinhaltet, welche als optimales Epitop berechnet wurde. Die verbleibenden Proline in dieser Sequenzfolge reichen aus, um eine leichtere Peptid-Bindung in die MHC-Klasse-II-Bindungsfurche zu ermöglichen. Das Peptid p181 weist keine IFN- $\gamma$ -Produktion auf, obwohl die Aminosäurefolge die gesamte Anfangssequenz des ABL-Peptides 908-922 umfasst. Es fehlt hier jedoch der Prolinrest. Somit scheint dieses Peptid suboptimal für die Aktivierung der T-Zellen und damit für die Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion zu sein. Das Peptid p183 führt im Vergleich zu p182 zu einer ungefähr zweifach geringeren, aber dennoch eindeutigen IFN- $\gamma$ -Produktion. Dies könnte darauf beruhen, dass in dieser Sequenzfolge das Leucin als Ankerposition noch funktionsfähig ist, während in den nachfolgenden Sequenzen der vordere Teilbereich des ABL908-922 Epitopes vollständig fehlt. Zudem besitzt die Sequenzfolge den Prolinrest. Es kann demnach vermutet werden, dass die Core-Region des hABL-Peptides 908-922 die Sequenzfolge LSRLKPAPP besitzt. Die anschließenden Sequenzfolgen p184 und p185, welche keine IFN- $\gamma$ -Sekretion induzieren, besitzen zwar viele Proline, ihnen fehlt aber wie oben erwähnt, die Core-Region des ABL908-922.

Aufgrund der Ergebnisse kann man annehmen, dass sowohl die ersten N-terminalen Aminosäuren wie LSRL als Ankerpositionen entscheidend für die Bindungsaffinität des Peptides sind, als auch eine Reihe von Prolinen am C-terminalen Ende, die ebenfalls einen wichtigen Einfluss auf die Einlagerung des Peptides in die Bindungsfurche besitzen. Es sind hierbei schon drei Proline in Folge ausreichend, um die Immunogenität des Epitopes zu steigern. Da das Peptid p183, welches zwar die Proline besitzt, jedoch nicht die Aminosäuren Lysin-Glycin-Lysin-Leucin, eine geringere Immunantwort induziert als p182, sieht es so aus, als ob die N-terminale Abfolge der Aminosäuren von größerer Bedeutung ist als der Prolinrest. In der Abbildung 3.7. B ist die Sequenz der hier verwendeten Epitope tabellarisch aufgeführt.



**Abb.3.7.: IFN- $\gamma$  Sekretion *ex vivo* stimulierter T-Lymphozyten mit Peptiden der ABL-Bibliothek**

HLA-DR1tg Mäuse wurden mit Domäne 6 immunisiert. Der Isolierung der T-Lymphozyten folgte deren Restimulation mit den Peptiden p181-p186 der ABL-Bibliothek für 24h. Mittels Elispot-Methode wurde die IFN- $\gamma$  Sekretion als Spotanzahl gemessen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der detektierten Spots angegeben, auf der X-Achse die zur Restimulation verwendeten Peptide der ABL-Bibliothek. B) Die Sequenz der zur Restimulation angewandten Peptide. Der unterstrichene Teilbereich scheint das Core-Epitop zu sein.

### 3.1.3. BCR-ABL-transduzierte Zellen präsentieren hABL908-922

Da in 3.1.2. gezeigt werden konnte, dass ABL908-922 natürlich prozessiert und präsentiert wird, stellte sich nun die Frage, ob ABL908-922 auch als Epitop von BCR-ABL-exprimierenden Zellen prozessiert wird. Dieses ist eine entscheidende Fragestellung für weiterführende, anwendungsbezogene Experimente. Falls sich bestätigt, dass ABL908-922 als natürliches Epitop des Fusionsproteins BCR-ABL existiert, welches ursächlich für Ph<sup>+</sup>-Leukämien verantwortlich ist, kann hABL908-922 in weiterführenden Tumorexperimenten als Antigen in Vakzinierungsversuchen eingesetzt werden.

Um der obigen Fragestellung nachzugehen, wurden zuerst hABL908-922 Hybridomzellen (SaABL/G2) auf ihre Spezifität getestet. Dies geschah sowohl im Hinblick auf das Peptid 908-922 als auch auf das Proteinfragment Domäne 6. Das Experiment sollte sicherstellen, dass erstens die Hybridoma spezifisch auf das Peptid reagieren und dass sie zweitens das Peptid aus der Proteinsequenz erkennen können. Das ist insofern wichtig, als dass dieses Hybridom später zur Erkennung des spezifischen Epitopes auf transduzierten APC eingesetzt werden sollte.

Das hier verwendete Hybridom SaABL/G2 wurde aus der ABL-spezifischen T-Zelllinie SaABL generiert<sup>150</sup>. Die Hybridoma wurden in Gegenwart von maturierten HLA-DR1-restringierten dendritischen Zellen für 24 h inkubiert, welche mit hABL908-922, Peptid

HA306-318 oder Domäne 6, beladen waren. Anhand der IL-2 Sekretion der Hybridomzellen konnte in einem sekundären Assay deren Aktivierungszustand gemessen werden (siehe 2.2.11.1.). Aus Abbildung 3.8. lässt sich entnehmen, dass eine deutliche Proliferation der Zellen nur dann zu verzeichnen ist, wenn zuvor die Stimulation mit hABL908-922 stattfand. Bei einer Stimulation mit HA306-318 ist keine Proliferation sichtbar. Das bedeutet, dass die Hybridomzellen durch die Stimulierung mit hABL-908-922 spezifisch IL-2 in den Überstand sekretieren, welches die Proliferation der CTL-L-2-Zellen bewirkt. Weiterhin ist zu beobachten, dass eine vergleichsweise ähnliche Proliferationsrate zu beobachten ist, wenn die Zellen zuvor mit Domäne 6 stimuliert wurden. Somit kann man davon ausgehen, dass alle Hybridomzellen spezifisch für ABL908-922, das Epitop ebenfalls in der Proteinsequenz erkennen. HA306-318 dient in diesen Experimenten als interne Spezifitätskontrolle der Hybridoma.

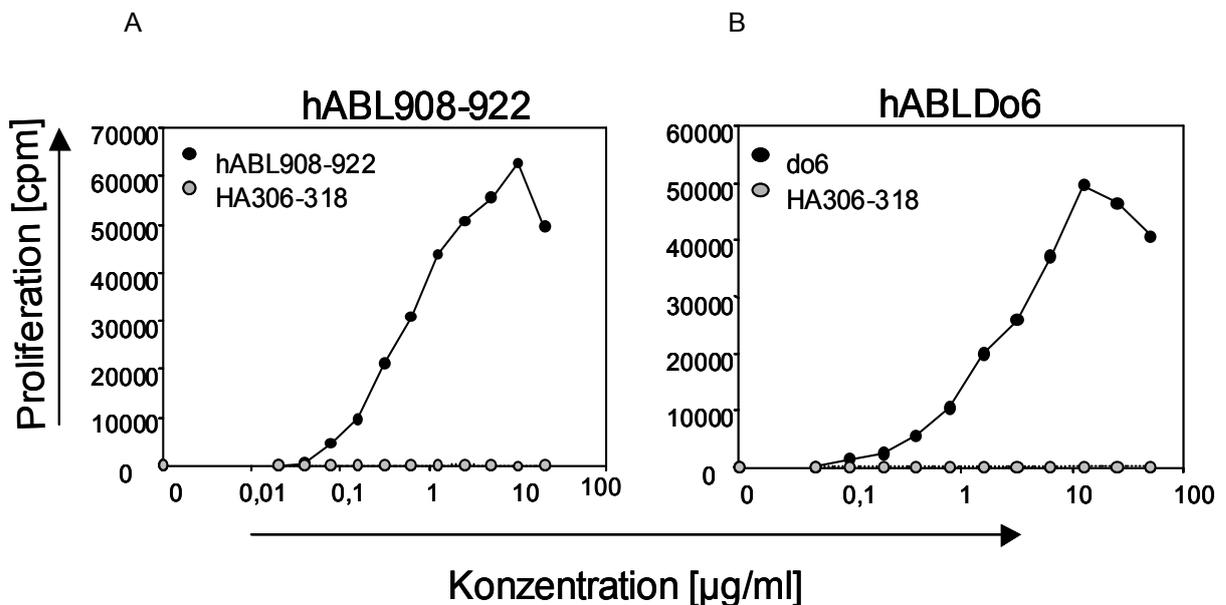
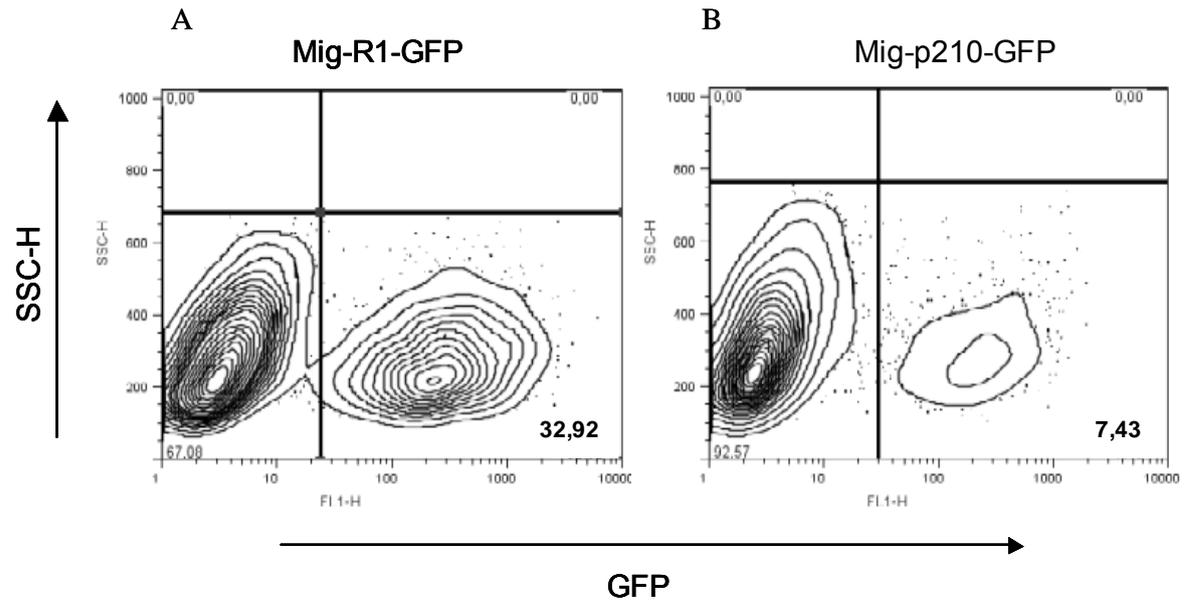


Abb.3.8.: Spezifität des generierten SaABL/G2-Hybridoms

SaABL/G2 wurde mittels Sekundärassay (2.2.11.1.) auf ihre Spezifität bezüglich des hABL908-922 Epitopes getestet. Die Proliferation bezieht sich hierbei auf IL-2-abhängige CTLL-2-Zellen. Die grau unterlegten Kreise zeigen die Proliferation für CTLL-2 Zellen, inkubiert mit Überstand HA306-318-stimulierten Hybridoma, die schwarzen Kreise ergeben die Proliferation für die CTLL-2-Zellen, welche mit dem Überstand hABL-stimulierter Hybridoma inkubiert wurden. A) Proliferationsassay mit Peptid hABL908-922 und Kontroll-Peptid HA306-318 B) Proliferationsassay mit dem ABL-Proteinfragment Do6 X-Achse: Konzentration des Peptides bzw. Proteins; Y-Achse: Zellzahl, gemessen aufgrund der H<sup>3</sup>-Inkorporation

Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse kann das Hybridom SaABL/G2 eingesetzt werden um die ektopische Expression des BCR-ABL zu überprüfen. Dazu wurden HLA-DR1 transgene Knochenmarkzellen präpariert (siehe 2.2.5.6.) und mit Mig-p210-GFP retroviral infiziert (siehe dazu 2.2.12.1., 2.2.12.2.). Der Vektor beinhaltet sowohl das Fusionsprotein BCR-ABL p210 als auch das GFP. Aufgrund der Konstruktion des Vektors kann davon ausgegangen werden, dass in den Zellen die das GFP-Protein exprimieren, auch gleichzeitig das BCR-ABL-Protein p210 exprimiert wird. In Abb.3.9. ist die Expressionshöhe des GFP-Proteins für verschieden transduzierte Knochenmarkzellen durchflusszytometrisch dargestellt. Die Expression des GFP-Proteins korreliert mit der Expression des BCR-ABL Proteins. Neben dem Protein p210 ist auch der leere Vektor mit GFP in Knochenmarkzellen transduziert worden (Mig-R1-GFP). Die Zellen die damit transduziert werden eignen sich daher als Kontrolle in nachfolgenden Experimenten. Die Graphen 3.9. A und B zeigen die Transduktionsrate der HLA-DR1tg Knochenmarkzellen, welche einerseits mit Mig-R1-GFP-und andererseits mit Mig-p210-GFP-tragenden Viruspartikeln infiziert wurden. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen unterscheidet sich allerdings voneinander, wobei die retrovirale Infektion der Knochenmarkzellen mit Mig-R1-GFP eine bessere Infektionsrate erzielt. Sie liegt hier bei 33 % der Gesamtzellzahl. Dagegen sind nur 7,4 % der Knochenmarkzellen GFP-positiv, welche mit Mig-p210-GFP infiziert wurden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Leervektor offensichtlich einfacher in die virusproduzierenden Zellen transfiziert werden kann, als der wesentlich größere Vektor Mig-p210. Zudem konnte beobachtet werden, dass die mit Mig-p210 transfizierten PLAT-E Zellen schneller absterben, sodass Mig-p210 womöglich leicht toxisch ist.

Obwohl anscheinend weniger Viruspartikel gebildet wurden und die damit verbundene Infektionseffizienz geringer ist, konnten dennoch ausreichend Knochenmarkzellen infiziert werden, um sie als dendritische Zellen zu differenzieren. Zusätzlich steigt die Rate der GFP-positiven Zellen während der Ausdifferenzierung zu dendritischen Zellen noch an, sodass die Anzahl der BCR-ABL-exprimierenden DCs zwischen 50 und 80% liegt. Es scheint, dass hier die Transformationskapazität des BCR-ABL-Proteins zum Tragen kommt, welche den transformierten dendritischen Zellen einen Proliferationsvorteil verschafft.



**Abb.3.9.: Retrovirale Transduktion *ex vivo* generierter HLA-DR1-transgener Knochenmarkzellen**

Knochenmarkzellen aus HLA-DR1tg Mäusen wurden isoliert und entsprechend Protokoll (2.2.5.7., 2.2.12.2.) für die retrovirale Infektion vorbereitet. Die Knochenmarkzellen wurden mit Retroviren infiziert und 3-4 Tage später bezüglich der GFP-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Darstellung der Zellen erfolgt im Rechtwinkelstreulicht (SSC) gegen die GFP-Expression. A) Infektionseffizienz der Mig-R1-GFP-tragenden Retroviren B) Infektionseffizienz der Mig-p210-GFP-tragenden Retroviren

Die BCR-ABL-exprimierenden Knochenmarkzellen wurden mittels Zugabe von GM-CSF zu dendritischen Zellen ausgereift.

Es ist bereits durch verschiedene Studien belegt, dass intrazelluläre Proteine, die beispielsweise durch eine Infektion in die Zelle eingebracht wurden, nicht nur auf MHC-Klasse-I, sondern auch auf MHC-Klasse-II präsentiert werden können<sup>178-180</sup>. Demzufolge sollte nachfolgend untersucht werden, ob das hABL908-922 durch die transformierten BCR-ABL<sup>+</sup>-HLA-DR1tg dendritischen Zellen ebenfalls über den MHC-Klasse-II-Prozessierungsweg an die Oberfläche gelangen und über das humane HLA-DR1 präsentiert werden.

Aus Abbildung 3.10. lässt sich schlussfolgern, dass hABL908-922 durchaus aus der BCR-ABL-Sequenz über MHC-Klasse-II natürlich prozessiert und präsentiert wird. Die SaABL/G2 Hybridomzellen werden spezifisch aktiviert und sekretieren dabei IL-2, welches über einen sekundären Proliferationsassay gemessen werden kann. Der Kontrollvektor Mig-R1 löst dagegen keine Proliferation aus.

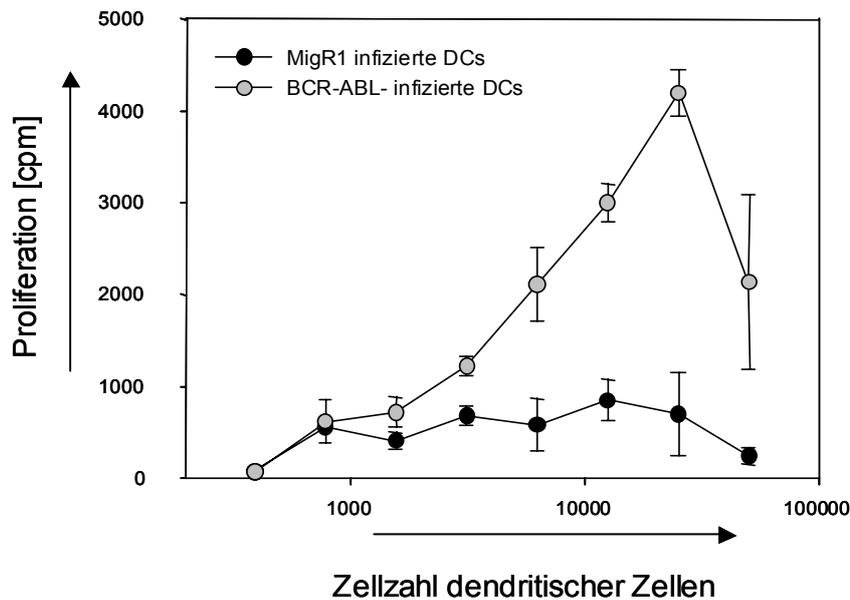


Abb.3.10.: Das hABL908-922 wird in BCR-ABL-exprimierenden dendritischen Zellen prozessiert und präsentiert

SaABL/G2-Zellen wurden mit Mig-R1 und Mig-p210 transduzierten DCs inkubiert. Nach 24 h wurde der Überstand abgenommen und die IL-2 Sekretion im Sekundärassay (2.2.11.1.) gemessen. Die Proliferation dieser Zellen wurde mittels  $^3\text{H}$  Inkorporation analysiert. X-Achse: Anzahl der transduzierten dendritischen Zellen; Y-Achse: Proliferation in cpm

### 3.2. Untersuchung der hABL-spezifischen $\text{CD4}^+$ -T-Zellantwort im BCR-ABL $^+$ -Tumormodell

Die vorangegangenen Daten zeigen, dass hABL908-922 als HLA-DR1-restringiertes Epitop des BCR-ABL Proteins präsentiert werden kann. Es stellt sich nunmehr die Frage, inwieweit das Peptid *in vivo* relevant sein könnte, um spezifischen Immunreaktionen gegenüber BCR-ABL-tragenden Tumorzellen zu induzieren. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass hABL908-922, welches aus der humanen ABL-Region entstammt, im Mausmodell ein Xenoantigen darstellt.

Spezifische  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen können eine entscheidende Rolle in der Tumorabstoßung spielen, indem sie beispielsweise zur Aktivierung und Aufrechterhaltung der  $\text{CD8}^+$ -T-Lymphozyten vermittelten Immunantwort beitragen<sup>161,181,182</sup>.  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen können jedoch auch ohne die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen zur Tumorabstoßung führen<sup>183</sup>.

Daher sollte auch für die CD4<sup>+</sup>-spezifische Antwort auf hABL908-922 untersucht werden, inwieweit diese Zellen Einfluss auf die Tumorabstoßung besitzen. Um dies zu beurteilen, wurde ein BCR-ABL<sup>+</sup> Tumormodell etabliert.

Das Modell wurde auf Grundlage der von Katsanis und Kollegen beschriebenen Experimente aufgebaut<sup>184</sup>, wobei die Tumorzelllinie 12B1 Anwendung findet. 12B1 Zellen entstammen von BALB/c Knochenmarkzellen die mit Mig-p210 retroviral infiziert wurden<sup>164</sup>. Damit tragen sie das Fusionsprotein b3a2, welches mit der chronischen myeloischen Leukämie assoziiert ist<sup>185</sup>. Katsanis und Kollegen zeigten in ihren Publikationen, dass diese Tumorzelllinie nach intravenöser Applikation eine akute Leukämie auslöst, die analog der humanen CML in der Blastenkrise verläuft<sup>184</sup>. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass diese Zellen nicht nur zur intravenösen Inokulation benutzt werden können, sondern auch subkutan injiziert eine Art soliden Tumor ausbilden<sup>186,187</sup>. Die subkutane Inokulation der 12B1 Zellen wurde als Tumormodell aufgrund der Einfachheit der Analyse für diese Experimente, leicht abgeändert, übernommen. Anhand der Messung der Tumorgroße kann eine Aussage darüber gemacht werden, welchen Einfluss verschiedene Vakzinierungsstrategien auf das Tumorwachstum haben.

