

Adoptiver T-Zell-Transfer zur Therapie hochmaligner
Lymphome im *c-myc*-transgenen Mausmodell

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

Cornelia Fahrenwaldt

aus Rostock

Erlangen, 2014

Diese Arbeit wurde von September 2009 bis April 2014 unter der Leitung von Prof. Dr. med. Armin Gerbitz an der medizinischen Klinik III der Charité Berlin (Campus Benjamin Franklin), dem Institut für Immunologie der Freien Universität Berlin und der medizinischen Klinik V des Universitätsklinikums Erlangen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Armin Gerbitz

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Blankenstein

Disputation am 17.07.2014

Inhalt

Zusammenfassung	1
Summary	2
1. Einführung	4
1.1 Tumorsuppressormechanismen.....	4
1.1.1 Apoptose	4
1.1.2 Seneszenz	6
1.2 Immuntherapie.....	9
1.3 B-Zelllymphome	11
1.4 λ -MYC-Mausmodell	11
1.5 Fragestellung dieser Arbeit	12
2. Material und Methoden	15
2.1 Mauslinien	15
2.2 Genotypisierung	16
2.2.1 DNA-Extraktion aus Mausschwanzbiopsien	16
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	16
2.2.3 OT-1-T-Zell Analyse.....	18
2.3 Zelllinien und Zellkultur	19
2.3.1 Gewinnung permanenter Myc-Zelllinien.....	19
2.3.2 Retrovirale Transduktion	20
2.4 Western Blot.....	21
2.5 Enzymimmunoassays (ELISA)	23
2.6 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR).....	23
2.7 Histologie und Immunhistochemie	23
2.7.1 SA- β -Galaktosidase-Assay	24
2.8 Kokultur-Experimente	25
2.9 Durchflusszytometrie	25
2.10 Tumortransfer-Experimente	25
2.11 Chemotherapie.....	26
2.12 OT1-T-Zell-Isolation und Transfer.....	27
2.13 Generierung λ -OVA transgener Mäuse	27
2.14 Software	29
3. Ergebnisse	30
3.1 Adoptiver T-Zelltransfer bei transplantierten Tumoren mit Apoptosedefekten	30
3.1.1 Herstellung Apoptose-defizienter Lymphom-Zelllinien mit Expression eines spezifischen Antigens	30

3.1.2	Zelllinien mit Apoptosedefekten sind weniger empfindlich gegenüber Chemotherapie	33
3.1.3	Chemotherapie <i>in vitro</i> induziert Seneszenz in <i>bcl-2</i> -überexprimierenden Zellen	36
3.1.4	Die Expression von MHC-Molekülen wird durch Chemotherapie nicht verändert	37
3.1.5	Zelllinien mit Apoptosedefekten werden von T-Zellen <i>in vitro</i> erkannt und eliminiert	38
3.1.6	Seneszente Zellen werden von antigenspezifischen T-Zellen lysiert	41
3.1.7	Generierung OVA-toleranter Mäuse	42
3.1.8	OT-1-T-Zelltoleranz in λ -OVA-Mäusen wird durch Chemotherapie unterbrochen.....	45
3.1.9	<i>Bcl-2</i> -Überexpression in Lymphomen führt zur verbesserten T-Zell-vermittelten Remission <i>in vivo</i>	47
3.1.10	Rezidierte Tumore sind Antigenverlust-Varianten	54
3.1.11	EDX-behandelte Lymphome enthielten kaum seneszente Zellen.....	58
3.2	Adoptiver T-Zelltransfer bei autochthonen λ -OVA x λ -MYC-Tumoren	60
3.2.1	Chemotherapie in Kombination mit adoptivem OT-1-Transfer bewirkt kein verlängertes Überleben.....	60
3.2.2	Tiere mit langer Tumoraltenz zeigen eine längere Remissionsdauer nach adoptivem T-Zelltransfer	62
3.2.3	Rezidierte Tumore sind Antigen-positiv	64
4.	Diskussion	68
4.1	Antigenverlust bei transplantierten <i>bcl-2</i> -überexprimierenden Lymphomen nach Chemotherapie und adoptivem T-Zelltransfer.....	68
4.2	Einfluss von <i>bcl-2</i> -Überexpression auf die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Antigenverlustvarianten.....	69
4.3	Rolle der <i>p53</i> -Defizienz für das verbesserte Überleben von Tumoren nach Chemotherapie und adoptivem T-Zelltransfer.....	71
4.4	Antigenverlustvarianten und Tumormgröße	72
4.5	T-Zelltoleranz im autochthonen Tumormmodell	73
4.6	Aggressivität von Lymphomen in Abhängigkeit ihrer Latenzzeit	74
4.7	Vergleich der Tumormodelle.....	75
4.8	Fazit	76
5.	Referenzen	77
6.	Anhang.....	85
7.	Danksagung.....	87

Zusammenfassung

Überwiegend wird mit der Überexpression des Apoptoseinhibitors Bcl-2 oder dem Verlust des zentralen Tumorsuppressorproteins p53 bei Tumoren eine negative Prognose assoziiert, da sie eine erhöhte Aggressivität aufweisen und Resistenzen gegenüber Chemotherapie und Strahlentherapie besitzen. Nach allogener Stammzelltransplantation, deren *Graft-versus-Tumor*-Effekt auf der zytotoxischen Aktivität von T-Zellen beruht, ließ sich bei Chemotherapie-resistenten Lymphomen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Progression der Krankheit beobachten. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob Chemotherapie-resistente Lymphome und durch Chemotherapie induzierte seneszente Lymphomzellen für T-Zelltherapie schlechter zugänglich sind.

Mit Hilfe der λ -MYC-Maus wurden hochmaligne *c-myc*-getriebene Lymphomzelllinien mit *bcl-2*-Überexpression und *p53*-Defizienz hergestellt und mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA) versehen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zelllinien Chemotherapie-resistent sind und *in vitro* Seneszenz als zweite DNA-Schadensstrategie ausbilden. Sowohl Chemotherapie-resistente als auch seneszente Lymphomzellen wurden von OVA-spezifischen OT-1-T-Zellen lysiert. Mit der λ -OVA-Maus, die OVA als B-zellspezifisches Antigen exprimiert, wurde eine OVA-tolerante Maus generiert, die das Antigen in normalen B-Zellen, aber auch nach Transplantation von OVA-positiven Lymphomzellen in der Neoplasie selbst trägt. Nach Chemotherapie und adoptivem T-Zelltransfer zeigten Mäuse mit transplantierten *bcl-2*-überexprimierenden Lymphomen statt des erwarteten verkürzten progressionsfreien Überlebens eine deutlich verlängerte Remissionsdauer. In weniger ausgeprägter Form konnte diese Verbesserung auch bei ersten Versuchen mit *p53*-defizienten Tumoren beobachtet werden. Da Rezidive OVA-negativ vorlagen, war davon auszugehen, dass *bcl-2*-Überexpression die Wahrscheinlichkeit für die Selektion von Antigenverlustvarianten nach Chemotherapie verringerte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden autochthone Lymphome von Mäusen der Kreuzung λ -OVA- x λ -MYC-Maus mit Chemotherapie und adoptivem OT-1-T-Zelltransfer behandelt. Es zeigte sich hier, dass der adoptive T-Zelltransfer, im Vergleich zur Behandlung mit Chemotherapie allein, insgesamt keine Verbesserung des Überlebens bewirkte. Allerdings war bei einer Gruppe von Mäusen mit verlängerter Latenz des Primärlymphoms ein verlängertes progressionsfreies Überleben zu beobachten. Rezidive waren in diesem Fall OVA-Antigen-positiv, weshalb die Induktion von T-Zelltoleranz vermutet wurde.

Diese Arbeit zeigt, dass *bcl-2*-Überexpression und eventuell auch *p53*-Defizienz in Lymphomen mögliche positive prognostische Faktoren für den adoptiven T-Zelltransfer nach Chemotherapie, zumindest aber kein Hindernis darstellen. Die Ergebnisse aus dem autochthonen Modell weisen darauf hin, dass im jungen Alter auftretende Lymphome eine höhere Aggressivität aufweisen können und dass in der klinischen Situation des adoptiven T-Zelltransfers mit B-zellspezifischem Zielantigen die Induktion von T-Zelltoleranz eher ein Problem darstellt als die Selektion von Antigenverlustvarianten.

Summary

Over-expression of the apoptosis inhibitor Bcl-2 or loss of the central tumor suppressor p53 in tumors is generally associated with negative prognosis, as these tumors show increased aggressiveness and resistance to chemotherapy and radiotherapy. It has been observed that after allogeneic stem cell transplantation (whose *graft-versus-tumor* effect is based on cytotoxic activity of T-cells), the probability of progression of the disease was elevated for chemotherapy resistant lymphomas. Consequently the question has been raised whether chemotherapy-resistant lymphomas and therapeutically induced senescent lymphoma cells are less accessible to T-cell therapy.

With the help of the λ -MYC mouse model, highly malignant *c-myc*-driven lymphoma cell lines were generated and supplied with the model antigen ovalbumin (OVA). It could be shown that these cell lines are chemotherapy-resistant and develop senescence as a second DNA damage strategy. Both chemotherapy-resistant and senescent cells were lysed by OVA-specific OT-1 T-cells. With the λ -OVA mouse (which expresses OVA as B-cell specific antigen) an OVA tolerant mouse was generated, which carries the antigen in normal B-cells as well as in the neoplasia itself — the transplanted OVA-positive lymphoma cells. After chemotherapy and adoptive T-cell transfer, mice with transplanted *bcl-2* over-expressing lymphomas clearly showed a prolonged remission instead of the expected decline in progression-free survival. This improvement was also observed (albeit less obviously) in *p53*-deficient tumors. As relapsed tumors were OVA-negative, it could be concluded that *bcl-2*-over-expression reduces the probability for the selection of antigen-loss variants after chemotherapy.

In the second part of this work autochthonous lymphomas of mice generated by intercrossing λ -OVA with λ -MYC mice were treated with chemotherapy and OT-1 T-cell transfer. Here it could be

shown that adoptive T-cell transfer compared with chemotherapy treatment alone did not result in improved survival. However, a group of mice with prolonged latency of the primary tumor showed prolonged progression-free survival. In this case relapsed tumors were OVA-positive. Therefore induction of T-cell tolerance was presumed.

This work shows that *bcl-2*-over-expression and optionally *p53*-deficiency in lymphomas may represent positive prognostic factors for adoptive T-cell transfer after chemotherapy and at least do not seem to impede remission. The results from the autochthonous model point towards higher aggressiveness in tumors which develop at a young age, and lead to the conclusion that the induction of T-cell tolerance in the case of adoptive T-cell transfer with B-cell specific target antigen poses more of a problem than selection of antigen loss variants.

1. Einführung

1.1 Tumorsuppressormechanismen

Krebs entsteht durch eine Serie aufeinander folgender Mutationen in Genen, welche die Funktion einer spezifischen Reihe von Signalwegen verändern. Diese Signalwege initiieren Mechanismen, die in drei Hauptkategorien eingeteilt werden können: Zelldifferenzierung, Zellreparatur und Zellüberleben².

Im täglichen Normalfall, in dem unsere Körperzellen vielfachen toxischen Umwelteinflüssen und körpereigenen metabolischen Prozessen ausgesetzt sind, werden bei Schädigung der Zelle umfangreiche DNA-Schadensprogramme in Gang gesetzt, die vor irreversibler Schädigung schützen. Tumorsuppressormechanismen bewahren die Zelle vor maligner Transformation vor allem durch Zellzyklus-Regulation, DNA-Reparatur und Induktion von Apoptose.

1.1.1 Apoptose

Apoptose, der programmierte Zelltod, der überwiegend als DNA-Schadensantwort eingeleitet wird, gehört zu den wichtigsten Tumorsuppressormechanismen. Auf ihm basiert im Wesentlichen die Wirkungsweise der klassischen zytostatischen Chemotherapie, die neben der Operation und Strahlentherapie als grundlegende Krebsbehandlungsmodalität angewandt wird.

Zwei verschiedene Signalwege, die an vielen Punkten reguliert werden, lösen Apoptose aus. Der intrinsische Hauptsignalweg ist verantwortlich für Signale von Überlebensfaktoren, Zellstress und Beschädigungen. Die Schaltzentrale dieses Weges ist das Mitochondrium. Im intermembranösen Spalt werden bei Aktivierung des Signals eine Reihe von pro-apoptotischen Faktoren sezerniert, die bei Freigabe in die Zelle den Zelltod veranlassen. Die Mitochondrien-Permeabilität wird durch ein komplexes Netzwerk an Interaktionen zwischen Proteinen der Bcl-2-Familie reguliert (Überblick³), das heißt stark vereinfacht durch das Verhältnis der Aktivität pro-apoptotischer Bax/Bak-Proteine und ihrer anti-apoptotischen Gegenspieler Bcl-2/BclX. Die Aktivität dieser Proteine wird über verschiedene BH3-*only* Angehörige (Bcl-2-Familie, mit Bcl-2-Homologie-3-Domäne) positiv oder negativ beeinflusst. Apoptose wird eingeleitet, wenn der schützende Bcl-2/BclX-Puffer durchbrochen wird durch die Summe der aktiven BH3-*only*-Proteine, die zur Dominanz der pro-apoptotischen Bax/Bak-Proteine führt. Diese permeabilisieren die Membran und setzen damit pro-apoptotische Faktoren frei. Einer dieser Faktoren, das Cytochrom c, leitet

mit Hilfe des Zelltod-Adapters Apaf1 die Aktivierung der Cystein-Protease Caspase-9 ein, welche eine proteolytische Downstream-Kaskade auslöst, an der Caspase-3 und Caspase-7 beteiligt sind. Im aktivierten Zustand spalten diese Caspasen Proteine, die zuständig sind für die Aufrechterhaltung des Genoms und der Integrität der Zelle, und ordnen Tod und Phagozytose der Zelle an. Die Regulation des intrinsischen Apoptose-Signalwegs erfolgt auf vielen Stufen: Auf der transkriptionellen und posttranskriptionellen Ebene der Bcl-2/BH3-*only* Proteine, der Expression von Todes-Effektor Komponenten und einer Klasse von Caspase-Blockern, bekannt als Apoptoseinhibitoren IAPs (*Inhibitors of Apoptosis*).

Der extrinsische Apoptose-Signalweg wird durch Andocken von Liganden wie FasL, TNF α , und Trail an die Todesrezeptoren Fas/CD95, TNFR (Tumornekrosefaktor-Rezeptor) und DR5 der Zelloberfläche ausgelöst. Diese verbundenen Elemente bilden den Tod-induzierenden Signalkomplex DISC (*Death inducing signalling complex*), der die initiatorische Caspase-8 aktiviert. In einigen Zelltypen ist dies ausreichend für Einleitung der *Downstream*-Caspasen. In anderen Zellen wird zusätzlich zum Todesrezeptor-Signal auch die Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs über das BH3-*only*-Protein Bid benötigt^{4,5}, das durch Caspase-8 aktiviert wird. Der extrinsische Signalweg wird durch *Decoy*-Rezeptoren moduliert, die Liganden binden, aber keine Signalfunktion besitzen und über intrazelluläre Moleküle, wie FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*), das mit Caspase-8 um die Bindung an den DISC konkurriert. Hinzu kommen auch hier IAPs, die die Initiator-Caspasen, sowie Effektor-Caspasen des Signalwegs modulieren (Überblick⁶).

Ein zentrales Tumorsuppressorprotein, das wegen seiner vielfältigen Funktionen auch als „Hüter des Genoms“ bezeichnet wird, ist p53. Wird die Ubiquitinierung dieses Proteins durch MDM2 über *Upstream*-Schadenssignale z.B. ARF unterbrochen, so wird p53 stabilisiert und akkumuliert⁷. Damit neoplastische Proliferation verhindert wird, arretiert p53 zuerst den Zellzyklus. Danach werden Reparaturmechanismen eingeleitet. Liegt die DNA-Schädigung, z.B. durch Chemotherapie, jedoch in einem Ausmaß vor, das nicht reparabel ist, so wird der mitochondriale Apoptose-Signalweg eingeleitet. P53 fungiert dabei nicht nur als Transkriptionsfaktor im Zellkern und reguliert dort die Ableseung pro- und anti-apoptotischer Proteine, sondern interagiert auch lokal im Mitochondrium⁸ mit Proteinen der Bcl-2-Familie⁹.

Die Blockade von Apoptose ist ein typisches Kennzeichen für Krebszellen, das zu unkontrolliertem Tumorwachstum und Chemotherapie-Resistenz führt. Als Vermittler zahlreicher Tumorsuppressor-Funktionen unterliegt p53 besonders häufig Schädigungen, die zu Neoplasien führen. Die Mehrheit aller humanen Krebsentitäten weist p53-Defizienzen oder Störungen von *Upstream*-Signalen auf, die dazu geführt haben, dass p53 ausgeschaltet ist. Folgen davon sind reduzierte

Kapazitäten der DNA-Reparatur und gestörte Apoptose-Signalgebung. Diese werden besonders beim menschlichen Li-Fraumeni-Syndrom¹⁰ deutlich. Betroffene dieser dominant vererbten Disposition erkranken bedingt durch das nur einfach vorhandene *p53*-Wildtypallel¹¹ mit hoher Wahrscheinlichkeit an Sarkomen und einer Reihe anderer Tumorarten, wie Brustkarzinomen und Malignomen des zentralen Nervensystems. Ausgewachsene Tumore dieser Patienten weisen sporadische Mutationen im einzelnen *p53*-Allel auf, die zum Funktionsverlust des Proteins führten. *P53*-Defizienz wird generell mit aggressivem Krebs, Chemotherapie-Resistenz und schlechter Prognose assoziiert (s. Überblick¹²).

Auch Aktivitätsänderungen innerhalb der *Bcl-2*-Familie sind in Krebszellen häufig zu finden. Hochregulierte anti-apoptotische Proteine erlauben Krebszellen vielfältige Stressfaktoren zu tolerieren, die üblicherweise zum Zelltod führen würden. Eines dieser Proteine ist der Apoptoseinhibitor *Bcl-2*. Er wurde im Zusammenhang mit der Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ im folliculären Lymphom entdeckt. Dort gerät das *bcl-2*-Gen in der Prä-B-Zellphase während des Immunglobulin(Ig)-Gen-Rearrangements^{13,14} in den Lokus der schweren Ig-Kette¹⁵ und wird somit als Fusionsgen gemeinsam mit Ig abgelesen. Normalerweise liegt das Protein in differenzierten B-Zellen herunter reguliert vor, im Fall der Translokation des Gens jedoch kommt es zur Überexpression von *bcl-2*. Transgene *bcl-2*-Ig-Mäuse¹⁶ zeigten Lymphadenopathien mit einer vergrößerten Population folliculärer B-Lymphozyten und Überlebensvorteilen reifer B-Zellen *in vitro*. Tumore entwickelten sich aber nur sehr langsam¹⁷. Daraus wurde geschlossen, dass erst zusätzliche genetische Veränderungen zur Entstehung hochgradiger Lymphome beitragen. Unterstützt wurde diese Vermutung in diesem Mausmodell damit, dass in der Hälfte der gewachsenen Lymphome die *myc*-Translokation $t(8;14)$ nachweisbar war. *Bcl-2*-Überexpression kommt nicht nur in B-Zelllymphomen vor, sondern wurde bei vielen weiteren Krebsarten, wie z.B. Prostata-, Kolorektal-, Magen-, und Lungenkrebs nachgewiesen. Erkrankungen, die diese Veränderung aufweisen, sind wie das folliculäre Lymphom überwiegend resistent gegenüber Chemotherapie und dementsprechend schwer behandelbar.

1.1.2 Seneszenz

Im Zusammenhang mit Chemotherapieresistenz¹⁸ und ursprünglich als Folge von *HRAS*-Onkogen-Überexpression¹⁹ wurde Seneszenz als weiterer wichtiger Tumorsuppressormechanismus entdeckt, der über *p53* vermittelt wird. Dabei handelt es sich um einen Prozess, der ursprünglich als Zellalterungsvorgang in Zellkultur von Fibroblasten²⁰ entdeckt wurde. Hayflick et al. beobachteten *in vitro*, dass die Teilung dieser Zellen nach vielfachen Passagen irreversibel zum Stillstand kam. Erst später wurde dieser permanente Zellzyklusarrest auch als

Tumorsuppressormechanismus *in vitro*¹⁹ und *in vivo*^{21,22} identifiziert. Während der Arrest bei „replikativer“ Seneszenz durch die voranschreitende Telomerverkürzung²³ im Verlauf der vielfach wiederholten Zellteilung in Gang gesetzt wird, so wird er bei „prämaturer“ Seneszenz durch akuten Stress, wie Onkogenaktivierung, oxidative Schädigung oder Chemotherapie ausgelöst. Beide Seneszenztypen werden über DNA-Schadensprogramme vermittelt. Statt pro-apoptotischer Proteine aktiviert p53 hier p21. Dieses interagiert mit den Zyklin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinase, CDK*) CDK2/4 und leitet damit einen permanenten Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase ein. Der Übergang von der G1- zur S-Zellzyklusphase wird auch über den p53-unabhängigen p16-Retinoblastom-Signalweg vermittelt. Dabei bindet p16 (Überblick²⁴) an CDK4/6 und verhindert mit der Blockierung der Kinase-Funktionen die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb). Dieses hält den Transkriptionsfaktor E2F1 durch Bindung im Cytoplasma davon ab seine Zielgene, die den G1/S-Übergang einleiten, im Zellkern zu transkribieren. Braig et al.²¹ zeigten, dass die Expression von S-Phase vermittelnden Genen dabei durch die lokale Ausbildung von Heterochromatin über Methylierung des Histons H3 an Lysin 9 (H3K9me) verhindert wird. Daraus wurde geschlossen, dass Seneszenz ein epigenetisch regulierter Prozess ist, der von Proteinen, wie der Rb-assoziierten Histonmethyltransferase Suv39h1 reguliert wird.

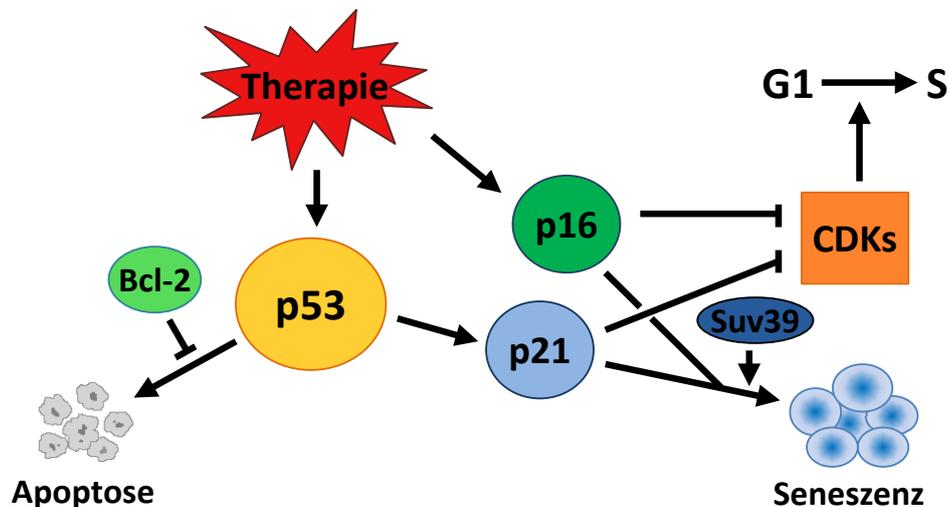


Abbildung 1 nach Schmitt¹: Schematische Darstellung Therapie-induzierter Apoptose- und Seneszenz-Signalwege. Beide Tumorsuppressormechanismen werden jeweils über das zentrale Tumorsuppressorprotein p53 vermittelt. Dabei kann Apoptose durch Bcl-2-Überexpression blockiert werden. Seneszenz kann auch p53-unabhängig über p16 eingeleitet werden. Dieses Protein inhibiert, genauso wie das über p53 aktivierte p21, spezifische Cyclin-abhängige Kinasen und verhindert damit den Wiedereintritt in die S-Zellzyklusphase. Ein Protein, das essentiell ist für den Eintritt in die Seneszenz ist die Histonmethyltransferase Suv39h1 (Suv39).

Eine Vermittlung von Seneszenz über die DNA-Schadensantwort wurde in vielen verschiedenen Krebs-Typen *in vitro* gezeigt. Zweifel, dass es sich nur um ein Kulturphänomen handeln könnte, wurden durch *in vivo*-Studien ausgeräumt und die klinische Relevanz des Prozesses bestätigt. So fanden Michaloglou *et al.*²⁵ Seneszenz in Melanozyten menschlicher Muttermale, die onkogene Mutationen in BRAF, einer Proteinkinase und *Downstream*-Effektor von Ras, aufwiesen. Da Muttermale überwiegend wachstumsarretiert bleiben bzw. sich über Jahrzehnte nicht verändern, schlossen sie, dass Seneszenz tatsächlich die Funktion eines protektiven, physiologischen Mechanismus einnimmt. Im Vergleich von Prostata-Tumoren vor und nach Chemotherapie mit Mitoxantron wurde Seneszenz ebenfalls als klinisch relevantes Phänomen entdeckt. Tumore, die chemotherapeutisch behandelt worden waren, wiesen vermehrt Zellen mit Expression der p16- und p21-Seneszenzmarker auf²⁶. Zunächst als Mechanismus der Tumorabwehr entdeckt, ergibt sich mit neueren Studien ein widersprüchliches Bild, was den positiven Einfluss von Seneszenz betrifft. In einer aktuelleren Studie²⁷ wurden Patienten mit malignem pleuralem Mesotheliom nach neoadjuvanter Chemotherapie auf die Seneszenzmarker p21 und PAI-1 untersucht. Patienten mit Tumoren, die die beiden Marker in erhöhter Form aufwiesen, zeigten wenig bis keine Reaktion auf die Behandlung. Überlebensdaten bestätigten, dass Seneszenzinduktion nach Tumorbehandlung mit Chemotherapie mit einem schlechten klinischen Ausgang assoziiert war. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie zur Seneszenz in nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom²⁸. Patienten, in deren operativ entfernten Lungentumoren nach Chemotherapie seneszente Zellen nachweisbar waren (78%), zeigten ein deutlich verringertes Gesamtüberleben.

Überlebensdaten dieser Art beweisen jedoch noch nicht, dass der schlechte klinische Ausgang tatsächlich auf dem seneszenten Zustand der Zellen selbst und nicht auf Seneszenz-auslösender Apoptoseblockade beruht. Aber es gibt Anlass zur Vermutung, dass Zellen in der Seneszenz ein malignitätsförderndes Potential besitzen. Denn seneszente Tumorzellen bleiben metabolisch aktiv und weisen einen Seneszenz-assoziierten sekretierenden Phänotyp (SASP) auf, der Veränderungen im Stroma fördern kann^{26,29}, welche erneutes malignes Wachstum ermöglichen. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass SASP-Zellen parakrin, über TGF- β und IL-1, ihren seneszenten Zustand auf umliegende Zellen übertragen können³⁰. Diese auf den ersten Blick tumorprotektive Eigenschaft, birgt auch die Möglichkeit, dass Immunzellen im Umfeld dieser Zellen durch Seneszenz außer Kraft gesetzt werden³¹. Desweiteren gibt es erste Hinweise auf arretierte Tumorzellen, die ihre Teilungsfähigkeit wieder erlangen^{32,33}. Es wurde u.a. gezeigt, dass Lungenkrebszellen durch Hochregulation von CDK1^{19,28,34,35} in der Lage sind den seneszenten Zustand wieder zu verlassen. Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass Tumorrezidive nach Chemotherapie auf den Teil der

Tumorzellen zurückgehen könnte, der zwischenzeitlich in den seneszenten Zustand eingetreten ist, diesen aber wieder verlassen hat.

1.2 Immuntherapie

Erweiterte Möglichkeiten der Behandlung Chemotherapie-resistenter Krebserkrankungen ergeben sich mit dem Forschungsfeld der Immuntherapie. Chemotherapie, Strahlentherapie und Chirurgie stellen zur Zeit noch die Hauptbehandlungsmodalitäten für Krebs dar. Doch häufig entziehen sich Tumorzellen dem Einfluss dieser Methoden durch Resistenzen und Metastasierung, so dass alternative Behandlungsformen gefunden werden müssen. Ziel aktueller Forschungsarbeiten ist die Aufhebung der Toleranz und die Aktivierung des Immunsystems gegen die entarteten Zellen. Prinzipiell ist das Immunsystem in der Lage neoplastische Zellen zu erkennen. Erste Hinweise für diese Fähigkeit wurden 1943 von Gross³⁶ durch Immunisierungsversuche erbracht, weitere folgten in den 50er und 60er Jahren³⁷⁻⁴⁰. Klein et al⁴⁰ zeigten 1960, dass Mäuse nach Immunisierung gegen autochthone Sarkomzellen in der Lage waren diese körpereigenen Krebszellen abzustößten. Inzwischen gilt als gesichert, dass als Voraussetzung für die Erkennung Merkmale nötig sind, die entartete von gesunden Körperzellen unterscheiden, sprich das Vorhandensein tumorspezifischer Antigene. Dies können virale, mutierte und fusionierte Proteine sein⁴¹.