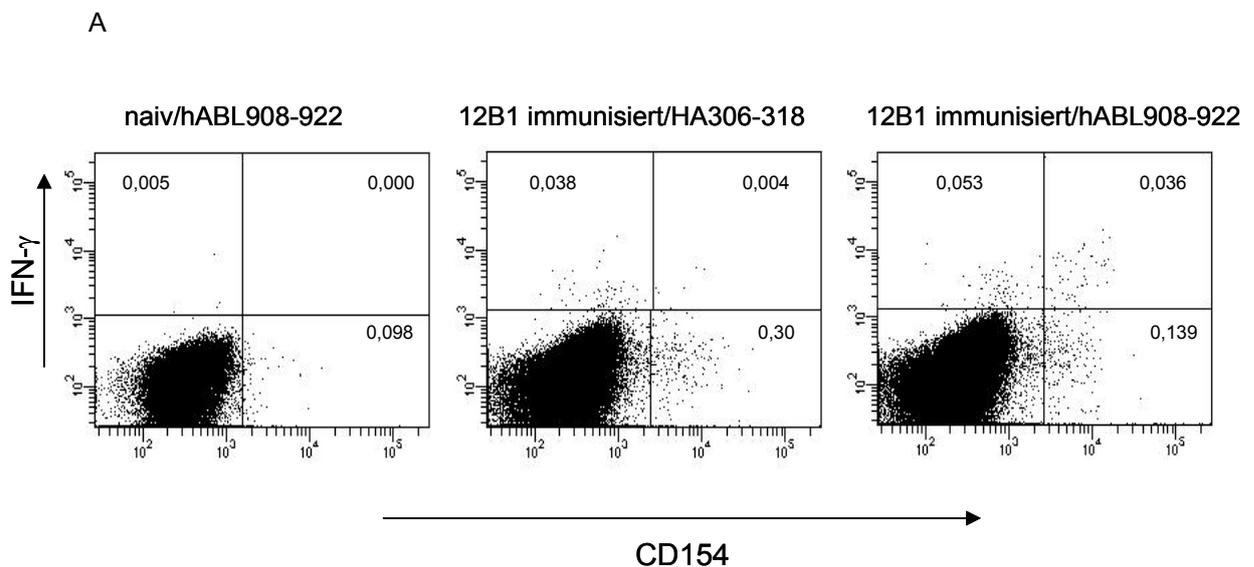
Es sollte als Erstes geklärt werden, ob hABL908-922 durch die Inokulation der BCR-ABL-exprimierenden Tumorzellen eine Immunreaktion induziert werden kann, die auf der Erkennung des Antigens hABL908-922 beruht. Würden sich aufgrund der injizierten Tumorzellen hABL908-922 spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausbilden, wären sie in den 12B1 immunisierten Tieren, nicht aber in den Tieren zu analysieren, die mit einem BCR-ABL irrelevanten Tumor immunisiert werden.

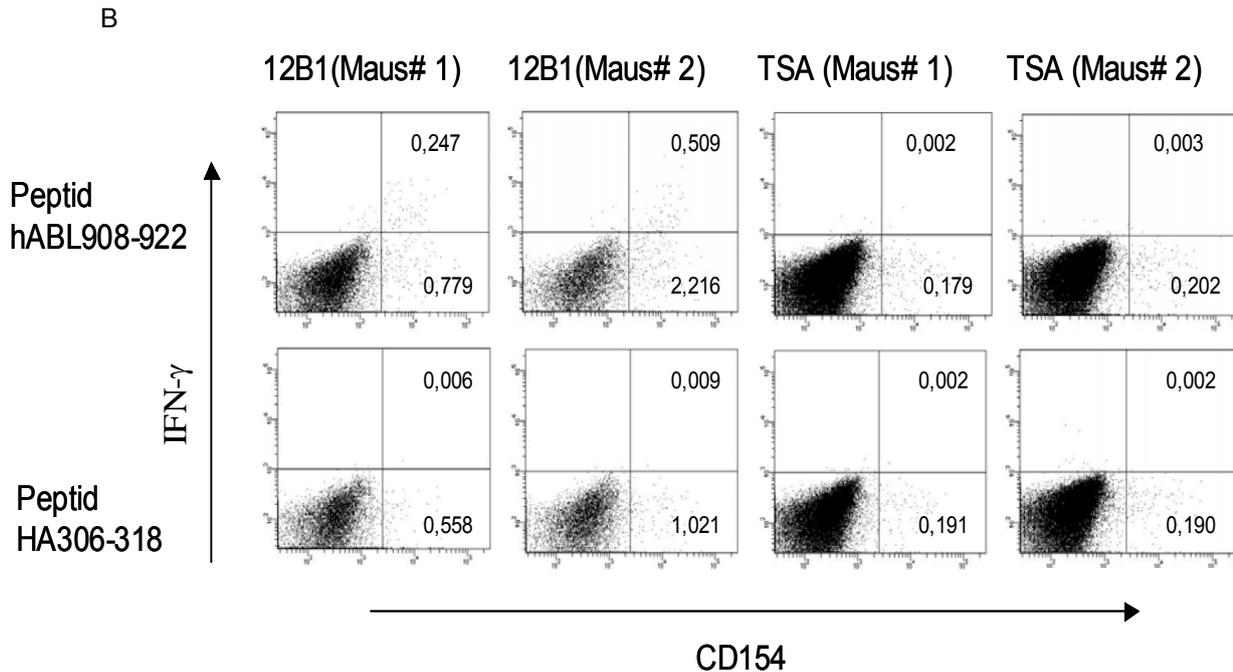
Um Reaktionen gegen den genetischen Hintergrund der Tumorzellen (BALB/c) zu vermeiden, wurden die Experimente in (HLA-DR1tgxBALB/c) F1 Mäusen durchgeführt. In Abbildung 3.11. A ist die Immunreaktion 12B1 immunisierter Mäuse auf die *ex vivo* Stimulation mit hABL908-922 und Kontrollpeptid HA306-318 durchflusszytometrisch dargestellt. Die Lymphozyten naiver Mäuse wurden ebenfalls *ex vivo* mit hABL908-922 stimuliert, um die Signalstärke einer unspezifischen Reaktion abzuschätzen. Wie hier in der linken Darstellung erkenntlich wird, findet praktisch keine Reaktion der Lymphozyten aus naiven Mäusen nach Stimulation mit hABL908-922 statt. Nur äußerst wenige CD4<sup>+</sup>-T-Zellen exprimieren IFN- $\gamma$  oder CD154. Ebenso findet keine spezifische Immunreaktion bei den Mäusen statt, die zwar mit Tumorzellen behandelt, *ex vivo* allerdings mit HA306-318 stimuliert wurden.

Aufgrund der Inokulation der Tumorzellen kommt es anscheinend zu einer leichten Aktivierung einiger CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, was durch eine etwas erhöhte Anzahl CD154<sup>+</sup>- T-

Zellen zu entnehmen ist. Die Anzahl der spezifischen, doppelt-positiven ( $CD154^+/IFN-\gamma^+$ )  $CD4^+$ -T-Zellen liegt jedoch nur bei 0,004 % des  $CD4^+$ -Gesamtanteils an Lymphozyten. Im Gegensatz dazu, sieht man in der rechten Darstellung der Abb. 3.11. A die Immunreaktion einer 12B1 injizierten Maus, deren Lymphozyten *ex vivo* mit hABL908-922 stimuliert worden sind. Hier ist nun sehr deutlich eine Population  $CD154/IFN-\gamma$ -positiver  $CD4^+$ -T-Zellen zu erkennen. Der Anteil liegt bei 0,036 % der Gesamtanzahl an  $CD4^+$ -T-Zellen. Damit ist der Prozentsatz um das neunfache höher als bei den mit HA306-318 *ex vivo* stimulierten Lymphozyten. Es kann also durch die Inokulation von 12B1 Tumorzellen eine spezifische hABL908-922 Immunreaktion induziert werden.

Um sicherzustellen, dass die beobachtete Induktion der spezifischen Immunreaktion tatsächlich BCR-ABL-assoziiert ist, wurden in einige F1-Tiere die BCR-ABL-negativen Tumorzellen der Tumorzelllinie TSA transferiert. Die TSA-Tumorzelllinie entstammt murinen Brustdrüsenkrebszellen und induziert nach subkutaner Injektion einen lokalen soliden Tumor. In Abbildung 3.11. B sind je zwei Tiere der entsprechenden Gruppe exemplarisch dargestellt. Wie man erkennen kann, findet man nur  $CD154/IFN-\gamma$ -doppelt-positive Zellen in den Lymphozyten vor, die aus 12B1 immunisierten Mäusen stammen und zusätzlich *ex vivo* mit hABL908-922 stimuliert worden sind. Sowohl in den Mäusen, welche TSA-Tumorzellen erhielten, als auch nach der Restimulation mit HA306-318 kann man keine Aktivierung spezifischer  $CD4^+$ -T-Lymphozyten erkennen.





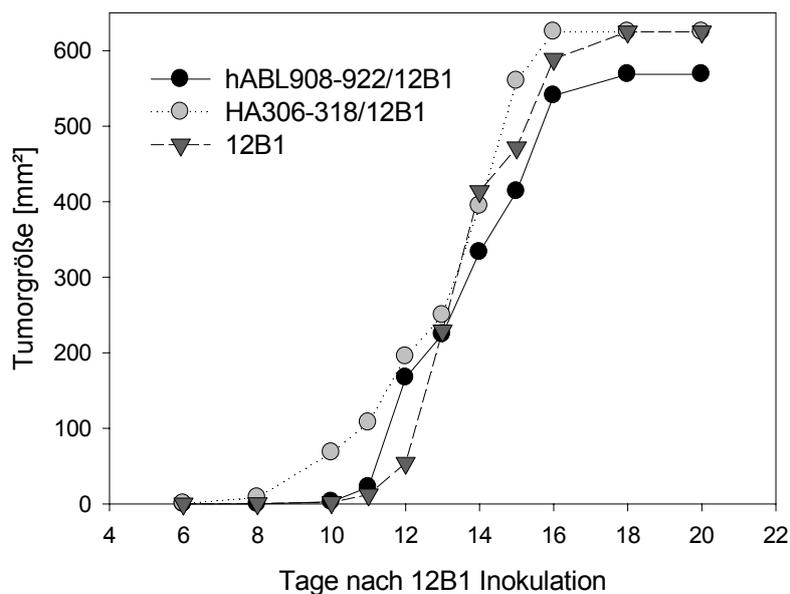
**Abb.3.11.: Induktion spezifischer Immunreaktion *ex vivo* stimulierter Lymphozyten Tumortragender Mäuse der F1 Generation**

A) 20 Tage nach 12B1 Tumordinokulation ( $3 \times 10^4$ ) in (HLA-DR1tgxBalb/c) F1-Mäuse wurden die T-Lymphozyten präpariert und mit HA306-318h oder ABL908-922 restimuliert (mittige Darstellung, rechte Darstellung). Die Immunantwort wurde durchflusszytometrisch anhand des CD4-Antikörpers und der CD154- bzw. der IFN- $\gamma$  Expression analysiert (Tumorgroße ca. 300-400 mm<sup>2</sup>). Die hier dargestellten Populationen sind auf die CD4-positiven Zellen eingegrenzt. In der linken Darstellung wurden Zellen einer naiven Maus analysiert, die mit hABL908-922 restimuliert wurden. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. B) In die F1-Mäuse wurden jeweils Zellen der 12B1- oder TSA-Tumorzelllinie appliziert. Nach 20 Tagen wurden die T-Lymphozyten auf CD154 und IFN- $\gamma$  Expression durchflusszytometrisch analysiert (Tumorgroße ca. 300-400 mm<sup>2</sup>). X-Achse: CD154 Expression; Y-Achse IFN- $\gamma$  Expression

Anhand der vorliegenden Ergebnisse aus Abb. 3.11. kann gezeigt werden, dass die Inokulation von BCR-ABL<sup>+</sup> 12B1-Zellen zur Generierung von hABL908-922-spezifischen T-Zellen führt. Es könnte demnach sein, dass die hABL908-922spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen einen Einfluss auf das Tumorwachstum haben. Um darauf eine Antwort zu finden, benutzten wir ein BCR-ABL<sup>+</sup>-Mausmodell, beruhend auf den hier angegebenen 12B1-Tumorzellen. Hierfür erfolgte eine Anpassung des Modells an die F1-Generation.

Anfänglich wurden in den Experimenten  $3 \times 10^4$  Zellen injiziert, später jedoch wurde die Zellzahl weiter reduziert, um ein größeres Zeitfenster für eventuelle Immunreaktionen zu schaffen. Die Tumorinduktion erfolgte nach Optimierung mit  $1,5 \times 10^4$  Tumorzellen pro Maus. Mit dieser Zellzahl beginnt das Tumorwachstum innerhalb von 10-13 Tagen nach Induktion, das Endstadium wird ca. 2-2,5 Wochen später erreicht. In den ersten Tumorexperimenten sollte ermittelt werden, ob die Vakzinierung mit hABL908-922 einen

Einfluss auf das Tumorwachstum hat. Dazu wurden F1-Mäuse am Tag -7 mit 10 µg Peptid pro Maus subkutan vakziniert. Am Tag 0 wurden den Tieren  $1,5 \times 10^4$  12B1 Zellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Die Positivkontrolle des Experimentes stellte eine Gruppe dar, die ihrerseits nur mit den 12B1 Tumorzellen behandelt wurden, vorher aber nicht mit Peptid vakziniert worden sind. Aufgrund des Tumorwachstums dieser Gruppe konnten die immunisierten Tiergruppen im Hinblick auf eventuelle Tumorreduktion bewertet werden. Die Ergebnisse sind beispielhaft für drei unabhängige Experimente in Abb. 3.12 dargestellt. Obwohl durch die Vakzinierung von hABL908-922 tumorspezifische T-Zellen generiert werden, scheint es, dass hABL908-922 keinen Einfluss auf die Reduktion des Tumors hat. Das Tumorwachstum ist vergleichbar mit dem Wachstum, welches in den Kontrollgruppen zu beobachten ist. Die Vakzinierung mit HA306-318 entspricht dem zeitlichen Verlauf der hABL-Vakzinierung. Der Verlauf des Tumorwachstums ist ungeachtet der Vakzinierungsmethode weiterhin progressiv.



**Abb.3.12.: Vakzinierung von (HLA-DR1tg x Balb/c) F1-Tieren**

Gruppen mit je 6 Tieren wurden entweder ohne Vakzinierung oder mit HA306-318 bzw. ABL-908-922 vakziniert und anschließend mit 12B1-Tumorzellen inokuliert ( $3 \times 10^4$ ). Es wurde die Tumorgröße in mm<sup>2</sup> bestimmt. Zu den Kontrollgruppen gehören Tiere, die nur 12B1-Tumorzellen appliziert bekamen und Tiere, welche mit HA306-318 vakziniert wurden. Die Vakzinierungen erfolgten mit je 10µg/ml Peptid. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen. X-Achse: Anzahl der Tage nach 12B1-Inokulation (Tag 0), Y-Achse: Tumorgröße in mm<sup>2</sup>

### 3.2.1. Modulation der Immunantwort hABL908-922 durch Inhibition der regulatorischen T-Zell-Population

Die in 3.1. und 3.2. gewonnenen Daten zeigen auf, dass hABL908-922 als BCR-ABL-Epitop natürlich prozessiert und präsentiert wird. Dennoch scheint es laut den Ergebnissen der Tumorexperimente aus Abb. 3.12. keinen relevanten Einfluss auf die Tumorprogression zu besitzen. Die Unfähigkeit eine effektive Immunreaktion zu induzieren und damit eine Tumorregression auszulösen bzw. das Wachstum zu verlangsamen, könnte auf Schutzmechanismen des Tumors zurückzuführen sein<sup>188-190</sup>.

Aufgrund der Annahme, dass die Balance zwischen tumorspezifischen Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen eine wesentliche Rolle in der Tumorabstoßung spielen, beschäftigen sich viele Studien mit der Depletion von  $T_{reg}$ . Es konnte mehrheitlich beobachtet werden, dass die Depletion  $CD25^+$ -Zellen die Anzahl der  $T_{reg}$  minimiert und zu einer effektiveren Tumorabwehr führt<sup>95,96</sup>.

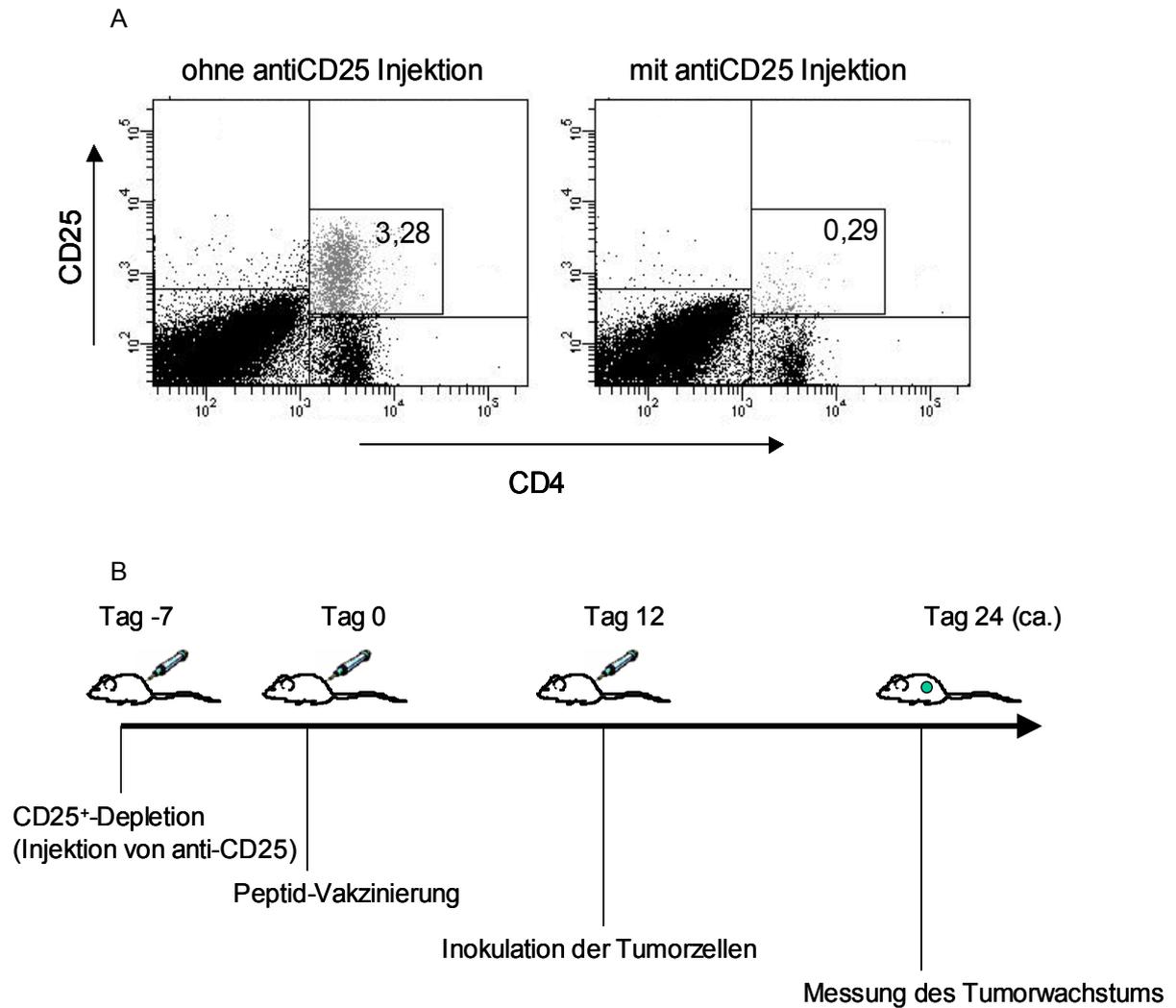
In Anwendung dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Depletion von  $CD25^+$ -T-Zellen ebenfalls einen Einfluss auf die Tumorabstoßung in unserem BCR-ABL<sup>+</sup>-Mausmodell hat.

Um die regulatorischen T-Zellen zu depletieren wurde der monoklonale anti-CD25-Antikörper pC61 eingesetzt. Im Gegensatz zum Klon 7D4 kann durch die Applikation des pC61 die  $T_{reg}$ -Population partiell eliminiert werden. In Kontrollfärbungen mit anti-CD25 und anti-FOXP3 konnte bewiesen werden, dass bei einer pC61-Anwendung mehrheitlich die  $CD25^+FOXP3^+$ -T-Zell-Population eliminiert wird und dies nicht mit einer Erhöhung der  $CD25^-FOXP3^+$ -Population korrespondiert<sup>191-193</sup>.

Da der pC61-Antikörper in der Arbeitsgruppe hergestellt wird, und bereits Anwendung in anderen Experimenten zur Entfernung von  $CD25^+$ -T-Zellen fand, wurde die Konzentration von 0,3 mg pro Maus übernommen, um es im CML-Modell zu testen.

Die Depletion der  $CD25^+$ -T-Zellen nach pC61-Injektion wurde am Tag 7 mittels antiCD25-Färbung überprüft. Wie die Abbildung 3.13 A zeigt, wurde die Anzahl der  $CD25$ -positiven Zellen von ursprünglich 3,28 % des Gesamtanteils an  $CD4^+$ -T-Zellen auf 0,29 % reduziert.

Aus dieser Beobachtung ergibt sich, dass das Zeitintervall von sieben Tagen zwischen pC61-Antikörper-Injektion und Peptid-Vakzinierung ausreichend ist, um vergleichsweise mehr spezifische Effektorzellen als  $T_{reg}$  in der Immunisierungsphase zu aktivieren. Nach 12 Tagen wurden den Mäusen  $1,5 \times 10^4$  BCR-ABL-Tumorzellen injiziert. Der zeitliche Verlauf der folgenden Tumorexperimente ist in der Abbildung 3.13 B. dargestellt.



**Abb.3.13.: Vakzinierungsprotokoll mit CD25-Depletion**

A) T-Lymphozyten von unbehandelten Tieren und von pC61-behandelten Tieren wurden 7 Tage nach deren pC61-Injektion mittels anti-CD25 und anti-CD4 durchflusszytometrisch analysiert. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. X-Achse anti-CD4, Y-Achse anti-CD25 B) Eine schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Tumorexperimente.

Wie in den vorherigen Tumorexperimenten beobachtet wurde, bewirkte die alleinige Vakzinierung mit dem Epitop 908-922 weder eine Tumorabstoßung noch eine Verzögerung des Wachstums (Abb. 3.12.). Um zu überprüfen, ob das hABL-Epitop 908-922 im Zusammenhang mit der T<sub>reg</sub>-Depletion zu einer Veränderung des Tumorwachstums oder gar zur Tumorabstoßung führt, wurde die Anzahl der CD25<sup>+</sup>-Zellen und damit auch die Anzahl der T<sub>reg</sub> mittels pC61 vor der Induktion der Immunantwort minimiert. Anhand der Vakzinierung mit dem Kontroll-Peptid HA306-318 konnte eine Aussage darüber gemacht werden, inwieweit die spezifische T-Zell-Aktivierung durch die hABL908-922-Vakzinierung wirklich ursächlich für die mögliche Veränderung des Tumorwachstums ist. Weiterhin konnte damit ausgeschlossen werden,

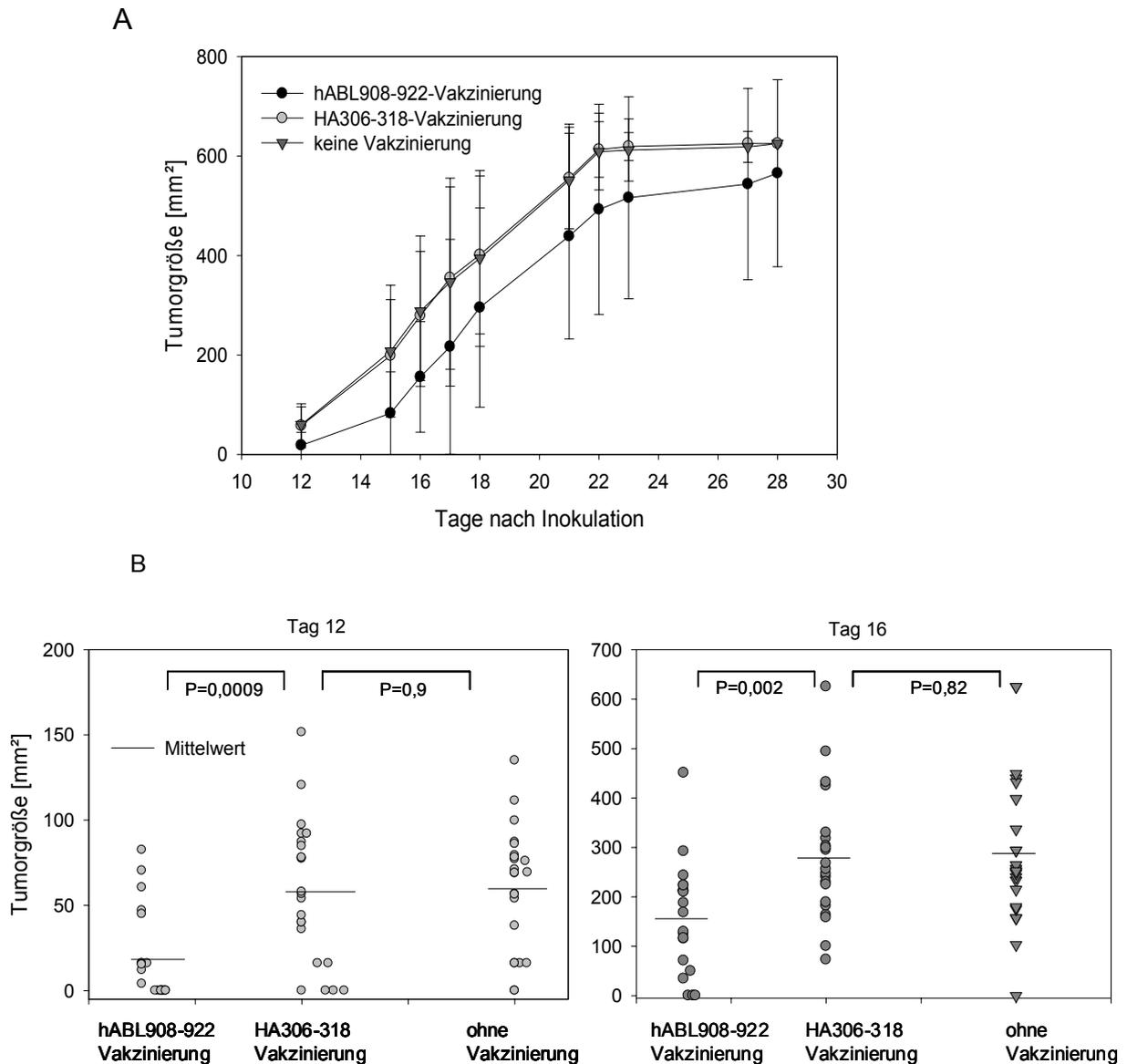
dass die CD25<sup>+</sup>-Depletion generell einen Einfluss auf das Tumorwachstum hat. Die (Balb/c x HLA-DR1) F1-Mäuse wurden mit je 5 µg Peptid/Maus injiziert. Es wurden jeweils 6 oder 7 Tiere pro Gruppe vakziniert. Eine weitere Kontrollgruppe erhielt weder eine Depletion der CD25<sup>+</sup>-Zellen, noch eine Vakzinierung mit Peptid. Diesen Tieren wurden ausschließlich 12B1-Tumorzellen appliziert.

Wie in der Abbildung 3.14 A gezeigt, konnte die Behandlung der Tiere mit anti-CD25 in Kombination mit dem Kontroll-Peptid HA306-318 keine Veränderung des Tumorwachstums bewirken, wohingegen die Vakzinierung mit dem BCR-ABL-relevanten tumorassoziierten hABL-Epitop jetzt zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums führt. Die HA306-318 vakzinierte Kontrollgruppe zeigt annähernd die Progression, welche bei der unbehandelten Gruppe vorzufinden ist. Nach einer entsprechenden Tumorgroße von ca. 600 mm<sup>2</sup> wurden die jeweiligen Tiere abgetötet.

Die Auswirkung der hABL-Vakzinierung zeigt sich besonders deutlich, wenn man sich die individuelle Verteilung des Tumorwachstums zu bestimmten Zeitpunkten betrachtet (Abb. 3.14. B). In den ersten Tagen der Tumorbildung (exemplarisch Tag 12) kann man einen signifikanten Unterschied ( $p=0,0009$ ) zwischen der hABL908-922 und der HA306-318 vakzinierten Gruppe feststellen. Die hABL-vakzinierten Tiere zeigen zu diesem Zeitpunkt ein deutlich verringertes Tumorwachstum. Es besteht zur gleichen Zeit jedoch kein Unterschied in der Tumorgroße zwischen HA306-318 vakzinierten und nicht vakzinierten Tieren. Dies gilt auch zu späteren Zeitpunkten. Am Tag 16 lässt sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,002$ ) in der Tumorgroße bei den Tieren feststellen, die mit hABL908-922 vakziniert wurden. Auch zu diesem Zeitpunkt besteht kein Unterschied in der Tumorprogression zwischen HA306-318 vakzinierten und nicht vakzinierten Tieren.

Aus den hier dargestellten Ergebnissen lässt sich einerseits ableiten, dass die Eliminierung CD25<sup>+</sup>-T-Zellen alleine zwar keine Veränderungen des Tumorwachstums bewirkt, in Kombination mit dem Tumor-relevanten Antigen hABL908-922 jedoch eine sichtliche Wachstumsverringering des BCR-ABL-assoziierten Tumors erzielt wird. Die Reduktion des Tumorwachstums lässt sich in den ersten Tagen der Tumorbildung deutlich beobachten und führt letztlich zu einer Verzögerung des Wachstums von etwa 2-3 Tagen. Eine Ursache für das Nachlassen der Tumorsuppression liegt womöglich in der Neubildung regulatorischer T-Zellen und eine damit verbundene erneute Inhibition der Immunantwort. Weiterführende Untersuchungen sind jedoch nötig um die Bedeutung von MHC-Klasse-II-tumorassoziierten Antigenen, wie hABL908-922, und die Bedeutung von

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bei der Tumorbwehr abschätzen zu können. Dies gilt insbesondere für das damit verbundene Gleichgewicht zwischen CD4<sup>+</sup>-Effektor-T-Zellen und T<sub>reg</sub>-Zellen..



**Abb.3.14.: Einfluss der CD25<sup>+</sup>- Depletion auf die Progression des BCR-ABL-assoziierten Tumors**

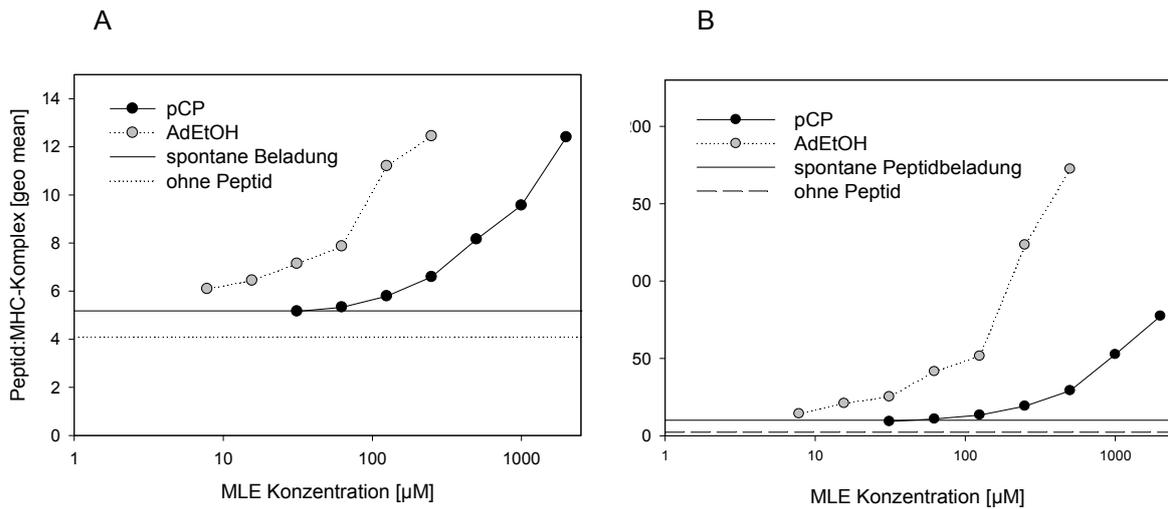
(BALB/c x HLA-DR1tg) F1 wurden mit dem Antikörper pC61 (anti-CD25) am Tag -7 behandelt (intradermale Injektion). Am Tag 0 wurden die Tiere jeweils mit HA306-318 oder hABL908-922 subkutan vakzinieren. Zeitlich versetzt erfolgte subkutan die Inokulation der Tumorzellen (Tag 12). A) Dargestellt ist die Messung der Tumorgöße in mm<sup>2</sup> (Y-Achse) über eine Zeitspanne von 30 Tagen nach Inokulation der Tumorzellen. Die schwarzen Kreise symbolisieren die hABL908-922-vakzinieren Gruppe, die grauen Kreise bezeichnen die HA306-318-vakzinieren Gruppe und die Dreiecke symbolisieren die Tiere, die keine Behandlung bekamen. Der eingetragene Wert gibt den P-Wert an, kalkuliert für den ungepaarten Student-T-Test B) Die individuelle Darstellung der Tumorprogression für alle Tiere einer Gruppe, exemplarisch für Tag 12 und 16 nach Inokulation der Tumorzellen. Die Linie gibt die durchschnittliche Tumorgöße für die jeweilige Gruppe an. Es ist der jeweilige P-Wert angegeben, kalkuliert für den ungepaarten Student-T-Test.

### 3.3. AdEtOH, ein allelspezifischer Katalysator

#### 3.3.1. Die katalytische Aktivität des AdEtOH

In diesem Abschnitt wurde das Kleinmolekül 2-(1-adamanyl)ethanol (AdEtOH) bezüglich seiner katalytischen Fähigkeiten näher untersucht. Im Gegensatz zu dem bereits bekannten *p*-Chlorophenol (pCP), welches als aromatische Verbindung in die Gruppe der Phenolderivate eingeordnet wurde, gehört das AdEtOH in die Gruppe der Adamanthylderivate. In den Studien von Marin-Esteban<sup>147,148</sup> konnte bereits gezeigt werden, dass die Beladung vom MBP-Protein auf lösliche MHC-Klasse-II-Moleküle durch pCP katalysiert wird. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass nicht nur die Beladung von löslichen MHC-Klasse-II-Molekülen, sondern auch die Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen katalysiert wird, welche an der Zelloberfläche gebunden sind. In diesen Studien konnte ferner demonstriert werden, dass die effektivere Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen Antigen-präsentierender Zellen sich in einer verstärkten Aktivierung MBP-spezifischer T-Zellen äußerte. Hier sollte nun untersucht werden, ob AdEtOH in gleicher Weise katalytisch aktiv ist und ob eine verbesserte Stimulation spezifischer T-Zellen durch die Anwendung von AdEtOH als Katalysator erreicht werden kann. In vorangegangenen Experimenten mittels ELISA wurde festgestellt, dass die Beladung von löslichen HLA-DR1-Molekülen mit HA306-318 durch AdEtOH verstärkt wird. Es sollte nun untersucht werden, ob AdEtOH auch die MHC-Moleküle an der Oberfläche von HLA-DR1 exprimierenden Zellen katalysiert. Dazu wurde ein Beladungsassay (2.2.7) mit IC106-120 und HA306-318 mit DRB1\*0101-exprimierenden Fibroblasten durchgeführt. DRB1\*0101 ist eine allelische Variante des humanen MHC-Klasse-II Moleküls.

Wie die Abbildung 3.15. verdeutlicht, kann die Beladung der HLA-DR1-Moleküle (DRB1\*0101) der Zellen mit Hilfe der Katalysatoren pCP und AdEtOH eindeutig verstärkt werden. Sowohl durch die Zugabe von pCP als auch von AdEtOH kann die Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle mit freiem Peptid so stark katalysiert werden, dass sie weit über der spontanen Peptidbeladung liegt. Darüber hinaus zeigt sich, dass AdEtOH eine bessere katalytische Aktivität besitzt als pCP. Da davon ausgegangen wird, dass sich an der Oberfläche der hier verwendeten HLA-DR1-exprimierenden Fibroblasten keine leeren, sondern bereits beladene MHC-Klasse-II-Moleküle befinden, kann man schlussfolgern, dass AdEtOH und pCP den Austausch von MHC-gebundenen Peptiden mit freien, höher affinen Peptiden katalysieren. Da HA306-318 ein wesentlich höher affines Peptid darstellt als CLIP106-120, werden auch weitaus mehr MHC-gebundene Peptide ausgetauscht. Dies erkennt man an einem deutlich höheren geomean im Vergleich zum CLIP-Peptid (3.15. A).



**Abb.3.15.: Peptid-Beladung HLA-DR1-exprimierender Zellen mit pCP und AdEtOH**

HLA-DR1-exprimierende Zellen wurden für 4 h mit biotinylierten Peptiden in Anwesenheit von pCP bzw. AdEtOH inkubiert. Nach Färbung mit Streptavidin-APC und anti-HLA-DR-Antikörper wurde die Beladung der Zellen mittels FACS analysiert und als geomean dargestellt. Die horizontale Linie gibt die spontane Beladung der Zellen in Abwesenheit von Katalysatoren an. Die gestrichelte Linie gibt das Hintergrundsignal an. A) Beladung mit 5µg CLIP106-120biot. B) Beladung mit 5µg HA306-318biot. Dargestellt ist je eines von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.3.2. Die katalytische Aktivität des AdEtOH ist allelspezifisch

Es ist bekannt, dass bei den HLA-DR-Varianten ein Dimorphismus für Glycin und Valin innerhalb der P1 Tasche an der Position 86 besteht. Versuche mit verschiedenen humanen APC deuteten bereits darauf hin, dass AdEtOH im Gegensatz zu pCP allelspezifisch wirkt (nicht gezeigt). Um zu untersuchen ob diese Selektivität mit der P1 Tasche in Verbindung gebracht werden kann, wurden DRB1\*0101, DRB1\*1501 und DRB1\*1502 herangezogen. DRB1\*0101 und DRB5\*0101 exprimieren die Aminosäure Glycin an der Position  $\beta$ 86, während DRB\*1501 an dieser Stelle die Aminosäure Valin aufweist. Die Vorversuche implizierten eine Korrelation der katalytischen Aktivität des AdEtOH mit der Aminosäure Glycin an der Position  $\beta$ 86 in der P1-Tasche. Um diese Annahme zu verifizieren wurden Beladungsassays mit Fibroblasten durchgeführt, welche entweder nur DRB1\*0101, DRB1\*1501 oder DRB5\*0101 exprimieren. Zusätzlich wurden zu diesen Zellen die entsprechenden komplementären Varianten durch Mutagenese von Valin zu Glycin oder von Glycin zu Valin generiert<sup>149</sup>. CLIP106-120 bindet mit höherer Affinität an DRB5\*0101 und geringer an DRB1\*1501, während MBP86-100 vorzugsweise an DRB1\*1501 bindet. Dementsprechend wurden die jeweiligen Peptide mit den HLA-DR-Varianten im Assay eingesetzt.

In Abbildung 3.16. ist die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität des AdEtOH zur Ausprägung der dimorphen Aminosäure  $\beta$ 86 veranschaulicht. Es kann gezeigt werden, dass die Bindung von MBP86-100 an DRB1\*1501 nur durch pCP, nicht aber durch

AdEtOH verstärkt wird. Das bedeutet, dass die Beladung des DRB1\*1501 durch eine AdEtOH-vermittelte Katalyse nicht beeinflusst wird. Anders verhält es sich hingegen mit pCP. P-Chlorophenol kann sowohl bei DRB1\*1501 als auch bei DRB5\*0101 katalytisch aktiv sein. Für das HLA-DR1 DRB1\*0101 sind sowohl AdEtOH als auch pCP katalytisch aktiv. Sofern bei den HLA-DR-Varianten das ursprüngliche Valin durch Glycin ersetzt wird ( $\beta 86V \rightarrow G$ ), findet die Katalyse durch AdEtOH statt. Das wird durch einen Anstieg des Geomeans in der Darstellung 3.16 B. verdeutlicht. Wenn Glycin durch Valin ( $\beta 86G \rightarrow V$ ) ersetzt wird, verliert AdEtOH bei diesen Transfektanten seine katalytische Wirkung (3.16. A). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die katalytische Wirkung von AdEtOH mit der Aminosäure Glycin an der Position  $\beta 86$  korreliert ist. AdEtOH wirkt in dieser Beziehung allelspezifisch. Alle MHC-Moleküle, die Glycin an der Position  $\beta 86$  besitzen, sind für die Katalyse von AdEtOH disponiert.

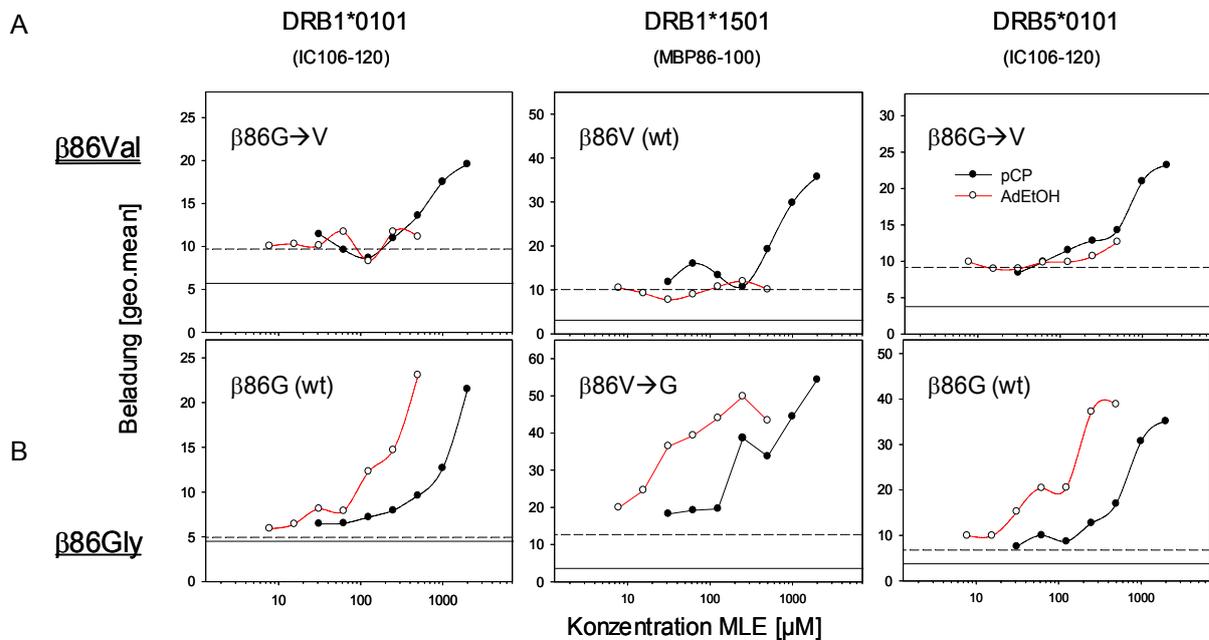


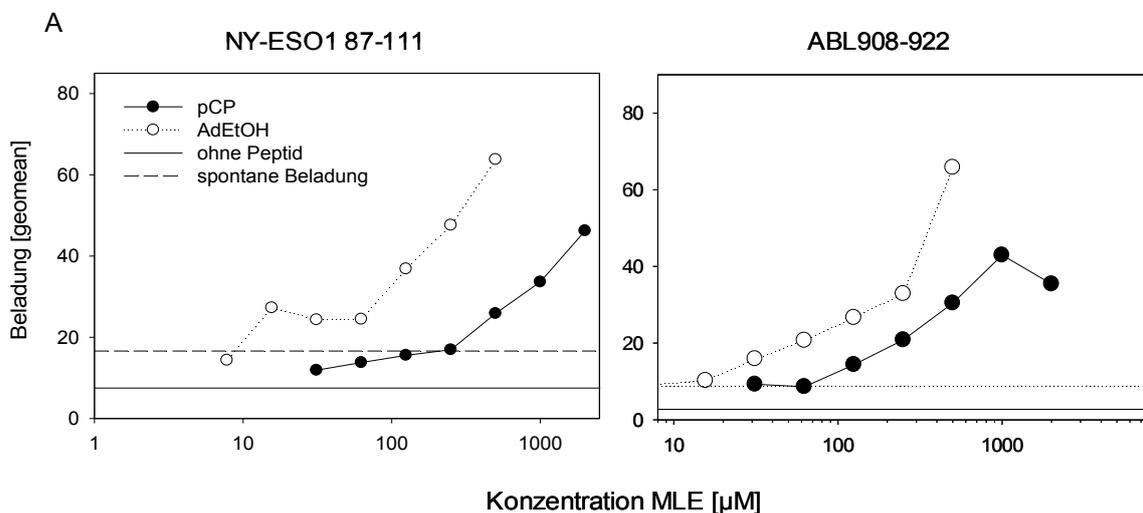
Abb.:3.16. Effekt des dimorphen Aminosäurerestes  $\beta 86$  auf die katalytische Aktivität des AdEtOH

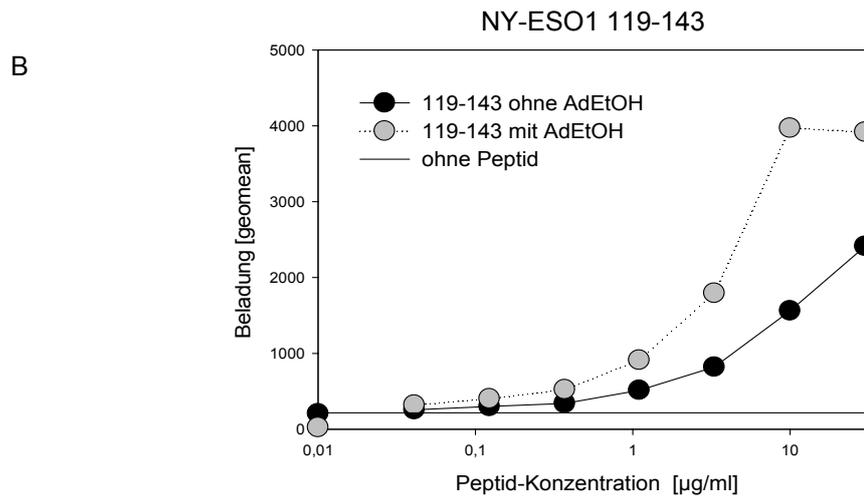
Dargestellt sind Mutanten von HLA-DR-Molekülen, welche durch den Austausch von  $\beta 86$ Glycin zu  $\beta 86$ Valin und von  $\beta 86$ Valin zu  $\beta 86$ Glycin generiert wurden. Die MHC-Moleküle wurden von Fibroblastenzellen transient exprimiert. Der Einfluss von pCP und AdEtOH wurde in einem Beladungsassay (2.2.7.) als geomean analysiert. 5  $\mu$ g/ml biotinyliertes CLIP106-120 wurde für DRB1\*0101 und DRB5\*0101 eingesetzt und 2,5  $\mu$ g/ml MBP86-100 wurde für DRB1\*1501 verwendet. Die horizontale Linie repräsentiert die Hintergrundfluoreszenz in Abwesenheit von Peptid, die durchgestrichene Linie gibt die spontane Beladung an. A) Fibroblasten wurden mit der Wildtyp-Form DRB1\*1501 und den Mutanten DRB1\*0101 und DRB5\*0101 transient transfiziert. B) Dargestellt sind die Wildtyp-Formen der Varianten DRB1\*0101 und DRB5\*0101 sowie die Mutante von DRB1\*1501.