Da bei vielen Krebserkrankungen bisher keine verwertbaren tumorspezifischen Antigene identifiziert werden konnten, werden in Forschung und Therapie auch tumorassoziierte Antigene als Ziel der Immunantwort anvisiert. Dazu gehören entwicklungs- und gewebespezifische, sowie überexprimierte Antigene. Etablierte Behandlungsformen wenden darüber hinaus inzwischen eine Reihe von Methoden an um die Immunität gegen den Tumor zu aktivieren. Dazu gehört die passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern wie z.B. Rituximab^{42,43} gegen CD20, die Einschleusung von Adjuvantien in die Tumorumgebung, z.B. Imiquimod bei basalem Zellkarzinom⁴⁴ und die systematische Gabe von Zytokinen wie Interleukin-2 (IL-2)^{45,46}. Vakzinierung gegen potentiell tumorinduzierende Viren, z.B. das Zervixkarzinom-induzierende humane Papilloma-Virus (HPV)⁴⁷ und Behandlung entsprechender Viruserkrankungen werden als Tumor-Prophylaxe angewandt.

Immuntherapie kann den Effekt von Chemotherapie verstärken und ist ein essentielles Element der wirksamen Mechanismen der Stammzelltransplantation gegen hämatologische Malignitäten. Diese wurde 1959 erstmals durch Georges Mathé^{48,49} als Methode zur Repopulierung des Knochenmarks nach Bestrahlung von Leukämiepatienten angewandt. In der Maus waren schon

drei Jahre zuvor nicht nur der positive Effekt der Knochenmarksrekonstitution nach Bestrahlung sondern auch ein Graft-versus-Leukämie-Effekt beobachtet und später genauer beschrieben worden worden^{50,51}. Die Optimierung dieses GvL-Effektes und die Herabregulierung des damit verbundenen schädigenden Graft-versus-Host-Effektes stehen heutzutage im Fokus vieler Forschungsarbeiten.

Mit der Entdeckung von tumorspezifischen infiltrierenden Lymphozyten (TILs) wurde eine weitere erfolgsversprechende Behandlungsmethode ins Leben gerufen. Fefer et al. beobachteten schon in den 60er Jahren die spontane Regression autochthoner muriner-Sarkoma-Virus (MSV)-induzierter Maustumore. Anhand dieses Modells wiesen sie u.a. das Vorhandensein tumorspezifischer Transplantations-Antigene (MSV) nach, die Abhängigkeit der erfolgreichen Regression von der Immunkompetenz des Hosts, die starke Infiltration regredierender Tumore mit Lymphozyten und die Möglichkeit, MSV-induzierte Tumore mit Hilfe von Milzzellen aus Mäusen nach spontaner Tumorregression zu kurieren⁵². Beim adoptiven T-Zelltransfer werden tumorspezifische T-Zellen gewonnen, expandiert und dem Patienten verabreicht. Sie sollen die Tumorzellen eliminieren und idealerweise mit der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses Rezidive verhindern. Erste klinische Erfolge wurden mit Hilfe von TILs schon erreicht. Sie konnten aus Melanomen isoliert, expandiert und wieder in die Patienten zurück gegeben werden. Bei 22% der Patienten konnte eine komplette Remission erreicht werden⁵³, von denen 95% einen langanhaltenden Heilungserfolg über 3 Jahre zeigten. Die Behandlung mit TILs ist jedoch nur effektiv bei Tumoren, die natürlicherweise besonders viele Mutationen und damit tumorspezifische Zielantigene bieten. Dazu gehören die durch UV-Strahlung vielfach veränderten Melanome, sowie Tabak-geschädigte Lungenkrebszellen, die für diese Anwendung in den Fokus rücken. Neuartige Formen des adoptiven Transfers ermöglichen auch die Behandlung von Tumoren aus denen keine TILs isoliert werden können. Autologe T-Zellen aus dem Patientenblut werden mit Hilfe von Retroviren mit T-Zellrezeptoren gegen spezifische Tumorantigene ausgerüstet. Dazu gehört die Übertragung von T-Zellrezeptoren aus Patienten mit guten Anti-Tumorreaktionen auf T-Zellen des HLA-identen Patienten, die Gewinnung von tumorspezifischen T-Zellrezeptoren aus immunisierten Mäusen und die Herstellung von chimären Antigen-Rezeptoren (CARs). CAR-T-Zellen sind unabhängig von der Antigenpräsentation der Tumorzellen über die Haupthistokompatibilitätskomplexe (Major histocompatibility complexes – MHC) und erkennen ähnlich wie Antikörper Oberflächenantigene über ihre CAR-Bindungsdomäne. In weiterentwickelter Form mit zusätzlicher kostimulatorischer Signaldomäne konnten sie von Porter et al.⁵⁴ schon erfolgreich zur Behandlung von B-Zell-Lymphomen und -Leukämien eingesetzt werden.

1.3 B-Zelllymphome

B-Lymphozyten sind neben den T-Lymphozyten eine wichtige Zellpopulation der adaptiven Immunantwort. Sie zeichnen sich aus durch Immunglobulin-Antigenrezeptoren mit hoher klonaler Diversität und sind deshalb im Lauf ihres Entwicklungsprozesses mit umfangreichem Genrearrangement besonders anfällig für maligne Transformationen. Diese Transformationen können durch chromosomale Translokationen und durch die Mutation von Onkogenen ausgelöst werden und führen zu abweichender intrazellulärer Signalgebung, gestörter transkriptioneller und epigenetischer Regulation. Die Folge davon ist die unkontrollierte Proliferation von B-Zellen in den lymphatischen Organen, die Entstehung von B-Zelllymphomen.

B-Zelllymphome werden nach Histologie, genetischer Abnormalität und Abhängigkeit von bestimmten Signalwegen in unterschiedliche Subtypen eingeteilt. Jeder Subtyp hat phänotypische Ähnlichkeit mit B-Zellen eines bestimmten Differenzierungsstadiums, gekennzeichnet durch An- oder Abwesenheit von Mutationen im Bereich der variablen Region der Immunglobuline und durch ein spezifisches Genexpressionsmuster⁵⁵.

Nach dem histologischen Erscheinungsbild werden B-Zelllymphome den Hodgkin- oder den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) zugeordnet. In die Gruppe der NHL, die Neoplasien des lymphatischen Gewebes umfasst, werden auch T-Zelllymphome eingeteilt. Nach dem klinischen Verlauf wird in der Kiel-Klassifikation bei NHL zwischen hochmalignen und niedrig malignen Lymphomen unterschieden. In der aktuelleren WHO-Klassifikation (WHO – World Health Organisation) werden alle Lymphome, inklusive Morbus Hodgkin, vorrangig nach histologischen Gesichtspunkten eingeordnet. Zur Zeit werden beide Klassifikationen parallel verwendet.

1.4 λ -MYC-Mausmodell

Die Basis für die Experimente dieser Arbeit ist die λ -MYC-Maus, ein murines Modell für hochmaligne B-Zelllymphome (NHL). Dieses Modell wurde nach dem ersten Myc-transgenen Mausmodell, der μ -MYC-Maus⁵⁶, das phänotypisch mit Vorläufer-B-Zellen ein lymphoblastisches Lymphom repräsentiert, als Modell für das Burkitt-Lymphom entwickelt⁵⁷.

Der humanen Erkrankung entsprechend wurde in der Maus die Translokation von Teilen des Ig λ Locus auf Chromosom 22 in die 3' Position des *c-myc* Gens auf Chromosom 8 nachgestellt⁵⁸. Indem das auf Chromosom 8 liegende Proto-Onkogen *c-myc* dadurch dem *Enhancer*-Element eines

Immunglobulingens in die Nähe gestellt wird, kommt es zur Deregulation mit konstitutiver Expression des Myc-Proteins, das eine wichtige Rolle im Zellzyklus einnimmt. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von *c-myc* in normalen B-Zellen über einen p53-abhängigen Signalweg zu Apoptose führt⁵⁹. Dementsprechend führt die *myc*-Translokation allein noch nicht zur Entwicklung von Neoplasien. Aktuelle Studien weisen auf die Aktivierung des PI3K-Signalwegs als weiteren Schritt zur Krebsentwicklung hin^{60,61}. Viele Burkitt-Lymphome tragen zudem Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53*.

λ -MYC-Mäuse entwickeln spontan B-Zelllymphome, die vor allem in Lymphknoten, Bauchraum und Milz auftreten. Das Überleben der Tiere liegt bei 82,5 Tagen nach Geburt (s. Abbildung 6). Phänotypisch weisen die Lymphome zum Teil typische Eigenschaften des Burkitt-Lymphoms, wie z.B. den Sternenhimmel, CD19-Positivität, Negativität für CD5 und T-Zellmarker CD4 und CD8 auf. Jedoch handelt es sich in diesem Fall nicht um einen Keimzentrums-Phänotyp, wie in der menschlichen Erkrankung, sondern um einen Prä-Keimzentrums-Phänotyp. Dementsprechend können die Lymphome der λ -MYC-Maus nicht klar als Burkitt-Lymphome eingeordnet werden. Sie sprechen auf Cyclophosphamidbehandlung an und bilden sich daraufhin komplett zurück, entwickeln aber nach einiger Zeit aufgrund der transgenen *myc*-Aktivität Rezidive. Aus etwa 30 % der primären Lymphome können in Kultur erfolgreich Zelllinien gezogen werden, die als Grundlage für diese Arbeit dienen.

Anhand der E μ -MYC-Maus konnten Schmitt et al.¹⁸ zeigen, dass Chemotherapie-behandelte *bcl-2*-überexprimierende Lymphome mit Seneszenz reagieren, während Seneszenz und Apoptose in *p53*-defizienten Lymphomen blockiert werden. Diesen Erkenntnissen folgend sollte die λ -MYC-Maus verwendet werden um *bcl-2*-überexprimierende, seneszente und *p53*-defiziente Lymphome zu gewinnen und nicht nur chemotherapeutisch, sondern zusätzlich mit adoptivem T-Zelltransfer zu behandeln. Der Fokus dieser Arbeit lag hiermit auf der Eliminierung hochmaligner, Chemotherapie-resistenter Lymphomzellen.

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Abgeleitet aus den Beobachtungen am E μ -MYC-Mausmodell von Schmitt et al.¹⁸ lässt sich vereinfacht sagen: Wenn in Tumorzellen, z.B. ausgelöst durch Chemotherapie, DNA-Schadenssignale erzeugt werden, so wird im Normalfall über das Tumorsuppressorprotein p53 Apoptose eingeleitet. Ist dieser Signalweg jedoch blockiert, z.B. durch *bcl-2*-Überexpression^{62,63}, so bleibt als Ausweg die Seneszenz: der Tumor wird nicht eliminiert, aber dauerhaft arretiert. Fällt

auch dieser Mechanismus weg z.B. durch Verlust von p53, das beide Prozesse vermittelt, so wird der Tumor nicht nur Chemotherapie-resistent, sondern setzt seine unkontrollierte Proliferation fort. Somit sind die Möglichkeiten der Therapie über DNA-Schadensinduktion erschöpft, und die Immuntherapie rückt in den Fokus. Bei Vorhandensein eines geeigneten Zielantigens im Tumor bietet sich der adoptive T-Zelltransfer an. Jedoch zeigen Studien nach allogener Stammzelltransplantation, deren GvL-Effekt ebenfalls auf der Wirkung von zytotoxischen T-Zellen beruht, dass die Wahrscheinlichkeit für das Fortschreiten der Krankheit bei Chemotherapie-resistenten Lymphomen deutlich erhöht ist^{64,65}.

Diese Beobachtungen führten zu der Frage, ob genetische Defekte wie *bcl-2*-Überexpression, oder *p53*-Verlust den GvL-Effekt kompromittieren. Deshalb ergab sich folgende Fragestellung:

1. Ist der Verlust der Fähigkeit zur Apoptose durch *bcl-2*-Überexpression oder *p53*-Defizienz verbunden mit einer Resistenz gegenüber T-Zelltherapie? Können *bcl-2*-überexprimierende Zellen im seneszenten Zustand von spezifischen T-Zellen lysiert werden?

Diesen Fragen sollte mit Hilfe transplantierte *bcl-2*-überexprimierende und *p53*-defiziente Lymphomzellen, die das Surrogatantigen Ovalbumin tragen, in einem OVA-toleranten Mausmodell nachgegangen werden. Dafür sollte die λ -OVA-Maus generiert werden, die OVA spezifisch im B-Zellkompartiment exprimiert. Chemotherapie kombiniert mit adoptivem T-Zell-Transfer von OVA-spezifischen OT-1-T-Zellen sollten als Behandlungsform für die Lymphome angewandt werden.

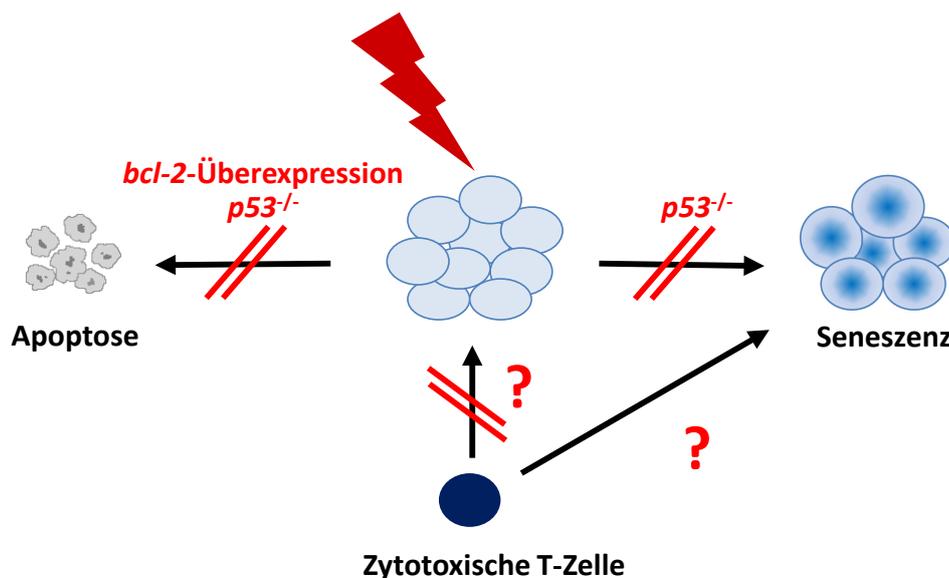


Abbildung 2: Grafische Darstellung der Fragestellung 1. Welche Folgen hat *p53*-Defizienz, *bcl-2*-Überexpression bzw. Seneszenz nach Chemotherapie (Blitz) auf die Eliminierbarkeit von B-Zelllymphomen durch spezifische zytotoxische T-Zellen?

Ergänzend sollten λ -OVA-Mäuse mit λ -MYC-Mäusen gekreuzt werden, um ein Mausmodell zu generieren, das spontan *c-myc*-getriebene Lymphome mit OVA-Antigen entwickelt. Damit sollte ermöglicht werden, oben beschriebene Behandlungsmethoden an Chemotherapie-sensitiven Tumoren in einem autochthonen Modell zu testen, das Tumortransfer vermeidbar macht. Ziel war es, folgende Fragestellung zu beantworten:

2. Sind autochthone *myc*-getriebene OVA-Tumore in einem Burkitt-Lymphom-Mausmodell durch Chemotherapie und kombinierten adoptiven T-Zelltransfer kurierbar?

2. Material und Methoden

2.1 Mauslinien

Alle verwendeten Tiere entsprachen durchgängig dem C57BL/6-Hintergrund. Sie werden im Folgenden als Wildtyp bezeichnet. λ -MYC-Männchen wurden mit Wildtyp-Weibchen gekreuzt.

OT-1-Mäuse (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J⁶⁶), STAT1^{-/-}-Mäuse (B6.129S(Cg)-Stat1tm1Dlv/J⁶⁷) und ACTB-OVA-Mäuse (2Tg(Actb-OVA)916Jen/J⁶⁸) wurden bezogen von Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA). Wildtyp-Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Deutschland) bezogen.

ACTB-OVA-Mäuse und P53^{+/-}-Mäuse (B6.129S2-Trp53tm1Tyj/J⁶⁹, zur Verfügung gestellt von Clemens Schmitt, MKFZ Berlin) wurden ebenfalls mit λ -MYC-Mäusen gekreuzt um Zelllinien aus spontan entstehenden B-Zell-Lymphomen zu generieren.

λ -OVA-Mäuse wurden mit Hilfe des gleichen Konstrukts generiert, das auch für die λ -MYC-Maus⁵⁷ verwendet wurde. Dabei wurde das gesamte Ovalbumin-Gen unter die Kontrolle der IgG- λ -Ketten-Regulator-Sequenz gebracht. Die Generierung der λ -OVA-Maus ist unter 4.13 ausführlich beschrieben. OVA-transgene Founder wurden mit dem Wildtyp rückgekreuzt. λ -OVA-Mäuse wurden mit λ -MYC-Mäusen gekreuzt. Die Nachkommen entwickeln spontan B-Zell-Lymphome und exprimieren OVA in den B-Zellen.

RAG1^{-/-}-Mäuse (B6.129S7-Rag1tm1Mom/J⁷⁰) wurden von Thomas Kammertöns (AG Blankenstein, Institut für Immunologie, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Alle Mausstämme wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gehalten.

Sämtliche Experimente wurden nach den Richtlinien und nach Genehmigung des lokalen Tierschutzkomitees (Antrag: IC114-G0013/09, Berlin; 54-2532.1-26/11, Regierung von Mittelfranken, Ansbach) durchgeführt.

2.2 Genotypisierung

2.2.1 DNA-Extraktion aus Mausschwanzbiopsien

Je Biopsie wurden 100 µl Extraktionslösung mit 25 µl Tissue Prep (je aus REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit, Sigma Aldrich, Missouri, USA) frisch angesetzt, gut gemischt, zur Probe gegeben und für 10' bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 3' auf 95 °C erhitzt. Nach der Neutralisation mit 100 µl Neutralisationspuffer konnte die Probe bei 4 °C gelagert werden.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Myc-PCR:

Zur Amplifikation der Myc-DNA wurde der Reaktionsmix nach folgendem Schema angesetzt: 1,4 µl H₂O; 5,0 µl PCR-Mix (Sigma-Aldrich, Missouri, USA); 0,4 µl Primer c-myc E2; 0,4 µl Primer c-myc I2; 0,4 µl Primer B-29 9 R; 0,4 µl Primer B-29 18 F 2. Je 2 µl *template* DNA wurden mit 8 µl Reaktionsmix versetzt und mit dem folgenden PCR-Programm behandelt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1	94°C	5'	Denaturierung
2	94°C	45''	
	56°C	30''	Annealing
	72°C	90''	Elongation
	Schritt 2 35x wiederholt		
3	72°C	10'	
	15°C	∞	

Als Negativkontrolle wurde Wildtyp-DNA verwendet. Für *c-myc* war eine Bande bei 480 bp zu erwarten, für die *Housekeeping*-Kontrolle B-29 eine Bande bei 376 bp.

STAT1^{-/-}-PCR:

Je 2 µl zu genotypisierender DNA wurden mit 8 µl folgenden Reaktionsmixes versetzt: 1,4 µl H₂O; 5,0 µl PCR-Mix (Sigma-Aldrich, Missouri, USA); 0,4 µl Primer STAT1^{-/-} p1; 0,4 µl Primer STAT1^{-/-} p2; 0,4 µl Primer STAT1^{-/-} p3. Anschließend wurden die Proben mit folgendem PCR-Programm behandelt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1	94°C	3'	Denaturierung
2	94°C	30''	
	56°C	45''	Annealing
	72°C	1'	Elongation
Schritt 2 30x wiederholt			
3	72°C	7'	
	15°C	∞	

Als Negativkontrolle wurde Wildtyp-DNA verwendet. Folgende Banden waren zu erwarten: für STAT1^{-/-} 340 bp, STAT1^{+/+} 140 bp und für STAT1^{+/-} 340 bp und 140 bp.

λ-OVA-PCR:

Je 2 µl zu genotypisierender DNA wurden mit 8 µl folgenden Reaktionsmixes versetzt: 1,4 µl H₂O; 5,0 µl PCR-Mix; 0,4 µl CD2 P3; 0,4 µl CD2 P4; 0,4 µl OVA P3; 0,4 µl OVA P4. Anschließend wurden die Proben mit dem folgenden PCR-Programm behandelt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1	94°C	3'	Denaturierung
2	94°C	1'	
	63°C	1'	Annealing
	72°C	2'	Elongation
Schritt 2 35x wiederholt			
3	72°C	10'	
	15°C	∞	

Als Negativkontrolle wurde Wildtyp-DNA verwendet. Für CD2 war eine Bande bei 572 bp und für OVA bei 376 bp zu erwarten.

ACTB-OVA-PCR:

Die ACTB-OVA-PCR wurde auf gleiche Weise wie die λ-OVA-PCR amplifiziert (s.o.).

p53-PCR:

Der Reaktionsmix für die Amplifikation der p53-DNA setzte sich folgendermaßen zusammen: 1x 10x PCR-Puffer; 1,5 mM MgCl₂; 0,4 µl dNTPs (10 mM); 0,4 µl Primer X7 (10 µM); 0,2 µl Primer X6.5 (10 µM); 0,8 µl Primer Neo (10 µM), 0,2 µl Taq (5U/µl). 2 µl Proben-DNA wurden mit 5,5 µl Reaktionsmix versetzt, mit A.dest auf 20 µl aufgefüllt und im Cyclyer mit folgendem Programm behandelt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1	92°C	5'	Denaturierung
2	92°C	1'	
	62°C	1'	Annealing
	72°C	1'	Elongation
	Schritt 2 35x wiederholt		
3	72°C	5'	
	4°C	∞	

Als Kontrolle wurde Wildtyp-DNA oder MYC-Maus-DNA verwendet. Für p53-Wildtyp +/+ (X6.5-X7) war eine Bande von 450 bp, für p53-Knockout -/- (Neo-X7) eine Bande von 600 bp zu erwarten. Für p53-heterozygot +/- waren dementsprechend beide Banden zu erwarten.

Material

- *Primer: c-myc E2 intfw 5`GCT CGT CTC AGA GAA GCT GG 3`, c-myc I2 rev 5` ATC TCT CCA GAT CTG CTA TCT C 3`;*
Interne Kontrolle: B-29 9 R: 5` CTT GTC AAG TAG CAG GAA GA 3`, B-29 18 F: 5` GTG GCA CGG AAC TTC TAG TC 3`;
STAT-/- STAT-/- p1 5`GAG ATA ATT CAC AAA ATC AGA GAG 3`, STAT-/- p2 5`CTG ATC CAG GCA GGC GTT G 3`, STAT-/- p3 5`TAA TGT TTC ATA GTT GGA TAT CAT 3`
OVA P3 5'-GGA GCT TCC ATT TGC CAG TGG-3', OVA P4 5'-AGA GAC GCT TGC AGC ATC CAC-3';
CD2 P3 5'-GTG CCT TGG GTC AGG ACA TC-3', CD2 P4 5'-GAC CAT CAA GAG GCT GCC TC-3'
P53 X7 5'-TAT ACT CAG AGC CGG CCT-3', X6.5 5'-ACA GCG TGG TGG TAC CTT AT-3', Neo 5'-TCC TCG TGC TTT ACG GTA TC-3'
(Metabion, Martinsried)
- *PCR-Gerät (Mastercycler, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)*

2.2.3 OT-1-T-Zell Analyse

Zur Typisierung von OT-1-Tieren wurde das periphere Blut durchflusszytometrisch untersucht. Nach der Zentrifugation über die Trennlösung Pancoll für 25 min bei 823 g ohne Bremsung wurden die Lymphozyten in PBS gegen CD8 und T-Zell-Rezeptoren Tα2 und Tβ5 gefärbt. OT-1-Mäuse wurden über doppelt positive Tα2⁺ Tβ5⁺ CD8-T-Zellen identifiziert.

Material

- Pancoll (PAN Biotech, Aidenbach)
- 10 x PBS: 80 g NaCl (Merck, Darmstadt); 11,6 g Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, Missouri, USA); 2 g KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt); KCl (Merck, Darmstadt) 2,0g; ad 1000ml H₂O (Millipore) , pH 7,0; steril filtriert, Lagerung bei 4°C
- Antikörper: APC Rat Anti-Mouse CD8a, Clone 53-6.7 (BD Bioscience, Heidelberg); FITC Mouse Anti-Mouse Vβ5.1, 5.2 TCR, Clone MR9-4 (BD Bioscience, Heidelberg); PE Rat Anti- Mouse Vα2 TCR, Clone B20.1 (BD Bioscience, Heidelberg)

2.3 Zelllinien und Zellkultur

2.3.1 Gewinnung permanenter Myc-Zelllinien

λ-MYC-Tiere mit B-Zell-Lymphomen wurden euthanasiert und die befallenen Lymphknoten entnommen. Die Lymphomzellen wurden über ein Zellsieb in Suspension gebracht, mit PBS gewaschen und auf MRC5-Feederzellen (Feeder B-Zell-Medium) ausplattiert. Ein Teil dieser Primärzellen wuchs über mehrere Wochen zu permanenten Feeder-unabhängigen Zelllinien. Einige Lymphomzelllinien konnten über mehrere Passagen über STAT1^{-/-} Mäuse ohne Hilfe von Feederzellen in einfachem B-Zell-Medium in Kultur gebracht werden. 291-Zellen wurden als repräsentative Myc-Zellen ausgewählt, da sie große Mengen des humanen Myc-Proteins, niedrige Mengen MHCI-Moleküle und kaum MHCII-Moleküle in Kultur exprimierten⁷¹.

P53^{+/-} x λ-MYC heterozygote Nachkommen entwickelten B-Zell-Lymphome, die auch das zweite p53-Wildtyp-Allel verloren hatten. Die daraus generierte parentale Zelllinie 189 lag dementsprechend p53^{-/-} vor.

Aus ACTB x λ-MYC B-Zell-Lymphomen wurde die OVA-transgene Zelllinie 110 gewonnen, da λ-OVA x λ-MYC-Mäuse zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung standen.

Material

- Feeder B-Zell-Medium: IMDM (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), 20 % FCS, 20% (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (PAN Biotech, Aidenbach), 2 mM L-Glutamin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), 100 U/ml Penicillin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), 100 µg/ml Streptomycin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), 1 mM Natriumpyruvat (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)
- B-Zell-Medium: IMDM + DMEM (Gibco/Invitroge, Karlsruhe) 1:1, 10 % FKS (PAN Biotech, Aidenbach), 4 mM L-Glutamin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), 0,01 % β-Mercaptoethanol (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)
- Zellkulturflaschen 75 ml und 25 ml (Greiner Biolabs, Frickenhausen)
- Steril-Pipetten 10, 15, 25 und 50 ml (Corning Life Science, New York, USA); 5 ml (Greiner Biolabs, Frickenhausen)

2.3.2 Retrovirale Transduktion

Parentale Zellen (PC) von etablierten Zelllinien (291 PC, 189 PC, 110 PC) wurden mit Hilfe der retroviral (auf dem Maus-Stammzell-Virus MSCV) basierten Vektoren MSCV-IRES-GFP, MSCV-OVA-IRES-GFP, MSCV-BCL2-IRES-GFP und MSCV-BCL2-IRES-DsRed (zur Verfügung gestellt von Clemens Schmitt, MKFZ, Berlin) transduziert. Dazu wurden PlatE-Verpackungszelllinien⁷² (zur Verfügung gestellt von Wolfgang Uckert, MDC, Berlin) in 6-Well-Platten (Corning Incorporated, New York, USA) ausgesät. Bei einer Konfluenz von 50 % wurden die Zellen mit Hilfe der FuGENE-Transfektions-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Herstellerangaben mit dem entsprechenden Vektor transfiziert. Zwei Tage später wurde der Virusüberstand abgenommen und mit 4 µg/ml Polybrene (Sigma, Steinheim) frisch auf 4×10^5 Lymphomzellen im Well einer 24-Well-Platte (Corning Incorporated, New York, USA) gegeben oder bei -20 °C für später aufbewahrt. Nach 24 h wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt und der Anteil der erfolgreich transduzierten GFP⁺-Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Dieser lag bei 2 – 15 %. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen wurden die Zellen bei späteren Versuchen nach Zugabe des Virusüberstands für 2 h bei 33 °C und 2228 g zentrifugiert, dadurch konnte der Anteil transduzierter Zellen auf 10 – 30 % erhöht werden. GFP-positive Zellen wurden durchflusszytometrisch aufgereinigt.