### 3.3.3. Anwendung des AdEtOH als Katalysator für verschiedene HLA-DR1 restringierte Peptide

Als nächstes wurde untersucht, welche Peptide sich mit AdEtOH verstärken lassen. Dazu wurden Peptide ausgewählt, die beispielsweise in der Krebstherapie eine Rolle spielen könnten. Dazu gehören Antigene, wie NY-ESO1 87-111 und NY-ESO1 119-143, die bereits in Melanoma-Patienten als Autoantigene identifiziert wurden<sup>194,195</sup>. Das in dieser Arbeit beschriebene ABL-Epitop 908-922 wurde ebenfalls in Bezug auf die katalytische Aktivität von AdEtOH untersucht. Hierzu wurden die biotinylierten Peptide im Beladungsassay (2.2.7.) unter Verwendung von DRB1\*0101 und DRB1\*0401-exprimierenden APC analysiert. Das Antigen NY-ESO1 119-143 wurde in früheren Studien als DRB1\*0401-restringiertes Epitop beschrieben, während das Epitop NY-ESO1 87-111 auf verschiedene HLA-DR- Varianten sowie auf HLA-DP4- binden kann, unter anderem auch auf DRB1\*0101.

Wie aus der Abb.3.17 A zu entnehmen ist, kann die Beladung sowohl für NY-ESO1 87-111 als auch für hABL908-922 mittels AdEtOH auf den DRB1\*0101-exprimierenden Zellen katalysiert werden. Die Katalyse von AdEtOH ist hierbei im Vergleich zu pCP weitaus besser. Dieses Ergebnis stimmt dabei mit den zuvor erhaltenen Daten überein (siehe 3.15). Die Abb.3.17 B stellt die Verstärkung der Beladung durch AdEtOH für das Antigen NY-ESO1 119-143 dar. Hierbei wurde eine konstante Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  AdEtOH eingesetzt, wobei das Peptid titriert wurde. Man sieht, dass bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  Peptid die Beladungskapazität durch AdEtOH um das Dreifache gesteigert wird. Es wurde festgestellt, dass der Einfluss der katalytischen Aktivität des AdEtOH davon abhängt, mit welcher Affinität das jeweilige Peptid an das MHC-Klasse-II-Molekül bindet. Hoch affine Peptide scheinen demnach besser katalysiert werden zu können, als niedrig affine Peptide.





**Abb.3.17: Katalytische Aktivität von AdEtOH bei unterschiedlichen Peptiden**

Die Beladung der biotinylierten Peptide NY-ESO1 87-111, NY-ESO1 119-143 und hABL908-922 wurden auf DRB1\*0101 oder DRB1\*0401-exprimierenden Zellen im Beladungsassay mit pCP und/oder AdEtOH getestet. Die Beladung wurde mittels Streptavidin-PE-Färbung im FACS als geommean analysiert. A) Die Peptide NY-ESO1 87-111 und hABL908-922 wurden in einer konstanten Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt und mit DRB1\*0101-exprimierenden APC in Anwesenheit von AdEtOH und pCP inkubiert. B) Es wurde eine konstante Konzentration von 250µM AdEtOH im Beladungsassay eingesetzt. Das Peptid NY-ESO1 119-143 wurde in Anwesenheit von AdEtOH oder ohne MLE mit DRB1\*0401-exprimierenden Zellen inkubiert.

Im Hinblick auf die Anwendung von AdEtOH als Katalysator für hABL908-922 wurde zudem untersucht, inwieweit sich die Beladung sowohl des Peptides als auch des Proteinfragments Domäne 6 auf dendritischen Zellen verstärken lässt und welche Auswirkung diese Verstärkung auf die CD4<sup>+</sup>-T-Zell-spezifische Immunantwort besitzt.

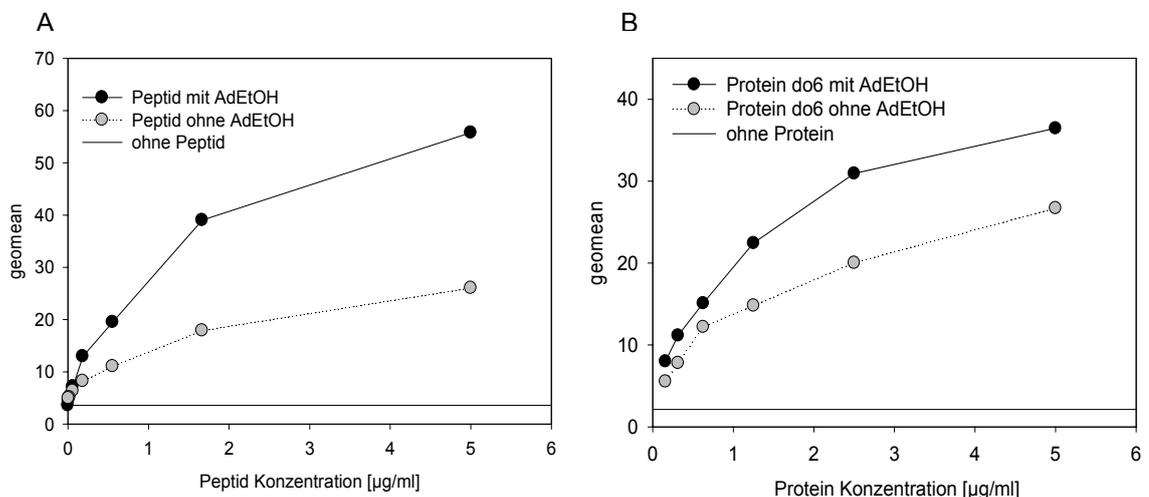
Es konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass pCP die Beladung mit längeren Proteinfragmenten katalysieren kann<sup>148</sup>. Die hier untersuchte Domäne 6 ist ein Fragment des ABL-Proteins mit einer Größe von 28 kDa. In diesem Teilbereich des ABL-Proteins findet sich die Peptidsequenz des hABL908-922 wieder. Da der Bereich durch seine Größe neben hABL908-922 auch andere Epitope enthält, könnte die katalytische Aktivität der Kleinmoleküle nicht nur auf HLA-DR1-exprimierende APC beschränkt sein, sondern auch für HLA-DR4 (HLA-DRB1\*0401) exprimierende APC gelten, auf dem das immundominante hABL908-922 nicht bindet.

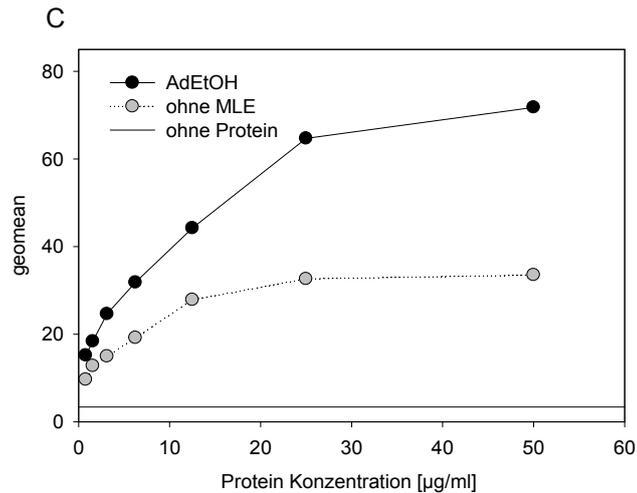
Da dendritische Zellen eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung CD4<sup>+</sup>-spezifischer T-Zellen übernehmen und die Untersuchungen zuvor nur mit HLA-DR-exprimierenden Fibroblasten erfolgte, sollte nun die Anwendung von AdEtOH als Katalysator für die Beladung dendritischer MHC-Klasse-II-Moleküle geprüft werden. Hierfür wurden Knochenmarkzellen von HLA-DR transgenen Mäusen isoliert und daraus HLA-DR1 (HLA-DRB1\*0101) und HLA-DR4 (DRB1\*0401) exprimierende dendritische Zellen generiert (2.2.5.7.). Diese Zellen wurden im vierstündigen Beladungsassay mit Domäne 6 oder

hABL908-922 in Anwesenheit von AdEtOH inkubiert und im FACS analysiert. Wie man anhand der Abb. 3.18. A und B erkennen kann, ist die Beladungseffizienz sowohl der HLA-DR1- als auch der HLA-DR4-exprimierenden Antigen-präsentierenden Zellen mit Domäne 6 durch die Kleinmoleküle pCP und AdEtOH deutlich erhöht. Im Proteinfragment erhaltene HLA-DR4-restringierte Epitope können durch die Anwendung von AdEtOH als Katalysator verstärkt auf MHC-Klasse-II-Moleküle der Variante HLA-DRB1\*0401 beladen werden. Es zeigt sich ebenso, dass die Beladung von hABL908-922 auf dendritische Zellen durch die Anwendung der Kleinmoleküle effektiver ist.

Dennoch ist die katalytische Aktivität von AdEtOH im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Experimenten mit HLA-DR-exprimierenden Fibroblasten etwas geringer. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Abweichung könnte die exozytotische Aufnahme des Antigens sein, welche einen alternativen MHC-Beladungsweg darstellt. Das bedeutet zudem aufgrund der Anwesenheit von HLA-DM in diesen Zellen, dass die Qualität der, sich an der Zelloberfläche von dendritischen Zellen befindlichen, MHC-Klasse-II-Moleküle eine andere ist. Im Vergleich zu den Fibroblasten können viele MHC-Klasse-II-Moleküle der Dendriten schon vorher mit hoch-affinen Peptiden beladen sein, sodass der Austausch mit biotinyliertem Peptid oder Proteinfragment nur in geringerem Umfang stattfindet.

Aufgrund der Tatsache, dass die Domäne 6 jedoch prinzipiell auf HLA-DRB1\*0401 katalysiert werden kann, sollte dieser Fakt auch für HLA-DRB1\*0401-exprimierende dendritische Zellen zutreffen. Die Abbildung 3.18. C zeigt, dass AdEtOH die Komplexbildung des HLA-DR4-Moleküls mit den entsprechenden Epitopen steigern kann. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die hier verwendeten Kleinmoleküle, im speziellen AdEtOH, die Beladungseffizienz suszeptibler MHC-Klasse-II-Moleküle erhöht. Voraussetzung für die katalytische Aktivität des AdEtOH ist die Aminosäure Glycin an der dimorphen Position  $\beta$ 86 in der Bindungstasche.





**Abb.3.18.: Katalyse der Antigen-Beladung ex vivo generierter dendritischer Zellen durch AdEtOH**

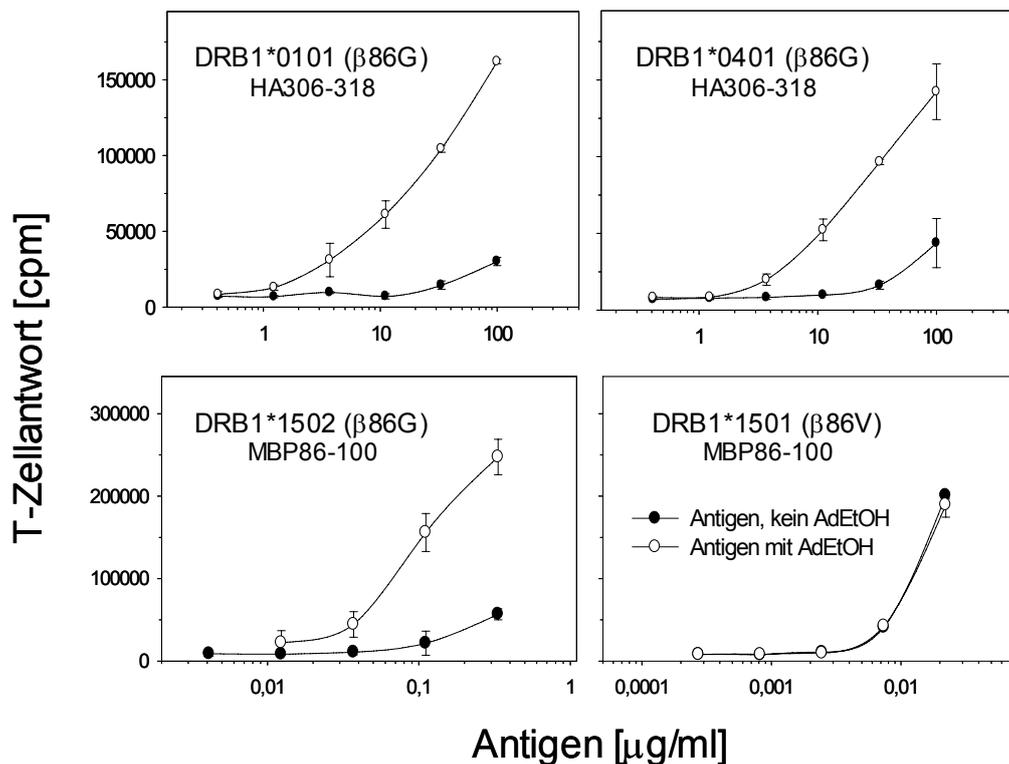
DCs wurden in Gegenwart von 250 µM AdEtOH mit biotinylierter hABL-Do6 oder biotinyliertem Peptid hABL908-922 inkubiert (4 h, 37°C) und anschließend mit Streptavidin-APC und HLA-DR Antikörper angefärbt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie, eingegrenzt auf HLA-DR-exprimierende DCs. Die Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle wurde anhand des geom. mean in Abhängigkeit von der Peptid- bzw. Protein-Konzentration gemessen. Als Hintergrundsignal dient die Messung der DCs in Gegenwart von AdEtOH, jedoch ohne Zusatz von Peptid oder Protein (durchgezogene Linie). A) HLA-DR1 (HLA-DRB1\*0101)-exprimierende DCs beladen mit hABL908-922-biot. in Gegenwart von 250 µM AdEtOH, oder ohne AdEtOH B) HLA-DR1 (HLA-DRB1\*0101)-exprimierende DCs beladen mit hABL-Do6-biot. mit 250 µM oder ohne AdEtOH C) HLA-DR4 (HLA-DRB1\*0401)-exprimierende DCs beladen mit hABL-Do6-biot. mit 250 µM oder ohne MLE. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

### 3.3.4. Modulation CD4<sup>+</sup> spezifischer T-Zellantworten in vitro durch den Einsatz von AdEtOH

Da dendritische Zellen die Fähigkeit besitzen, Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und somit die Aktivierung CD4<sup>+</sup>-spezifischer Immunreaktionen induzieren, ist es interessant zu untersuchen, ob die Katalyse der Peptidbeladung mit AdEtOH einen allelspezifischen verstärkenden Effekt auf die T-Zellantwort besitzt. In früheren Studien konnte bereits für pCP gezeigt werden, dass eine bessere Beladungseffizienz der APC auch zu einer verstärkten T-Zellantwort führt<sup>148</sup>.

Als Erstes wurde untersucht, ob der allelspezifische Effekt des AdEtOH auch bei der Katalyse spezifischer T-Zellantwort auftritt. Wie sich aus der Abb.3.19 ergibt, ist der Effekt von AdEtOH nur dann offensichtlich, wenn das Antigen durch ein suszeptibles MHC-Molekül präsentiert wird. Andernfalls zeigt sich keine katalytische Aktivität. So kann die CD4<sup>+</sup>-T-Zellantwort für HA306-318 sowohl auf den Varianten DRB1\*0101 und

DRB1\*0401 katalysiert werden. Dies gilt auch für MBP86-100, jedoch beschränkt auf DRB1\*1502. Es kann keine Verstärkung der MBP86-100-Antwort auf DRB1\*1501-exprimierenden Zellen beobachtet werden. Der Differenz zwischen beiden DRB1\*15-Varianten besteht allein in der unterschiedlichen Aminosäure an der Position  $\beta$ 86 (DRB1\*1501  $\beta$ 86V, DRB1\*1502  $\beta$ 86G).



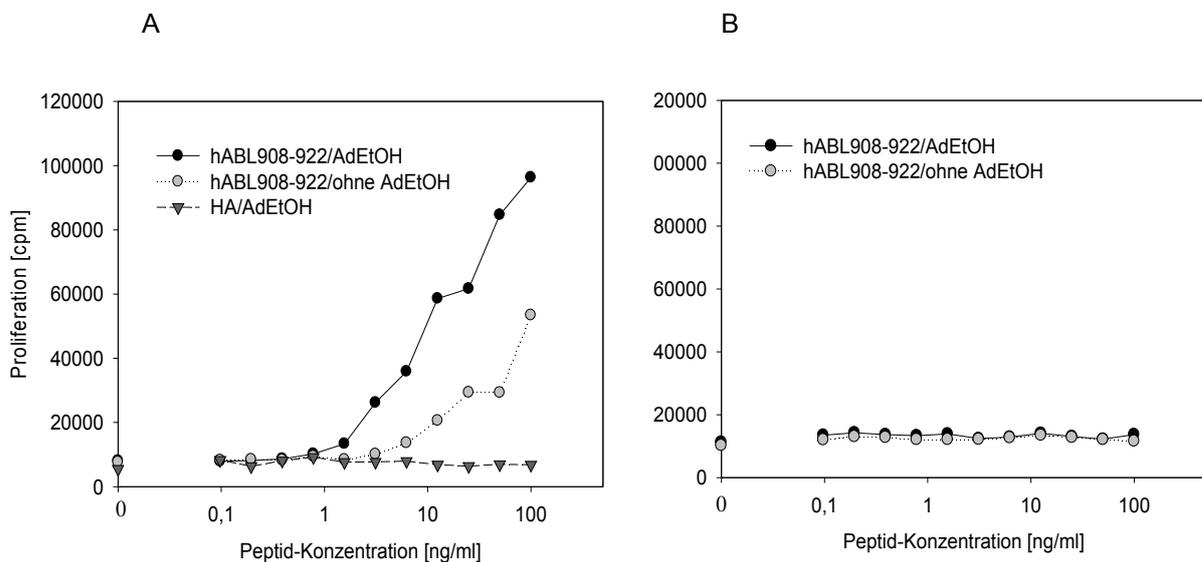
**Abb.3.19.: Allelspezifischer Effekt von AdEtOH bei der Verstärkung CD4<sup>+</sup>-spezifischer T-Zellantworten**

Dargestellt ist die Proliferation spezifischer T-Zellen, welche mit APC und entsprechendem Antigen inkubiert wurden, in Anwesenheit von 250µM AdEtOH oder in Abwesenheit von AdEtOH. T-Zellantworten sind für die AdEtOH-suszeptibelen Varianten DRB1\*0101, DRB1\*1502, DRB1\*0401 und für die AdEtOH nicht suszeptibele Variante DRB1\*1501 gezeigt. Für die DRB1\*0101 und DRB1\*0401 restringierte Immunantwort wurde HA306-318 verwendet, wobei das Hybridom EvHAX5 mit der Fibroblastenzelllinie L57.23 (als APC) benutzt wurde. Die 8475/94 T-Zellen wurden mit L243.6 als APC eingesetzt. Die DRB1\*1501 und DRB1\*1502 restringierten Antworten wurden mittels MBP86-100 und der Hybridom-Linie 2E12 untersucht, wobei L1502 (DRB1\*1502) und L1501 (DRB1\*1501) als APC dienten. Es wurde eine konstante Konzentration von 250µM verwendet.

Da gezeigt wurde, dass hABL908-922 ein HLA-DR1-restringiertes Antigen ist, sollte nachfolgend geklärt werden, inwieweit AdEtOH die hABL908-922-spezifische Immunantwort verstärkt. Um dies *in vitro* zu prüfen, wurde das hABL908-922-spezifische

Hybridom SaABL/G2 eingesetzt. In diesem Experiment wurden *ex vivo* generierte dendritische Zellen als APC verwendet, welche das humane HLA-DRB1\*0101 exprimieren. Die eingesetzte Zellzahl der DCs lag konstant bei 5000 Zellen. Die DCs wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von AdEtOH mit hABL908-922 inkubiert und anschließend als beladene APC den Hybridomzellen präsentiert. Als Kontrolle wurde das irrelevante Peptid HA306-318 in Anwesenheit von AdEtOH eingesetzt.

AdEtOH hat allein keinen Einfluss auf die Stimulation (Abb. 3.20 A) der Zellen. Somit ist die deutliche Verstärkung der Proliferation mittels AdEtOH spezifisch für das hABL908-922-Epitop. Des Weiteren erkennt man in der Abb.3.20. B, dass der Anstieg der Immunantwort HLA-DRB1\*0101 restringiert ist, da offensichtlich weder eine Immunantwort, noch eine Verstärkung durch AdEtOH erzielt wird, wenn die Hybridomzellen mit HLA-DRB1\*0401-restringierten dendritischen Zellen stimuliert werden.



**Abb.3.20.: Einfluss der MLE-Verstärkung auf die Immunantwort des hABL908-922-spezifischen Hybridoms stimuliert mit *ex vivo* generierten DCs**

DCs wurden allein oder in Gegenwart von AdEtOH mit hABL908-922 inkubiert (4 h, 37°C) und anschließend den Hybridoma als APC präsentiert. Die Stimulation des spezifischen Hybridoms wurde mittels eines Sekundärassays mit CTL-L-2-Zellen bestimmt. A) Die Peptide-Stimulation von SaABL/G2-Zellen mittels HLA-DRB1\*0101-exprimierender DCs mit und ohne AdEtOH B) Eingesetzt wurden HLA-DRB1\*0401-exprimierende DCs, welche während der Peptid-Beladung mit oder ohne AdEtOH inkubiert wurden. Auf der X-Achse ist die Konzentration des Peptides aufgetragen, auf der Y-Achse ist die Proliferation der CTL-L-2-Zellen verzeichnet, welche mit der jeweiligen Stimulation des Hybridoms korreliert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

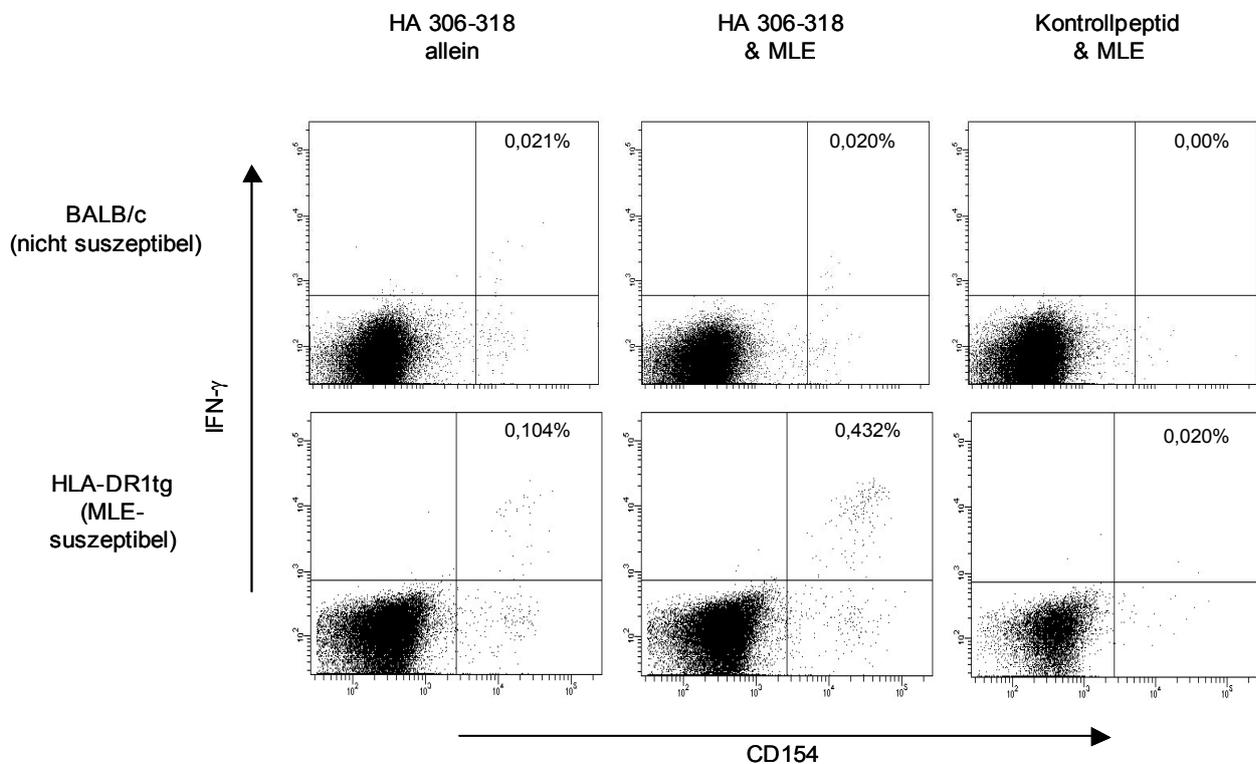
### 3.3.5. Modulation CD4<sup>+</sup>-spezifischer T-Zellantworten *in vivo* durch den Einsatz von AdEtOH

Diese oben gezeigten Daten belegen, dass AdEtOH eingesetzt werden kann, um spezifische Immunantworten *in vitro* zu verstärken. Es stellte sich deshalb die Frage, ob eine *in vivo* Anwendung ähnliche Ergebnisse erzielt. AdEtOH wurde hierzu als Adjuvans-Zusatz bei der Immunisierung eingesetzt.

Um vorab *in vivo* die Allel-Spezifität des Katalysators AdEtOH zu testen, wurde das Peptid HA306-318 zur primären Immunisierung von BALB/c-Mäusen verwendet. Die Immunisierung mit HA306-318 induziert in BALB/c Mäuse eine spezifische Immunantwort. Hierbei wird die Immunantwort jedoch nur durch die murinen MHC-Klasse-II-Moleküle I-A<sup>d</sup> bzw. I-E<sup>d</sup> vermittelt. Da AdEtOH die Beladung des humanen MHC-Klasse-II-Moleküls, jedoch nicht die der murinen MHC-Moleküle katalysiert, sollte die modulatorische Fähigkeit des AdEtOH ausschließlich bei HLA-DRtg Mäusen zu beobachten sein. Die spezifische Aktivierung wurde mittels des anti-CD154-Antikörpers in Kombination mit dem anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 3.21.). Zur Validierung der Ergebnisse diente zudem der IFN- $\gamma$ -Elisot (Abb. 3.22.).

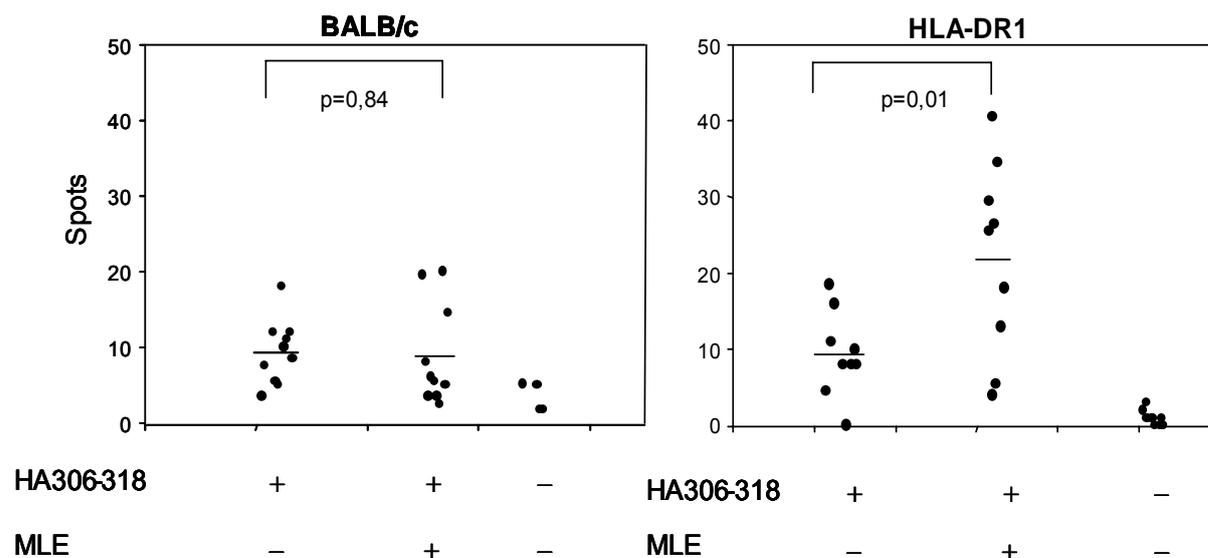
Aus der Abbildung 3.21. ergibt sich, dass AdEtOH tatsächlich nur die Immunantwort verstärkt, die HLA-DR1-restringiert ist. Im oberen Teil der Abbildung ist die spezifische Immunantwort der BALB/c Lymphozyten auf die *ex vivo* Stimulierung mit HA306-318 und auf die Stimulierung mit Kontroll-Peptid dargestellt. Im Vergleich der Immunantworten von HA306-318 und HA306-318/MLE immunisierten Mäusen zeigt sich, dass keine Unterschiede in der Aktivierung der Lymphozyten bestehen. Die Anzahl der doppelt-positiven (CD154/IFN- $\gamma$ ) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist sowohl bei den HA306-318 immunisierten, als auch bei den HA306-318/MLE immunisierten Mäusen gleich. Die Immunantwort gegen das spezifische Peptid von beiden Immunisierungsvarianten liegt bei 0,02 %. Die *ex vivo* Stimulation mit Kontroll-Peptid zeigt die Spezifität der Immunantworten auf HA306-318. Hier ist keine Aktivierung spezifischer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkennbar. Im unteren Teil der Abb. 3.21. ist die Immunantwort der *ex vivo* stimulierten HLA-DR1-transgenen Lymphozyten dargestellt. Im Gegensatz zur *ex vivo* Stimulation der BALB/c Lymphozyten zeigt sich hier, dass die Mäuse, welche mit AdEtOH primär immunisiert worden sind, eine deutlich höhere Aktivierung der spezifischen Lymphozyten aufweisen, als diejenigen, die nur mit HA306-318 gespritzt wurden. Die Aktivierung der HA306-318 immunisierten Zellen in Kombination mit MLE ist um das 4fache erhöht. Es ist keine deutliche Antwort erkennbar, wenn die Zellen mit dem Kontroll-Peptid *ex vivo* stimuliert wurden, sodass auch hier die Antigen-spezifität der Immunantwort gewährleistet ist.

In der Abbildung 3.22. sind die Ergebnisse der Elispots graphisch dargestellt. 3.22. A zeigt die Immunantworten der BALB/c Lymphozyten und 3.22. B die der HLA-DR1tg Lymphozyten. Wie aus diesen Darstellungen erkenntlich wird, ist die IFN- $\gamma$ -Sekretion durch Zugabe von AdEtOH in der Immunisierungsphase nur bei den Zellen deutlich gesteigert, welche HLA-DR1-restringiert sind. Die Verstärkung mit AdEtOH ist hierfür mit  $p=0,01$  signifikant. Es besteht dagegen kein signifikanter Unterschied in der IFN- $\gamma$ -Sekretion bei den BALB/c Lymphozyten. Im Mittel ist die IFN- $\gamma$ -Sekretion sowohl für HA306-318, als auch für HA306-318/MLE primär immunisierter Lymphozyten gleich. Damit deckt sich die Aussage der Abbildung 3.22. mit dem Ergebnis aus 3.21..



**Abb.3.21.: Einfluss der MLE-Verstärkung von AdEtOH auf die Immunantwort HA306-318 immunisierter Mäuse *in vivo* (FACS)**

Dargestellt ist eine repräsentative FACS-Analyse von Lymphknotenzellen immunisierter BALB/c- und HLA-DR1tg Mäuse. Die Tiere wurden allein mit HA306-318 oder in Kombination mit AdEtOH immunisiert. Der Einfluss von AdEtOH auf die spezifische Immunantwort wurde mittels CD154-Färbung und IFN- $\gamma$ -Färbung bestimmt. Die Zellen wurden für 6 h mit HA306-318 oder einem irrelevanten Peptid inkubiert. Die intrazelluläre Färbung der Lymphozyten wurde laut Protokoll (siehe 2.2.6.2., 2.2.6.3.) durchgeführt. Die hier graphisch dargestellten Zellen exprimieren alle den Oberflächenmarker CD4. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. X-Achse:CD154-Färbung, Y-Achse: IFN- $\gamma$  -Färbung



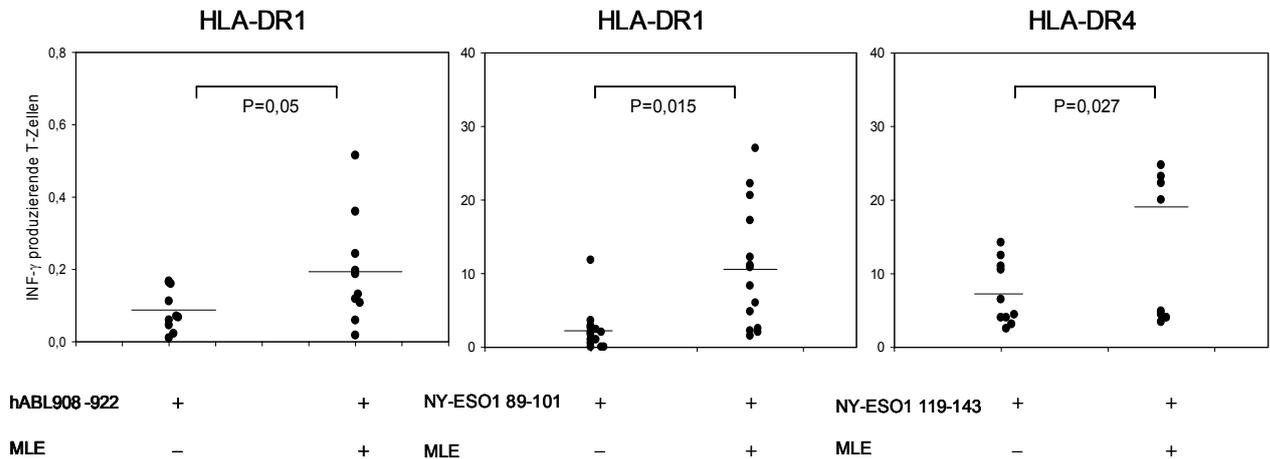
**Abb.3.22: Einfluss des Kleinmoleküls AdEtOH auf die Immunantwort HA306-318 immunisierter Mäuse *in vivo* (Elispot)**

Dargestellt ist die Elispot-Analyse von Lymphknotenzellen primär immunisierter BALB/c- und HLA-DR1tg Mäuse. Die Tiere wurden mit HA306-318 oder in Kombination mit 10 mM AdEtOH primär immunisiert. Der Einfluss von AdEtOH auf die spezifische Immunantwort wurde mittels IFN- $\gamma$ -Sekretion bestimmt. Die BALB/c-Lymphozyten wurden mit 4  $\mu\text{g/ml}$  für 24 h *ex vivo* stimuliert. Die HLA-DR1tg Zellen wurden mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  HA306-318 für 24 h *ex vivo* stimuliert. Der Elispot wurde laut Protokoll 2.2.10. durchgeführt. Auf der Y-Achse ist die Spotanzahl verzeichnet, welche mit der IFN- $\gamma$ -Sekretion der Zellen korreliert. Die X-Achse gibt die verschiedenen Tiergruppen an. Der eingetragene Wert gibt den P-Wert an, kalkuliert für den ungepaarten Student-T-Test

### 3.3.6. Die Verstärkung vom Tumorantigenen durch AdEtOH

Da gezeigt werden konnte, dass AdEtOH die Immunantwort *in vivo* katalysiert, sollte geprüft werden, ob auch andere CD4<sup>+</sup>-spezifische Immunantworten *in vivo* verstärkt werden können. Dazu erfolgte die Analyse spezifischer Immunantworten für NY-ESO1 119-143, NY-ESO1 89-101 und hABL908-922 mittels CD154- und IFN- $\gamma$ -Färbung. Während HLA-DR4-transgenen Tieren das Antigen NY-ESO1 119-143 appliziert wurde, erhielten HLA-DR1-transgene Mäuse entweder hABL908-922 oder NY-ESO1 89-101. Die Peptide wurden mit AdEtOH oder ohne AdEtOH in die jeweiligen Tiere appliziert. Es konnte beobachtet werden (Abb. 3.23.), dass AdEtOH alle Immunreaktionen in gewissem Umfang verstärkt. Die Varianzen in der Verstärkung der Peptide lassen sich dadurch erklären, dass die hier untersuchten Antigene unterschiedliche Affinitäten besitzen. So ist das Epitop HA306-318 beispielsweise besonders hoch affin, während die Affinität für NY-ESO1 89-101 oder hABL908-922 vergleichsweise geringer ist. Die CD4<sup>+</sup>-Antwort für das

NY-ESO1 119-143 lässt sich im HLA-DR4tg-Maussystem ebenfalls gut verstärken. Demnach lässt sich aus den *in vivo* Ergebnissen schließen, dass AdEtOH eine Erhöhung der spezifischen Immunantwort bewirkt und möglicherweise als Modulator von proinflammatorischen Immunreaktionen in weiteren *in vivo* Anwendungen eingesetzt werden kann.



**Abb.3.23.: Anwendung von AdEtOH als Adjuvans-Zusatz *in vivo***

AdEtOH wurde mit 10mM als Adjuvans-Zusatz in der Immunisierungsphase eingesetzt. HLA-DRtg Mäuse wurden mit Peptid und CPG1826 mit Zusatz von AdEtOH oder ohne AdEtOH primär immunisiert. Nach 12 Tagen wurden die Immunantworten im FACS anhand von CD154-Expression und der IFN- $\gamma$ -Produktion gemessen. Die Peptide hABL908-922 NY-ESO1 89-101 und NY-ESO1 119-143 wurden mit je 5 $\mu$ g/Maus injiziert. Die *ex vivo* Stimulierung erfolgte für 6 h mit 10  $\mu$ g/ml Peptid. Die intrazelluläre Färbung der Lymphozyten wurde laut Protokoll (siehe 2.2.6.2, 2.2.6.3.) durchgeführt. Die hier graphisch dargestellten Zellen exprimieren alle CD4 und CD154. Exemplarisch ist jeweils eins von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. Der eingetragene Wert gibt den P-Wert an, kalkuliert für den ungepaarten Student-T-Test: Y-Achse: IFN- $\gamma$ -Expression

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei Themenbereiche bearbeitet, deren Ergebnisse hier diskutiert werden sollen. Als Erstes wurde mit hABL908-922 ein Epitop des hABL-Proteins charakterisiert, welches als tumorassoziiertes Antigen in BCR-ABL<sup>+</sup>-Zellen überexprimiert wird. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Epitop in HLA-DR1tg Mäusen *in vivo* eine spezifische CD4<sup>+</sup>-Immunreaktion induzieren kann, wobei es im murinen System allerdings ein Xenoantigen darstellt. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass bereits die Injektion BCR-ABL-exprimierender Zellen ausreicht, um eine hABL908-922-spezifische Antwort einzuleiten. Diese Antwort kann von BCR-ABL-negativen Tumorzellen nicht induziert werden. Trotzdem konnte die Vakzinierung mit diesem Peptid keine Verzögerung im Tumorwachstum auslösen. In Kombination mit der Depletion CD25-positiver Zellen konnte dagegen eine signifikante Verzögerung des Tumorwachstum ausgelöst werden, was auf den Einfluss regulatorischer T Zellen bei der Inhibition tumorspezifischer Antworten hinweist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das organische Kleinmolekül 2-(1-adamantyl)ethanol als Katalysator der Peptid-Beladung näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Katalyse des AdEtOH allelspezifisch ist und mit der Ausprägung der Aminosäure Glycin an der Position  $\beta$ 86 in der P1 Tasche korreliert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die katalytische Aktivität von AdEtOH in einer Verstärkung der T-Zell-Antwort widerspiegelt. Der verstärkende Effekt von AdEtOH konnte auch in *in vivo* Experimenten beobachtet werden, wobei AdEtOH als Adjuvans-Zusatz eingesetzt wurde. Für einige der untersuchten Peptide zeigte sich dabei *ex vivo* eine deutlich verbesserte Antigen-spezifische CD4<sup>+</sup>-Immunantwort.

### 4.1. Die Charakterisierung der hABL908-922-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Immunantwort

Neben vielen anderen Möglichkeiten, um einen Ansatz für Vakzinierungsstrategien zu entwickeln, ist die Identifizierung und Untersuchung neuer Epitope ein wesentlicher Bestandteil. Es konnte bereits beobachtet werden, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in Tumore infiltrieren können und durch Tumorantigene spezifisch aktiviert werden<sup>196,197</sup>. Hierbei ist jedoch auch die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-Helferzellen erforderlich, welche das Zusammenspiel mit anderen Immunzellen vermitteln<sup>198</sup>.

Aufgrund der gesammelten Erfahrungen hinsichtlich tumorspezifischer Immunreaktionen und regulatorischer Einflüsse durch den Tumor findet die Peptid-bezogene Immuntherapie neue Beachtung<sup>199-201</sup>. Dabei soll die Aktivierung der eigenen Immunabwehr zur effektiven und langfristigen Tumorabstoßung beitragen. Hierzu ist jedoch zu bemerken, dass zwischen induzierten und spontanen Tumoren unterschieden werden muss. Während bei induzierten Tumoren, beispielsweise Virus-induzierte Tumore, die Immunabwehr auf tumorspezifische, zumeist vom Virus abstammende Antigene reagiert, kann eine effektive Tumorabwehr gegen spontane Tumore nur unzureichende aufgebaut werden. Dies liegt vor allem daran, dass diese Tumorbildung in einem toleranten Milieu erfolgt, sodass gegen tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene eine Toleranz besteht. Hierbei ist die Tumorabwehr auf die Induktion der Autoimmunität angewiesen. Daher gestaltet sich eine Therapie bzw. eine Vakzinierung konzeptionell sehr schwierig.