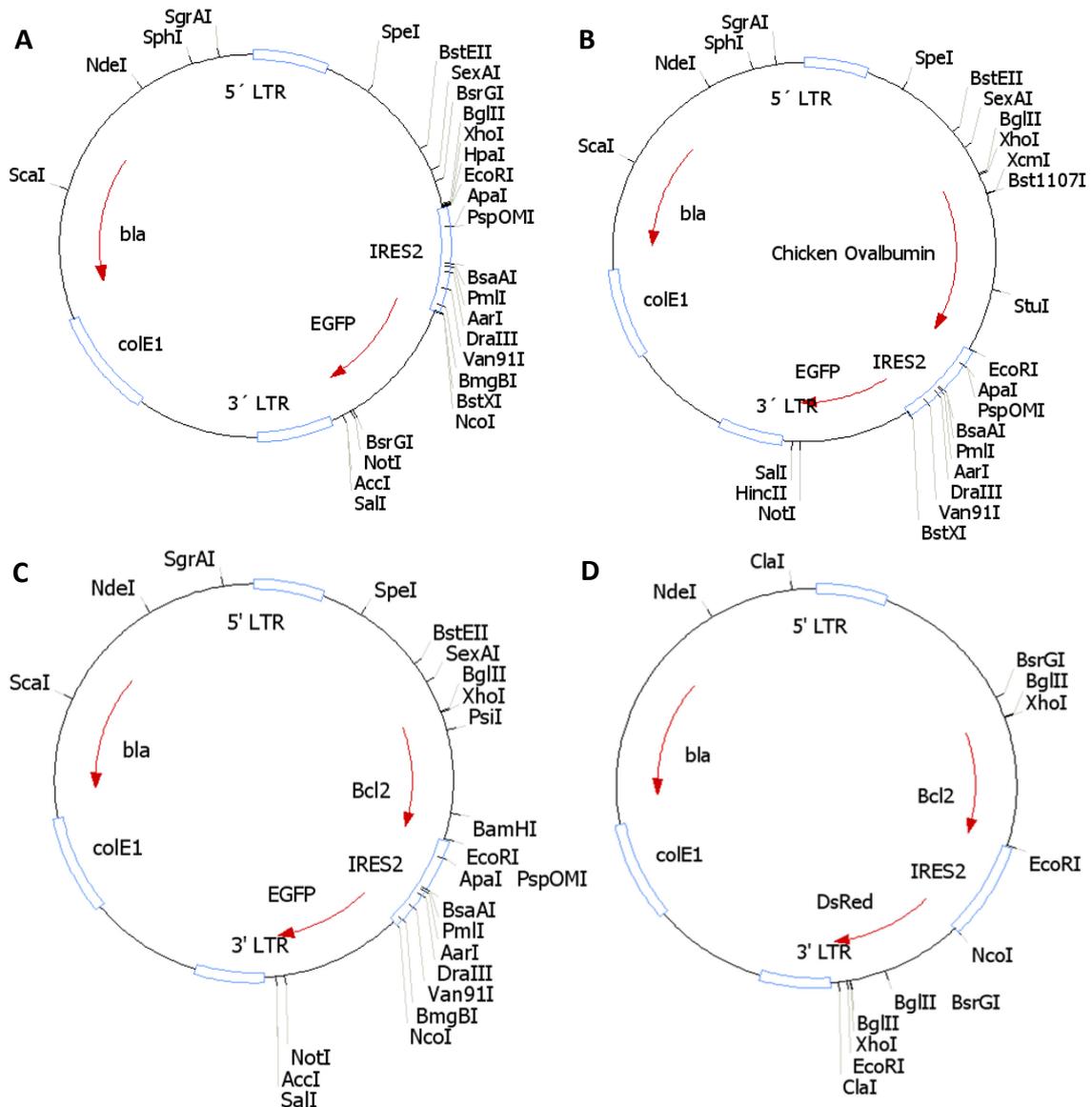


Abbildung 3: Restriktionskarten der MSCV-Vektoren für die retrovirale Transduktion der Lymphomzelllinien; LTR - *Long Terminal Repeat* aus dem Maus-Stammzell-Virus, bla - β -Lactamase-Resistenzgen, colE1 - *Origin of Replication*, IRES2- interne ribosomale Eintrittsstelle (koppelt Gen für OVA oder Bcl2 an GFP bzw. DsRed. GFP/DsRed-Positivität einer Zelle ist damit Zeichen für die positive Transduktion.) A) MSCV-IRES-GFP, B) MSCV-OVA-IRES-GFP, C) MSCV-Bcl2- IRES-GFP, D) MSCV-Bcl2-IRES-DSRed.

2.4 Western Blot

1×10^7 bis 5×10^7 Lymphomzellen wurden pelletiert und anschließend durch RIPA-Puffer, versetzt mit Proteinase-Inhibitor-Cocktail, auf Eis für 30 min lysiert, indem alle 10 min gevortext wurde. Die Proben wurden bei 4°C für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand direkt weiterverwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

Mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) wurde die Proteinmenge der hergestellten Lysate über die Biuret-Reaktion bestimmt. Mit Hilfe eines Photometers wurde die Farbstoffintensität der jeweiligen Proben gemessen und die entsprechende Proteinkonzentration anhand einer BSA-Standardreihe berechnet.

10 – 20 µg Protein je Probe wurden mit SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden über ein 10 % Agarosegel mittels SDS-PAGE in einer Elektrophorese-Kammer (BioRad, München) für die ersten 10 min bei 100 V und dann 60 min bei 160 V in TBE-Puffer aufgetrennt.

Mit einem Transblot-Semi-Dry-Blot-Gerät (BioRad, München) wurden die Proteine für 50 min bei 15 V in Transfer-Puffer von dem Gel auf eine Highbond-C-Super-Nitrozellulose-Membran (Amersham, GE Healthcare, Freiburg) transferiert. Die Membran wurde anschließend in PBS-Tween gewaschen und über Nacht in 5 % Magermilchpulver (Heirler, Radolfzell) in PBS-Tween geblockt.

Der Primärantikörper wurde für 1 h bei RT mit der Membran in 5 % Magermilchpulver in PBS-Tween inkubiert und nachfolgend gründlich ausgewaschen, 1 x 15 min und 2 x 5 min mit PBS-Tween. Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde ebenfalls für 1 h bei RT in 5 % Magermilchpulver in PBS-Tween zur Membran gegeben und der Waschvorgang wiederholt.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe von ECL-Lösung (Amersham, GE Healthcare) auf Kodak X-Omat LS film (Sigma-Aldrich, Steinheim). Die Entfernung der Antikörper von der Membran wurde in 100 mM Glycin, pH 2,9 für 30 – 60 min durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde ein direkt HRP-gekoppelter β-Aktin-Antikörper verwendet.

Material

- *RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4 (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt) pH mit HCl eingestellt), 150mM NaCl (Merck, Darmstadt), 1 mM EDTA (Merck, Darmstadt), 1% TritonX-100 (Merck, Darmstadt), 0,25% Na-Deoxycholat (Serva, Heidelberg)*
- *Lyse-Puffer: RIPA-Puffer + 1 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich, Steinheim), 5 mM NaF (Merck, Darmstadt), 4% Proteinase-Inhibitor-Cocktail 25x MiniComplete (Roche Diagnostics, Mannheim)*
- *SDS-Ladepuffer: 300 mM Tris/HCl (Merck, Darmstadt), pH 6,8, 12 % SDS (Merck, Darmstadt), 50 % Glycerol (Merck, Darmstadt) and 0.2 % Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)*
- *10 % SDS-PAGE-Gel: Trenngel: 30 % Acrylamid (Merck, Darmstadt), Tris/HCl 1.5 M, pH 8,8, H₂O, 10 % SDS, 10 % APS (Merck, Darmstadt), 6 µl TEMED (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), Sammelgel -30 % Acrylamid, Tris/HCl 0.5 M, pH 6,8, H₂O, 10 % SDS, 10 % APS, 4 µl TEMED*
- *TBE-Puffer: (10x) 108 g Tris Base (Merck, Darmstadt), 55 g Borsäure (Merck, Darmstadt) 40 ml, 0,5 M EDTA pH 8 (Merck, Darmstadt) mit A.dest auf 1l aufgefüllt*

- *Precisions Plus Protein all blue Standard (Biorad, München)*
- *Transfer-Puffer: 14,4g Glycin (Merck, Darmstadt), 3,025g Tris, 200ml Methanol reinst (Merck, Darmstadt), mit A.dest auf 1 l aufgefüllt*
- *PBS-Tween: PBS mit 0.05 % Tween-20 (Merck, Darmstadt)*
- *Primärantikörper: Bcl2 (BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg), Anti-Ovalbumin Rabbit polyclonal ab1221 (Abcam, Cambridge, England), Anti-Histone H3 (tri methyl K9) ab 8898 (Abcam, Cambridge, England), Anti-beta Actin [mAbcam 8226] (HRP)-Loading control ab20272, (Abcam, Cambridge, England)*
- *Sekundärantikörper: Goat Anti-Rabbit IgG HRP-Gekoppelt (ab6721, abcam, Cambridge, England)*

2.5 Enzymimmunoassays (ELISA)

ELISAs zur Quantifizierung von IFN γ in den Überständen der MLRs wurden mit Hilfe des BD OptEIA™ Maus IFN γ -ELISA-Kits (BD Biosciences, Heidelberg) anhand der Herstellerangaben in (NUNC Maxisorp) ELISA-Platten durchgeführt und die Absorption jedes Wellinhalts bei 450 nm und 570 nm am ELISA-Reader (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale) gemessen.

2.6 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Polymerase Kettenreaktion wurde mit dem Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) in einem Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. 1 μ l Proben-cDNA (Verdünnung 1 : 5) wurde mit 5 μ l Master Mix, 2,8 μ l destilliertem Wasser, 1 μ l Reference Dye, 0,1 μ l Forward Primer (10 pmol) und 0,1 μ l Reverse Primer (10 pmol) versetzt und für die PCR verwendet. Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 95 °C für 15 min und 40 Zyklen inklusive Denaturierung bei 95 °C für 5 s folgte die Annealing/Elongationsphase bei 60 °C für 15 s. Zum Ende jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Bei beendeter Amplifikation wurde die DNA bezüglich ihres Schmelzverhaltens analysiert, indem die Fluoreszenz während der langsamen Erhitzung der Lösung von 60 °C auf 90 °C (0,1 °C/s) gemessen wurde.

2.7 Histologie und Immunhistochemie

Gewebe wurde für 12 h in 10 % gepuffertem Formalin fixiert, anschließend dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die eingebetteten Proben wurden am Mikrotom in 2 - 3 μ m dicke Schnitte geteilt und entparaffinisiert. Zur Demaskierung der Antigen-Epitope wurden die Schnitte in Zitrat-Puffer (pH 6) gekocht oder mit Proteinase K enzymatisch behandelt und in TBS (pH 7,4) gewaschen. Nach der Behandlung mit Blockingpuffer (DAKO) wurden die Proben mit dem

Primärantikörper inkubiert. Für die Detektion wurden biotinylierte Sekundärantikörper verwendet, gefolgt vom Streptavidin-AP-Kit oder dem Envision-PO-Kit (DAKO). Peroxidase wurde mit hochsensitivem Diaminobenzidin (DAB, DAKO) farblich markiert. Beide Substrate wurden 6 bis 10 min mit den Proben inkubiert.

Material:

- TBS-Waschpuffer: 4,5 g Tris Base (Sigma-Aldrich, Steinheim), 34,3 g Tris-HCL (Calbiochem ultrol Grade, Schwalbach), 43,9 g NaCl (Fluka); pH 7,4-7,6
- Hämalau, Eosin-G-Lösung 0,5% (Merck, Darmstadt)
- Zitrat-Puffer: 10 mM Zitronensäure (Merck, Darmstadt) in A.dest, pH 6 über NaOH (Merck, Darmstadt)
- Primärantikörper: p16 (Batch H2129, Santa Cruz), p21 (Ab online)
- Sekundärantikörper: biotinylierter Donkey Anti-Rabbit (Dianova)

2.7.1 SA- β -Galaktosidase-Assay

Für die Färbung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase wurde ein Teil des Tumors in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Am Cryostat (Thermo Scientific) wurden 5 μ m Schnitte hergestellt, auf SuperFrostPlus-Objektträger aufgebracht und über Nacht luftgetrocknet. Sie wurden in Alufolie eingewickelt bei -80 °C aufbewahrt. Für die Färbung wurden die Proben zuerst in einer Fixier-Lösung für 10 min bei RT fixiert, dann 2 x in PBS/MgCl₂ gewaschen. Die Schnitte wurden für 14 h bei 37 °C in X-Gal-Lösung inkubiert und danach 3 x in PBS/MgCl₂ gewaschen. Für die Kernfärbung wurden die Proben für 5 min mit Kernechtrot (Roth) gegengefärbt und anschließend gewaschen. Zum Eindecken wurde wasserbasiertes Einbett-Medium (Roth) verwendet. Die gefärbten Objekte wurden bei 4 °C aufbewahrt.

Material:

- Tissue-Tek O.C.T. (Hartenstein) ; Mikrotom-Klingen35N (Feather PFM Medical, Köln), SuperFrostPlus-Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen)
- PBS/MgCl₂: 1 mM MgCl₂(Merck, Darmstadt) in PBS, pH 5,5
- Fixierlösung: 0,25 % Glutaraldehyd (50 % Glutaraldehyd Stock, Roth 4995.1), 2% Paraformaldehyd (Pulver bei 4°C, Sigma P6148) in PBS pH 5,5; eine Woche bei 4°C haltbar, langfristige Aufbewahrung bei 20°C
- Färbelösung: 20x Kaliumcyanid Stock (820 mg K₃Fe(CN)₆, 1,05 mg K₄Fe(CN)₆ x 3H₂O in 25 ml PBS); 40x X-Gal-Lösung (i.e. 40 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside(Sigma-Aldrich, Seelze) in 1 ml DMSO (Sigma-Aldrich, Seelze); für 10 ml 9,3 ml PBS/MgCl₂, 0,5 ml 20x KC-Lösung und 0,25 ml 40x X-Gal-Lösung

2.8 Kokultur-Experimente

Zelllinien mit OVA-Antigen wurden in einem Vierer-Ansatz jeweils 1×10^5 in einer U-Bottom-96 Well-Mikroplatte (Becton, Dickinson, Heidelberg) mit und ohne OT-1-T-Zellen in verschiedenen Effektor-Target-Verhältnissen ausgesät. Als Positiv-Kontrolle wurden die Zelllinie 291 OVA oder andere OVA-positive Zelllinien mitgeführt, als Antigen-Negativ-Kontrolle 291 GFP oder 291 PC. Nach 20 h, 48 h oder 7 Tagen wurde der Überstand für einen IFN γ -ELISA abgenommen und die Zellen wurden über Durchflusszytometrie analysiert.

2.9 Durchflusszytometrie

Zellen wurden in 4 °C kaltem PBS gewaschen und für 10 min mit 10 % Überstand von Klon 2.4G2 inkubiert um Fc γ -Rezeptoren zu blocken. Fluoreszenzfarbstoff-markierte monoklonale Antikörper wurden in Konzentrationen von 0,5-1 μ g/ml für 15 min bei 4 °C zu den Zellen gegeben. Diese wurden anschließend 2 x mit kaltem PBS gewaschen und am Durchflusszytometrie-Gerät (FACSCalibur oder FACSCantoII, Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. MHC-Multimere (ProImmune, Oxford, UK) wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

Material

- *FACS-Puffer: 500 ml PBS, 0,5 g BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim), 250 μ l 20 % NaN $_3$ (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)*
- *FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)*
- *Antikörper: PerCp CD19, Clone 6D5 (Biolegend, Uithoorn, Niederlande), PE Rat Anti-Mouse CD19, Clone 1D3, (BD Biosciences, Heidelberg), APC Rat Anti-Mouse CD8a, Clone 53-6.7 (BD Biosciences, Heidelberg); V450 Rat Anti-Mouse CD4, Clone RM4-5 (BD Biosciences, Heidelberg); Pe-Cy $^{\text{TM}}$ 7 Hamster Anti-Mouse CD69, Clone H1.2F3 (BD Biosciences, Heidelberg); PE Mouse Anti-Mouse H-2Kb, Clone AF6-88.5 (BD Biosciences, Heidelberg) ; PE Mouse Anti-Mouse I-A[b], Clone AFG-120.1, (BD Biosciences, Heidelberg), Biotin Mouse Anti-Mouse I-A[b], Clone AFG-120.1, (BD Biosciences, Heidelberg), Biotin Mouse Anti-Mouse H-2Kb, Clone AF6-88.5 (BD Biosciences, Heidelberg), Annexin-V APC (BD Biosciences, Heidelberg)*
- *Farbstoffe: DAPI (BD Biosciences, Heidelberg), 7-AAD (BD Biosciences, Heidelberg)*

2.10 Tumortransfer-Experimente

Für Tumortransfer-Experimente wurden je nach Experiment Mäuse im Alter von 8 – 17 Wochen verwendet. Die Lymphomzellen wurden 48 h vor dem Transfer gesplittet, direkt vorher in eiskaltem PBS gewaschen und schließlich s.c. in einer Dosis von 1×10^5 oder 1×10^6 in die rechte Flanke der Empfängermäuse injiziert. Das Tumorwachstum am Ort der Injektion wurde 3 x pro

Woche mit Hilfe einer Schieblehre gemessen. Der durchschnittliche Tumordurchmesser wurde aus dem Mittelwert der gemessenen Länge, Breite und Höhe des Tumors berechnet.

Ab einem Tumordurchmesser von 12 mm, wurden die Mäuse über zervikale Dislokation getötet und die Tumore entnommen. Ein Teil des Tumors wurde für die Immunhistochemie (s.4.7) verwendet, der Rest des Tumors über ein Zellsieb (50 - 100 µm Maschen, Omnilab Falcon) in Suspension gebracht und in PBS gewaschen. Erythrozyten wurden anschließend mit Hilfe des ACK-Puffers für 4 min bei 4 °C lysiert. Nach erneutem Waschen wurde über Trypan-Blau (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) in einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Lauda Königshofen) die Zellzahl bestimmt. Je nach Versuch wurden Zellen für Western Blot Lysate, RNA-Gewinnung und für die Aufbewahrung in Flüssigstickstoff abgenommen. Der Rest der Zellen wurde für die Durchflusszytometrie oder für Kokulturen weiterverarbeitet.

Material

- Falcon Tubes 15 ml, 50 ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
- ACK-Puffer: 4,145g NH_4Cl (Merck, Darmstadt); 0,0185 g EDTA; 0,5 g KHCO_3 ; ad 500ml H_2O (Millipore); steril filtriert, Lagerung bei 4°C

2.11 Chemotherapie

Cyclophosphamid, ein Stickstofflost-Derivat mit alkylierender Wirkung, ist Hauptbestandteil der Standardtherapie von Non-Hodgkin-Lymphomen CHOP (Cyclophosphamid, Hydroxy-Doxorubicin, Vincristin, Prednison). Es wird experimentell zur Induktion von Seneszenz *in vivo*¹⁸ eingesetzt. Je nach Experiment wurde bei einem Tumordurchmesser von 3-10 mm eine Dosis von 250 mg/kg Cyclophosphamid (Endoxan, EDX) i.p. injiziert. Für den Nachweis von Seneszenz wurden Tumore 7 Tage später isoliert und im SA-β-Galaktosidase-Assay weiterverarbeitet.

Cyclophosphamid ist ein Prodrug und muss in der Leber in den aktiven Bestandteil Phosphoramid-Mustard umgewandelt werden um seine Wirkung zu entfalten. In *in vitro*-Experimenten wurde daher Adriamycin (Doxorubicin) eingesetzt¹⁸. Bei Adriamycin handelt es sich um ein Anthracyclin, das in DNA und RNA interkaliert. Dieses wurde je nach Versuch und Einwirkungszeit in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,05 µg/ml bis 1 µg/ml verwendet.

2.12 OT1-T-Zell-Isolation und Transfer

OT-1-T-Zellen wurden mit Hilfe des Maus - CD8⁺ *T cell Isolation Kits II* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach Herstellerprotokoll zu 85 – 95 % Reinheit aus OT-1-Maus-Milzen aufgereinigt und *in vitro* oder *in vivo* eingesetzt. Das CD8-Kompartiment der OT-1-Mäuse wird zu 96 – 99 % von OT-1-T-Zellen gebildet, welche einen klonotypischen Rezeptor tragen, der spezifisch ein Ovalbumin-Peptid (SIINFEKL, OVA₂₅₇₋₂₆₄) im Kontext von MHC-I (H-2K^b) erkennt. Daher konnten aufgereinigte CD8-Zellen aus Milzen dieses Mausmodells mit OT-1-T-Zellen gleichgesetzt werden.

Beim adoptiven T-Zelltransfer wurden drei Tage nach Chemotherapie 1×10^6 Zellen i.v. in die Empfängermäuse injiziert. Nach sieben Tagen wurde die Expansion der OT-1-T-Zellen mit Hilfe des SIINFEKL-MHC-I-Pentamer im peripheren Blut gemessen. Dieses Multimer detektiert T-Zellen, deren T-Zellrezeptor das SIINFEKL-Peptid im Kontext von H-2K^b erkennt.

Material

- MACS-Puffer: EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim), 0,3723 g BSA (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 2,5 g mit PBS auf 450 ml aufgefüllt + 0,09% NaN₃

2.13 Generierung λ-OVA transgener Mäuse

Das Konstrukt für die λ-OVA-Maus wurde am Hämatologikum des Helmholtz-Zentrums München von Frank Lehmann und Georg Bornkamm kloniert und in embryonalen Stammzellen getestet. Die anschließende Blastozysten-Injektion wurde am MPI in Dresden von Roland Naumann durchgeführt. Transgene Founder wurden im Rahmen dieser Arbeit analysiert.

Wie bei der Generierung der Igλ-myc Maus⁵⁷ für c-Myc wurde pBC119B als Vektor-Rückrat für die Codierung von Ovalbumin (OVA) verwendet, ein Vektor mit EBV oriP, der ein 12 kb BglIII-Fragment vom humanen Igλ konstanten Locus trägt, umgeben von DNase hypersensitiven *Sites* HSS-1, -2, und -3⁵⁸. Neben OVA wurden durch Verlust der Signaldomäne trunkiertes humanes CD2 (thCD2) und EGFP als Positiv-Marker für die Durchflusszytometrie eingebracht. Um die Expression unerwünschter Antigene zu verhindern wurde das Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase deletiert (pBC119B-DH).

Ein Fragment mit dem CMV-Minimal-Promoter und dem OVA *Open Reading Frame* (ORF), flankiert von einer Sall Site in 5' und einer BglIII Site in 3' Richtung wurde aus pCDNA3-OVA amplifiziert und in pJ3Ω⁷³ eingebracht. Um eine optimale OVA-Expression zu sichern, wurde das dritte Intron des

humanen H-ras Gens aus pEJ6.6⁷⁴ mit einem Primer, flankiert von BglIII und MnlI *Sites*, amplifiziert und in die BglIII und MnlI Site *downstream* des OVA ORF eingefügt. Im Folgenden wurde das thCD2-enhaltende Fragment mit Primern, flankiert von BamHI *Sites*, aus dem embryonalen Stammzell-Zielvektor CD-R26-CAGp-EMC-IRES-thCD2 amplifiziert und in die BglIII Site zwischen OVA ORF und dem H-ras Intron 3 kloniert. Das Sall-ClaI Fragment mit Minimal-CMV-Promotor, OVA-IRES-thCD2 und H-ras Intron 3 wurde in pBC119B-DH eingebracht um pBC119B-DH-OVA-IRES-thCD2 herzustellen. Ein hybridisiertes Doppelstrangnukleotid, das den murinen V κ 2-Promoter mit SacII- and XhoI-Überhängen trägt, wurde nun in die SacII und in die Sall *Sites* vorm CMV MinimalPromoter von pBC119B-DH-OVA-IRES-thCD2 kloniert um pBC119B-DH-mV κ 2-OVA-IRES-thCD2 zu generieren. Die Sequenz des ersten Strangs des Oligonukleotids S2-Sal-V κ 2-(Xho) war: 5'GGGTCGACAATTCTGCAGCTGTGCCTACCCTTTGCTGATTTGCATGTACCCAAAGCATAGC-3' und der zweite Strang 5'TCGAGCTATGCTTTGGGTACATGCAAATCAGCAAAGGGTAGGCACAGCTGCAGAATTGTC GACCCGC-3'.

Der EGFP-ORF mit dem enthaltenen CMV-Minimal-Promoter wurde von pEGFP-C1 mit Primern, die von einer NgoMIV site am 5' und einer Sall site am 3' Ende flankiert wurden, vervielfältigt und in die NgoMIV and Sall *Sites* von Bluescript kloniert. Ein 1,9 kb Fragment mit Beta-Globin Intron und Polyadenylierungsstelle wurde von pRTS1 (Bornkamm et al., 2005) mit Primern amplifiziert, die von 5' Sall und 3' KpnI *Sites* flankiert wurden und hinter den EGFP ORF kloniert um pBS-min-EGFP herzustellen. Die EGFP-Betaglobin-Intron-Expressionskassette hinter dem CMV-*Minimalpromoter* wurde mit NgoMIV und KpnI in pBC119B-DH kloniert um pBC119B-DH-EGFP und in pBC119B-DH-mV κ 2-OVA-IRES-thCD2 um pBC119B-DH-mV κ 2-OVA-IRES-thCD2-EGFP zu generieren.

Um die EGFP-Expressionseffizienz der beiden Plasmide zu überprüfen wurden sie transient in die Burkitt-Lymphom-Linie DG75 transfiziert. Da GFP nur schwach exprimiert wurde, wurden die Plasmide dahingehend verändert, dass sie entweder eine oder beide Expressionskassetten in der gegenläufigen Orientierung der Ig λ konstanten Region tragen. Dafür wurde pBC119B-DH-OVA-IRES-thCD2 mit ClaI und Bst1107I verdaut und ein Linker mit Restriktionsstellen für (ClaI)-BstBI-BsiWI-PacI-Sall-AsiSI-Bst1107I wurde zwischen Swal und SacII in pBC119B-DH-MCS1 eingefügt um pBC119B-DH-MCS2 herzustellen. Das Sall-ClaI-Fragment des pBC119B-DH-mV κ 2-OVA-IRES-thCD2 mit der kompletten um λ -VOC (für V κ 2, OVA und trunkiertes humanes CD2) zu generieren. Um EGFP zusätzlich in λ -VOC einzufügen, wurden BsiWI und BstBI *Sites* in pBS-min-EGFP zwischen die NgoMIV und DraIII *Sites* in 5' Richtung und zwischen KpnI und PstI *Sites* in 3' Richtung der min-EGFP-Kassette eingebracht. Mit Hilfe von BsiWI und BstBI wurde die min-EGFP-Kassette dann in λ -

VOC kloniert um λ -EGFP-VOC zu generieren. λ -VOC und λ -EGFP-VOC wurden mit PvuI linearisiert und in befruchtete Eizellen injiziert um transgene Mauslinien zu generieren, die entweder OVA-IRES-thCD2 oder EGFP plus OVA-IRES-thCD2 B-zellspezifisch exprimieren.

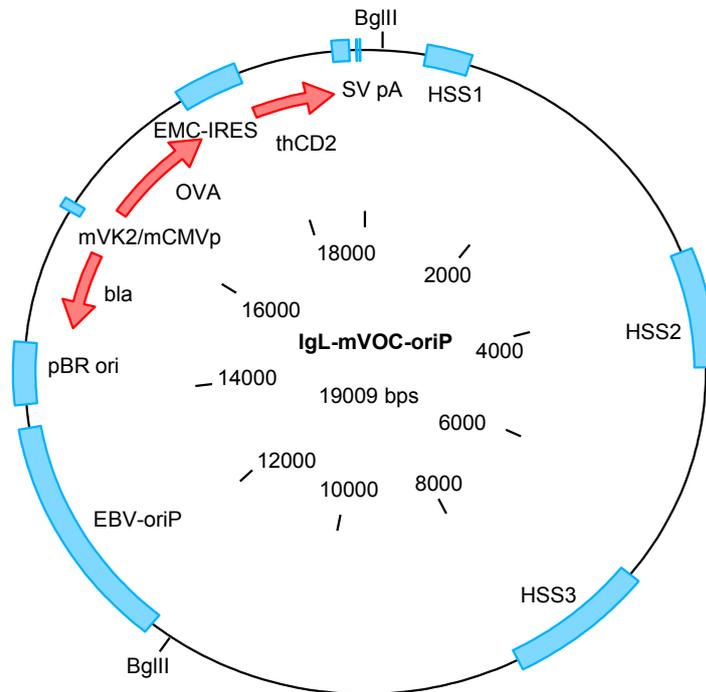


Abbildung 4: λ -VOC-Vektor-Konstrukt. Eine OVA-IRES-thCD2 Expressionskassette hinter dem murinen κ 2-Promoter wurde vor die Ig λ konstante Region in pBC119B-DH-MCS2 eingebracht. λ -VOC steht für κ 2, OVA und trunkiertes humanes CD2.