Dass eine Vakzinierung bei induzierten Tumoren tatsächlich eine klinische Bedeutung besitzt, konnte anhand der Vakzinierung zum Schutz vor Cervix Karzinomen verdeutlicht werden<sup>202,203</sup>. Diese Karzinome entstehen aufgrund von Pappiloma-Virus-Infektionen. Bei nicht-viralen Tumoren zeigten bisherige Vakzinierungsstrategien dagegen kaum klinische Erfolge<sup>204</sup>. Eine Möglichkeit, warum kaum klinische Erfolge erzielt werden, besteht in der Ausprägung unterschiedlicher Schutzmechanismen seitens des Tumors. So können beispielsweise spezifische Tumorantigene, sofern sie vorhanden sind, in ihrer Expression durch den Tumor herab reguliert werden. Eine hohe Expression von tumorspezifischem Antigen kann beispielsweise zur Destruktion von Tumorstroma führen, wobei die Stromazellen selbst tumorspezifisches Antigen präsentieren<sup>205</sup>. Demnach ist die Menge an Antigen, welches von APC präsentiert werden kann, für eine effektive Immunantwort von zentraler Bedeutung<sup>206</sup>. Es können aber auch die MHC-Moleküle selber betroffen sein, welche in ihrer Expression unterdrückt werden. Ein weiterer Punkt besteht in der Tatsache, dass zudem die Stimulation zumeist ohne kostimulatorische Signale erfolgt, sodass selbst tumorspezifische T-Zellen nicht funktionell sind. Außerdem können immunregulatorische Schutz- und Toleranzmechanismen zum tragen kommen, welche natürlich bei Autoantigenen, welche tumorassoziierte Antigene letztlich darstellen, besonders ausgeprägt sind.

Bei der Vakzinierung nicht-induzierter Tumore sind demnach nicht nur die tumorspezifischen Peptide von entscheidender Bedeutung, sondern auch die jeweiligen Vakzinierungsmuster. So zeigen erste Ergebnisse in Melanoma-Patienten, dass eine Vakzinierung mit autologen Tumorzellen, welche durch eine Virus-Infektion modifiziert wurden, zu einer verbesserten Überlebensrate führt<sup>207</sup>. Eine weitere Möglichkeit besteht in

der Expansion autologer spezifischer T-Zellen, welche durch adoptiven Transfer dem Patienten zurückgeführt werden<sup>156</sup>. Eine weitere Aussicht, um eine effektive Immunantwort zu induzieren, besteht in der gleichzeitigen Applikation eines entsprechenden Adjuvans, welches proinflammatorisch wirkt. Studien belegen, dass die Induktion einer Immunantwort die Zugabe von Immunstimulatoren, wie IFA<sup>208</sup>, Montanide<sup>209</sup> und zusätzliche TLR-Agonisten, wie beispielsweise CpG-OND<sup>210,211</sup> erfordert.

Angesichts der Kenntnis, dass CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bedeutenden Einfluss auf die Induktion und die Aufrechterhaltung der anti-Tumorimmunität besitzen<sup>212,213</sup>, wurde in der vorliegenden Arbeit unter anderem die Immunogenität von CD4<sup>+</sup>-Epitopen der humanen ABL-Tyrosinkinase charakterisiert. Dazu wurde in einem humanisierten Mausmodell gearbeitet. Die hier verwendeten Tiere sind HLA-DR1 transgene Mäuse. Anhand der Immunisierung diverser ABL-Peptide konnte festgestellt werden, dass hABL908-922 von den getesteten Peptiden die stärkste Immunantwort induzieren kann. Dieses Ergebnis lässt sich aus der äußerst starken IFN- $\gamma$  Sekretion der T-Lymphozyten schließen, welche nach *ex vivo*-Restimulierung mit hABL908-922 (KGKLSRLKPAPPPPP) auftritt (Abb. 3.2.). Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Immunisierung mit dem homologen murinen ABL-Antigen in diesen Tieren ebenfalls eine deutliche Immunreaktion auslösen kann, eine Kreuzreaktivität ist jedoch nicht zu beobachten (S. Höpner, Diplomarbeit). Um nachzuweisen, dass dieses Peptid auch natürlich präsentiert wird, wurden Fragmente des ABL-Proteins (Domänen) exprimiert. Die Domäne 6, welche die hABL908-922-Sequenz beinhaltet, umspannt dabei die Aminosäuresequenz 891 bis 1149 des ABL-Proteins. In Abb. 3.5. konnte gezeigt werden, dass die hABL908-922-spezifische Immunantwort nicht nur durch das synthetisch hergestellte Peptid, sondern auch durch die Applikation der Domäne 6 induziert werden kann. Fast alle CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, welche durch die Domäne 6 aktiviert werden, reagieren spezifisch auf das hABL-Epitop 908-922. Damit wird einerseits nachgewiesen, dass dieses Epitop aus dem ABL-Protein von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen prozessiert und auf deren MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden kann. Darüber hinaus lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass das Peptid hABL908-922 in dieser ABL-Region das immundominante Antigen für HLA-DR1 ist und z.B. auch von BCR-ABL-exprimierenden dendritischen Zellen (HLA-DR1tg) direkt präsentiert wird (Abb. 3.10.)

Es stellte sich nunmehr die Frage, ob die Induktion der hABL908-922 spezifischen CD4<sup>+</sup>-Immunantwort eine Rolle in der BCR-ABL<sup>+</sup>-Tumorabstoßung spielt. Die Transplantation von BCR-ABL<sup>+</sup>-Tumorzellen war offensichtlich hinreichend, hABL908-922 spezifische

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in vivo* zu generieren. Unter Verwendung der gebräuchlichen 12B1-Tumorzelllinie<sup>184</sup> konnte somit die Relevanz des hABL-Antigens zumindest in HLA-DR1tg Mäusen bestätigt werden (3.11.). Folglich ist davon auszugehen, dass nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* hABL-spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen natürlicherweise prozessiert und präsentiert werden können.

Anschließend wurde untersucht, ob die Vakzinierung mit hABL908-922 im Tiermodell zu einer Tumorregression führt. Obwohl das Antigen hABL908-922 im Tiermodell sogar ein Xenoantigen darstellt, wodurch eine effektivere Immunantwort induziert werden sollte und die Vakzinierung durch Zugabe von CpG (CpG-OND1826) sogar verstärkt wurde<sup>28,210</sup>, konnte keine effektive Tumorregression beobachtet werden. Demnach ist die Immunantwort gegen das MHC-Klasse-II-restringierte hABL908-922 allein offensichtlich nicht ausreichend, um den Tumor abzustoßen.

Da mittels Klasse-II grundsätzlich sowohl CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen als auch suppressive T<sub>reg</sub> Zellen aktiviert werden können, stellte sich die Frage, ob letztere die Auslösung der tumorspezifischen Immunantwort behindern<sup>214,215</sup>. Neben der Suppression der T<sub>H</sub>-Zellen können T<sub>reg</sub> auch die Funktion von natürlichen Killerzellen und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten negativ beeinflussen<sup>216</sup> und die Entwicklung von Gedächtniszellen inhibieren<sup>217</sup>. Verschiedene Studien hatten gezeigt, dass das Tumor-Milieu zur Akkumulation von T<sub>reg</sub> führen kann<sup>218</sup>. Eine schematische Übersicht der supprimierenden Faktoren ist in 4.1. gegeben. In dieser Grafik wird unter anderem deutlich, dass Tumorzellen nicht nur in der Lage sind, Suppressorzellen zu rekrutieren, sondern auch über die Sekretion von TGF-β CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>-T-Zellen in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>-T-Zellen zu konvertieren<sup>219</sup>.

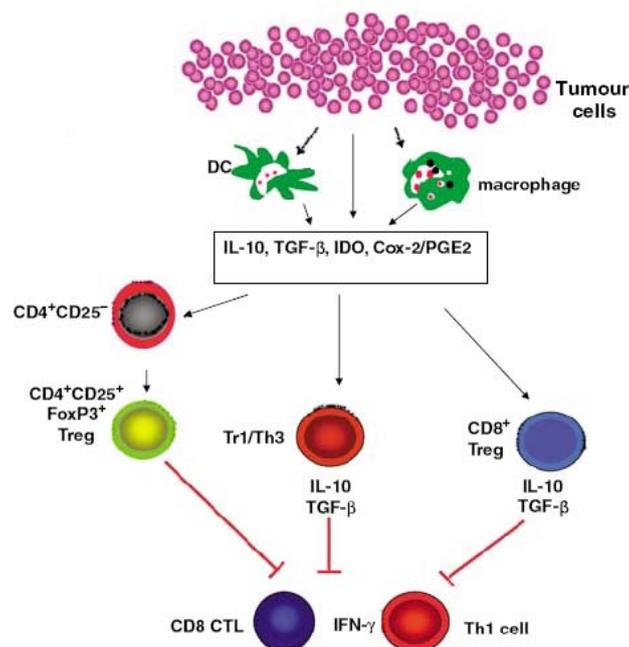


Abb.4.1.: Schematische Darstellung suppressiver Effekte bei Tumoren [Oncogene (2008) 27, 168-180]

Aufgrund der Feststellung, dass in vielen Krebs-Patienten die Anzahl der regulatorischen T-Lymphozyten oftmals erhöht ist, und die Zellen einen entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben<sup>86,220-222</sup>, bestand die Annahme, dass in der Tat regulatorische T-Zellen die Effektorfunktion der hABL-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen unterbinden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Depletion von CD25<sup>+</sup>-T<sub>reg</sub> während der Immunisierungsphase funktionelle, tumorspezifische CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen generiert werden. Infolge dessen sind beispielsweise spezifische Effektorzellen in der Lage, in einem Darmkrebsmodell mit CT26-Tumorzellen, diese abzustößen. Die Abstoßungsreaktion ist abhängig von der IFN- $\gamma$ -Produktion der Effektorzellen. Aufgrund erneuter Proliferation von T<sub>reg</sub> verlieren die Effektorzellen jedoch ihre anti-tumorale Kapazität. Dennoch scheint die Depletion der CD25<sup>+</sup>-T<sub>reg</sub> die Induktion einer längerfristigen anti-tumoralen Immunantwort zu fördern<sup>215</sup>.

In dieser Studie erfolgte die Eliminierung von CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> durch den Antikörper pC61. Die Applikation von pC61 (anti-CD25 mAb) führt zu einer Eliminierung von CD25<sup>+</sup> positiven Zellen und damit auch von CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub><sup>191,192</sup>. Der Effekt ist allerdings transient, da nach 7-10 Tagen sich die Anzahl der CD25<sup>+</sup>-Zellen bereits wieder normalisiert. Wie in 3.14. gezeigt, führt eine Depletion CD25<sup>+</sup>-T-Lymphozyten während der Immunisierungsphase mit hABL908-922 zu einer signifikanten Verzögerung des Tumorwachstums von BCR-ABL-positiven Tumorzellen. Demnach ist davon auszugehen, dass auch hier, wie in den anderen Studien, die regulatorischen T-Lymphozyten eine effektive anti-Tumorimmunantwort unterbinden. Die Immunisierung mit dem hABL-Peptid 908-922 in Kombination mit anti-CD25 führt jedoch zu einer Aktivierung tumorspezifischer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die ihrerseits prinzipiell eine generelle anti-Tumorimmunantwort induzieren und steuern könnten.

Eine vollständige Tumorabstoßung wurde jedoch nicht beobachtet. Das könnte beispielsweise daran liegen, dass die Auswirkungen der T<sub>reg</sub>-Depletion über den Zeitraum des Experimentes verloren gehen und sich erneut eine supprimierende T<sub>reg</sub>-Population aufbauen kann. Es wäre denkbar, dass eine zusätzliche Applikation, beispielsweise von anti-IL-10-Rezeptor, eine längerfristige Unterdrückung suppressiver Elemente erzielt und damit die Effizienz der Immunantwort erhöht wird. Weiterführende Experimente könnten hier angeschlossen werden, um diese Frage zu klären. Weiterhin müsste untersucht werden, ob die Kombination mit CD8<sup>+</sup>-Epitopen und damit die zusätzliche Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen letztlich zur vollständigen Tumorabstoßung führt. Eine Studie von Roth *et al.* deutet bereits darauf hin, dass eine verstärkte Immunreaktion durch die Kombination eines CD8<sup>+</sup>-relevanten Peptides mit einem entsprechenden CD4<sup>+</sup>-Epitop induziert werden könnte. Hierbei wurde sowohl ein CD8<sup>+</sup>-Epitop als auch das T-Helfer-Peptid mittels des Lipopeptides Pam3Css an der Oberfläche von Liposomen verankert.

Dadurch wird eine potente proinflammatorische Immunreaktion erzeugt, welche CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-vermittelt ist<sup>223</sup>.

Zusammenfassend zeigt sich, dass hABL908-922 eine CD4<sup>+</sup>-spezifische Immunreaktion hervorrufen kann. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass neben den zytotoxischen T-Zellen ebenso CD4<sup>+</sup>-T-Zellen maßgeblich an einer Immunantwort gegen Tumorzellen beteiligt sind. Diese Ergebnisse liegen im Einklang mit der gegenwärtigen Ansicht über die Rolle der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Tumorbekämpfung<sup>161,183,224</sup>. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass nur durch die Eliminierung von T<sub>reg</sub> eine gewisse hABL908-922-spezifische Immunreaktion induziert werden kann, wohingegen eine Vakzinierung ohne vorherige T<sub>reg</sub>-Depletion zu keiner Immunantwort führt. Damit bestätigt sich in dieser Arbeit die Ansicht, dass die Depletion von T<sub>reg</sub> eine entscheidende Rolle in der Tumorbekämpfung spielt<sup>95,225</sup>.

Abschließend sollte jedoch noch angemerkt werden, dass das Antigen hABL908-922 als humanes Autoantigen zwar unmittelbare Bedeutung für klinische Anwendungen haben könnte, in diesem Modell jedoch ein Xenoantigen darstellt und somit die Projektion der im Rahmen des Tiermodells erhaltenen Ergebnisse kritisch zu bewerten ist. Experimente mit dem homologen Mausepitop, welches zumindest *ex vivo* ähnlich starke Immunantworten auslöst wie das humane Equivalent, würde zwar ein ‚saubereres‘ Modellsystem darstellen, die Tatsache, dass auch das humane Xenoantigen keine Regression des Tumors bewirkt, lässt jedoch diese Frage zweitrangig erscheinen, wenn es zunächst um die Untersuchung der Rolle von CD4-Tumorepitopen bei der Tumorabstoßung geht. Auch hier scheinen T<sub>reg</sub> Zellen die Wirkung der proinflammatorischen CD4<sup>+</sup>-Zellen nachhaltig zu unterdrücken.

Da mit einem Mausmodell gearbeitet wurde, welches auf der humanen BCR-ABL-Variante b3a2 basiert, kann zumindest festgestellt werden, dass hABL908-922 als Epitop im humanen BCR-ABL-Protein vorkommen kann und dieses Epitop möglicherweise eine gewisse CD4<sup>+</sup>-Helfer-Antwort induzieren könnte. Es ist hierbei wiederum zu bedenken, dass die im Tiermodell erzielte Wirkung von der möglichen Wirkung im Menschen abzugrenzen ist, da es sich bei hABL908-922 um ein Autoantigen handeln würde. Das bedeutet, dass eine Induktion der T-Zellen womöglich nicht nur Tumor-gerichtet wäre, sondern auch autoreaktive Immunreaktionen hervorrufen könnte. In Studien mit humanem Blut und Patientenmaterial müsste in weiterführenden Studien geklärt werden, ob spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gegen hABL908-922 überhaupt generiert werden können, da sie vorab normalerweise durch die thymale Selektion depletiert werden. Andererseits könnten hABL908-922 spezifische T-Zellen auch anerg oder tolerant sein, sodass keine

Immunreaktion, selbst bei Präsentation des Antigens, ausgelöst wird. Demnach kann die Frage nach einer klinischen Relevanz des hABL908-922 noch nicht beantwortet werden.

Einige Studien zeigen jedoch, dass tumorassoziierte Antigene, welche zumeist Autoantigene sind, und deren Aktivierung spezifischer autoreaktiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durchaus Einfluss auf die Entwicklung und Persistenz zytotoxischer T-Lymphozyten besitzen und somit maßgeblich an der anti-Tumorimmunität beteiligt sind<sup>226,227</sup>. In einer aktuellen Studie konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Vakzinierung mittels dendritischer Zellen eine zytotoxische Immunreaktion gegen Tumorzellen als auch gegen normale Melanozyten hervorruft, wodurch Vitiligo verursacht wird<sup>228</sup>. Inwieweit diese Autoimmunreaktionen bei einer Tumortherapie akzeptiert werden können, muss von Fall zu Fall entschieden werden.

Eine Identifizierung von tumorassoziierten Autoantigenen kann aber auch dazu verwendet werden, um die spezifischen T-Zell-Rezeptoren der dadurch aktivierten T-Zellen zu isolieren, und diese zu modifizieren. Dadurch könnten höher affine bzw. spezifischere Effektorzellen generiert werden. Wichtige Grundlagen werden hierfür auch durch die Weiterentwicklung der adoptiven T-Zell-Therapie geschaffen.

## 4.2. AdEtOH ist ein effektiver Katalysator für die Peptid-Beladung von MHC-Klasse-II-Varianten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung des Einflusses von „MHC-loading enhancern (MLE)“ auf die Immunreaktion. Angesichts der Tatsache, dass durch das Ungleichgewicht zwischen Suppression und Proinflammation im Tumor zumeist eine effektive Tumor-gerichtete Immunreaktion fehlschlägt, wurde hier untersucht, inwieweit die organische Substanz AdEtOH die Immunantwort verstärken kann, indem es die Beladung der APC mit Antigenen katalysiert. Zudem untersuchten wir, ob AdEtOH als Adjuvans-Additiv *in vivo* eingesetzt werden kann.

AdEtOH wurde während eines ‚screenings‘ einer organischen Kleinmolekül-Datenbank entdeckt und in dieser Arbeit näher charakterisiert. Es konnte bereits für pCP gezeigt werden, dass der Einsatz dieser Kleinmoleküle Einfluss auf die MHC-Klasse-II-Peptid-Bindung hat<sup>147</sup> was zu einer verstärkten CD4<sup>+</sup>-Immunantwort führt<sup>148</sup>. Im Fall von AdEtOH haben wir dabei eine interessante Beobachtung gemacht. Es konnte festgestellt werden, dass die katalytische Aktivität von AdEtOH allelspezifisch ist. Im Gegensatz zu pCP kann mit AdEtOH die Peptid-Beladung nur von bestimmten MHC-Klasse-II-Varianten katalysiert werden (Abb. 3.16). AdEtOH wirkt nur bei den MHC-Klasse-II-Varianten, welche an der Position  $\beta$ 86 ein Glycin besitzen. Ein Austausch mit Valin führte zur Inaktivierung der katalytischen Aktivität des AdEtOH. Im Vergleich dazu veränderte sich die katalytische Aktivität des pCP nicht. Die beobachtete Allel-Spezifität ist somit mit der Existenz der Aminosäure Glycin an der Position  $\beta$ 86 in der P1-Bindungstasche des HLA-DR-Moleküls direkt korreliert<sup>149</sup>. Es konnte weiterhin demonstriert werden, dass diese allelspezifische Katalyse auch auf die Verstärkung von T-Zell-Antworten zutrifft. So werden nur die Immunantworten durch AdEtOH verstärkt, die für HLA-DR-Varianten restringiert sind, welche Glycin an der Position  $\beta$ 86 aufweisen. Das sind beispielsweise DRB1\*0101, DRB1\*0401 und DRB5\*0101. Die HLA-DR-Variante DRB1\*1501 wird durch AdEtOH nicht katalysiert (Abb.3.16 . 3.19).

Die Position  $\beta$ 86 befindet sich in der P1-Tasche des MHC-Klasse-II-Moleküls. Mit der dimorphen Ausprägung von Valin oder Glycin an dieser Stelle, wird die Tiefe der P1-Tasche determiniert<sup>142,229</sup>. So können bei Valin nur kleine aliphatische Reste binden (Ile, Leu, Val, Met), wohingegen durch die Ausprägung von Glycin eine tieferen Tasche erzeugt wird, worin größere aromatische Reste binden können (Phe, Tyr, Trp). Im Gegensatz zum größeren AdEtOH kann pCP die Peptid-Beladung unabhängig von der Tiefe der P1-Tasche katalysieren. Es besteht die Annahme, dass durch die Wechselwirkung des AdEtOH innerhalb der P1-Bindungstasche, die Konformation der

rezeptiven Form des MHC-Klasse-II-Moleküls stabilisiert wird. Dadurch wird gewährleistet, dass die Bindungstasche nicht kollabiert, sodass ein Austausch von Antigenen auch an der Oberfläche von APC erfolgen kann<sup>149</sup>. Da sich ein Teil dieser Arbeit auf ein ABL-Epitop mit HLA-DR1-Restriktion bezieht, wurde AdEtOH verwendet, um dessen Wirkungsweise für hABL908-922 *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Die in 3.17. bzw. 3.20. aufgeführten Ergebnisse zeigen *in vitro* eine deutliche Erhöhung der hABL908-922-Peptidbindung auf HLA-DR1-Moleküle. Es konnte gezeigt werden, dass durch AdEtOH wesentlich mehr MHC-Klasse-II-Moleküle an der Oberfläche von APC mit dem entsprechenden Peptid beladen werden. Zudem kann auch eine Proteinbeladung, hier gezeigt für Domäne 6, katalysiert werden. Für das Protein konnte außerdem demonstriert werden, dass AdEtOH nicht nur für HLA-DR1, sondern auch für HLA-DR4 (HLA-DRB1\*0401) katalytisch aktiv ist. Die verbesserte Beladung Antigen-präsentierenden Zellen führt wiederum zu einer verstärkten hABL908-922-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Immunantwort *in vitro* (Abb. 3.18.).