2.14 Software

Für die statistische Auswertung und für die graphische Darstellung der Daten wurde GraphPad Prism 5.02 (GraphPad, La Jolla, USA) verwendet. Über die BD FACSDiva Software (BD, Heidelberg) wurden Daten am FACSCanto II gewonnen. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte über die FlowJo Software PC Version 7.6 (Celeza, Olten, Switzerland). Zur Analyse der CBA-Daten wurde die FCAP Array™ v3.0.1 Software (BD, Heidelberg) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Adoptiver T-Zelltransfer bei transplantierten Tumoren mit Apoptosedefekten

3.1.1 Herstellung Apoptose-defizienter Lymphom-Zelllinien mit Expression eines spezifischen Antigens

An die Zelllinien, die in die λ -OVA-Maus transplantiert werden sollten, stellten sich folgende Anforderungen: Sie sollten OVA als spezifisches Antigen für den OT-1-T-Zelltransfer exprimieren und zusätzlich einen Apoptosedefekt durch *bcl-2*-Überexpression oder einen Apoptose-/Seneszenzdefekt durch *p53*-Verlust aufweisen. Für die Zeit, in der das OVA-tolerante Mausmodell noch nicht zur Verfügung stand, wurden vorübergehend auch Zelllinien ohne OVA-Antigen benötigt.

Als OVA-exprimierende Kontroll-Zelllinie ohne Apoptosedefekt wurde mit Hilfe des Vektors MSCV-OVA-IRES-GFP die Zelllinie 291OVA generiert und anhand der GFP-Expression durchflusszytometrisch aufgereinigt. Diese Zelllinie wurde anschließend durch Transduktion mit dem Vektor MSCV-Bcl2-IRES-DsRed zur Überexpression von *bcl-2* gebracht (291OVA-Bcl2). Myc-Lymphomzelllinien wiesen allgemein eine hohe spontane Apoptose-Rate auf (vgl. Abbildung 8). *Bcl-2*-transduzierte Zellen selektierten sich in Kultur von selbst, da ihnen Bcl-2 als Apoptoseinhibitor einen Überlebensvorteil verschaffte. Für die Herstellung einer Zelllinie mit *bcl-2*-Überexpression ohne OVA-Antigen wurde die Zelllinie 291PC mit dem Vektor MSCV-Bcl2-IRES-GFP und als GFP-Kontrolle mit dem Vektor MSCV-IRES-GFP transduziert. Die GFP-Kontrolle wurde durchflusszytometrisch aufgereinigt.

Um Zelllinien zu generieren, in denen ein Apoptose-/Seneszenzdefekt durch *p53*-Verlust vorliegt, wurden $p53^{+/-}$ -Mäuse mit λ -MYC-Mäusen gekreuzt. In den λ -MYC x $p53^{+/-}$ -Nachkommen, die über PCR genotypisiert wurden, verringerte sich die Tumortalenz deutlich, und das Überleben wurde signifikant verkürzt (37 Tage, s. Abbildung 6A). Das *p53*-Wildtypallel ging dabei in den $p53^{+/-}$ heterozygoten Lymphomen verloren. Über PCR konnte bestätigt werden, dass die gewonnenen Lymphomzellen homozygot $p53^{-/-}$ vorlagen. Die Lymphom-Zelllinie 189PC wurde retroviral mit dem Vektor MSCV-OVA-IRES-GFP transduziert. Die daraus resultierende Zelllinie 189OVA wurde anhand der GFP-Expression durchflusszytometrisch aufgereinigt. Da in diesem Fall die Herstellung einer

Apoptose-/Seneszenzdefekt-freien 189OVA-Kontroll-Linie nicht möglich war, wurde die 291OVA auch hier als Kontrolle hinzugezogen.

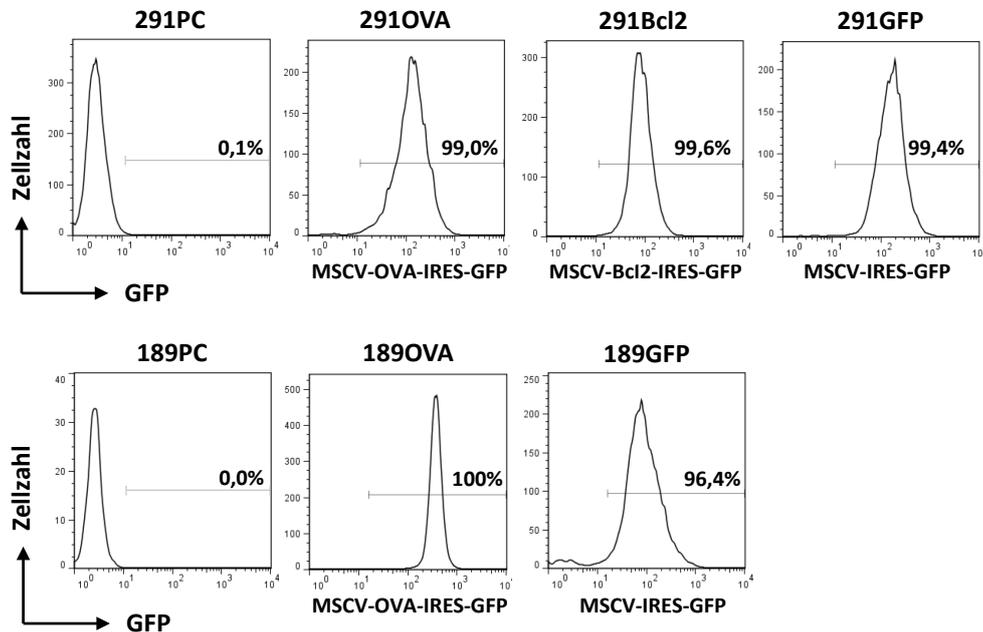


Abbildung 5: Transduzierte Zelllinien waren nach durchflusszytometrischer Aufreinigung zu > 96 % GFP-positiv. Die parentalen Zelllinien 291PC und 189PC wurden retroviral mit Vektoren für OVA-Expression und Bcl2-Überexpression, jeweils verbunden mit GFP-Expression, transduziert. Als Kontrolle wurde je eine GFP-exprimierende Linie hergestellt. GFP-Positivität zeigte die erfolgreiche Transduktion der Zellen an.

Für die Herstellung OVA-transgener Lymphom-Zelllinien, die die retrovirale Transduktion mit MSCV-OVA-IRES-GFP verzichtbar machen, wurden ACTB-OVA-Mäuse, die ubiquitär Ovalbumin exprimieren, mit λ -MYC-Mäusen verpaart. Bezüglich des krankheitsfreien Überlebens konnten in den Nachkommen keine signifikanten Unterschiede zur λ -MYC-Maus festgestellt werden (s. Abbildung 6). Aus einem Lymphom der Nachkommen wurde die OVA-Linie 110PC gewonnen. Diese Lymphom-Zelllinie wurde retroviral mit dem Vektor MSCV-Bcl2-IRES-GFP transduziert. Mit der damit generierten 110Bcl2 stand eine weitere OVA-exprimierende Lymphom-Zelllinie mit Apoptosedefekt durch *bcl-2*-Überexpression zu Verfügung. Als GFP-Kontrolle wurde mit Hilfe des Vektors MSCV-IRES-GFP die Zelllinie 110GFP hergestellt. Da sich die Generierung dieser Zelllinie als schwierig erwies und die Zelllinie möglicherweise durch größeren Stress während der Transduktion und Aufreinigung Veränderungen erworben hatte, wurde als Kontrolle zur 110Bcl2 zusätzlich die 110PC verwendet.

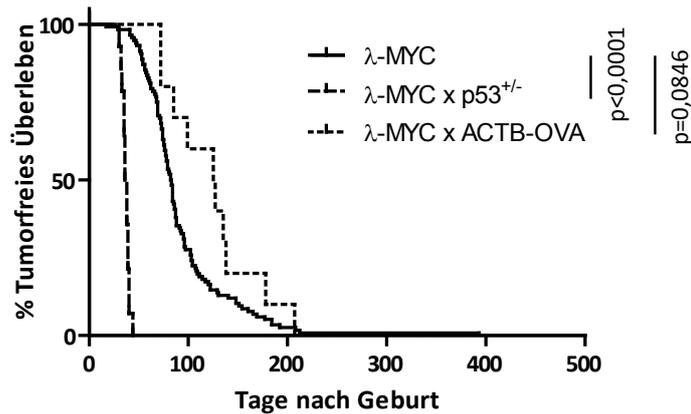


Abbildung 6: In λ -MYC x p53^{+/-}-Mäusen war die Tumoraltenz stark verkürzt. Krankheitsfreies Überleben (Kaplan-Meier) von λ -MYC x p53^{+/-}-Mäusen und λ -MYC x ACTB-OVA-Mäusen im Vergleich zu λ -MYC-Mäusen. (LogRank-Test, λ -MYC n=134, λ -MYC x p53^{+/-} n=14, λ -MYC x ACTB-OVA n=10).

Im Western Blot ließen sich die entsprechenden Genprodukte nach Transduktion nachweisen (Abbildung 7). Die Quantifizierung zeigte, dass 291OVA und 291OVA-Bcl2 keine Unterschiede in der OVA-Proteinexpression aufwiesen, während 189OVA deutlich geringere Mengen Ovalbumins produzierte. Alle hergestellten Lymphomzelllinien sind zur Übersicht in Tabelle 1 mit ihren Charakteristika aufgeführt.

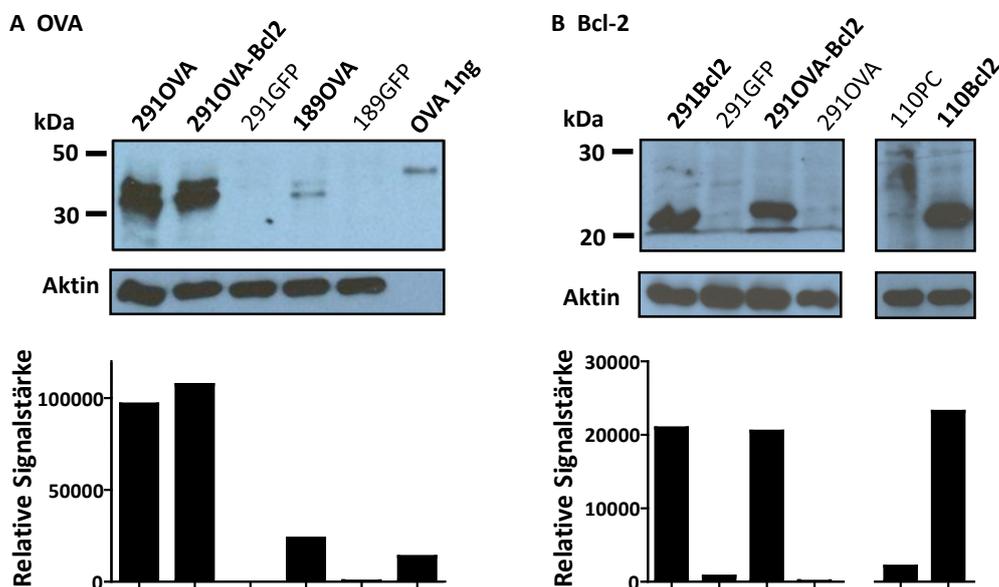


Abbildung 7: Die Genprodukte Ovalbumin (OVA) und Bcl-2 waren in den transduzierten Zelllinien auf Proteinebene nachweisbar. Die parentalen Zelllinien 291PC und 189PC wurden retroviral mit Vektoren für OVA-Expression und *bcl-2*-Überexpression, jeweils verbunden mit GFP-Expression, transduziert und durchflusszytometrisch nach GFP aufgereinigt. Lysate der Zelllinien wurden im Western Blot mit Hilfe von Antikörpern gegen A) OVA und B) Bcl2 getestet. Unterhalb der Banden ist das Ergebnis der Quantifizierung des jeweiligen Proteins unter Berücksichtigung der Aktin-Bandenstärke dargestellt.

Bezeichnung	Genotyp	Erwartete Eigenschaft
291PC	<i>c-myc</i> -transgen	
291GFP	<i>c-myc</i> -transgen, <i>GFP</i>	
291Bcl2	<i>c-myc</i> -transgen, <i>bcl-2</i> gekoppelt an <i>GFP</i>	Apoptosedefekt
291OVA	<i>c-myc</i> -transgen, <i>Ovalbumin(OVA)</i> gekoppelt an <i>GFP</i>	
291OVA-Bcl2	<i>c-myc</i> -transgen, <i>OVA</i> gekoppelt an <i>GFP</i> , <i>bcl-2</i> gekoppelt an <i>Ds-Red</i>	Apoptosedefekt
110PC	<i>OVA</i> -transgen, <i>c-myc</i> -transgen	
110GFP	<i>OVA</i> -transgen, <i>c-myc</i> -transgen, <i>GFP</i>	
110Bcl2	<i>OVA</i> -transgen, <i>c-myc</i> -transgen, <i>bcl-2</i> gekoppelt an <i>GFP</i>	Apoptosedefekt
189PC	<i>p53</i> ^{-/-} , <i>c-myc</i> -transgen	Apoptose-/Seneszenzdefekt
189GFP	<i>p53</i> ^{-/-} , <i>c-myc</i> -transgen, <i>GFP</i>	Apoptose-/Seneszenzdefekt
189OVA	<i>p53</i> ^{-/-} , <i>c-myc</i> -transgen, <i>OVA</i> gekoppelt an <i>GFP</i>	Apoptose-/Seneszenzdefekt

Tabelle 1: Übersicht generierter Myc-Zelllinien nach Genotyp und erwarteter Eigenschaft

3.1.2 Zelllinien mit Apoptosedefekten sind weniger empfindlich gegenüber Chemotherapie

Zur Überprüfung, ob *bcl-2*-Überexpression und *p53*-Defekt die generierten Zelllinien, wie erwartet resistent gegenüber Chemotherapie machen, wurden zunächst die Zelllinien ohne OVA-Antigen (291GFP, 291Bcl2 und 189GFP) für 5 Tage mit 0,05 µg/ml Adriamycin behandelt. Die Vitalität der Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht erfasst. Über das Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter, FSC) wird die relative Größe der Zellen gemessen und auf der x-Achse dargestellt. Über das Seitwärtsstreulicht (Side-Scatter, SSC) wird die relative Granularität gemessen und auf der y-Achse angezeigt. Die vitale Population lässt sich anhand

dieser Eigenschaften in der grafischen Darstellung von der toten Population abgrenzen, da abgestorbene Zellen deutlich kleiner und granularer sind. Die vitale Population wurde im Lebendgate erfasst. Wie zuvor schon erwähnt weisen Lymphomzelllinien, die für diese Arbeit verwendet wurden, gewöhnlich (auch *in vivo*) einen hohen Grad an Spontanapoptose auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Adriamycin zu einer starken Abnahme der Vitalität der 291GFP-Zellen (von 57,4 % auf 9,56 %) führte. Im Gegensatz hierzu zeigten die *bcl-2*-transduzierten 291-Zellen schon im unbehandelten Zustand einen verringerten Anteil an Spontanapoptose und damit eine höhere Vitalität, die durch die Adriamycin-Behandlung deutlich weniger stark (von 79,6 % auf 56,2 %) abnahm. Die Vitalität der *p53*-defizienten 189GFP nahm ebenfalls weniger stark ab (von 63,5 % auf 25,6 %), lag aber nach Behandlung in geringerem Umfang vor als bei 291Bcl2.

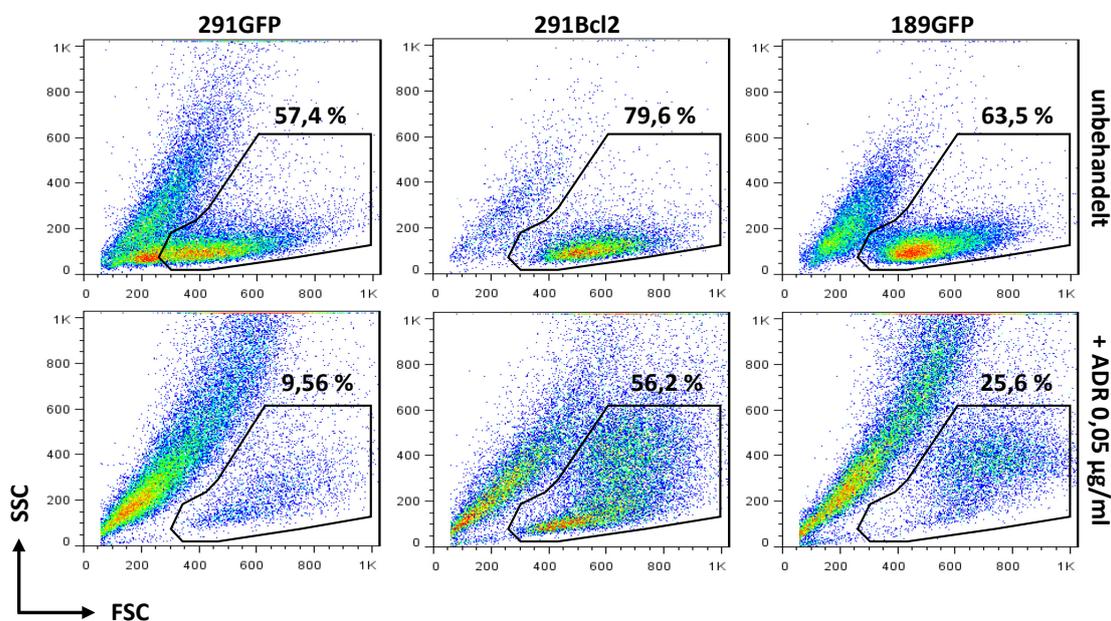


Abbildung 8: *Bcl-2*-transduzierte und *p53*-defiziente Lymphomzelllinien zeigten eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapie. Die Lymphomzelllinien 291 GFP, 291 Bcl2 und 189GFP wurden 5 Tage lang in Kultur mit 0,05 µg/ml Adriamycin behandelt. Gezeigt ist der Forward-Side-Scatter (SSC-Side-Scatter, FSC-Forward-Scatter) der Zelllinien vor und nach Behandlung. Ihre vitalen Populationen sind im Lebend-Gate markiert und quantifiziert.

Die oben verwendeten Zelllinien wurden auch *in vivo* auf ihre Chemotherapie-Resistenz getestet. Dazu wurden 1×10^5 Zellen subkutan (s.c.) in die rechte Flanke von *STAT1*^{-/-} Mäuse injiziert. Nach etwa 12 Tagen konnten die sich entwickelnden Tumore am Injektionsort ertastet werden. Bei einer Tumorgöße von 10 mm Durchmesser (Tag 17 bis 21) wurde intraperitoneal (i.p.) eine Dosis von 250 mg/kg Cyclophosphamid (EDX) injiziert. Lymphome der 291GFP-Gruppe nahmen nach dieser Behandlung kontinuierlich an Größe ab. Hingegen wuchsen 291Bcl2-Lymphome nicht oder nur

sehr verlangsamt weiter. Ähnlich verhielten sich auch die 189GFP-Lymphome, welche aber zwei Tage nach Behandlung mit EDX sehr langsam zu schrumpfen begannen. Bei den unbehandelten Kontroll-Lymphomen der drei Zelllinien nahm die Größe der Tumore kontinuierlich zu, so dass die Mäuse aufgrund der Tumorlast schon nach 5 Tagen euthanasiert werden mussten.

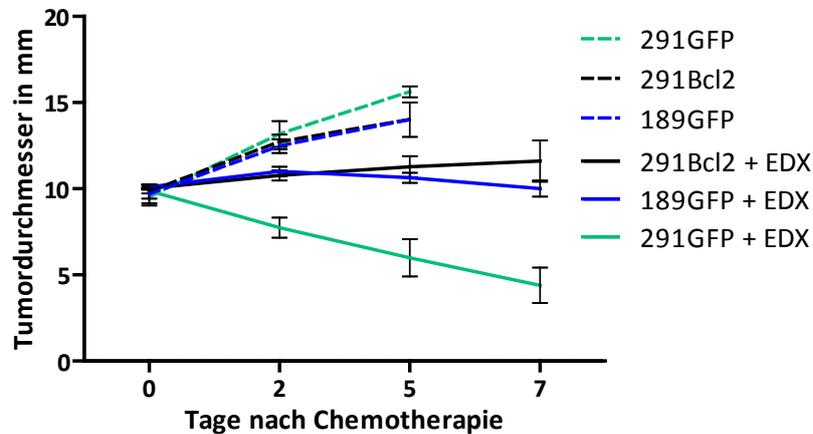


Abbildung 9: *Bcl-2*-überexprimierende und *p53*-defiziente Lymphome sind resistenter gegenüber EDX-Behandlung. Jeweils 1×10^5 Zellen der Lymphom-Zelllinien 291GFP, 291Bcl2 und 189GFP wurden s.c in *STAT1*^{-/-}-Mäuse (n=9-10) injiziert. Mäuse mit einem Tumordurchmesser von 10 mm wurden mit 250 mg/kg EDX behandelt oder blieben als Kontrollgruppe (n=5) unbehandelt (Standardfehler).

Die Ergebnisse des *in vitro*-Versuchs spiegeln sich damit auch *in vivo* wieder. *Bcl-2*-transduzierte und *p53*-defiziente Zelllinien zeigten sich resistenter gegenüber Chemotherapie. Dabei erwies sich für die Überlebensfähigkeit der Zellen die *bcl2*-Überexpression als größerer Vorteil als der *p53*-Verlust.

Für die Versuche mit Chemotherapie und OT1-Transfer im λ -OVA-Mausmodell wurden auch die dafür eingesetzten OVA-positiven Zellen *in vitro* auf ihre Resistenz gegenüber Chemotherapie untersucht. In diesem Fall wurden die Zelllinien 291OVA, 291OVA-Bcl2, 189OVA, 110PC, 110GFP und 110Bcl2 in Kultur für 20 h mit 1 μ g/ml Adriamycin behandelt. Anschließend wurde durchflusszytometrisch ihre Annexin-V-Positivität als Marker für Apoptose bestimmt. Da die Zahl der Zellen, die sich schon vor Behandlung in Spontanapoptose befanden, zwischen den Zelllinien stark variierte (s. Abbildung 8), sollte der Anteil apoptotischer Zellen ermittelt werden, der tatsächlich aus der Chemotherapie resultierte. Daher wurde über die Messung der Annexin-V-Positivität der Zellen vor und nach Behandlung mit Adriamycin der Anteil der induzierten Apoptose berechnet. Wie in der Abbildung 10 gezeigt, bewirkte die Chemotherapie nach 20 h bei 291OVA eine Zunahme Annexin-V-positiver Zellen um 24,3 %, während Apoptose in der *bcl-2*-überexprimierenden Linie 291OVA-Bcl2 unterdrückt wurde (1,1 %). Auch bei der *p53*^{-/-}-Linie

189OVA schien weniger Apoptose (8,2 %) induziert zu werden, allerdings stellte sich der Unterschied zu 291OVA als nicht signifikant heraus. Bei den OVA-transgenen Lymphom-Zelllinien 110PC und 110GFP nahm der Anteil Annexin-V-positiver Zellen um 22,5 % bzw. 13,2 % zu. Durch *bcl-2*-Überexpression (110Bcl2) wurde Apoptose ebenfalls unterdrückt (0,7 %).

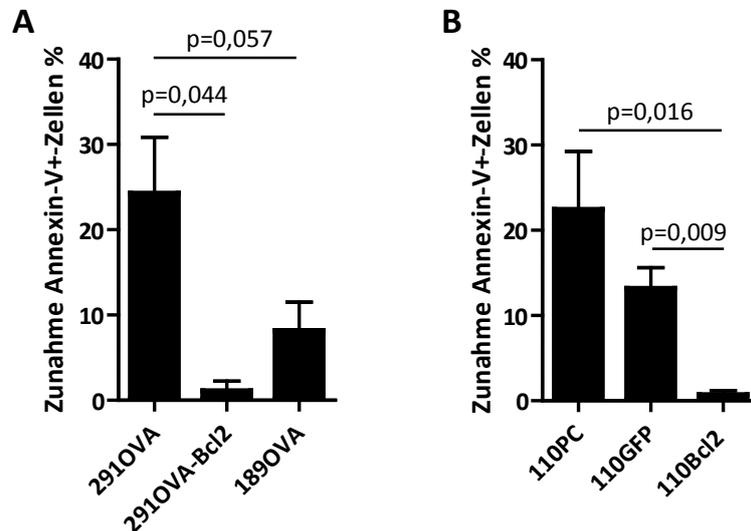


Abbildung 10: Chemotherapie-Resistenz der OVA-Zelllinien *in vitro*. 20 h nach Behandlung mit 1 µg/ml Adriamycin wurde die AnnexinV-Positivität der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt und mit Hilfe unbehandelter Kontrollen die Zunahme des Prozentsatzes der AnnexinV⁺-Zellen ermittelt (Zunahme = Chemotherapie-induzierte Apoptose – spontane Apoptose), n=3-7 (Mann-Whitney-Test). A) OVA-transduzierte Zelllinien, B) OVA-transgene Zelllinien.

Bcl-2-Überexpression resultierte in den Lymphom-Zelllinien *in vitro* sowie *in vivo* in einer verringerten Apoptosefähigkeit und damit einer erhöhten Chemotherapie-Resistenz. Zu einem geringeren Ausmaß war eine Resistenz bzw. die Tendenz zur Chemotherapie-Resistenz auch bei Lymphomzelllinien mit *p53*-Verlust zu beobachten.

3.1.3 Chemotherapie *in vitro* induziert Seneszenz in *bcl-2*-überexprimierenden Zellen

Zytospins der Adriamycin-behandelten Zellen ohne OVA-Antigen aus dem Vorversuch wurden mit Hilfe des β -Galaktosidase-Assays auf Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase gefärbt. 291GFP-Zellen erschienen unter dem Mikroskop klein, deformiert und wiesen keine Färbung auf, da der Großteil der Zellen tot war (s. auch Abbildung 8). 291Bcl2-Zellen waren größer als vor Behandlung, wiesen riesige Zellkerne auf und zeigten eine Blaufärbung der Vesikel. 189GFP hingegen zeigte kleine, deformierte, ungefärbte Zellen, sowie große Zellen mit Blaufärbung der Vesikel.

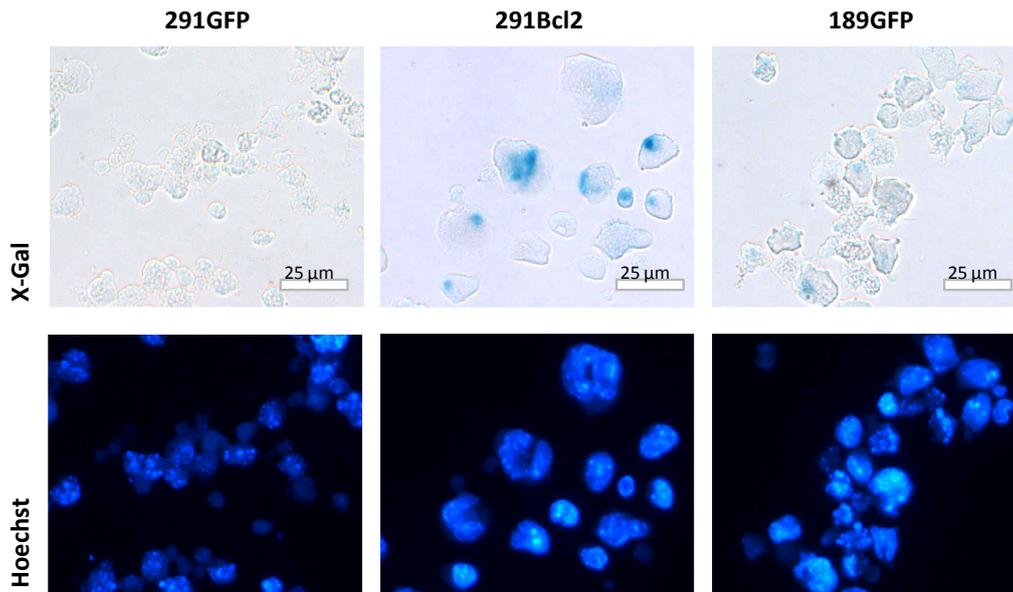


Abbildung 11: Adriamycin-Behandlung induziert Seneszenz in *bcl-2*-überexprimierenden Zellen. 291GFP, 291Bcl2 und 189GFP wurden für 5 Tage in Kultur mit 0,05 µg/ml ADR behandelt. Anschließend wurden Zytospins hergestellt. Die Zellen wurden im SA-β-Galaktosidase-Assay mit X-Gal angefärbt. Vesikel seneszenten Zellen erschienen dadurch blau. Die Kerne der Zellen wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt.

Die Chemotherapie führte bei den *bcl-2*-überexprimierenden Zellen, die, wie schon im Vorversuch festgestellt wurde, Apoptose-defizient waren, zur Induktion von Seneszenz. Auch derjenige Teil der *p53*^{-/-}-Zellen, der die Behandlung überlebt hatte, war in den seneszenten Zustand eingetreten. Dementsprechend war zu vermuten, dass die Vermittlung der Seneszenz p53-unabhängig über p16 stattgefunden hat.