Um festzustellen, ob sich auch *in vivo* die Immunantwort verstärken lässt und die Katalyse von AdEtOH Allelspezifisch verläuft, wurden einerseits BALB/c Mäuse (nicht suszeptibel für AdEtOH) und andererseits HLA-DR1tg Mäuse (suszeptibel für AdEtOH) mit HA306-318 immunisiert. Beide Stämme können jedoch gegen dieses Antigen eine CD4<sup>+</sup>-spezifische Immunreaktion aufbauen. Es konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass AdEtOH als Adjuvans-Additiv in der Tat nur in den Tieren eine verstärkte Immunreaktion induziert, welche das humane MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR1 besitzen. AdEtOH ist bezüglich des murinen MHC-Klasse-II-Moleküls nicht katalytisch aktiv. Andererseits wurde damit bestätigt, dass AdEtOH auch *in vivo* eine Antigen-spezifische Immunreaktion verstärken kann (siehe Abb. 3.21, 3.22). Die Untersuchung des AdEtOH als Adjuvans-Additiv ergab für verschiedene Peptide, darunter auch tumorassoziierte NY-ESO-1-Antigene, eine verstärkende Antigen-spezifische Immunantwort (Abb. 3.23.).

Die *in vivo* Daten zeigen dabei jedoch eine hohe individuelle Varianz in der Verstärkung der Immunantwort. Dafür können mehrere Gründe verantwortlich sein. Einerseits könnte die ‚Individualität‘ der Tiere eine Rolle spielen, andererseits können auch Faktoren, wie zeitlich abhängige Applikation oder leichte Varianzen in der Applikationsstelle die Ursache für eine erhöhte Varianz in der Wirkungsweise von AdEtOH sein. Zusätzlich ist für die verstärkende Wirkungsweise des AdEtOH auch entscheidend, mit welcher Affinität die jeweiligen Antigene an das MHC-Klasse-II-Molekül binden. So können hoch affine Antigene, wie HA306-318, besser katalysiert werden als beispielsweise hABL908-922, welches im Vergleich zu HA306-318 nicht so stabil an HLA-DR1 bindet (Dieses

Ergebnisse wurden aus einem Thermo-shift Assay<sup>230</sup> entnommen, welcher von Sebastian Günther durchgeführt wurde; nicht gezeigt).

Trotz der positiven Tendenzen ist AdEtOH bestenfalls als Pilotverbindung zu betrachten. Eine Anwendung von AdEtOH in klinischen Tests ist nicht denkbar, da die einzusetzende Konzentration im mM-Bereich liegt und demnach viel zu hoch ist. Weiterführende Analysen zur Identifizierung sowohl natürlicher als auch modifizierter neuer niedermolekularer Katalysatoren mit verbesserter Aktivität sind bereits in Kooperation mit dem FMP-Berlin angelaufen.

In einer aktuellen Studie der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nicht nur ‚chemikalienartige‘ Verbindungen sondern auch Dipeptide eine katalytische MLE-Wirkung besitzen können<sup>150</sup>. Die Anwendung von niedermolekularen „MHC-loading-enhancern“ bleibt im Hinblick auf therapeutische Zwecke jedoch noch offen. Es konnte in dieser Arbeit aber immerhin schon vermittelt werden, dass MLEs als Katalysatoren *in vitro* sehr effektiv sind und diese Wirkung zumindest prinzipiell auch *in vivo* zeigen. Sie könnten somit beispielsweise eingesetzt werden, um schwache Immunantworten gegen Tumorantigene *ex vivo* besser zu detektieren oder um eine bessere Expansion spezifischer CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zu erreichen, indem die Peptid-spezifische Beladungskapazität der APC durch MLEs erhöht wird. Neben der Relevanz von MLEs für den gezielten immuntherapeutischen Einsatz, stellt sich allerdings eine weitere wichtige Frage in Bezug auf deren Relevanz für Autoimmunerkrankungen. Aufgrund ihrer Eigenschaft ‚unkontrollierte‘ Beladungen aktivierter APC mit Autoantigenen zu katalysieren, gilt es zu untersuchen, inwieweit dadurch Autoimmunreaktionen ausgelöst werden können. In diesem Zusammenhang muss ferner geprüft werden, in welchem Umfang natürliche Kleinmoleküle in der Umwelt vorkommen, und inwieweit diese als Risikofaktoren zu betrachten sind.

## 5. Literaturverzeichnis

### 5.1. Eigene Publikationen

Hopner S, Dickhaut K, Hofstätter M, et al. Small organic compounds enhance antigen loading of class II major histocompatibility complex proteins by targeting the polymorphic P1 pocket. *J Biol Chem.* 2006;281:38535-42.

Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007;110:1225-32.

Gupta, S., Hopner, S., Rupp, B., et al. Anchor side chains of short peptide fragments trigger ligand-exchange of class II MHC molecules *PLoS ONE.* 2008; 3: e1814

Andreas Schlundt, Wolfgang Kilian, Michael Beyermann, et al. Challenging MHC class II molecules by NMR spectroscopy (eingereicht bei PNAS)

Höpner S, Kirsten Falk, Olaf Roetzschke  
Characterisation of tumour-reactive CD4<sup>+</sup>T cells specific for an ABL derived tumour-associated antigen (in Vorbereitung)

Höpner S\*, Katharina Dickhaut\*, Jamina Eckhard, et al. Amplification of tumour-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses *in vivo* by small molecular 'MHC-loading enhancer' (MLE). (in Vorbereitung)

\* gleicher Beitrag

### 5.2. Publikationen

1. Kessler JH, Bres-Vloemans SA, van Veelen PA, et al. BCR-ABL fusion regions as a source of multiple leukemia-specific CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes. *Leukemia.* 2006;20:1738-1750.
2. ten Bosch GJ, Toornvliet AC, Friede T, Melief CJ, Leeksa OC. Recognition of peptides corresponding to the joining region of p210BCR-ABL protein by human T cells. *Leukemia.* 1995;9:1344-1348.
3. Volpe G, Cignetti A, Panuzzo C, et al. Alternative BCR/ABL splice variants in Philadelphia chromosome-positive leukemias result in novel tumor-specific fusion proteins that may represent potential targets for immunotherapy approaches. *Cancer Res.* 2007;67:5300-5307.
4. Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, et al. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med.* 1993;178:489-495.
5. Romero P, Cerottini JC, Speiser DE. The human T cell response to melanoma antigens. *Adv Immunol.* 2006;92:187-224.
6. Guckel B, Rentzsch C, Nastke MD, et al. Pre-existing T-cell immunity against mucin-1 in breast cancer patients and healthy volunteers. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132:265-274.
7. Girling A, Bartkova J, Burchell J, Gendler S, Gillett C, Taylor-Papadimitriou J. A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int J Cancer.* 1989;43:1072-1076.
8. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005;7:211-217.
9. Prehn RT, Prehn LM. The flip side of immune surveillance: immune dependency. *Immunol Rev.* 2008;222:341-356.

10. Yu P, Rowley DA, Fu YX, Schreiber H. The role of stroma in immune recognition and destruction of well-established solid tumors. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:226-231.
11. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1-27.
12. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3:991-998.
13. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007;117:1137-1146.
14. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21:137-148.
15. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001;410:1107-1111.
16. Engel AM, Svane IM, Rygaard J, Werdelin O. MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scand J Immunol.* 1997;45:463-470.
17. Qin Z, Blankenstein T. A cancer immunosurveillance controversy. *Nat Immunol.* 2004;5:3-4; author reply 4-5.
18. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN  $\gamma$  receptors. *Immunity.* 1994;1:447-456.
19. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon- $\gamma$  activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood.* 2001;97:192-197.
20. Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon  $\gamma$ . *J Exp Med.* 2002;196:129-134.
21. Willimsky G, Blankenstein T. The adaptive immune response to sporadic cancer. *Immunol Rev.* 2007;220:102-112.
22. Klein G, Klein E. Immune surveillance against virus-induced tumors and nonrejectability of spontaneous tumors: contrasting consequences of host versus tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74:2121-2125.
23. Blankenstein T. Do autochthonous tumors interfere with effector T cell responses? *Semin Cancer Biol.* 2007;17:267-274.
24. Klein G, Klein E. Surveillance against tumors--is it mainly immunological? *Immunol Lett.* 2005;100:29-33.
25. Yannelli JR, Hyatt C, McConnell S, et al. Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience. *Int J Cancer.* 1996;65:413-421.
26. Baxevasis CN, Dedoussis GV, Papadopoulos NG, Missitzis I, Stathopoulos GP, Papamichail M. Tumor specific cytolysis by tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Cancer.* 1994;74:1275-1282.
27. Lee PP, Yee C, Savage PA, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med.* 1999;5:677-685.
28. Miconnet I, Koenig S, Speiser D, et al. CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol.* 2002;168:1212-1218.
29. Appay V, Jandus C, Voelter V, et al. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8 $^{+}$  T cells in the circulation but not in the tumor site. *J Immunol.* 2006;177:1670-1678.
30. Bender A, Karbach J, Neumann A, et al. LUD 00-009: phase 1 study of intensive course immunization with NY-ESO-1 peptides in HLA-A2 positive patients with NY-ESO-1-expressing cancer. *Cancer Immun.* 2007;7:16.
31. Nishikawa H, Qian F, Tsuji T, et al. Influence of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$  regulatory T cells on low/high-avidity CD4 $^{+}$  T cells following peptide vaccination. *J Immunol.* 2006;176:6340-6346.
32. O'Dwyer ME, Druker BJ. STI571: an inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase for the treatment of chronic myelogenous leukaemia. *Lancet Oncol.* 2000;1:207-211.
33. Ricci C, Scappini B, Divoky V, et al. Mutation in the ATP-binding pocket of the ABL kinase domain in an STI571-resistant BCR/ABL-positive cell line. *Cancer Res.* 2002;62:5995-5998.
34. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia.* 2002;16:2190-2196.
35. Verstovsek S, Golemovic M, Kantarjian H, et al. AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of p190 Bcr-Abl activation and of in vitro proliferation of Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer.* 2005;104:1230-1236.
36. Weisberg E, Manley P, Mestan J, Cowan-Jacob S, Ray A, Griffin JD. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J Cancer.* 2006;94:1765-1769.
37. Dasatinib: BMS 354825. *Drugs R D.* 2006;7:129-132.

38. Steinberg M. Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clin Ther.* 2007;29:2289-2308.
39. Bennett JH, . Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med Surg J.* 1845;64:413-423.
40. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med.* 1999;131:207-219.
41. Friedreich N. Ein neuer Fall von Leukämie  
*Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 1857; 12:37-57.
42. Nowell P HD. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science ( National Academy of Science).* 1960;132:1497.
43. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1982;300:765-767.
44. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, et al. Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1983;306:239-242.
45. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell.* 1984;37:1035-1042.
46. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243:290-293.
47. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3:730-737.
48. Tsukamoto AS, Reading C, Carella A, et al. Biological characterization of stem cell present in mobilized peripheral blood of CML patients. *Bone Marrow Transplant.* 1994;14 Suppl 3:S25-32.
49. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med.* 2004;351:657-667.
50. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367:645-648.
51. Buzzeo MP, Scott EW, Cogle CR. The hunt for cancer-initiating cells: a history stemming from leukemia. *Leukemia.* 2007;21:1619-1627.
52. Bocchia M, Korontsvit T, Xu Q, et al. Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood.* 1996;87:3587-3592.
53. Butt NM, Rojas JM, Wang L, Christmas SE, Abu-Eisha HM, Clark RE. Circulating bcr-abl-specific CD8+ T cells in chronic myeloid leukemia patients and healthy subjects. *Haematologica.* 2005;90:1315-1323.
54. Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood.* 1995;86:3118-3122.
55. Westermann J, Schlimper C, Richter G, Mohm J, Dorken B, Pezzutto A. T cell recognition of bcr/abl in healthy donors and in patients with chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2004;125:213-216.
56. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science.* 1990;247:824-830.
57. Blick M, Romero P, Talpaz M, et al. Molecular characteristics of chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Cancer Genet Cytogenet.* 1987;27:349-356.
58. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 2002;107:76-94.
59. Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia.* 1996;10:751-756.
60. Chasseriau J, Rivet J, Bilan F, et al. Characterization of the different BCR-ABL transcripts with a single multiplex RT-PCR. *J Mol Diagn.* 2004;6:343-347.
61. Fainstein E, Marcelle C, Rosner A, et al. A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukaemia. *Nature.* 1987;330:386-388.
62. Lichty BD, Keating A, Callum J, et al. Expression of p210 and p190 BCR-ABL due to alternative splicing in chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1998;103:711-715.
63. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood.* 1996;88:2375-2384.
64. Inokuchi K. Chronic myelogenous leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies. *J Nippon Med Sch.* 2006;73:178-192.
65. Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, et al. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:7457-7462.

66. Birchenall-Roberts MC, Ruscetti FW, Kasper JJ, et al. Nuclear localization of v-Abl leads to complex formation with cyclic AMP response element (CRE)-binding protein and transactivation through CRE motifs. *Mol Cell Biol.* 1995;15:6088-6099.
67. Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, et al. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:7457-7462.
68. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science.* 1990;247:1079-1082.
69. Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell.* 1991;66:161-171.
70. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol.* 1993;13:7587-7595.
71. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 2006;24:677-688.
72. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science.* 1999;285:221-227.
73. Shimizu Y. LFA-1: more than just T cell Velcro. *Nat Immunol.* 2003;4:1052-1054.
74. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell.* 1987;49:273-280.
75. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *AustJSci.* 1957;20:67-69.
76. Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:217-223.
77. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-562.
78. Wang HY, Lee DA, Peng G, et al. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity.* 2004;20:107-118.
79. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155:1151-1164.
80. Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, Caton AJ, Laufer TM. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med.* 2001;194:427-438.
81. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299:1057-1061.
82. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:330-336.
83. Horak I, Lohler J, Ma A, Smith KA. Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance. *Immunol Rev.* 1995;148:35-44.
84. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, et al. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;198:235-247.
85. Berendt MJ, North RJ. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med.* 1980;151:69-80.
86. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001;61:4766-4772.
87. Woo EY, Yeh H, Chu CS, et al. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol.* 2002;168:4272-4276.
88. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* 2002;169:2756-2761.
89. Kawaida H, Kono K, Takahashi A, et al. Distribution of CD4+CD25high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. *J Surg Res.* 2005;124:151-157.
90. Viguier M, Lemaitre F, Verola O, et al. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol.* 2004;173:1444-1453.
91. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2006;107:3639-3646.
92. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10:942-949.

93. Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006;66:1123-1131.
94. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 2005;202:919-929.
95. Nagai H, Horikawa T, Hara I, et al. In vivo elimination of CD25+ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F10 melanoma, when combined with interleukin-12 gene transfer. *Exp Dermatol.* 2004;13:613-620.
96. Steitz J, Bruck J, Lenz J, Knop J, Tuting T. Depletion of CD25(+) CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res.* 2001;61:8643-8646.
97. Viehl CT, Moore TT, Liyanage UK, et al. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells promotes a tumor-specific immune response in pancreas cancer-bearing mice. *Ann Surg Oncol.* 2006;13:1252-1258.
98. Pommatau E, Dargent M, Revillard JP, Vauzelle-Usclard C, Gignoux M. [Treatment of Malignant Tumors by Cyclophosphamide.]. *Sem Hop.* 1964;40:452-462.
99. Renner WA. [Experiences with Endoxan and Mitarsen in a metastasizing breast cancer.]. *Med Klin.* 1963;58:254-255.
100. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood.* 2003;102:276-283.
101. Dai Y, Rahmani M, Corey SJ, Dent P, Grant S. A Bcr/Abl-independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2. *J Biol Chem.* 2004;279:34227-34239.
102. Kujawski LA, Talpaz M. The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18:459-471.
103. Cortes J, Rousselot P, Kim DW, et al. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood.* 2007;109:3207-3213.
104. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood.* 2007;110:3540-3546.
105. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood.* 1990;76:2462-2465.
106. Antin JH. Graft-versus-leukemia: no longer an epiphenomenon. *Blood.* 1993;82:2273-2277.
107. Jorritsma A, Gomez-Eerland R, Dokter M, et al. Selecting highly affine and well-expressed TCRs for gene therapy of melanoma. *Blood.* 2007;110:3564-3572.
108. Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, et al. Enhanced functionality of T cell receptor-redirectioned T cells is defined by the transgene cassette. *J Mol Med.* 2008;86:573-583.
109. Engels B, Uckert W. Redirecting T lymphocyte specificity by T cell receptor gene transfer--a new era for immunotherapy. *Mol Aspects Med.* 2007;28:115-142.
110. Gold JE, Zachary DT, Osband ME. Adoptive transfer of ex vivo-activated memory T-cell subsets with cyclophosphamide provides effective tumor-specific chemoimmunotherapy of advanced metastatic murine melanoma and carcinoma. *Int J Cancer.* 1995;61:580-586.
111. Lu X, Jiang X, Liu R, Zhao H, Zhang S. Adoptive transfer of pTRP2-specific CTLs expanding by bead-based artificial antigen-presenting cells mediates anti-melanoma response. *Cancer Lett.* 2008.
112. Westermann J, Kopp J, van Lessen A, et al. Vaccination with autologous non-irradiated dendritic cells in patients with bcr/abl+ chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;137:297-306.
113. Gannage M, Abel M, Michallet AS, et al. Ex vivo characterization of multi-epitopic tumor-specific CD8 T cells in patients with chronic myeloid leukemia: implications for vaccine development and adoptive cellular immunotherapy. *J Immunol.* 2005;174:8210-8218.
114. Yasukawa M, Ohminami H, Kojima K, et al. HLA class II-restricted antigen presentation of endogenous bcr-abl fusion protein by chronic myelogenous leukemia-derived dendritic cells to CD4(+) T lymphocytes. *Blood.* 2001;98:1498-1505.

115. Vignard V, Lemercier B, Lim A, et al. Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells. *J Immunol.* 2005;175:4797-4805.
116. Valmori D, Fonteneau JF, Valitutti S, et al. Optimal activation of tumor-reactive T cells by selected antigenic peptide analogues. *Int Immunol.* 1999;11:1971-1980.
117. Karbach J, Gnjatic S, Pauligk C, et al. Tumor-reactive CD8(+) T-cell clones in patients after NY-ESO-1 peptide vaccination. *Int J Cancer.* 2007.
118. Bocchia M, Wentworth PA, Southwood S, et al. Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules. *Blood.* 1995;85:2680-2684.
119. Greco G, Fruci D, Accapezzato D, et al. Two bcr-abl junction peptides bind HLA-A3 molecules and allow specific induction of human cytotoxic T lymphocytes. *Leukemia.* 1996;10:693-699.
120. Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T, et al. Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood.* 2000;95:1781-1787.
121. Cathcart K, Pinilla-Ibarz J, Korontsvit T, et al. A multivalent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2004;103:1037-1042.
122. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:13885-13890.
123. Morita S, Oka Y, Tsuboi A, et al. A phase I/II trial of a WT1 (Wilms' tumor gene) peptide vaccine in patients with solid malignancy: safety assessment based on the phase I data. *Jpn J Clin Oncol.* 2006;36:231-236.
124. Rezvani K, Yong AS, Mielke S, et al. Leukemia-associated antigen specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood.* 2007.
125. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia.* 2000;14:1777-1784.
126. Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today.* 1995;16:487-494.
127. Kumar S, Jones TR, Oakley MS, et al. CpG oligodeoxynucleotide and Montanide ISA 51 adjuvant combination enhanced the protective efficacy of a subunit malaria vaccine. *Infect Immun.* 2004;72:949-957.
128. Dranoff G. GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol Rev.* 2002;188:147-154.
129. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 1993;364:33-39.
130. Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature.* 1990;345:615-618.
131. Zhong G, Castellino F, Romagnoli P, Germain RN. Evidence that binding site occupancy is necessary and sufficient for effective major histocompatibility complex (MHC) class II transport through the secretory pathway redefines the primary function of class II-associated invariant chain peptides (CLIP). *J Exp Med.* 1996;184:2061-2066.
132. Saudrais C, Spehner D, de la Salle H, et al. Intracellular pathway for the generation of functional MHC class II peptide complexes in immature human dendritic cells. *J Immunol.* 1998;160:2597-2607.
133. Wang K, Peterson PA, Karlsson L. Decreased endosomal delivery of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes in dynamin-deficient cells. *J Biol Chem.* 1997;272:17055-17060.
134. Roche PA, Teletski CL, Stang E, Bakke O, Long EO. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:8581-8585.
135. Dugast M, Toussaint H, Dousset C, Benaroch P. AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J Biol Chem.* 2005;280:19656-19664.
136. Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, et al. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity.* 1996;4:357-366.
137. Kropshofer H, Vogt AB, Stern LJ, Hammerling GJ. Self-release of CLIP in peptide loading of HLA-DR molecules. *Science.* 1995;270:1357-1359.
138. Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell.* 1995;82:155-165.
139. Vogt AB, Kropshofer H, Hammerling GJ. How HLA-DM affects the peptide repertoire bound to HLA-DR molecules. *Hum Immunol.* 1997;54:170-179.