3.1.4 Die Expression von MHC-Molekülen wird durch Chemotherapie nicht verändert

Da das OVA-SIINFEKL-Peptid für die Erkennung durch OT1-T-Zellen im Kontext von MHC-I-Molekülen präsentiert werden muss, wurde die Expression von MHC-Molekülen vor und nach Chemotherapie untersucht. Tumore aus oben beschriebenem *in vivo* Experiment mit den Lymphom-Zelllinien 291GFP, 291Bcl2 und 189OVA wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von MHC untersucht. Obwohl einzelne Lymphome Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe aufwiesen, ergab sich eine weite Streuung der Expression der MHC-Komplexe (mit Ausnahme der MHC-II-Moleküle der 291Bcl2-Tumore). Daher waren nach Behandlung keine signifikanten Veränderungen messbar. Im Vergleich mit 291GFP wiesen 291Bcl2-Tumore nach Chemotherapie eine signifikant höhere Expression von MHC-I-Molekülen auf und exprimierten signifikant weniger MHC-II-Moleküle. 189GFP-Tumore zeigten keine Unterschiede.

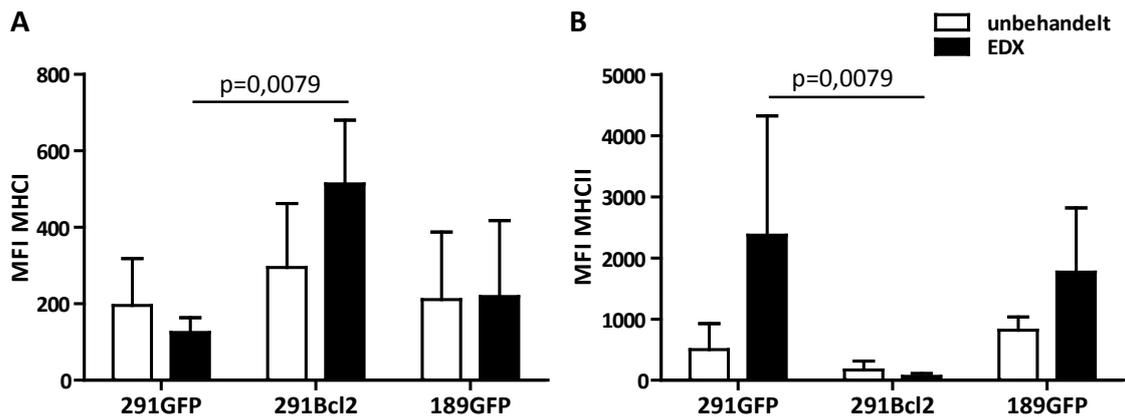


Abbildung 12: Die MHC-Expression wird durch EDX nicht verändert. Jeweils 1×10^5 Zellen der drei Lymphom-Zelllinien 291GFP, 291Bcl2 und 189GFP wurden s.c in STAT1^{-/-} Mäuse injiziert. Mäuse mit einem Tumordurchmesser von 10 mm wurden mit 250 mg/kg EDX behandelt oder blieben als Kontrollgruppe unbehandelt. Die Tumore wurden am Tag 7 nach EDX entnommen und durchflusszytometrisch auf ihre MHC I-Expression A) und ihre MHC II-Expression B) untersucht (n=5, Mittelwerte mit Standardabweichung). Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen nach Färbung. Alle nicht markierten Unterschiede in den Grafiken waren nicht signifikant (Mann-

In den *in vivo*-Versuchen mit adoptivem T-Zelltransfer in der λ -OVA-Maus wurde der OT-1-Transfer 3 Tage nach Chemotherapie durchgeführt. Sieben Tage nach EDX, wie in diesem Versuch repräsentiert, würden sich diese OT-1-Zellen im Fall der Erkennung des OVA-Antigens auf den Lymphomen in der Expansionsphase befinden. Dafür benötigte MHC I-Moleküle waren bei allen Lymphomzelllinien prinzipiell vorhanden. *Bcl-2*-Überexpression führte in Chemotherapie-behandelten Lymphomen zu einer höheren MHC I-Expression als in den anderen Gruppen. Ob über die exprimierten MHC I-Moleküle auch OVA präsentiert und von OT-1-T-Zellen erkannt wird, wurde im folgenden Versuch überprüft.

3.1.5 Zelllinien mit Apoptosedefekten werden von T-Zellen *in vitro* erkannt und eliminiert

Mit Hilfe von Kokulturversuchen sollte untersucht werden, wie zytotoxische T-Zellen auf OVA-positive Lymphomzelllinien mit *bcl-2*-Überexpression oder *p53*-Verlust reagieren.

Hierzu wurden die OVA-transduzierten Zelllinien mit den entsprechenden Defekten – 291OVA - Bcl2 und 189OVA – die OVA-positive Kontrolle 291OVA und die OVA-negativen Kontrollen 291GFP und 189GFP verwendet. Diese Zelllinien wurden jeweils für 48 h in einem Effektor-Target-Verhältnis (E:T) von 1:1 mit aufgereinigten OT-1-T-Zellen kultiviert. Als Kontrolle für die Vitalität der Lymphomzellen wurde die selbe Menge Lymphomzellen ohne OT-1-Zellen kultiviert.

Anschließend wurden die Zellkulturüberstände für einen IFN γ -ELISA abgenommen und die Konzentration des enthaltenen Zytokins IFN γ gemessen. Wie in Abbildung 13A gezeigt, hatte bei allen OVA-exprimierenden Zelllinien uneingeschränkt eine starke OT-1-T-Zellreaktion mit IFN γ -Sekretion stattgefunden.

Die Zellen der Kokulturen wurden durchflusszytometrisch auf ihre Zusammensetzung in Lymphomzellen (GFP⁺) und OT-1-T-Zellen (CD8⁺) untersucht (s. Abbildung 13B). Um sicher zu gehen, dass es sich bei GFP-negativen Zellen um T-Zellen handelt, wurden jeweils beide Histogramme gezeigt. In der Negativ-Kontrolle mit 291GFP war eine geringe Zahl an OT-1-T-Zellen und eine mehr als dreifach höhere Zahl an Lymphomzellen zu finden. Dementsprechend hatte keine T-Zellexpansion stattgefunden, während Lymphomzellen ungehindert proliferierten. In der Positivkontrolle mit 291OVA waren nur noch OT-1-Zellen nachweisbar. In der Vitalitätskontrolle ohne OT-1-Zellen waren stattdessen große Mengen an Lymphomzellen vorhanden, was darauf schließen ließ, dass die Lymphomzellen in Kokultur durch Einfluss der T-Zellen und nicht durch mangelnde Vitalität verschwunden waren. Auch in der Kokultur mit 291Bcl2-OVA waren die Lymphomzellen vollständig eliminiert, während sie in der Vitalitätskontrolle ungehindert proliferiert hatten. In der Negativ-Kontrolle mit 189GFP kam es wie bei 291GFP zu keiner T-Zellreaktion. Die 189OVA wurde, wie 291Bcl2, vollständig lysiert und zeigte Proliferation in der Vitalitätskontrolle.

Diese Kokulturversuche wurden auch nach 20 h Vorbehandlung durch 1 μ g/ml Adriamycin durchgeführt. Zusätzlich wurden die OVA-transgenen Zelllinien 110PC, 110GFP und 110Bcl2 getestet. Auch hier reagierten die OT-1-T-Zellen ohne Einschränkung mit IFN γ -Sekretion (Daten nicht gezeigt).

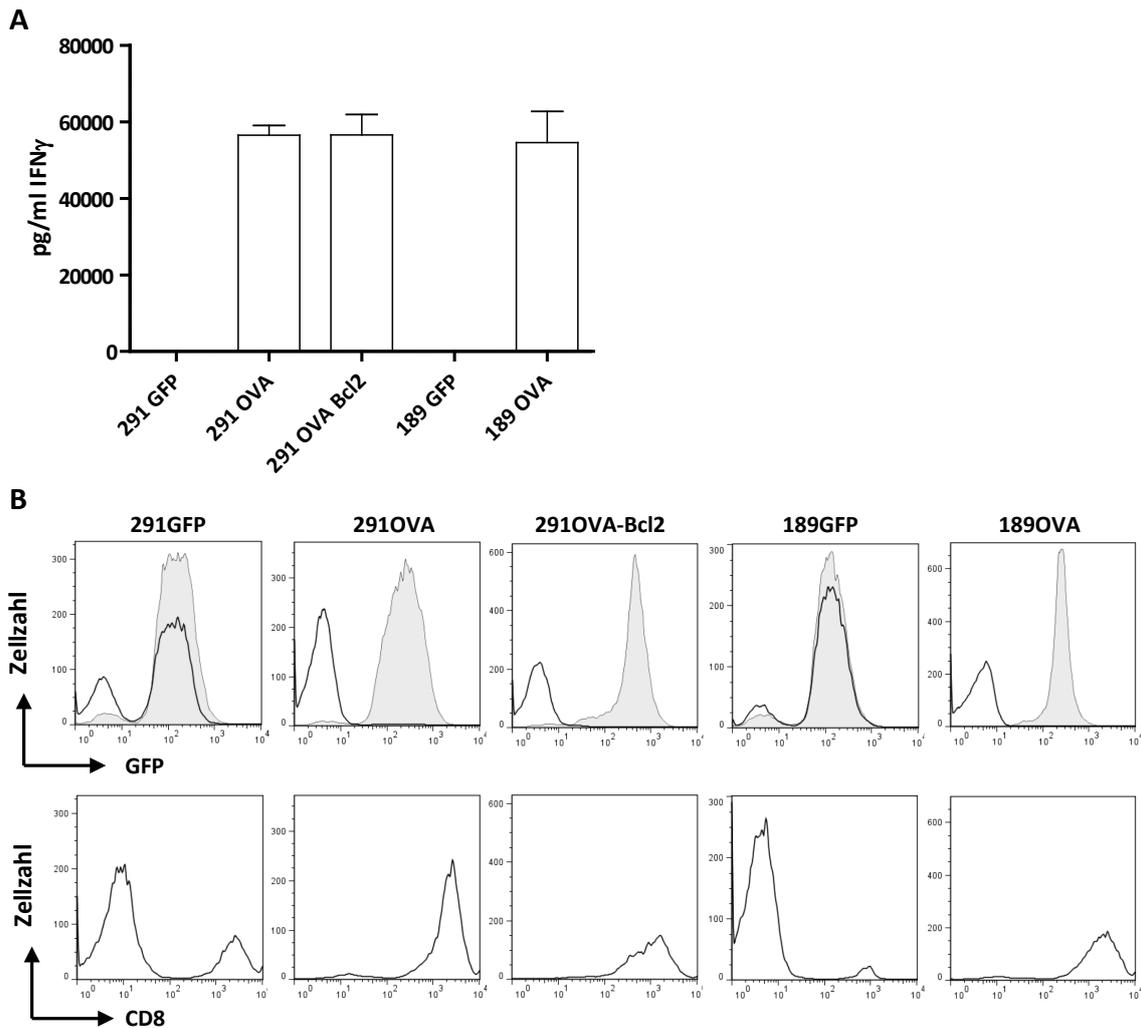


Abbildung 13: *Bcl-2*-überexprimierende und *p53*-defiziente OVA-Lymphom-Zelllinien wurden von OT-1-T-Zellen erkannt und lysiert. OVA-transduzierte Zelllinien und GFP-Kontrollen wurden für 48 h 1:1 (E:T) mit OVA-SIINFEKL-spezifischen OT-1-T-Zellen in Vierer-Ansätzen kokultiviert und nach 48 h durchflusszytometrisch (Lebendgate) analysiert. Als Vitalitätskontrolle wurde die selbe Menge an Lymphomzellen allein kultiviert (grau hinterlegt). A) Im ELISA wurde die Konzentration an sezerniertem IFN γ bestimmt. In einem Balken der Grafik sind alle vier Ansätze im Mittelwert (mit Standardabweichung) zusammengefasst. B) Je Probe wurden 50000 Zellen der Gesamtpopulation inklusive toter Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Histogramme zeigen die Menge der Zellen aus dem Lebendgate. Lymphomzellen sind oben über GFP dargestellt. Als Abgleich, dass es sich bei GFP-negativen Zellen um T-Zellen handelt, sind unten die CD8-positiven Zellen gezeigt.

Zelllinien mit *bcl-2*-Überexpression und *p53*-Verlust wurden genauso gut erkannt und lysiert, wie Kontrollzelllinien ohne Apoptosedefekte. Damit wurde bestätigt, dass sie nicht nur MHC-I-Moleküle exprimierten, sondern dass auch die Präsentation des OVA-Peptids funktionell war.

3.1.6 Seneszente Zellen werden von antigenspezifischen T-Zellen lysiert

Um zu untersuchen, ob auch seneszente Zellen durch T-Zellen eliminiert werden können, wurden 291OVA-Bcl2-Zellen 5 Tage lang in Kultur mit 0,05 µg/ml Adriamycin behandelt. Die Seneszenz der Zellen wurde nach Chemotherapie durch das SA-β-Galaktosidase-Assay geprüft (s. Abbildung 14A). Auch ohne Behandlung zeigten vereinzelte 291OVA-Bcl2-Zellen schon eine Blaufärbung, nach ADR-Behandlung lagen alle Zellen vergrößert vor und wiesen die typische Blaufärbung der Vesikel auf, was auf die Induktion von Seneszenz schließen ließ. Diese seneszenten 291OVA-Bcl2-Zellen wurden anschließend für 48 h in einem Effektor-Target-Verhältnis von 1:1 mit OT1-T-Zellen kokultiviert. In den Überständen konnte eine hohe IFN γ -Konzentration nachgewiesen werden (s. Abbildung 14B). Demzufolge hatte eine starke OT-1-T-Zellreaktion stattgefunden. Auch durchflusszytometrisch (s. Abbildung 14C) zeigte sich, dass seneszente Zellen ähnlich gut wie unbehandelte 291 OVA-Bcl2-Zellen (vgl. 5.1.5) lysiert werden konnten. In der Kultur waren nur noch CD8-Zellen nachweisbar. Seneszente Zellen in der Kontrolle ohne OT-1-Zellen waren vital und lagen aufgrund ihres Proliferationsarrests in geringer Menge vor als Kontroll-Lymphomzellen im Kokultur-Versuch mit 291OVA-Bcl2 (vgl. Abbildung 13).

Demzufolge stellte der seneszente Zustand von Lymphomzellen *in vitro* genauso wenig ein Hindernis für die Eliminierung durch zytotoxische T-Zellen dar, wie die *bcl-2*-Überexpression oder der Verlust von *p53*.

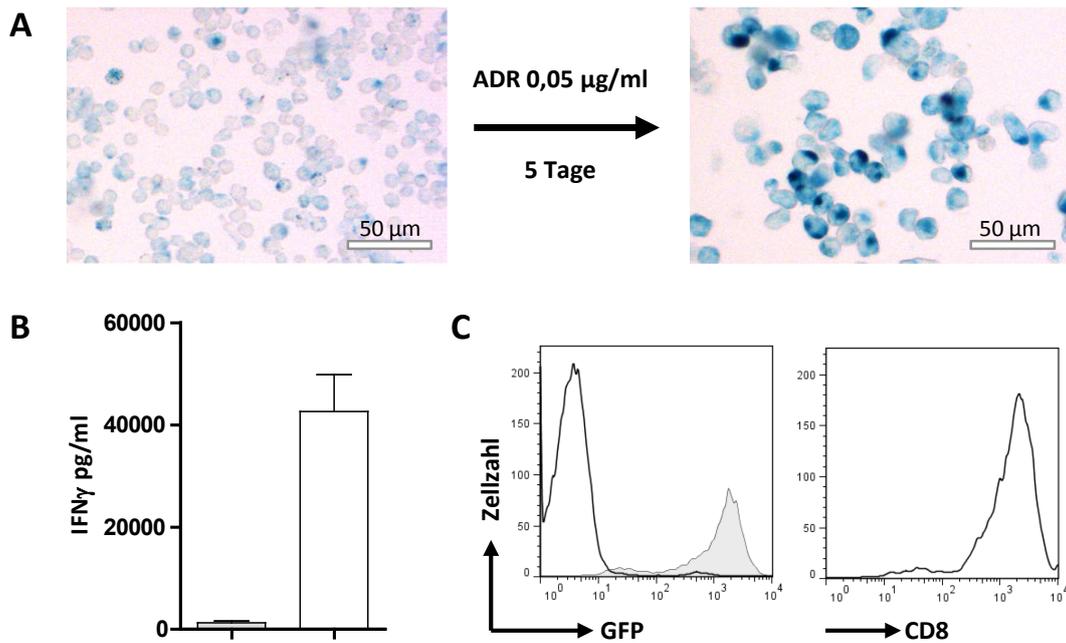


Abbildung 14: Seneszente Zellen wurden von OT-1-T-Zellen eliminiert. 291OVA-Bcl2-Zellen wurden für 5 Tage in Kultur mit 0,05 µg/ml Adriamycin behandelt. **A)** In den Zellen wurde vor und nach der Behandlung SA-β-Galaktosidase über X-Gal angefärbt (Blaufärbung). **B)** OT-1-T-Zellen wurden für 48 h 1:1 (E:T) mit seneszenten 291OVA-Bcl2 Zellen kokultiviert. Als Kontrolle für die Vitalität der seneszenten Lymphomzellen ohne T-Zelleinfluss wurde die gleiche Menge seneszenten Zellen allein ausgesät (grau hinterlegt in B und C). In den Zellkulturüberständen wurde mit ELISA die Konzentration von IFN γ bestimmt. In einem Balken sind alle vier Ansätze im Mittelwert zusammengefasst (linker Balken Kontrolle ohne OT-1-Zellen). **C)** Je Probe wurden 50000 Zellen der Gesamtpopulation inklusive toter Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Histogramme zeigen die Menge der Zellen aus dem Lebendgate. Lymphomzellen sind links über GFP dargestellt. Als Abgleich, dass es sich bei GFP-negativen Zellen um T-Zellen handelt, sind rechts daneben die CD8-positiven Zellen gezeigt.

3.1.7 Generierung OVA-toleranter Mäuse

Tumortransferversuche werden überwiegend in immunkompromittierten Mausmodellen, wie z.B. T-/B-Zell-defizienten RAG-Mäusen durchgeführt. Damit ist es möglich, immunogene Tumore ohne Aktivierung des Empfänger-Immunsystems zum Anwachsen zu bringen und diese kontrolliert durch adoptiven Transfer mit antigenspezifischen T-Zellen zu behandeln. Allerdings muss aufgrund des Fehlens wesentlicher immunologischer Komponenten in diesen murinen Modellen davon ausgegangen werden, dass die Ausbildung des Tumorstromas, welches eine wichtige Rolle bei der Tumorabstoßung spielt, nicht dem Stroma von immunkompetenten Empfängern entspricht. Um diese Einschränkungen zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Mausmodell generiert, das durch B-zellspezifische OVA-Expression (s. 4.13) tolerant gegenüber dem Ziel-Antigen ist. Die

λ -OVA-Maus stellte damit ein geeignetes Modell für die Transplantation OVA-positiver Lymphomzellen und die Behandlung der Tumore mit OT-1-T-Zellen dar. Durch Kreuzung mit der λ -MYC-Maus war es möglich, Tumore sogar in einem autochthonen Modell zu behandeln und dabei Artefakte, die bei Transplantation von Tumorzellen entstehen⁷⁵ vollständig zu umgehen. Da OVA als Antigen auch in den gesunden B-Zellen exprimiert wird, ergab sich als Risiko durch den adoptiven T-Zelltransfer die Kompromittierung des endogenen B-Zellkompartiments. Dieses Problem spiegelt jedoch auch klinisch relevante Situationen wieder, in denen B-zellspezifische Antigene, zum Beispiel CD19⁵⁴, als Zielantigen zur Behandlung von malignen B-Zellerkrankungen herangezogen werden. Die langfristige Eliminierung endogener B-Zellen erwies sich in solchen Experimenten nicht als lebensbedrohlich und damit als klinisch tolerierbar.

Das λ -VOC-Zielkonstrukt, auf dem OVA über eine IRES-Site an trunkiertes humanes CD2 gekoppelt hinter dem CMV-Promoter in der Ig λ -Region vorliegt (vereinfacht dargestellt in Abbildung 15A) wurde in ES-Zellklone eingebracht, die im Blastozystenstadium in weibliche Trägartiere transferiert wurden. Die Founder-Generation wurde durch Kreuzung mit dem Wildtyp auf Keimbahntransmission untersucht. In verschiedenen Ansätzen, wie Western-Blot oder immunhistochemische Detektion stellte sich heraus, dass sich OVA auf Proteinebene nicht eindeutig nachweisen ließ. Auch huCD2, das ursprünglich als Oberflächen-Marker für die erfolgreiche Vektorintegration verwendet werden sollte, war durchflusszytometrisch mit spezifischen Antikörpern nicht detektierbar. Daher wurden Milzzellen aus OVA-PCR-positiven Founder-Mäusen für die Durchführung einer OVA-spezifischen qPCR aufbereitet. Zum Vergleich wurden die Zelllinie 291OVA als Positivkontrolle und Milzzellen aus transgen negativen Geschwistern mitgeführt. λ -OVA-Milzzellen exprimierten mit 291OVA vergleichbar große Mengen des OVA-Transkripts (s. Abbildung 15B). Um zu Verifizieren, dass nicht nur OVA-mRNA sondern auch OVA-Protein hergestellt und auf B-Zellen präsentiert wird, wurden durchflusszytometrisch aufgereinigte B-Zellen (CD19⁺) aus Founder-Milzen für 48 h in einem Effektor-Target-Verhältnis von 1:1 mit SIINFEKL-spezifischen OT-1-T-Zellen kokultiviert. Als Kontrollen wurden Gesamtmilzzellen, aufgereinigte T-Zellen (CD3⁺) und doppelt-negative CD19⁻/CD3⁻ (DN) Rest-Zellen verwendet. Die Aktivierung der T-Zellen wurde über die Messung der Konzentration des Zytokins IFN γ im Zellkulturüberstand im ELISA geprüft. Hier zeigte sich (s. Abbildung 15C), dass die OVA-Expression bis hin zur Präsentation funktionell war. OT-1-T-Zellen reagierten auf B-Zellen mit ähnlich starker IFN γ -Sekretion wie auf Gesamtmilzzellen, während keine Reaktion auf CD3-Zellen oder DN-Milzzellen festzustellen war.

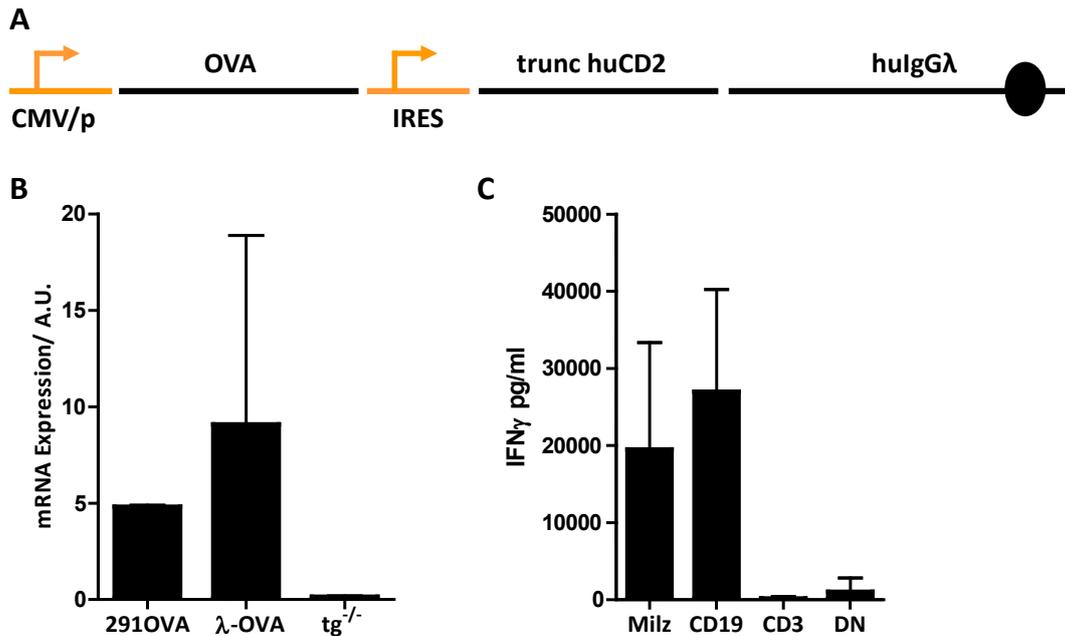


Abbildung 15: λ -OVA Mäuse exprimierten OVA B-zellspezifisch. A) Vereinfachte Darstellung des λ -OVA-Maus-Konstrukts. OVA liegt über eine IRES-Site mit trunkiertem humanem CD2 gekoppelt hinter dem CMV-Promoter in der IgG λ -konstanten Region. Dadurch sollten OVA und hu CD2 B-zellspezifisch exprimiert werden. B) Milzzellen von λ -OVA-Mäusen (n=11) und transgennegativen Geschwistern (tg^{-/-}, n=6) wurden für eine OVA-spezifische qPCR aufbereitet. 291OVA (n=2) wurde als Positivkontrolle verwendet. Es wurde jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Unterschiede waren nicht signifikant (Mann-Whitney-Test). C) Durchflusszytometrisch aufgereinigte CD19⁺-Zellen aus einer λ -OVA-Founder-Milz wurden für 48 h 1:1 (E:T) mit OT-1-T-Zellen kokultiviert. Als Kontrollen wurden Gesamtmilzzellen, aufgereinigte CD3⁺-Zellen und doppelt-negative CD3⁻/CD19⁻-Restzellen (DN) verwendet. Im ELISA wurde die Konzentration des sekretierten IFN γ s in den Zellkulturüberständen gemessen. In einem Balken wurden vier Ansätze je Probe im Mittelwert mit Standardabweichung

Um die Toleranz der Tiere gegen OVA zu prüfen, wurden 1×10^6 291OVA-Zellen s.c. in λ -OVA Mäuse und transgennegative Geschwister injiziert. In den λ -OVA-Mäusen wuchsen die 291OVA-Tumore schneller heran als in den transgennegativen Tieren. Dies spiegelte sich auch in einem signifikant verringerten Gesamtüberleben der λ -OVA-Mäuse wieder. Im Vektor MSCV-OVA-IRES-GFP, mit dem die 291OVA-Zelllinie transduziert worden war, liegt GFP über eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) an OVA gekoppelt vor. Daher lässt sich bei GFP-Expression darauf schließen, dass OVA ebenfalls exprimiert wird. Ein Verlust der GFP-Expression weist auf einen OVA-Verlust hin. Entnommene Tumorzellen beider Gruppen wurden daher durchflusszytometrisch auf GFP-Expression geprüft. Bis auf eine Ausnahme (n=1/7) zeigten alle aus transgennegativen Mäusen entnommenen Lymphomzellen einen GFP-Verlust. Lymphomzellen aus λ -OVA-Mäusen waren durchgehend GFP-positiv. Der Western-Blot bestätigte, dass Tumore, die in transgennegativen

Tieren gewachsen waren, das OVA nicht mehr exprimierten. Ausnahme war ein OVA-positiver Tumor, der auch in der Durchflusszytometrie keinen Verlust der GFP-Expression gezeigt hatte.

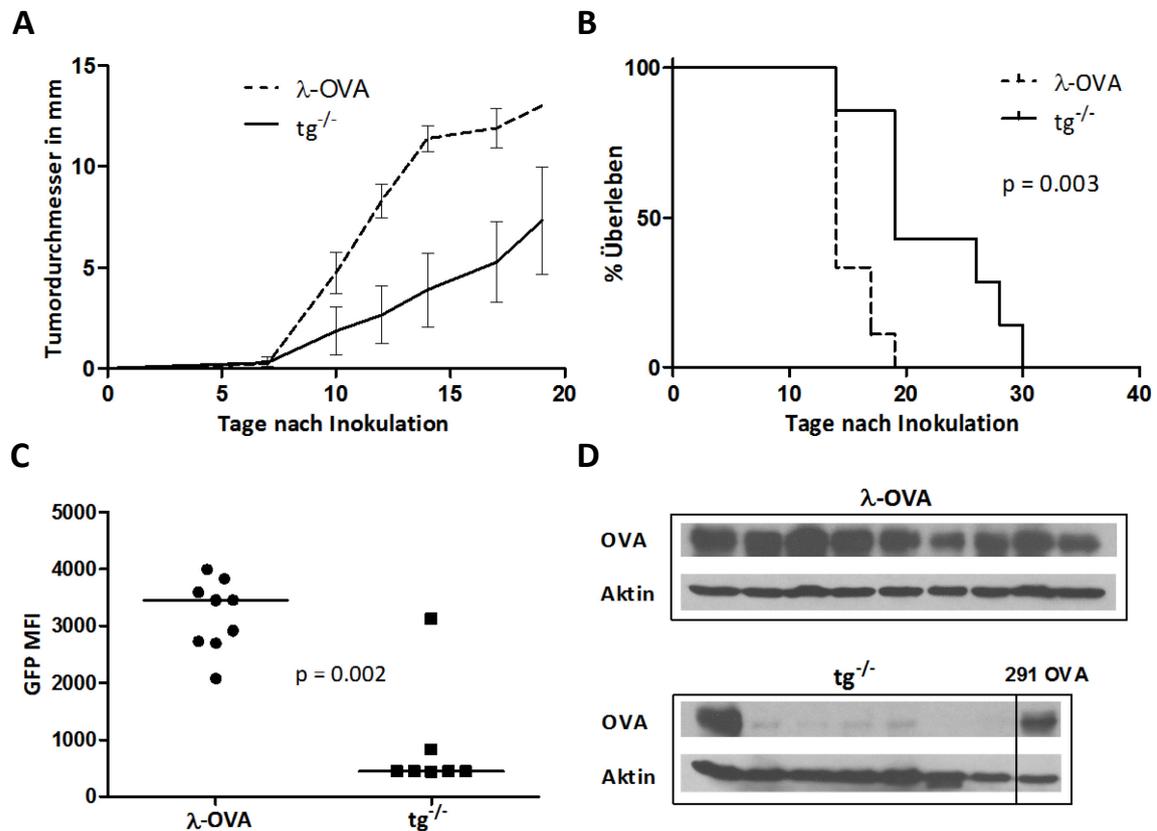


Abbildung 16: OVA-positive Lymphomzellen wuchsen in λ -OVA-Mäusen ohne Antigenverlust. 1×10^6 291OVA-Lymphomzellen wurden s.c. in λ -OVA-Mäuse und in $tg^{-/-}$ -Geschwister injiziert. A) Der Verlauf des Tumorwachstums ist anhand der Tumordurchmesser (λ -OVA $n=9$, $tg^{-/-}$ $n=7$) mit Mittelwert und Standardfehler gezeigt. B) Das Gesamtüberleben wurde mit Hilfe einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (Log-Rank-Test). C) Die Mittlere Fluoreszenzintensität von GFP der Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen (Median, Mann-Whitney-Test). D) Das OVA-Protein wurde über einen OVA-spezifischen Antikörper im Western-Blot detektiert.

Die fehlende Selektion von Antigenverlustvarianten in λ -OVA-Mäusen bestätigte die Toleranz der Tiere gegenüber OVA.

3.1.8 OT-1-T-Zelltoleranz in λ -OVA-Mäusen wird durch Chemotherapie unterbrochen

In der λ -OVA-Maus wurde zuvor nachgewiesen, dass normale B-Zellen OVA exprimieren und dass transplantierte OVA-exprimierende Lymphomzellen toleriert werden. Im nächsten Schritt sollte vorerst ohne transplantierte Lymphomzellen untersucht werden, wie sich OT-1-Zellen nach Transfer in λ -OVA-Mäuse verhalten.

Dazu wurden 1×10^7 OT-1-Milzzellen i.v. in λ -OVA-Mäuse und in transsgenegative Geschwister injiziert. Zehn Tage später erfolgte in beiden Mausgruppen eine Vakzinierung durch s.c. Injektion von 50 μ g OVA und 50 μ l *Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA). An Tag 0 vor, sowie an Tag 5, 10, 15, 20 nach Transfer wurde die Zahl der OT-1-Zellen und B-Zellen im peripheren Blut durchflusszytometrisch gemessen. In den λ -OVA-Mäusen blieb der Anteil der OT-1-T-Zellen an der Lymphozytenzahl im peripheren Blut trotz Transfer im Verlauf des Versuchs unverändert kaum detektierbar, während in den transsgenativen Tieren nach Vakzinierung ein Anstieg der OT-1-Zellzahlen auf 100 Zellen pro μ l Blut zu beobachten war. B-Zellzahlen in transsgenativen sowie in λ -OVA-Mäusen zeigten im Verlauf des Versuchs gewöhnliche Schwankungen.

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die OT-1-T-Zellen in λ -OVA-Mäusen durch Induktion von T-Zelltoleranz inhibiert wurden.

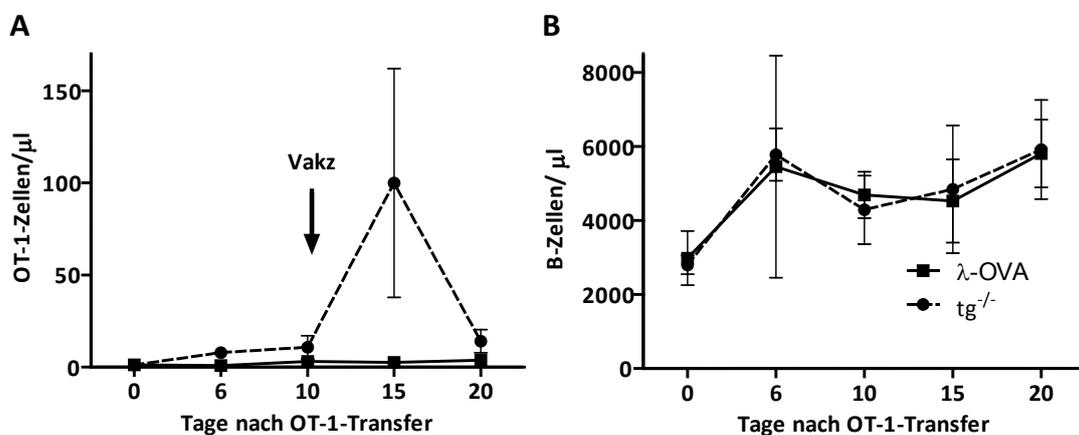


Abbildung 17: OT-1-T-Zellen zeigten auch nach Vakzinierung mit OVA-Protein keine Expansion nach Transfer in λ -OVA-Mäuse. 1×10^6 OT-1-T-Zellen wurden i.v. in λ -OVA-Mäuse (n=6) und transsgenegative Geschwister (n=5) injiziert. An Tag 10 wurden alle Mäuse mit 50 μ g OVA + 50 μ l IFA vakziniert. OT-1-Zellzahlen A) und B-Zellzahlen B) im peripheren Blut wurden an Tag 0, 5, 10, 15 und 20 durchflusszytometrisch gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Um zu überprüfen, ob toleranzinduzierende Zellen durch Chemotherapie deletiert werden, wurden im zweiten Versuchsansatz beide Mausgruppen mit einer Dosis von 250 mg/kg EDX behandelt. Drei Tage nach Chemotherapie wurden 1×10^6 OT-1-T-Zellen transferiert. Im peripheren Blut der λ -OVA-Mäuse war 7 Tage nach Transfer ein deutlicher Anstieg der OT-1-Zellzahlen zu beobachten, der bis Tag 14 wieder unter die Nachweisbarkeitsgrenze zurück fiel. In transsgenativen Geschwistertieren blieben die OT-1-Zellzahlen im Blut hingegen unverändert. B-Zellen in beiden Gruppen waren nach Chemotherapie fast vollständig deletiert. In transsgenativen Tieren begann ihre Regeneration spätestens an Tag 7 (10 Tage nach EDX), während B-Zellzahlen in λ -OVA-Mäusen erst nach Rückgang der OT-1-Zellzahlen ab Tag 14 (17

Tage nach EDX) wieder anstiegen. An Tag 56 hatten sich B-Zellzahlen beider Mausgruppen wieder angeglichen und lagen fast vollständig regeneriert vor.

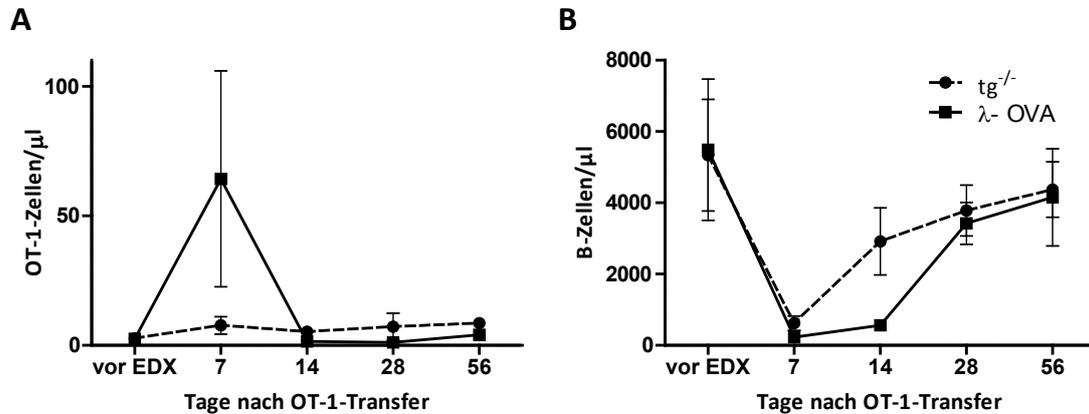


Abbildung 18: Die OT-1-T-Zelltoleranz in λ-OVA-Mäusen wurde durch Chemotherapie unterbrochen. λ-OVA-Mäuse (n=5) und transgennegative Geschwister (n=4) wurden mit einer Dosis von 250 mg/kg EDX behandelt. Drei Tage nach Chemotherapie wurden 1×10^6 OT-1-Zellen i.v. transferiert. An Tag 7, 14, 28 und 56 wurden OT-1-T-Zellzahlen A) und B-Zellzahlen B) im peripheren Blut durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass OT-1-T-Zellen nach Transfer in λ-OVA-Mäuse toleriert werden. Da es sich beim Zielantigen OVA um ein Selbstantigen handelte, wurde damit die autoreaktive Wirkung der OT-1-Zellen verhindert. Durch Chemotherapie konnten toleranzinduzierende Zellen eliminiert werden, so dass OT-1-Zellen in der Lymphopenie nach OVA-Antigenkontakt ungehindert expandieren konnten. Damit war die wichtigste Voraussetzung für Transferversuche bei transplantierten Tumoren gegeben.

3.1.9 *Bcl-2*-Überexpression in Lymphomen führt zur verbesserten T-Zell-vermittelten Remission *in vivo*

In vitro-Versuche hatten keinen Unterschied zwischen Wildtyp, *p53*-defizienten und *bcl-2*-überexprimierenden Zelllinien bezüglich ihrer Eliminierbarkeit durch spezifische T-Zellen gezeigt. Nun sollte die *in vivo*-Situation im λ-OVA-Mausmodell untersucht werden.

1×10^6 291OVA-, 291OVA-Bcl2- und 189OVA-Lymphomzellen wurden s.c. in λ-OVA-Mäuse injiziert. Nach etwa 14 Tagen, sobald der Tumor eine Größe von 3-10 mm Durchmesser erreicht hatte, wurden sie i.p. mit einer Dosis von 250 mg/kg EDX behandelt. Drei Tage nach Chemotherapie wurden in der Lymphopenie 1×10^6 OT-1-T-Zellen i.v. transferiert. Um Einflüsse durch den Transfer unterschiedlicher Präparationen von OT-1 Zellen auszuschließen, wurde eine ausreichende Menge

an OT-1-T-Zellen aufgereinigt und portioniert eingefroren. So konnte gewährleistet werden, dass alle Tiere ein identisches Zellpräparat erhielten.

Sieben Tage nach Transfer wurden OT-1-T-Zellzahlen und B-Zellzahlen im peripheren Blut durchflusszytometrisch gemessen. Diese Messung wurde wöchentlich bis Tag 21 fortgeführt und noch einmal an Tag 56 wiederholt. Eine Woche nach Transfer waren OT-1-T-Zellen (nicht detektierbar vor Transfer) in der 291OVA-Gruppe auf 831 Zellen/ μ l, bei 291OVA-Bcl2 auf 564 Zellen/ μ l und bei 189OVA sogar auf 1112 Zellen/ μ l expandiert (Mittelwerte, s. Abbildung 19A). In drei Mäusen der 189OVA-Gruppe zeigte sich eine besonders starke Reaktion mit OT-1-T-Zellzahlen von um die 2000 Zellen/ μ l. Daher war in dieser Gruppe eine hohe Streuung (s. Standardabweichung in Abbildung 19A) zu beobachten. Endogene B-Zellen aller Gruppen lagen am Tag 7 in niedrigen Zahlen von etwa 98-198 Zellen/ μ l vor (Mittelwerte, vgl. ca. 5500 Zellen/ μ l vor Chemotherapie, s. Abbildung 19B). Während die Zahl der OT-1-T-Zellen ab Tag 7 schnell wieder zurückging, ließ sich ein langsamer Anstieg der B-Zell-Zahlen beobachten. 21 Tage nach T-Zell-Transfer waren OT-1-T-Zellzahlen im Blut der Mäuse, die 291OVA und 291OVA-Bcl2 erhalten hatten, wieder fast auf den Wert vor Therapie abgesunken. Bei den Mäusen mit 189 OVA-Tumoren in denen eine besonders starke OT-1-T-Zellreaktion stattgefunden hatte, zog sich dieser Prozess länger hin. Sie waren spätestens nach 56 Tagen wieder am Ursprungswert angekommen. Endogene B-Zellen hatten diesen zu diesem Zeitpunkt erst zur Hälfte wieder erreicht.

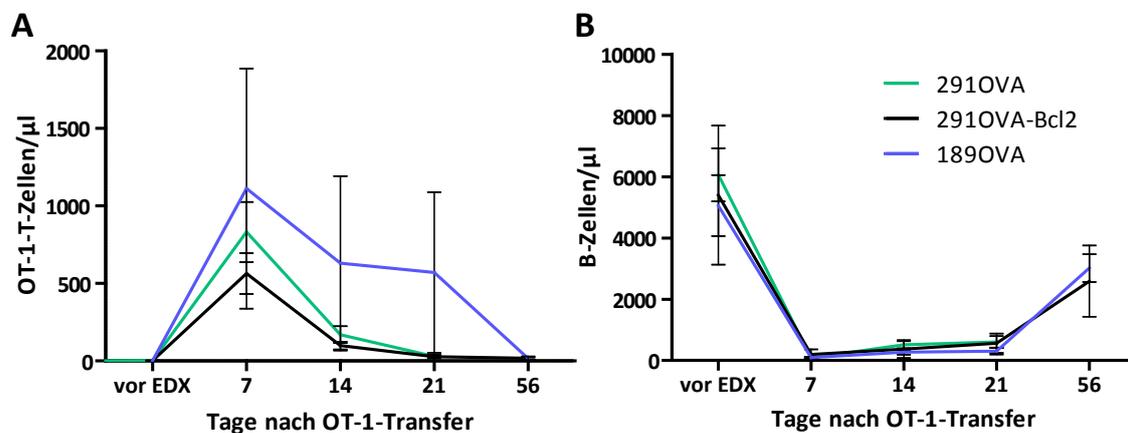


Abbildung 19: OT-1-T-Zellen zeigten eine starke Expansion nach Transfer in tumortragende EDX-behandelte Mäuse. 1×10^6 291OVA-, 291OVA-Bcl2- und 189OVA-Zellen wurden s.c. in λ -OVA-Mäuse injiziert. Bei einer Tumorgroße von 3-10 mm Durchmesser wurden die Mäuse mit einer Dosis von 250 mg/kg EDX behandelt. Drei Tage nach Chemotherapie (=Tag 0) wurden 1×10^6 OT-1-Zellen i.v. transferiert. An den Tagen 7, 14, 21 und 56 wurden OT-1-T-Zellzahlen A) und B-Zellzahlen B) im peripheren Blut durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (291 OVA n=10, 291OVA-Bcl2 n=10, 189OVA n=9).

Bei großen 291OVA-Tumoren (> 7 mm Durchmesser) bewirkte der OT-1-Transfer erst eine Zunahme der Tumorgöße, anschließend eine kurzzeitige Abnahme und schließlich nach etwa 14 Tagen wuchsen die Tumore ungehindert weiter (s. Abbildung 20A). Kleinere Tumore begannen sofort zu schrumpfen, verschwanden nach OT-1-Transfer und rezidierten innerhalb von 14-21 Tagen nach Chemotherapie. Nur ein Tumor (n=1/10) wurde dauerhaft eliminiert. In der 291OVA-Bcl2-Gruppe nahmen einige Tumore nach OT-1-Transfer ebenfalls an Größe zu. Der Großteil der Tumore begann anschließend zu schrumpfen und verschwand dauerhaft (n=9/11). Eine Ausnahme war ein großer Tumor (9 mm), der nicht komplett eliminiert werden konnte und 14 Tage nach Chemotherapie wieder an Größe zunahm. Ein weiterer Tumor (5 mm) war vorerst nach Tag 11 nicht mehr zu ertasten und rezidierte an Tag 35. 189OVA-Tumore schrumpften nach OT-1-Transfer und verschwanden nach etwa 14 Tagen. Einige Tage später traten erste Rezidive auf. An Tag 40 war über die Hälfte der Tumore wieder gewachsen. Vier von neun 189OVA-Tumoren blieben dauerhaft in Remission. Die Nachbeobachtungszeit der Tiere mit anhaltender Remission betrug mindestens 100 Tage nach Therapie. Ein Teil der Tiere wurde auch bis zu 200 Tage lang weiter beobachtet.

In der Kaplan-Meier-Überlebenskurve (s. Abbildung 20B) zeigte sich ein signifikant besseres Überleben der 291OVA-Bcl2-Gruppe. Auch bei Mäusen mit Tumoren mit *p53*-Verlust kam es zu einem signifikant verlängerten rezidivfreien Überleben im Vergleich zum Wildtyp 291OVA.

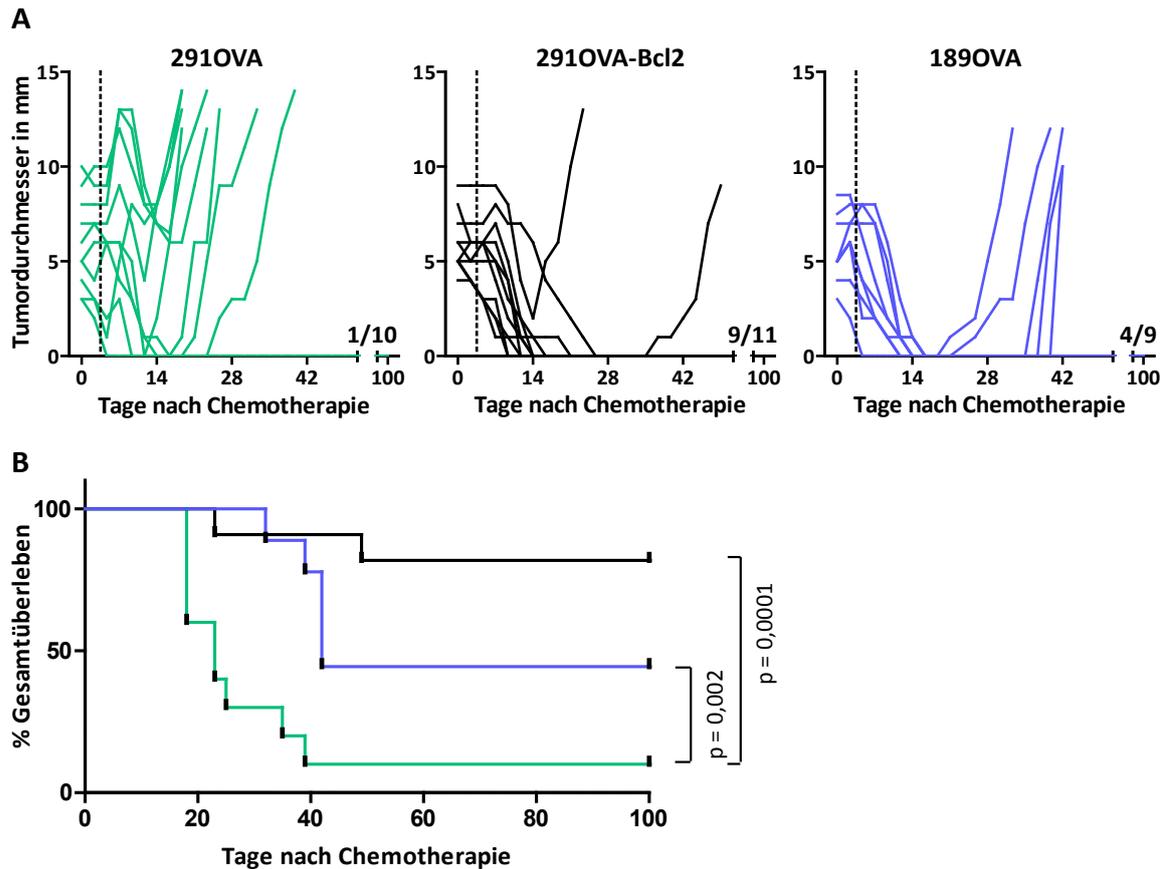


Abbildung 20: Mäuse mit *bcl-2*-überexprimierenden und *p53*-defizienten Tumoren entwickelten weniger Rezidive und zeigten ein verbessertes Überleben. 1×10^6 291OVA-, 291OVA-Bcl2- und 189OVA-Zellen wurden s.c. in λ -OVA-Mäuse injiziert. Bei einer Tumorgöße von 3-10 mm Durchmesser wurden die Mäuse mit einer Dosis von 250 mg/kg EDX behandelt. Drei Tage nach Chemotherapie wurden 1×10^6 OT-1-Zellen i.v. transferiert. A) Gezeigt ist der Verlauf des Tumorwachstums anhand des Tumordurchmessers. Eine Linie repräsentiert ein Tier. Die vertikale unterbrochene Linie markiert den Zeitpunkt des OT-1-Transfers. Steile Rezidiv-Verläufe repräsentieren Milz-oder Lymphknotentumore, die ursprünglich nicht tastbar waren und erst bei größerem Durchmesser entdeckt wurden. Am rechten Ende der x-Achse ist der Anteil der Mäuse mit andauernder Remission an der Gesamtzahl der Gruppe angegeben. B) Das Gesamtüberleben der drei Mausgruppen nach Chemotherapie und T-Zelltransfer wurde vergleichend in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (Log-Rank-Test).

Um diese Ergebnisse mit einer weiteren *bcl-2*-überexprimierenden Zelllinie zu verifizieren, wurde als zweite Tumorzelllinie die, aus der ACTB x λ -MYC Maus gewonnene, OVA-transgene Zelllinie 110 verwendet. Die Experimente wurden in identischer Weise wie die Versuche mit den retroviral OVA-transduzierten Zelllinien durchgeführt. Zur 110Bcl2-Zelllinie wurde die GFP-Vektorkontrolle 110GFP und die Zelllinienkontrolle 110PC (vgl. 5.1.1) mitgeführt. Die Expansion der OT1-T-Zellen nach Transfer verhielt sich ähnlich wie nach Transfer von retroviral transduzierten OVA-

exprimierenden Zelllinien (vgl. Abbildung 19). B-Zellen im peripheren Blut lagen an Tag 7 nach Chemotherapie in sehr geringen Zahlen vor. OT-1-T-Zellzahlen der 110-GFP-Gruppe waren auf 1437 Zellen/ μ l, 110 PC auf 1130 Zellen/ μ l und 189OVA auf 1090 Zellen/ μ l angestiegen (s. Abbildung 21A). Bei 110 PC und 110 GFP nahmen diese Zahlen bis Tag 14 erst schneller, danach langsamer ab und waren am Tag 28 fast komplett auf den Ursprungswert zurückgegangen. Bei 110Bcl2 nahm die OT-1-T-Zellzahl nach Tag 7 kontinuierlich langsam ab und hatte am Tag 28 noch nicht wieder den Ursprungswert erreicht. Dementsprechend hatten B-Zell-Zahlen in der Bcl2-Gruppe bis Tag 28 kaum wieder zugenommen, während bei 110PC und 110GFP ein geringer Anstieg zu verzeichnen war (s. Abbildung 21B).

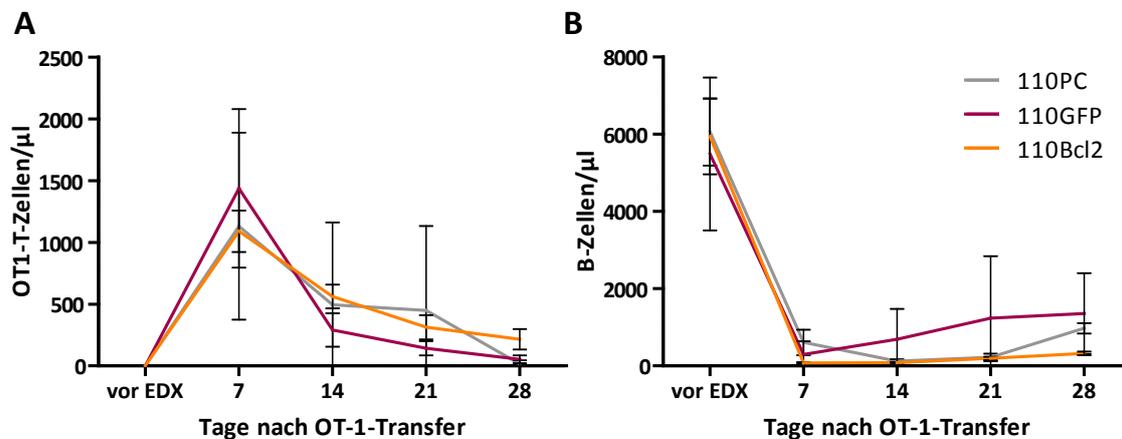


Abbildung 21: OT-1-T-Zellen zeigten eine starke Expansion nach Transfer in tumortragende EDX-behandelte Mäuse. 1×10^6 110PC-, 110GFP- und 110Bcl2-Zellen wurden s.c. in λ -OVA-Mäuse injiziert. Bei einer TumorgroÙe von 6-9 mm Durchmesser wurden die Mäuse mit einer Dosis von 250 mg/kg EDX behandelt. Drei Tage nach Chemotherapie (=Tag 0) wurden 1×10^6 OT-1-Zellen i.v. transferiert. An den Tagen 7, 14, 21 und 28 wurden OT-1-T-Zellzahlen A) und B-Zellzahlen B) im peripheren Blut durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (110PC n=8, 110GFP n=7, 110Bcl2 n=17).

Die EDX-Therapie kombiniert mit T-Zelltransfer resultierte in einem kompletten Verschwinden aller s.c. Tumore in einem Zeitraum von Tag 7 bis Tag 25 (s. Abbildung 22A). 110PC-Tumore rezidierten (n=6/7), ähnlich wie 110GFP-Tumore (n=5/6) innerhalb von 14-42 Tagen nach Chemotherapie. Nur 5 von 17 Tieren mit *bcl-2*-überexprimierenden Lymphomzellen bekamen Rezidive. Diese traten 26-35 Tage nach Chemotherapie auf, ein Tumor rezidierte sogar erst an Tag 103. Deshalb wurde die Beobachtungszeit nach Therapie auf 200 Tage erhöht.

In der Kaplan-Meier-Überlebenskurve (s. Abbildung 22B) zeigte sich ebenfalls ein signifikant verlängertes rezidivfreies Überleben für Mäuse mit *bcl-2*-überexprimierenden Lymphomen nach adoptivem T-Zelltransfer.