140. Rotzschke O, Falk K. Origin, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Curr Opin Immunol.* 1994;6:45-51.
141. Nelson CA, Vidavsky I, Viner NJ, Gross ML, Unanue ER. Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:628-633.
142. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature.* 1994;368:215-221.
143. Rabinowitz JD, Vrljic M, Kasson PM, et al. Formation of a highly peptide-receptive state of class II MHC. *Immunity.* 1998;9:699-709.
144. Boniface JJ, Lyons DS, Wettstein DA, Allbritton NL, Davis MM. Evidence for a conformational change in a class II major histocompatibility complex molecule occurring in the same pH range where antigen binding is enhanced. *J Exp Med.* 1996;183:119-126.
145. Falk K, Lau JM, Santambrogio L, et al. Ligand exchange of major histocompatibility complex class II proteins is triggered by H-bond donor groups of small molecules. *J Biol Chem.* 2002;277:2709-2715.
146. Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity.* 1998;9:377-383.
147. Marin-Esteban V, Falk K, Rotzschke O. "Chemical analogues" of HLA-DM can induce a peptide-receptive state in HLA-DR molecules. *J Biol Chem.* 2004;279:50684-50690.
148. Marin-Esteban V, Falk K, Rotzschke O. Small-molecular compounds enhance the loading of APC with encephalitogenic MBP protein. *J Autoimmun.* 2003;20:63-69.
149. Hopner S, Dickhaut K, Hofstatter M, et al. Small Organic Compounds Enhance Antigen Loading of Class II Major Histocompatibility Complex Proteins by Targeting the Polymorphic P1 Pocket. *J Biol Chem.* 2006;281:38535-38542.
150. Gupta S, Hopner S, Rupp B, et al. Anchor side chains of short peptide fragments trigger ligand-exchange of class II MHC molecules. *PLoS ONE.* 2008;3:e1814.
151. Wang RF, Rosenberg SA. Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev.* 1999;170:85-100.
152. Marchand M, van Baren N, Weynants P, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer.* 1999;80:219-230.
153. Nagorsen D, Scheibenbogen C, Letsch A, et al. T cell responses against tumor associated antigens and prognosis in colorectal cancer patients. *J Transl Med.* 2005;3:3.
154. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, et al. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:6458-6462.
155. Jager E, Gnjjatic S, Nagata Y, et al. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:12198-12203.
156. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive cell transfer therapy. *Semin Oncol.* 2007;34:524-531.
157. Schmidt SM, Schag K, Muller MR, et al. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood.* 2003;102:571-576.
158. Bund D, Mayr C, Kofler DM, Hallek M, Wendtner CM. Human Ly9 (CD229) as novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) recognized by autologous CD8+ T cells. *Exp Hematol.* 2006;34:860-869.
159. Zeng G. MHC Class II-Restricted Tumor Antigens Recognized by CD4+ T Cells: New Strategies for Cancer Vaccine Design. *J Immunother.* 2001;24:195-204.
160. Toes RE, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med.* 1999;189:753-756.
161. Baxevanis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, Gritzapis AD, Sotiriadou R, Papamichail M. Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J Immunol.* 2000;164:3902-3912.
162. Burgert HG, White J, Weltzien HU, Marrack P, Kappler JW. Reactivity of V beta 17a+ CD8+ T cell hybrids. Analysis using a new CD8+ T cell fusion partner. *J Exp Med.* 1989;170:1887-1904.
163. Born W, White J, O'Brien R, Kubo R. Development of T cell receptor expression: studies using T cell hybridomas. *Immunol Res.* 1988;7:279-291.
164. McLaughlin J, Chianese E, Witte ON. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:6558-6562.

165. Wlodek L, Grabowska A, Marcinkiewicz J. The modulation of IL-2 dependent proliferation of CTLL-2 cells by 2- methyl-thiazolidine-2,4-dicarboxylic acid. *Immunopharmacology*. 1995;30:51-58.
166. Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther*. 2000;7:1063-1066.
167. Falk K, Rotzschke O, Strominger JL. Antigen-specific elimination of T cells induced by oligomerized hemagglutinin (HA) 306-318. *Eur J Immunol*. 2000;30:3012-3020.
168. Falk K, Rotzschke O, Santambrogio L, Dorf ME, Brosnan C, Strominger JL. Induction and suppression of an autoimmune disease by oligomerized T cell epitopes: enhanced in vivo potency of encephalitogenic peptides. *J Exp Med*. 2000;191:717-730.
169. Rosloniec EF, Brand DD, Myers LK, et al. An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen. *J Exp Med*. 1997;185:1113-1122.
170. Pear WS, Miller JP, Xu L, et al. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood*. 1998;92:3780-3792.
171. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999;50:213-219.
172. Woods A, Chen HY, Trumbauer ME, Sirotna A, Cummings R, Zaller DM. Human major histocompatibility complex class II-restricted T cell responses in transgenic mice. *J Exp Med*. 1994;180:173-181.
173. Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995;374:546-549.
174. Sandler AD, Chihara H, Kobayashi G, et al. CpG oligonucleotides enhance the tumor antigen-specific immune response of a granulocyte macrophage colony-stimulating factor-based vaccine strategy in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2003;63:394-399.
175. Blair PJ, Riley JL, Harlan DM, et al. CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J Exp Med*. 2000;191:651-660.
176. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*. 1992;357:80-82.
177. Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med*. 1992;175:1091-1101.
178. Zwickey HL, Unternaehrer JJ, Mellman I. Presentation of self-antigens on MHC class II molecules during dendritic cell maturation. *Int Immunol*. 2006;18:199-209.
179. Tewari MK, Sinnathamby G, Rajagopal D, Eisenlohr LC. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat Immunol*. 2005;6:287-294.
180. Oxenius A, Bachmann MF, Ashton-Rickardt PG, Tonegawa S, Zinkernagel RM, Hengartner H. Presentation of endogenous viral proteins in association with major histocompatibility complex class II: on the role of intracellular compartmentalization, invariant chain and the TAP transporter system. *Eur J Immunol*. 1995;25:3402-3411.
181. Ossendorp F, Mengede E, Camps M, Filius R, Melief CJ. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J Exp Med*. 1998;187:693-702.
182. Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, et al. Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol*. 2000;165:6047-6055.
183. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*. 2007;109:5346-5354.
184. He L, Feng H, Raymond A, et al. Dendritic-cell-peptide immunization provides immunoprotection against bcr-abl-positive leukemia in mice. *Cancer Immunol Immunother*. 2001;50:31-40.
185. Melo JV. BCR-ABL gene variants. *Baillieres Clin Haematol*. 1997;10:203-222.
186. Zeng Y, Graner MW, Feng H, Li G, Katsanis E. Imatinib mesylate effectively combines with chaperone-rich cell lysate-loaded dendritic cells to treat bcr-abl+ murine leukemia. *Int J Cancer*. 2004;110:251-259.
187. Graner MW, Zeng Y, Feng H, Katsanis E. Tumor-derived chaperone-rich cell lysates are effective therapeutic vaccines against a variety of cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 2003;52:226-234.
188. Whiteside TL. The role of immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Treat Res*. 2006;130:103-124.

189. Bogen B. Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *Eur J Immunol.* 1996;26:2671-2679.
190. Lauritzsen GF, Hofgaard PO, Schenck K, Bogen B. Clonal deletion of thymocytes as a tumor escape mechanism. *Int J Cancer.* 1998;78:216-222.
191. Zelenay S, Demengeot J. Comment on "Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells". *J Immunol.* 2006;177:2036-2037; author reply 2037-2038.
192. Stephens LA, Anderton SM. Comment on "Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells". *J Immunol.* 2006;177:2036; author reply 2037-2038.
193. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002;169:4712-4716.
194. Mandic M, Castelli F, Janjic B, et al. One NY-ESO-1-derived epitope that promiscuously binds to multiple HLA-DR and HLA-DP4 molecules and stimulates autologous CD4+ T cells from patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Immunol.* 2005;174:1751-1759.
195. Zarour HM, Storkus WJ, Brusica V, Williams E, Kirkwood JM. NY-ESO-1 encodes DRB1\*0401-restricted epitopes recognized by melanoma-reactive CD4+ T cells. *Cancer Res.* 2000;60:4946-4952.
196. Ochsenbein AF, Siervo S, Odermatt B, et al. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature.* 2001;411:1058-1064.
197. Kreider JW, Bartlett GL, Butkiewicz BL. Relationship of tumor leucocytic infiltration to host defense mechanisms and prognosis. *Cancer Metastasis Rev.* 1984;3:53-74.
198. Hong C, Lee H, Oh M, Kang CY, Hong S, Park SH. CD4+ T cells in the absence of the CD8+ cytotoxic T cells are critical and sufficient for NKT cell-dependent tumor rejection. *J Immunol.* 2006;177:6747-6757.
199. Chianese-Bullock KA, Irvin WP, Jr., Petroni GR, et al. A Multipptide Vaccine is Safe and Elicits T-cell Responses in Participants With Advanced Stage Ovarian Cancer. *J Immunother.* 2008.
200. Phan GQ, Touloukian CE, Yang JC, et al. Immunization of patients with metastatic melanoma using both class I- and class II-restricted peptides from melanoma-associated antigens. *J Immunother.* 2003;26:349-356.
201. Eisenbach L, Bar-Haim E, El-Shami K. Antitumor vaccination using peptide based vaccines. *Immunol Lett.* 2000;74:27-34.
202. Ferenczy A, Franco EL. Prophylactic human papillomavirus vaccines: potential for sea change. *Expert Rev Vaccines.* 2007;6:511-525.
203. Garcia Carranca A, Galvan SC. Vaccines against human papillomavirus: perspectives for controlling cervical cancer. *Expert Rev Vaccines.* 2007;6:497-510.
204. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004;10:909-915.
205. Spiotto MT, Schreiber H. Rapid destruction of the tumor microenvironment by CTLs recognizing cancer-specific antigens cross-presented by stromal cells. *Cancer Immunol.* 2005;5:8.
206. Spiotto MT, Fu YX, Schreiber H. Tumor immunity meets autoimmunity: antigen levels and dendritic cell maturation. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:725-730.
207. Schirmacher V. Clinical trials of antitumor vaccination with an autologous tumor cell vaccine modified by virus infection: improvement of patient survival based on improved antitumor immune memory. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54:587-598.
208. Weber JS, Hua FL, Spears L, Marty V, Kuniyoshi C, Celis E. A phase I trial of an HLA-A1 restricted MAGE-3 epitope peptide with incomplete Freund's adjuvant in patients with resected high-risk melanoma. *J Immunother.* 1999;22:431-440.
209. Lienard D, Rimoldi D, Marchand M, et al. Ex vivo detectable activation of Melan-A-specific T cells correlating with inflammatory skin reactions in melanoma patients vaccinated with peptides in IFA. *Cancer Immunol.* 2004;4:4.
210. Speiser DE, Lienard D, Rufer N, et al. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest.* 2005;115:739-746.
211. Novakovic S, Stegel V, Kopitar A, Ihan A, Novakovic BJ. Preventive and therapeutic antitumor effect of tumor vaccine composed of CpG ODN class C and irradiated tumor cells is triggered through the APCs and activation of CTLs. *Vaccine.* 2007;25:8241-8256.

212. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*. 1998;188:2357-2368.
213. Ostrand-Rosenberg S. CD4+ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Invest*. 2005;23:413-419.
214. Chaput N, Darrasse-Jeze G, Bergot AS, et al. Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. *J Immunol*. 2007;179:4969-4978.
215. Casares N, Arribillaga L, Sarobe P, et al. CD4+/CD25+ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination. *J Immunol*. 2003;171:5931-5939.
216. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 1999;163:5211-5218.
217. Cote AL, Usherwood EJ, Turk MJ. Tumor-specific T-cell memory: clearing the regulatory T-cell hurdle. *Cancer Res*. 2008;68:1614-1617.
218. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3(+) regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer*. 2008.
219. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198:1875-1886.
220. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res*. 2003;9:4404-4408.
221. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2003;9:606-612.
222. Liu L, Wu G, Yao JX, Ding Q, Huang SA. CD4+CD25high regulatory cells in peripheral blood of cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008;29.
223. Roth A, Rohrbach F, Weth R, Frisch B, Schuber F, Wels WS. Induction of effective and antigen-specific antitumor immunity by a liposomal ErbB2/HER2 peptide-based vaccination construct. *Br J Cancer*. 2005;92:1421-1429.
224. Mumberg D, Monach PA, Wanderling S, et al. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8633-8638.
225. Clarke SL, Betts GJ, Plant A, et al. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE*. 2006;1:e129.
226. Wong SB, Bos R, Sherman LA. Tumor-Specific CD4+ T Cells Render the Tumor Environment Permissive for Infiltration by Low-Avidity CD8+ T Cells. *J Immunol*. 2008;180:3122-3131.
227. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*. 1998;393:480-483.
228. Jacobs JF, Aarntzen EH, Sibelt LA, et al. Vaccine-specific local T cell reactivity in immunotherapy-associated vitiligo in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2008.
229. Smith KJ, Pyrdol J, Gauthier L, Wiley DC, Wucherpfennig KW. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA\*0101, DRB1\*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp Med*. 1998;188:1511-1520.
230. Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD, et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J Biomol Screen*. 2001;6:429-440.

## 6. Zusammenfassung

CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten übernehmen als Helfer-Zellen eine entscheidende Aufgabe in der Induktion und Koordination produktiver Immunreaktionen. Als Suppressorzellen können CD4<sup>+</sup>-T-Zellen destruktive inflammatorische Prozesse, welche zu Autoimmunreaktionen führen, unterbinden. Daneben können diese Zellen aber auch tumorspezifische Immunantworten supprimieren und zur Progression des Tumorwachstums beitragen. Dagegen kann eine gezielte Aktivierung spezifischer CD4<sup>+</sup>-Effektorzellen (Th1, Th2, Th17) zu einer effektiven anti-tumoralen Immunantwort führen.

In diesem Kontext befassen sich viele Gruppen mit der Identifizierung tumorspezifischer Epitope, welche therapeutisch eingesetzt werden könnten. Bei der Identifizierung BCR-ABL-relevanter Antigene wurde der Fokus größtenteils auf CD8<sup>+</sup>-Epitope aus der Breakpoint-Region des Fusionsproteins gelegt. Eine Reihe von Studien zeigen jedoch, dass die Aktivierung sowohl von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als auch von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von großer Bedeutung ist.

In dieser Arbeit wurde ein neues Antigen vorgestellt, welches der ABL-Kinase entstammt, die in BCR-ABL transformierten Zellen überexprimiert ist. Das CD4<sup>+</sup>-Antigen hABL908-922 ist HLA-DR1-restringiert und kann im humanisierten Mausmodell als Xenoantigen eine starke CD4<sup>+</sup>-spezifische Immunreaktion induzieren. Die hABL908-922-spezifischen T-Zellen können aber auch *ex vivo* in Lymphknoten und Milz BCR-ABL-transplanteder Mäuse detektiert werden. Gewisse anti-tumorale Effekte durch eine Vakzinierung mit hABL908-922 lassen sich erst nach Depletion von CD25<sup>+</sup>-T-Zellen feststellen. Da aber hABL908-922 eine reine CD4<sup>+</sup>-spezifische Immunreaktion induziert, ist das Epitop, trotz des Mangels einer vollständigen Tumorabstoßung, durchaus ein interessantes ABL-Epitop.

In Anlehnung an therapeutische Zwecke ist ein Vakzinierungsansatz mit autoreaktiven Antigenen, wie es für hABL908-922 im Menschen der Fall wäre, generell kritisch zu betrachten, da mögliche Autoimmunreaktionen nicht auszuschließen sind. Dennoch kann die Identifizierung solcher Antigene für mögliche Modifikationen bezüglich spezifischer T-Zell-Rezeptoren relevant werden, da für die Abwehr nicht-viraler Tumore die Induktion der Autoimmunität ein wichtiger Faktor ist.

Ein weiterer Teil der hier vorgelegten Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung der niedermolekularen chemischen Verbindung 2-(1-adamantyl)ethanol (AdEtOH). AdEtOH konnte als allelspezifischer Katalysator der Peptid-Beladung identifiziert werden. Als Katalysator kann AdEtOH sowohl Antigen-spezifische CD4<sup>+</sup>-Immunreaktionen *in vitro* als auch *in vivo* verstärken. Die Ergebnisse zeigen, dass die allelspezifische katalytische Aktivität des AdEtOH mit der Ausprägung der Aminosäure Glycin an der Position  $\beta$ 86 in der P1-Tasche des MHC-Klasse-II-Moleküls korreliert. Eine allelspezifische Verstärkung

der Immunreaktion kann auch bei Zugabe von AdEtOH als Additive zum Adjuvans erreicht werden.

## 7. Summary

CD4<sup>+</sup> T cells play a crucial role in induction and coordination of immune reaction leading to tumor regression and better survival. However CD4<sup>+</sup> T cells, namely regulatory T cells control immune response and have suppressive function to prevent autoimmune reactions. Hence such cells could also suppress specific immune responses against tumor antigens. Several studies could show, that the activation of tumor specific T cells and the depletion of regulatory T cells leads to an overall better clinical outcome.

Current immunotherapies are based on CD8<sup>+</sup> T cells recognizing antigens from the breakpoint region, which are actually tumor-specific antigens. However there are only some candidates for immune based therapeutic application. It could demonstrate that the vaccination with tumor-specific antigens induce specific CD8<sup>+</sup> T cell response. Nevertheless up to now there is no appreciable clinical success. However recent publications show that CD4<sup>+</sup> T cells play also a key role in induction of effective anti-tumor response. Therefore the combination of both activation of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells could increase and ameliorate tumor regression. For that reason there is a need to discover tumor-specific and tumor-associated antigens in terms of CD4 T cells.

In this context we investigated here the immunogenicity of our newly identified ABL-derived CD4<sup>+</sup> T cell epitope. This epitope is located within the ABL-region, which itself is over expressed in BCR-ABL expressing cells. Due to the construction of the BCR-ABL fusion protein, the ABL-component is basically equal in all Ph<sup>+</sup> leukemias.

Here we show that the epitope ABL908-922, which is restricted to HLA-DR1, is able to induce strong immune reaction in HLA-DR1tg mice. Moreover we could demonstrate that this peptide is processed and presented by HLA-DR1 expressing dendritic cells, which were previously infected with BCR-ABL protein. In addition hABL-specific CD4<sup>+</sup> T cells can be activated by transplantation of BCR-ABL<sup>+</sup> tumor cells. Furthermore the effectiveness of hABL908-922 specific CD4 T cells was investigated in a BCR-ABL<sup>+</sup> tumor model. With immunization of hABL908-922 we could not detect any tumor reduction or delay. But the inclusion of Treg depletion within the vaccination protocol promote the activation of hABL908-922 specific CD4 T cells, which results in certain tumor delay. Additional to the analysis of ABL-antigens, we investigated the role of MHC loading enhancer (MLE), which are small organic compounds. Recently we published that MLEs like pCP are capable to enhance peptide loading at the surface of Antigen presenting cells. Here we could characterize an organic molecule, AdEtOH which catalyzes in an allele-specific manner. The allele-specificity is correlated with the expression of Glycin at the position  $\beta$ 86 in the P1-pocket. Moreover we used AdEtOH to investigate the effect *in*

*vivo*. We could show that the enhancement of AdEtOH as adjuvant additive is reflected in an increased specific immune response *in vivo*. However the role of such MLE for treatment is not clear and have to be explored in further studies.

## 8. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABL	Abelson murine leukemia Kinase
AdEtOH	Adamanthanethanol
ALL	akute Lymphatische Leukämie
AML	akute Myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäuren
Bp	Basenpaare
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BSA	Rinderserumalbumin (engl.:bovine serum albumin)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Differenzierungantigen (engl.: cluster of differentiation)
CFA	Komplettes Freundesches Adjuvans (eng.: Freundesches adjuvant complete)
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
cpm	gezählte Ergebnisse pro Minute (engl.: counts per minute)
CREB	CREB (engl.: cAMP response element binding)-Proteine sind Transkriptionsfaktoren
CTL	zytotoxische T-Zellen
DCs	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ELISPOT	<i>enzyme-linked immunospot assay</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
fwd	vorwärts / forward
FOXP3	CD25+Treg spezifischer Transkriptionsfaktor <i>forkhead box 3</i>
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> , genetische Bezeichnung für menschliche Haupthistokompatibilitätskomplexe, die einzelnen Genloci sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet und die Allele durch Zahlen
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography)
HRP	Meerrettich-Peroxidase-Enzym <i>horse raddish Peroxidase</i>
Ic	<i>invariant chain</i>
IFA	inkomplettes Freundesches Adjuvans (engl.: Freundesches adjuvans incomplete)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
JAK	Janus-Kinasen
kDa <sup>12</sup> C)	Kilo-Dalton ( 1Da =1/12 der Masse des Kohlenstoff-Isotops
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
MAP	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute(n)

MLE	MHC-Beladungskatalysator (engl.:MHC-loading enhancer)
mut	Mutante
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF-R	<i>platelet-derived growth factor</i> -Rezeptor
Ph <sup>+</sup>	Philadelphia-Chromosom-positiv
PLP	Proteolipidprotein
PI3-K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
RAG	Rekombinationsaktivierungsgen (RAG-2/- Deletion dieses Gens führt in entsprechenden Mäusen zum Verlust von T-und B-Zellen)
RB	Retinoblastoma-Protein: Tumorsuppressor-Protein
rev	rückwärts/ reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.:rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	Sekunde
SCF	Stammzellenfaktor (engl.: stem cell factor)
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt (engl.: severe combined immunodeficiency), Sammelbezeichnung für Krankheiten, die Fehlfunktionen im Immunsystem aufweisen
SCT	Stammzellen-Transplantation
Src	Rous-Sakromvirus
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAA	tumorassoziertes Antigen
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (engl.: transforming growth factor)
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Units (Enzymeinheiten)
V	Volt
wt	Wildtyp

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in der Arbeitsgruppe Zelluläre Immunologie unter der Leitung von Dr. Olaf Röttschke und Dr. Kirsten Falk angefertigt.

Bei Dr. Olaf Röttschke und Dr. Kirsten Falk möchte ich mich für die Übergabe des interessanten Themas bedanken und für ihre Unterstützung bei der Durchführung meines Projektes. Ich danke für die wissenschaftlichen Diskussionen und Denkanstöße. Bei Priv. Doz. Christian Freund, Prof. Udo Heinemann und Dr. Martin Lipp möchte ich mich für Ihr Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe, die mir die Möglichkeit gab, meine Arbeit mit ihrer umfangreichen Unterstützung, in einer harmonischen und freundschaftlichen Atmosphäre anzufertigen. Ich bedanke mich dafür, dass sie eigene Erfahrungen mit mir geteilt haben und mir manche nützliche Tipps gaben.

Ich möchte mich besonders bei Katharina Dickhaut bedanken, mit der ich einige Projekte gemeinschaftlich bearbeitet habe. Ich bedanke mich für manches ermunternde Wort und für die Gesellschaft an manchen langen Abenden. Ich bedanke mich auch bei Sebastian Günther für seine Unterstützung und die Modellierung der Bilder. Ich bedanke mich bei allen, die ein offenes Ohr für meine Probleme und gute Ratschläge hatten, sowie manche konstruktive Kritik.

Ich möchte mich bei Jörg Scheffel bedanken, mit dem ich so machen Gedankengang diskutiert habe und mit dem ich an vielen Abenden in wissenschaftlichen Diskussionen versunken bin. Danke für deine Hilfe und für deine seelische Unterstützung!

Ich möchte mich bei unseren Sekretärinnen P.Heink und S.Giering für ihre organisatorische Hilfe bedanken.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mir die Voraussetzungen schufen, meinen Werdegang so zu gestalten, wie ich es mir vorstellte und die mir in den letzten Zügen dieser Arbeit den Rücken stärkten und mich herzlich begleiteten.