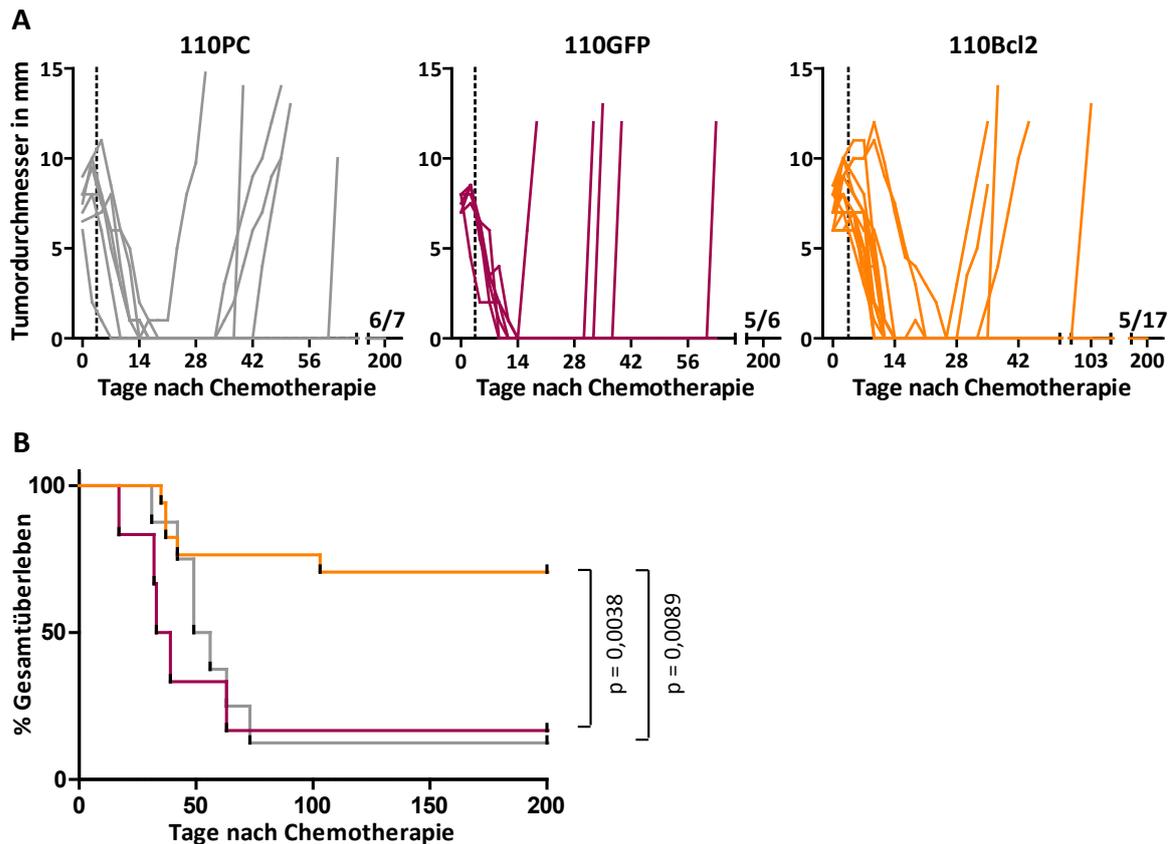


Abbildung 22: Mäuse mit *bcl-2*-überexprimierenden Lymphomen entwickelten weniger Rezidive und zeigten ein verbessertes Überleben. 1×10^6 110PC-, 110GFP- und 110Bcl2-Zellen wurden s.c. in λ -OVA-Mäuse injiziert. Bei einer Tumorgroße von 6-9 mm Durchmesser wurden die Mäuse mit einer Dosis von 250 mg/kg EDX behandelt. Drei Tage nach Chemotherapie wurden 1×10^6 OT-1-Zellen i.v. transferiert. A) Gezeigt ist der Verlauf des Tumorwachstums anhand des Tumordurchmessers. Eine Linie repräsentiert ein Tier. Die vertikale unterbrochene Linie markiert den Zeitpunkt des OT-1-Transfers. Steile Rezidiv-Verläufe repräsentieren Milz- oder Lymphknotentumore, die ursprünglich nicht tastbar waren und erst bei größerem Durchmesser entdeckt wurden. Am rechten Ende der x-Achse ist der Anteil der Mäuse mit andauernder Remission an der Gesamtzahl der Gruppe angegeben. B) Das Gesamtüberleben der drei Mausgruppen nach Chemotherapie und T-Zelltransfer wurde vergleichend in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (Log-Rank-Test).

Um sicher zu gehen, dass Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen nicht auf eine unterschiedliche Tumorgroße bei Chemotherapie zurückzuführen waren (Abbildung 23), wurden die Tumordurchmesser der verschiedenen Gruppen beider Versuchsansätze bei Behandlungsbeginn verglichen. Dabei zeigte sich kein Unterschied. Desweiteren hätten die unterschiedlichen Ergebnisse auch auf unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten der unterschiedlichen Zelllinien zurückzuführen sein können. Deshalb wurde die Dauer nach Tumorinokulation bis zum Anwachsen des Tumors, definiert als tastbare Schwellung, verglichen.

Dabei war nur ein Unterschied zwischen 291OVA und 189OVA feststellbar: 189OVA-Tumore wuchsen langsamer an als 291OVA-Tumore.

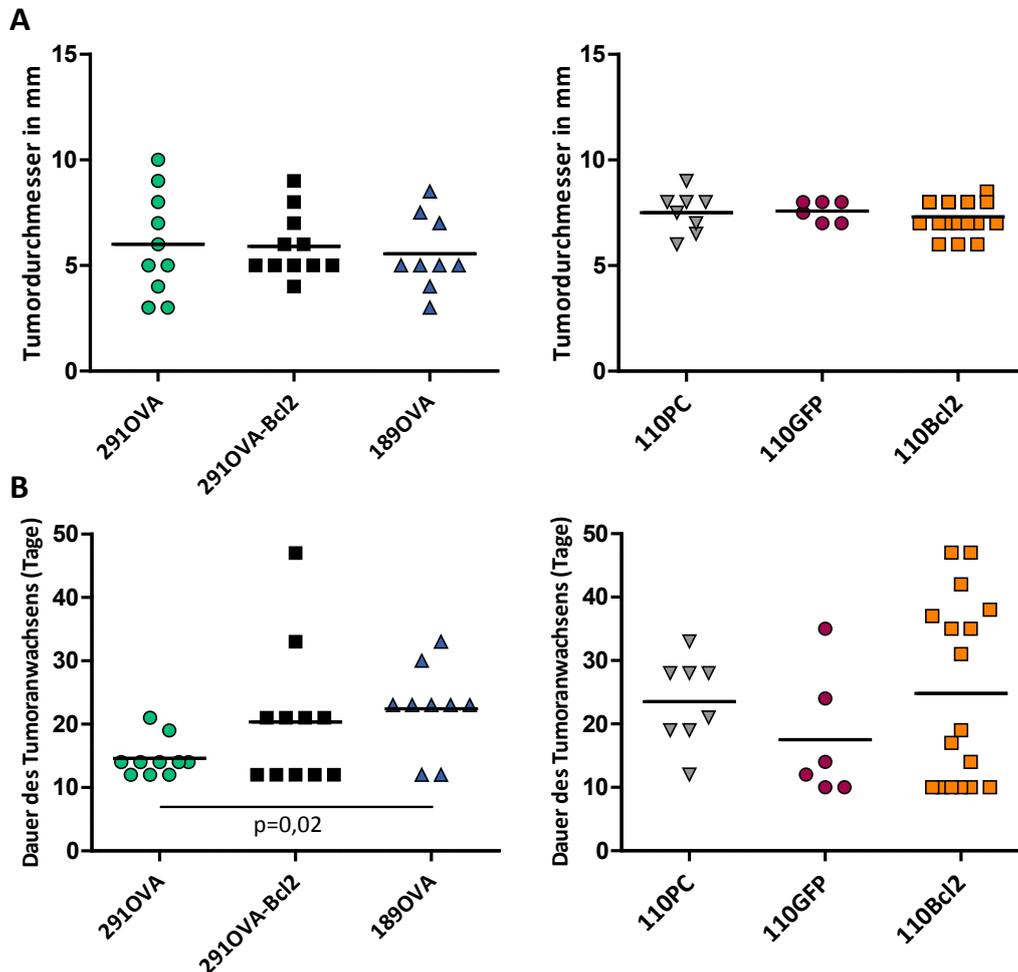


Abbildung 23: Unterschiedliche Voraussetzungen für die Tumorentwicklung vor Behandlung mit Chemotherapie ließen sich nur zwischen 291OVA und 189OVA feststellen. A) Die Tumorgöße zu Beginn der Behandlung unterschied sich in den jeweiligen Versuchsgruppen nicht signifikant (Mann-Whitney-Test, n=9-12 u. 7-17). B) Gezeigt ist die Dauer bis zum Erscheinen des Tumors nach Inokulation der Lymphomzellen. Nur signifikante Unterschiede wurden markiert (Mann-Whitney-Test, n=9-12 u. 8-17).

In den Versuchen dieses Kapitels konnte gezeigt werden, dass adoptiv transferierte OT-1-T-Zellen OVA-positive Lymphome erkennen und eliminieren konnten, auch wenn in diesen Lymphomzellen *bcl-2*-Überexpression oder *p53*-Verlust vorlag. Bei *bcl-2*-überexprimierenden und *p53*-defizienten Lymphomen zeigte sich sogar eine verbesserte T-Zell-vermittelte Remission. Mäuse mit *bcl-2*-überexprimierenden Tumoren hatten dabei den größten Überlebensvorteil. Dieser Überlebensvorteil lag weder begründet in unterschiedlichen Tumorgößen zwischen 291OVA- und 291OVA-Bcl2-Tumoren zum Zeitpunkt der Behandlung, noch in einer unterschiedlichen Tumorstadiumsgeschwindigkeit. Was hingegen *p53*-defiziente Tumore anging, so könnte eine

verringerte Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore zu einer verbesserten Remission beigetragen haben.

3.1.10 Rezidierte Tumore sind Antigenverlust-Varianten

Die nach Chemotherapie und adoptivem OT-1-Transfer rezidierten Tumore wurden zunächst durchflusszytometrisch auf die OVA-Antigenexpression untersucht. Da die Zelllinien 291OVA und 189OVA retroviral mit MSCV-OVA-IRES-GFP transduziert waren, wurde GFP, wie oben bereits beschrieben, als Signal für die Expression des Antigens verwendet. Es zeigte sich, dass alle rezidierten 291OVA- und 291OVA-Bcl2-Tumore nach OT-1-Transfer GFP-negativ waren (s. Abbildung 24), was einen Antigenverlust nahe legte. Rezidierte 189OVA-Zellen waren hingegen genauso GFP-positiv, wie Tumore, die nur mit EDX und nicht mit OT-1-Transfer behandelt wurden.

Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Messung wurde die OVA-Expression auf RNA-Ebene untersucht. Mit Hilfe einer qPCR konnte für 291OVA und 291OVA-Bcl2 gezeigt werden, dass der Verlust der GFP-Expression mit dem Verlust der OVA-mRNA verbunden war. Im Gegensatz hierzu konnte in den rezidierten Tumorzellen der 189OVA gezeigt werden, dass zwar GFP-Protein vorhanden war, jedoch keine OVA-mRNA mehr gebildet wurde. Als Kontrollen wurde jeweils die injizierte Tumorzelllinie und die dazugehörige GFP-Kontrolle verwendet. Um den GFP-entkoppelten OVA-Antigenverlust zu verifizieren, wurden die rezidierten 189OVA-Zellen zusätzlich immunologisch untersucht. OT-1-T-Zellen wurden für 20 h 1:2 (E:T) mit rezidierten 189OVA-Zellen kokultiviert. Als Kontrollen wurden je eine OVA-positive und OVA-negative Lymphomzelllinie verwendet. Anschließend wurde im ELISA die IFN γ -Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. In Kontakt mit rezidierten 189OVA-Zellen reagierten OT1-T-Zellen nicht mit IFN γ -Sekretion. Damit waren auch diese Tumorzellen als Antigenverlustvarianten nach Chemotherapie und OT-1-Transfer anzusehen.

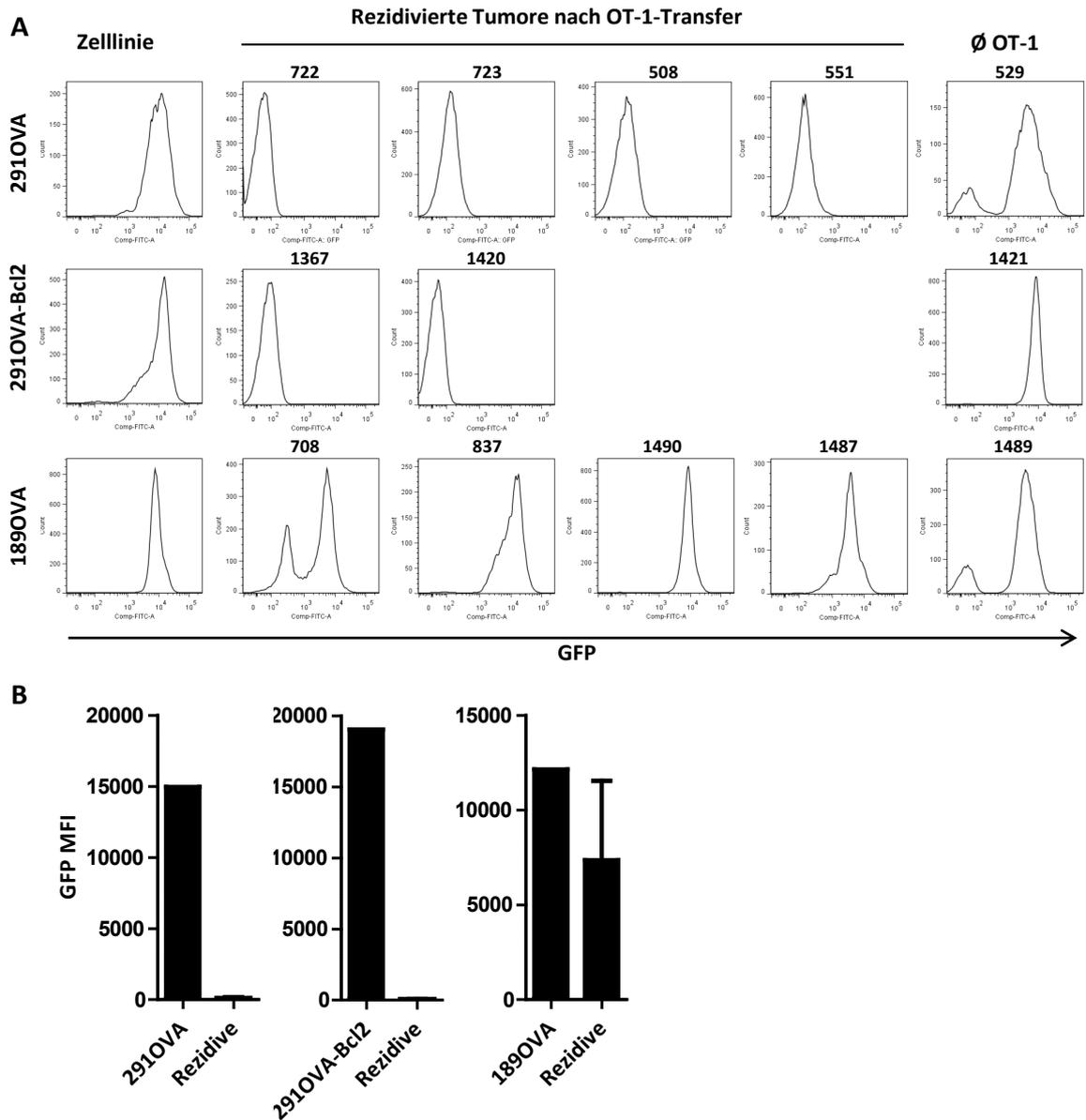


Abbildung 24: Rezidierte Tumore der OVA-transduzierten Zelllinien zeigten den Verlust der GFP-Expression mit Ausnahme von 189OVA. Rezidive von Tumoren der Zelllinien 291OVA, 291OVA-Bcl2 und 189OVA nach EDX und OT-1-Transfer wurden nach der Entnahme durchflusszytometrisch auf die Expression von GFP untersucht. A) Exemplarisch (Beispiel mit Mausnummer) gezeigt ist die GFP-Expression der Lymphomzellen der drei Gruppen im Histogramm. Als Kontrollen wurden jeweils die injizierte Zelllinie, sowie ein Tumor, der nicht mit OT-1-T-Zellen behandelt war, gemessen. B) In den Grafiken sind jeweils für GFP die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Zelllinien vor Injektion, sowie der Mittelwert der durchflusszytometrisch gemessenen MFI der rezidierten Tumorzellen dargestellt (Standardabweichung, 291 OVA n=10, 291OVA-Bcl2 n=2, 189OVA n=4).

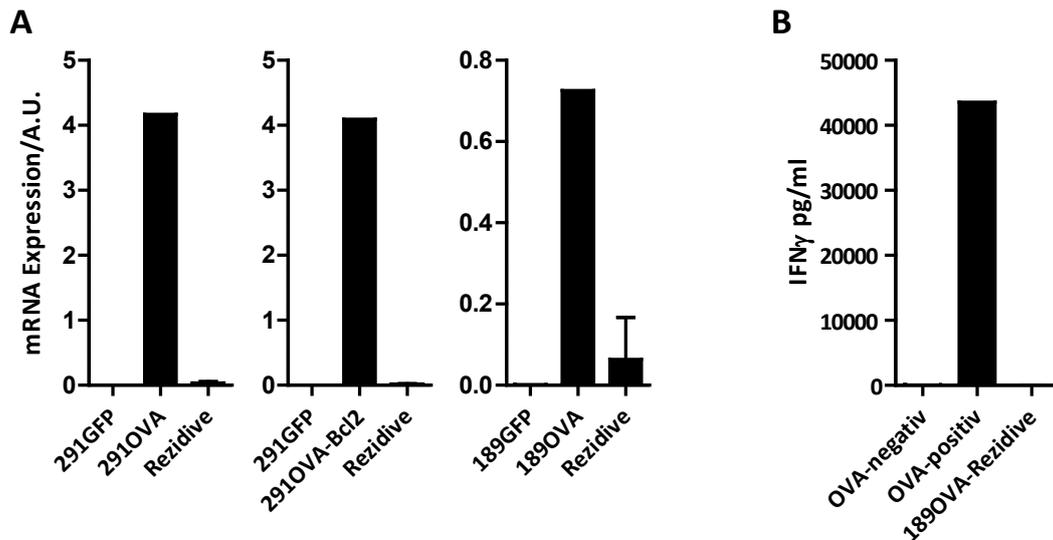


Abbildung 25: Rezidierte Tumore der OVA-transduzierten Zelllinien zeigten einen OVA-Antigenverlust. A) Mit den rezidierten Tumorzellen der Zelllinien 291OVA, 291Bcl2-OVA und 189OVA nach Chemotherapie und OT-1-Transfer wurde eine qPCR durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde die injizierte Zelllinie, als Negativ-Kontrolle die jeweilige GFP-Kontrolle verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen Menge (A.U. – arbitrary units) an OVA-mRNA mit Standardabweichung (291OVA n=9 , 291OVA-Bcl2 n=2 , 189OVA n=4). B) OT-1-T-Zellen wurden für 20 h 1:2 (E:T) mit rezidierten 189OVA-Zellen kokultiviert. Im ELISA wurde die Konzentration von IFN γ im Kulturüberstand gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine OVA-positive Lymphomzelllinie, als Negativkontrolle eine OVA-negative Linie verwendet. Im Balken der 189OVA-Rezidive sind je vier Ansätze von n=4 Rezidiven im Mittelwert mit Standardabweichung zusammengefasst.

Retrovirale Transduktion erreicht auch bei durchflusszytometrisch aufgereinigten Zellen selten 100 % Reinheit (vgl. Abbildung 5). Es kann daher argumentiert werden, dass die inokulierten Zelllinien bereits Antigenverlustvarianten beinhalteten. Am Tag der Injektion waren 99,3-100 % aller Zellen GFP-positiv (Daten nicht gezeigt). Durch die Generierung der ACTB-OVA-transgenen Linie 110PC konnte dieses Problem exemplarisch umgangen werden. Mit den rezidierten Tumorzellen der drei transgenen Zelllinien 110PC, 110GFP und 110Bcl2 wurde ebenfalls eine qPCR durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde die injizierte Zelllinie, als Negativkontrolle eine OVA-negative Zelllinie verwendet. In der qPCR zeigte sich auch bei diesen rezidierten Tumorzellen ein Verlust der OVA-mRNA (s. Abbildung 26A). Da die OVA-transgenen Zelllinien allgemein wenig OVA-mRNA produzieren und OVA-Negativität schwierig abzugrenzen ist, wurde der OVA-Verlust auch immunologisch verifiziert. OT-1-T-Zellen wurden für 20 h 1:2 (E:T) mit rezidierten Tumorzellen der drei Gruppen kokultiviert. Als Kontrollen wurden eine OVA-positive und eine OVA-negative Lymphomzelllinie verwendet. Anschließend wurde im ELISA die IFN γ -Konzentration im

Zellkulturüberstand bestimmt. In Kontakt mit rezidierten Tumorzellen wurden OT-1-T-Zellen nicht mehr zur IFN γ -Sekretion angeregt (s. Abbildung 26B).

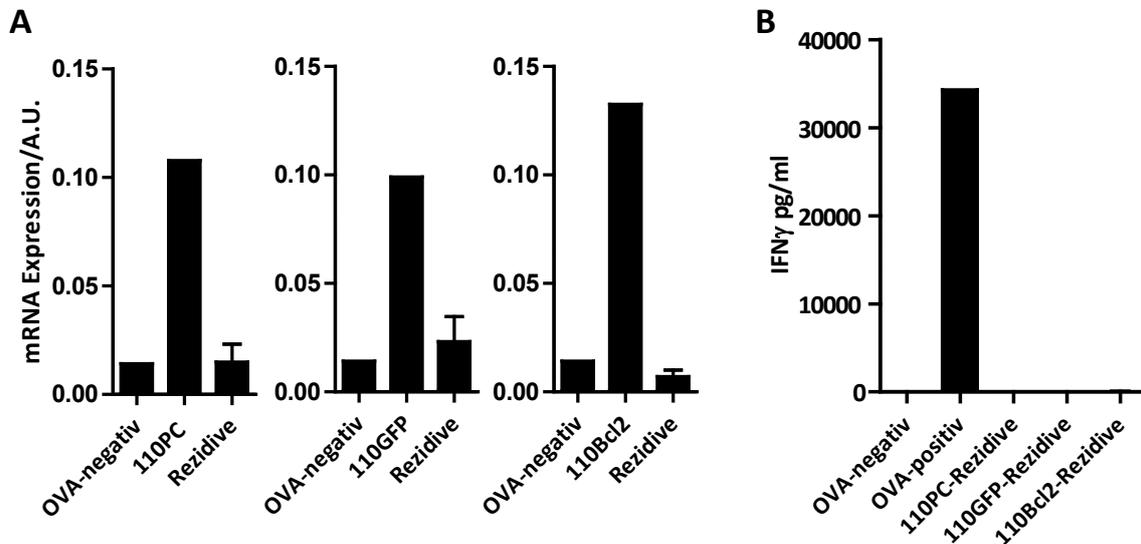


Abbildung 26: Rezidierte Tumore der drei OVA-transgenen Linien zeigten einen OVA-Antigenverlust. A) Mit den Tumorrezidiven der Zelllinien 110PC, 110GFP und 110Bcl2 nach Chemotherapie und OT-1-Transfer wurde eine qPCR durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde die injizierte Zelllinie, als Negativ-Kontrolle die jeweilige GFP-Kontrolle verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichungen. B) OT-1-T-Zellen wurden für 20 h 1:2 (E:T) mit rezidierten Tumorzellen kokultiviert. Im ELISA wurde die Konzentration von IFN γ im Kulturüberstand gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine OVA-positive Lymphomzelllinie, als Negativkontrolle eine OVA-negative Linie verwendet. In den Balken der Rezidive sind je 4 Ansätze von n=3 Rezidiven im Mittelwert mit

Rezidierte Tumorzellen nach Chemotherapie und OT-1-T-Zelltransfer stellten sich durchgängig als antigennegativ heraus. Dass Rezidive aufgrund der Selektion von Antigenverlustvarianten auftraten bestätigte die Beobachtungen des Vorkapitels: Antigenpositive Tumorzellen konnten unabhängig von *bcl-2*-Überexpression und *p53*-Verlust durch OT-1-Zellen erkannt und eliminiert werden. Da nach Behandlung von *bcl-2*-überexprimierenden und *p53*-defizienten Tumore weniger Rezidive auftraten, lässt sich vermuten, dass diese Tumore mit geringerer Wahrscheinlichkeit Antigenverlustvarianten entwickeln.

3.1.11 EDX-behandelte Lymphome enthielten kaum seneszente Zellen

In vitro konnte in *bcl-2*-überexprimierenden Zelllinien durch Behandlung mit Adriamycin Seneszenz induziert werden (vgl. Abschnitt 5.1.6). Ergebnisse aus Versuchen mit der E μ -MYC-Maus¹⁸ ließen den Schluss zu, dass EDX-Behandlung *in vivo* auch in λ -MYC-Lymphomzellen Seneszenz bewirkt. Um zu überprüfen ob *bcl-2*-überexprimierende Tumore nach Chemotherapie mehr seneszente Zellen beinhalten wurden in *in vivo*-Versuchen von Abschnitt 5.1.8 als Kontrolle 291OVA- und 291OVA-Bcl2-Lymphome ohne OT-1-Transfer mitgeführt. Das heißt, Mäuse mit einem Tumordurchmesser von 7-10 mm wurden nur mit EDX behandelt und die Tumore 7 Tage nach Chemotherapie entnommen. Kryokonserviertes Gewebe wurde auf die Expression der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase untersucht. In Paraffinschnitten wurden seneszente Zellen mit Hilfe von Antikörpern gegen die Seneszenzmarker p21 und p16 angefärbt.

Nach dem SA- β -Galaktosidase-Assay war die charakteristische Blaufärbung der Vesikel nur bei wenigen Zellen zu sehen (s. Abbildung 27A). Dabei gab es bezüglich der Häufigkeit auch keine Unterschiede zwischen 291OVA- und 291OVA-Bcl2-Tumoren. Bei den gefärbten Paraffinschnitten wurde die Lokalisation der Seneszenzmarker p16 und p21 im Zellkern als Positivität für Seneszenz gewertet. Wie bei der β -Gal-Färbung waren nur wenige Zellen positiv für diese Marker.

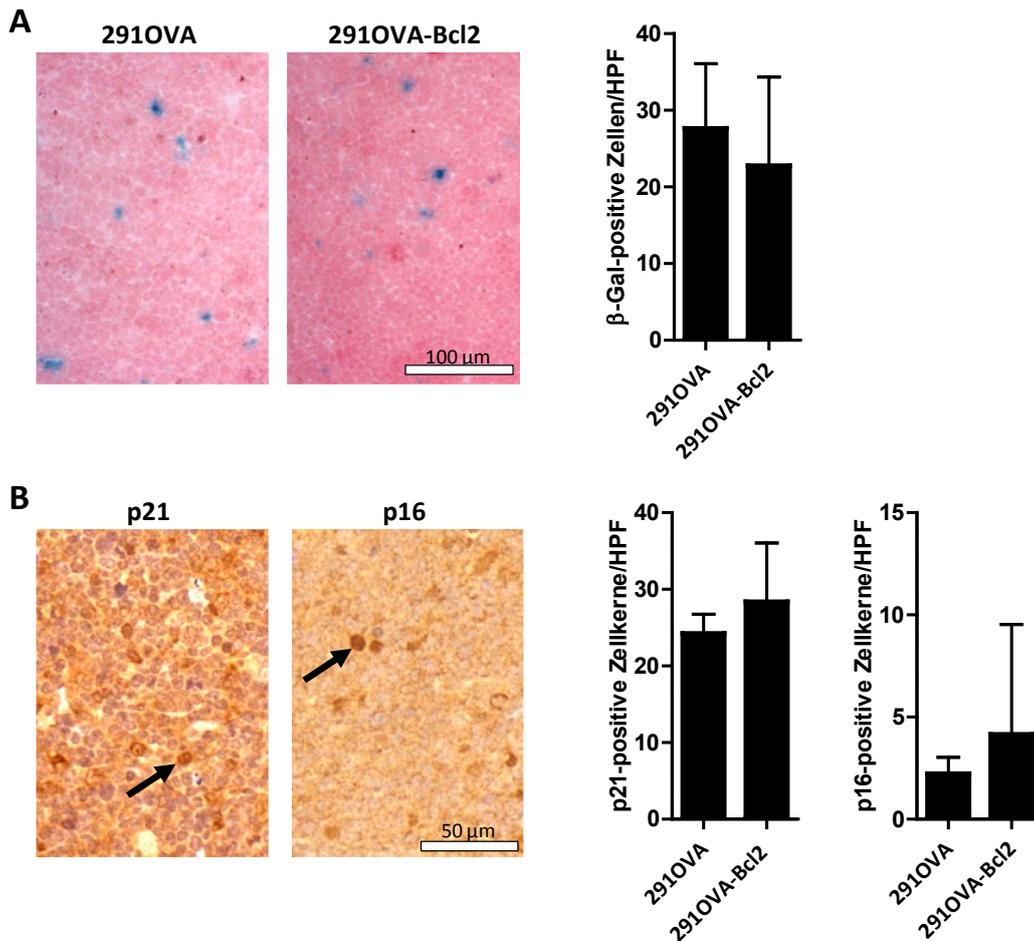


Abbildung 27: 291OVA-Bcl2- und 291OVA-Tumore wiesen nach Chemotherapie kaum seneszente Zellen auf. In λ -OVA-Mäuse transplantierte 291OVA- und 291OVA-Bcl2-Lymphomzellen wurden bei einem Tumordurchmesser von 7-10mm i.p. mit einer Dosis von 250 mg/kg EDX behandelt. Sieben Tage nach Chemotherapie wurden die Tumore entnommen und auf verschiedene Arten gefärbt. A) Kryokonserviertes Gewebe wurde mit Hilfe des β -Gal-Assays auf SA-assoziierte β -Galaktosidase gefärbt (links, rosa Zellkernfärbung durch Kernechtrot). Seneszente Zellen, welche eine Blaufärbung der Vesikel zeigten, wurden geblindet quantifiziert (je 10 Felder pro Tumor, n=5). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Unterschiede waren nicht signifikant (Mann-Whitney-Test). B) In Paraffinschnitten wurden die Seneszenzmarker p16 und p21 immunhistologisch gefärbt (Braunfärbung durch DAB, blaue Zellkernfärbung durch Hämatoxylin). Braune Zellkernfärbung wurde als Positivität für Seneszenz gewertet, s. Beispiele links. Auch hier ergab sich nach geblindeter Quantifizierung (je 10 Felder, n=3-9, Mann-Whitney-Test) kein signifikanter Unterschied.

Bezüglich der Seneszenzinduktion nach EDX-Behandlung ergaben sich keine Unterschiede zwischen 291OVA-Wildtypumoren und *bcl-2*-überexprimierenden Tumoren.

3.2 Adoptiver T-Zelltransfer bei autochthonen λ -OVA x λ -MYC-Tumoren

Durch die Generierung des λ -OVA-Mausmodells und die Kreuzung mit dem λ -MYC-Mausmodell war es möglich, Artefakte in Folge der Transplantation von Tumorzellen zu vermeiden und für den adoptiven T-Zelltransfer ein ideales Tumormodell mit tumorassoziiertem Zielantigen zu schaffen. Das OVA-Antigen wird genauso wie das natürliche Antigen CD19, das schon in einigen therapeutischen Ansätzen als Zielantigen für B-Zell-Malignitäten verwendet wird, in normalen sowie in malignen B-Zellen exprimiert. λ -OVA x λ -MYC-Mäuse zeigten ein tumorfreies Überleben von 107,5 Tagen und damit eine verlängerte Tumorlatenz im Vergleich zur λ -MYC-Maus. OVA-positive B-Zelllymphome waren in den zervikalen, axillären und inguinalen Lymphknoten, sowie zum Teil auch in der Milz zu finden.

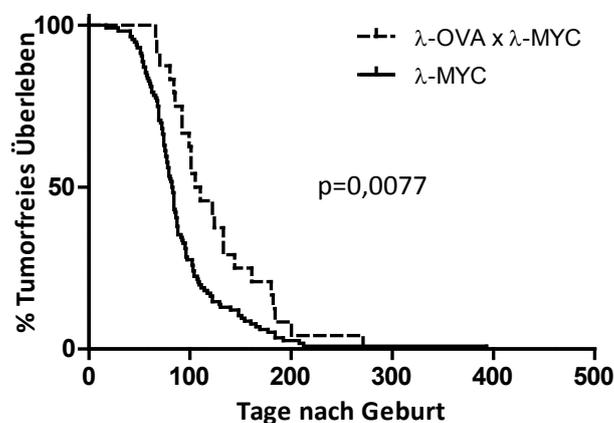


Abbildung 28: λ -OVA x λ -MYC-Mäuse zeigten eine verlängerte Tumorlatenz. Krankheitsfreies Überleben (Kaplan-Meier-Kurve) der λ -OVA x λ -MYC-Mäuse im Vergleich zu λ -MYC-Mäusen (LogRank-Test, λ -MYC n=134, λ -OVA x λ -MYC n=24). Das mediane tumorfreie Überleben der λ -OVA x λ -MYC-Mäuse betrug 107,5 Tage (λ -MYC-Mäuse 82,5 Tage).

Mit Hilfe der λ -OVA x λ -hu-MYC-Mäuse wurde der adoptive T-Zelltransfer bei spontanen B-Zelllymphomen mit uneingeschränkter Heterogenität ermöglicht.

3.2.1 Chemotherapie in Kombination mit adoptivem OT-1-Transfer bewirkt kein verlängertes Überleben

Die Hypothese lautete, dass OT-1-Transfer das Überleben der λ -OVA x λ -hu-MYC-Mäuse nach Chemotherapie mit EDX verlängern würde. Um zu untersuchen, ob der T-Zelltransfer in λ -OVA x λ -MYC-Mäusen nach Chemotherapie Einfluss hat, wurde folgender experimenteller Ansatz gewählt: Die Behandlung erfolgte zum Zeitpunkt der deutlich sichtbaren Schwellung der Lymphknoten (Gesamtstumormenge >10mm Durchmesser). Es wurden zwei Behandlungsgruppen gebildet. Die

erste Gruppe wurde nur mit EDX (i.p., 250 mg/kg) behandelt (Tumor-Endoxan-Gruppe = TE-Gruppe). Die zweite Gruppe wurde zusätzlich drei Tage nach Chemotherapie in der Lymphopenie i.v. mit 1×10^6 OT-1-T-Zellen behandelt (Tumor-Endoxan-OT-1-Gruppe = TEO-Gruppe). Um Einflüsse durch den Transfer unterschiedlicher Präparationen von OT-1-T-Zellen auszuschließen wurden hier, wie im Transplantationsmodell, aufgereinigte und portioniert eingefrorene OT-1-T-Zellen verwendet. Eine Randomisierung erfolgte darin, dass die Mäuse mit spontan auftretenden Lymphomen abwechselnd in die TE- oder TEO-Gruppe eingeordnet wurden. Als primärer Endpunkt wurde das Überleben nach Chemo-Immuntherapie festgelegt.

Die entsprechend behandelten Mäuse werden im Folgenden als TE- und TEO-Mäuse bezeichnet. Alle Mäuse zeigten schon zwei Tage nach Chemotherapie keine tastbaren Lymphome mehr. 7 Tage nach OT-1-Transfer wurden im peripheren Blut der TEO-Mäuse durchflusszytometrisch die OT-1-T-Zellzahl und die B-Zellzahl gemessen.

Im Vergleich zum adoptiven Transfer im Tumormodell mit Transplantation der Tumorzellen (s. Abbildung 19, Abbildung 21), war eine deutlich geringere OT-1-Expansion mit hoher Streuung zwischen den Tieren zu beobachten. Am Tag 21 waren die OT-1-Zellen wieder nicht mehr detektierbar. B-Zellen waren an Tag 7 am Nadir angekommen und erholten sich ab Tag 14. B-Zellzahlen an Tag 21 zeigten eine starke Streuung, da sich im peripheren Blut einiger Mäuse schon Leukämien entwickelten. Diese wurden etwa eine Woche später auch als Lymphome sichtbar.

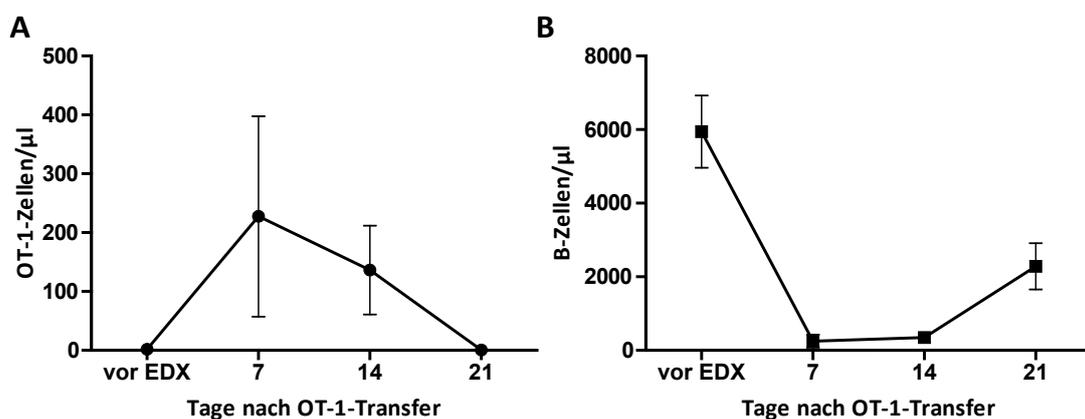


Abbildung 29: OT-1-T-Zellzahlen expandierten nach adoptivem Transfer. Bei Auftreten eines Lymphoms wurden λ -OVA x λ -hu-MYC-Mäuse der TEO-Gruppe i.p. mit einer Dosis von 250 mg/kg EDX behandelt. Drei Tage nach Chemotherapie (=Tag 0) wurden 1×10^6 OT-1-Zellen i.v. transferiert. Am Tag 7, 14 und 21 wurden OT-1-T-Zellzahlen (über OVA-SIINFEKL-Multimer) A) und B-Zellzahlen (über CD19) B) im peripheren Blut durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler (n=9).

Die TEO-Gruppe zeigte im Vergleich zur TE-Gruppe kein signifikant verlängertes rezidivfreies Überleben nach Chemotherapie. Das Überleben betrug für beide Gruppen 34 Tage nach EDX-Behandlung.

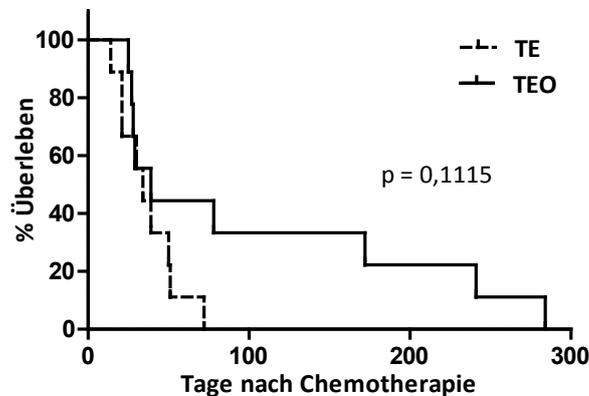


Abbildung 30: TEO-Mäuse zeigten kein verlängertes rezidivfreies Überleben. λ -OVA x λ -MYC Tiere mit spontanen Tumoren, wurden i.p. mit einer Dosis von 250 mg/kg EDX behandelt (=TE-Gruppe). Die TEO-Gruppe erhielt zusätzlich eine Behandlung mit adoptivem Transfer von 1×10^6 OT-1-T-Zellen (Log-Rank-Test, Kaplan-Meier-Kurve).

Obwohl sich eine messbare Expansion der OT-1-Zellen zeigte, konnte keine signifikante Verbesserung des Überlebens nach Chemo-Immuntherapie im Vergleich zu Chemotherapie allein erreicht werden.

3.2.2 Tiere mit langer Tumortalenz zeigen eine längere Remissionsdauer nach adoptivem T-Zelltransfer

In der Kaplan-Meier-Überlebenskurve (s. Abbildung 30) fiel auf, dass über 40 % der TEO-Mäuse eine längere Remissionsdauer zeigten. Diese Tiere (s. auch Abbildung 31A) wiesen auch eine längere Latenzzeit (s. Abbildung 31B) bis zum Auftreten des Primärlymphoms auf. Diese Latenzzeit betrug mindestens 133 Tage (19 Wochen) nach Geburt. Der Mittelwert der Latenzzeit für TEO-Mäuse betrug 116,7 Tage. Mäuse mit längerer Latenz wurden als „TEOspät“ Gruppe definiert. Tiere mit kürzerer Latenzzeit wurden als „TEOfrüh“ Gruppe definiert. Sie zeigten eine Tumortalenz von höchstens 105 Tagen (15 Wochen). Tumortalenzen zwischen TEOspät- und TEOfrüh-Gruppe waren signifikant unterschiedlich ($p=0,0159$, Mann-Whitney-Test).

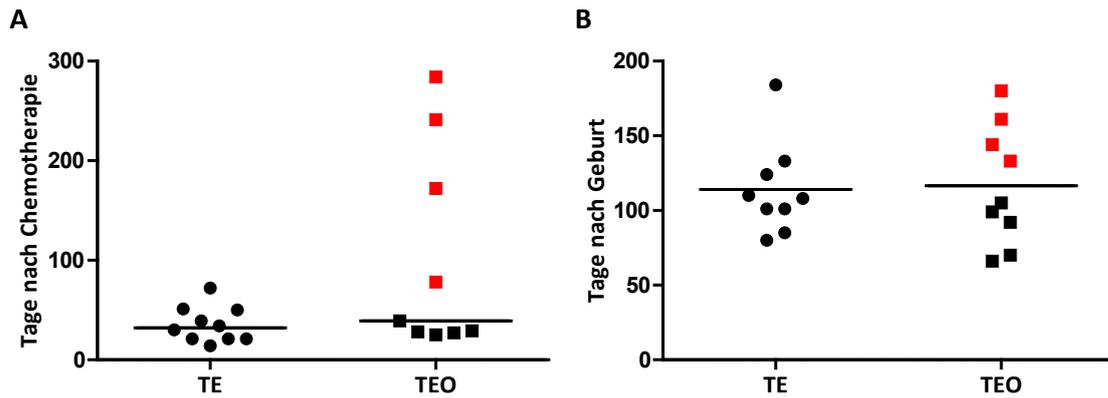


Abbildung 31: TEO-Mäuse mit überdurchschnittlich hoher Remissionsdauer A), in Rot dargestellt, (Median), zeigten B) eine überdurchschnittliche Latenzzeit bis zum Auftreten primärer Lymphome (Mittelwert). Unterschiede in A) und B) waren nicht signifikant (Mann-Whitney-Test).

Vergleicht man das Überleben der TEOfrüh und der TEOspät-Gruppe nach Chemotherapie, so ergeben sich hier signifikante Unterschiede. TEO-Mäuse mit langer Tumoraltenz zeigten gegenüber TEO-Mäusen mit raschem Tumoraufreten einen deutlichen Überlebensvorteil. Während TEOspät-Tiere im Median 172 Tage rezidivfrei überlebten, waren es bei TEOfrüh-Tieren nur 28 Tage. TEOfrüh-Mäuse unterschieden sich damit nicht von TE-Mäusen, die unabhängig von der Tumoraltenz nach Behandlung im Median 43 Tage überlebten, während die Gabe von OT-1-T-Zellen bei TEOspät-Tieren diese signifikant von TEOspät-Tieren unterschied, welche 34 Tage überlebten (s. Abbildung 32). Je länger die Latenzzeit der TEOspät-Tumore, desto länger war auch die Remissionsdauer nach adoptivem T-Zelltransfer.

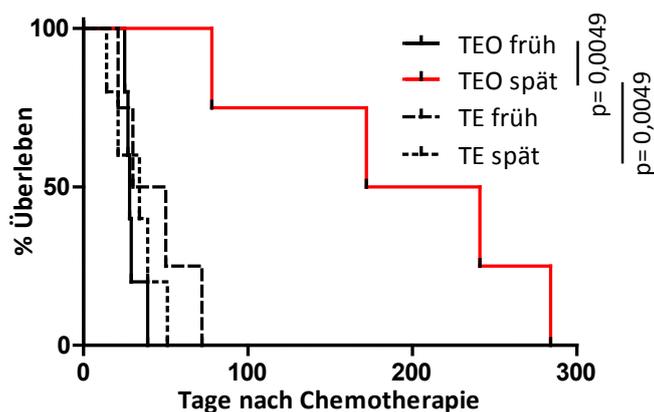


Abbildung 32: Tiere mit langer Tumoraltenz zeigen ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben nach Chemo-Immuntherapie. In der Kaplan-Meier-Überlebenskurve wurde das rezidivfreie Überleben unterschiedlicher Versuchstiergruppen verglichen (TE = Tumor-Endoxan-Behandlung, TEO = Tumor-Endoxan-OT-1-Behandlung, früh = kurze Tumoraltenz bei Primärtumor, spät = lange Tumoraltenz bei Primärtumor, Log-Rank-Test).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Latenzzeit bis zum Auftreten des Primärlymphoms bzw. das Alter der Mäuse zum Zeitpunkt des Primärlymphoms eine entscheidende Rolle für die Wirksamkeit des adoptiven OT-1-Transfer spielte. Bei längerer Latenzzeit bzw. höherem Alter der Maus zeigte sich eine deutliche Verbesserung des Überlebens nach adoptivem T-Zelltransfer.

3.2.3 Rezidierte Tumore sind Antigen-positiv

Wie im Tumormodell mit transplantierten Tumorzellen (vgl. 5.1.10) wurden rezidierte Tumore auf die Selektion von Antigenverlustvarianten untersucht. Um zu überprüfen, ob in den TEO-Rezidiven noch OVA-Transkript hergestellt wurde, wurde eine qPCR durchgeführt (s. Abbildung 33A). Es stellte sich heraus, dass bei TEO-Rezidiven kein Verlust der OVA-mRNA stattgefunden hatte. Unterschiede zwischen TE- und TEO-Rezidiven waren nicht signifikant. Eine hohe Streuung innerhalb der Gruppe der TE-Rezidive war durch einen Tumor zu erklären, der besonders viel OVA-mRNA aufwies (#1214 mit 6 A.U.). Ob OVA auch auf Proteinebene exprimiert und auf den Tumorzellen präsentiert wurde, wurde immunologisch untersucht. OT-1-T-Zellen wurden für 20 h im Effektor-Target-Verhältnis 1:2 mit rezidierten TEO-Lymphomzellen kokultiviert. Als Kontrollen wurden eine OVA-positive und eine OVA-negative Lymphomzelllinie verwendet. Anschließend wurde im ELISA die IFN γ -Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. OT-1-T-Zellen sekretierten im Kontakt mit rezidierten Zellen in der Kokultur noch deutlich nachweisbare Mengen (4410 pg/ml – 37609 pg/ml) von IFN γ (Abbildung 33B). Ähnlich viel IFN γ wie in der Positiv-Kontrolle wurden nur bei einem besonders frühen TEOfrüh-Rezidiv und sonst bei TEOspät-Rezidiven nachgewiesen. Auf das TEOspät-Rezidiv #1213, das sich nach der längsten Remissionsdauer entwickelt hatte, war keine T-Zellreaktion erfolgt. Dies bestätigte die geringe Menge OVA-Transkript, die in der qPCR ermittelt wurde (0,01 A.U.) und damit als Ausnahme den OVA-Antigenverlust. Rezidiv #1848 mit der geringsten positiven OT-1-T-Zellreaktion (4411 pg/ml Konzentration IFN γ) wies eine hohe OVA-Transkriptmenge (1,10 A.U.) auf. Hingegen bewirkte Rezidiv #1096 eine starke IFN γ -Sekretion (37609 pg/ml), exprimierte aber weniger OVA-mRNA (0,32 A.U.). Ein Zusammenhang zwischen der Stärke der T-Zellreaktion und dem Ausmaß der OVA-Expression der Rezidive konnte damit ausgeschlossen werden.

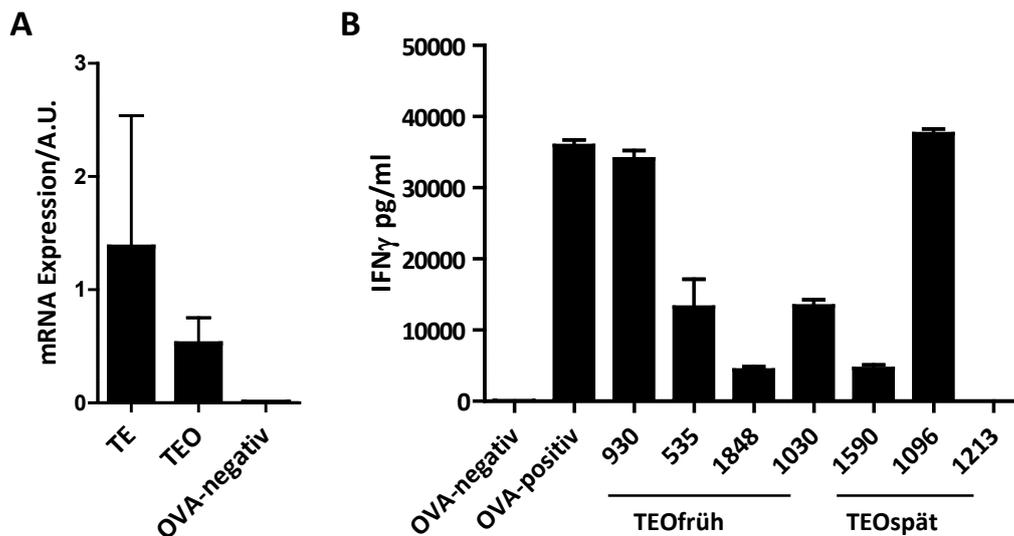


Abbildung 33: Rezidierte Lymphome TEO-behandelter Lymphome waren OVA-positiv. A) Mit den rezidierten Tumorzellen nach Chemotherapie und OT-1-Transfer wurde eine qPCR durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurden rezidierte TE-Tumorzellen, als Negativ-Kontrolle eine OVA-negative Zelllinie verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen Menge (A.U. – arbitrary units) der OVA-mRNA (TE n=5, TEO n=8) mit Standardfehler. Unterschiede sind nicht signifikant (Mann-Whitney-Test). B) OT-1-T-Zellen wurden für 20 h 1:2 (E:T) mit rezidierten TEO-Lymphomzellen kokultiviert. Im ELISA wurde die Konzentration von IFN γ im Kulturüberstand gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine OVA-positive Lymphomzelllinie, als Negativkontrolle eine OVA-negative Linie verwendet. In einem Balken sind je 4 Ansätze der jeweiligen Probe im Mittelwert mit Standardabweichung zusammengefasst. Die Rezidive sind von links nach rechts nach Zeitpunkt ihres Primärtumors geordnet.

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach 20 h Kokultur zeigte, dass die OT-1-T-Zellen in allen Ansätzen durch Kontakt mit antigenpositiven rezidierten Tumorzellen expandiert waren. Die OT-1-T-Zellen die im Verhältnis 1:2 (E:T) in Kultur gebracht worden waren, lagen nun etwa im Verhältnis 1:1 zu den Lymphomzellen vor (s. repräsentatives Beispiel in Abbildung 34). Bezüglich des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf den T-Zellen zeigten sich Unterschiede zwischen TEOfrüh- und TEOspät-Rezidiven. Während bei Kontakt mit TEOfrüh-Tumorzellen der Aktivierungsmarker bei etwa drei Viertel der Zellen nach 20 h negativ vorlag und dementsprechend schon wieder zurückgegangen zu sein schien oder nur von einem Teil der OT-1-T-Zellen präsentiert worden war, waren T-Zellen in den TEOspät-Kokulturen vollständig CD69-positiv. Die Mittlere Fluoreszenzintensität wurde in Abbildung 34B verglichen. Nach 7 Tagen Kokultivierung waren die rezidierten B-Lymphomzellen der TEOfrüh-Gruppe noch in gleicher Zahl wie nach 20 h vorhanden, während in der TEOspät-Gruppe nur T-Zellen und zum Teil andere Tumor-infiltrierende Zellen (CD19⁻, CD8⁻) übrig geblieben waren. Die Vitalitätskontrolle (ohne OT-

1) zeigte, dass die Lymphomzellen allein lebensfähig waren. In der Kokultur mit dem rezidierten TEOspät-Lymphom #1096 (Abbildung 34) war eine Immunreaktion abgelaufen, die die OT-1-T-Zellen sogar 7 Tage lang aktiviert gehalten hatte.

Adoptiver OT-1-Transfer nach Chemotherapie hatte im autochthonen Tumormodell nicht zur Selektion von Antigenverlustvarianten geführt. Die Ursache für die Rezidivierung muss daher in anderen Mechanismen gesucht werden.

Zwischen rezidierten TEOfrüh-Lymphomen und rezidierten TEOspät-Lymphomen zeigten sich Unterschiede in der Fähigkeit OT-1-T-Zellen zu aktivieren. In Kultur mit rezidierten TEOfrüh-Lymphomen reagierten OT-1-T-Zellen mit verminderter Aktivität und waren nicht in der Lage die Lymphomzellen zu eliminieren. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass TEOfrüh-Lymphome in der Lage sind spezifische CD8-T-Zellen innerhalb kurzer Zeit zu inhibieren.

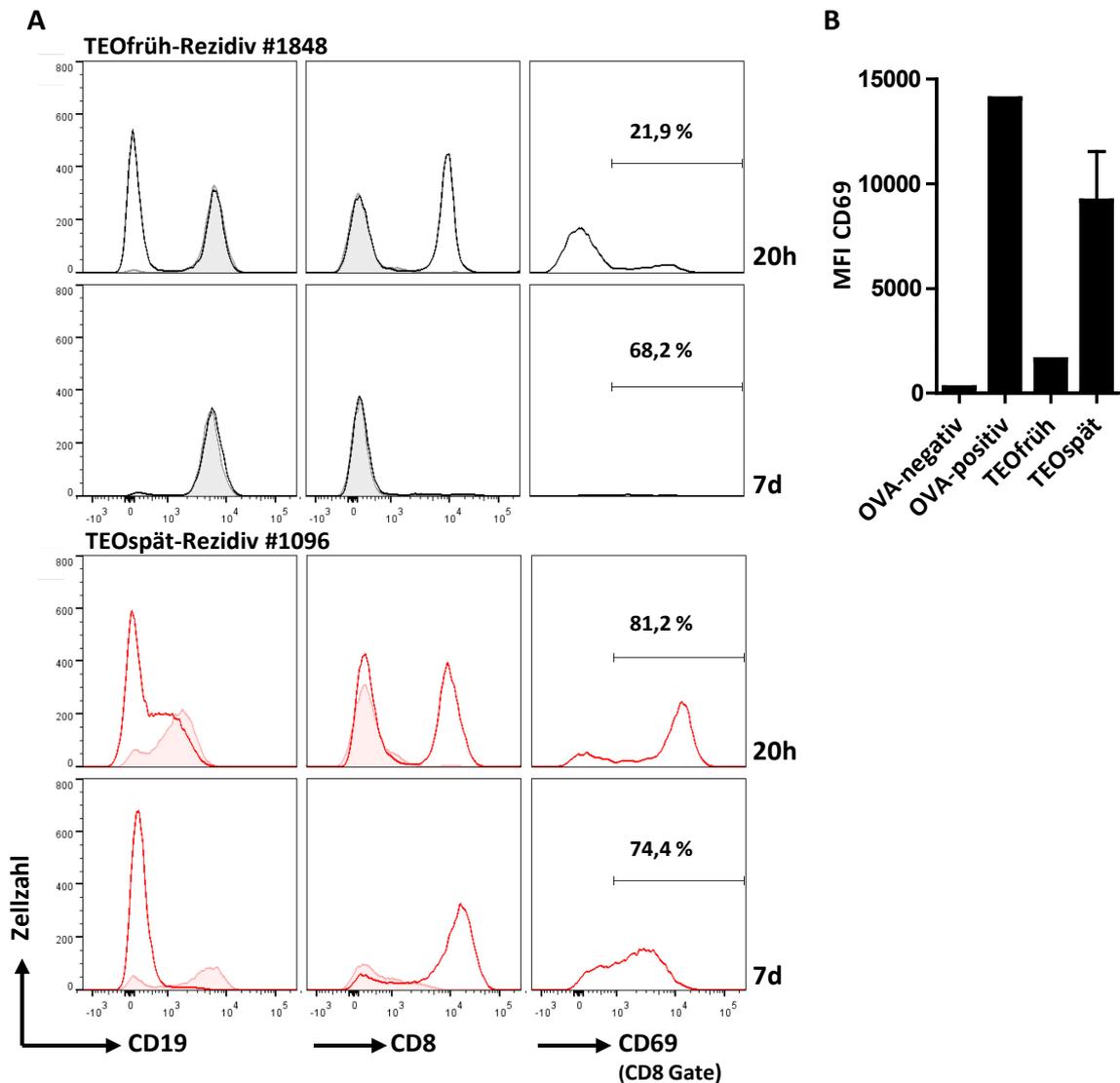


Abbildung 34: TEOfrüh-Rezidive inhibieren die OT-1-T-Zellaktivität. OT-1-T-Zellen wurden für 20 h 1:2 (E:T) mit rezidierten Tumorzellen kokultiviert. Als Vitalitätskontrolle wurden rezidierte Lymphomzellen allein mitgeführt (farbig hinterlegt). Für jeden Ansatz wurden durchflusszytometrisch nach 20 h und nach 7 Tagen B-Zellzahlen (CD19⁺), T-Zellzahlen (CD8⁺) und CD69-positive T-Zellen (CD8⁺, CD69⁺) gemessen. In A) ist jeweils eine repräsentative Kokultur gezeigt. B) Grafisch dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität des Aktivierungsmarkers CD69 (CD8-Gate) auf TEOfrüh-Rezidiven kurzer Remissionsdauer (n=3) und TEOspät-Rezidiven langer Remissionsdauer (exklusive OVA-negatives Rezidiv, n=2), mit Mittelwerten und Standardabweichung. Unterschiede waren aufgrund der geringen Fallzahlen nicht signifikant (Mann-Whitney-Test).

4. Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden *c-myc*-getriebene B-Zelllymphomlinien mit *bcl-2*-Überexpression und *p53*-Verlust generiert, die Resistenz gegenüber Chemotherapie zeigten. Untersucht wurde, ob diese Apoptose-Defizienzen im Mausmodell auch negativen Einfluss auf die Behandlung mit adoptivem T-Zelltransfer haben. Für die entsprechenden Versuche erwies sich das vielfach eingesetzte Modellantigen OVA als Zielantigen gut geeignet, da es im H2^b MHC-Kontext immunogen wirkt und eine bereits gut charakterisierte OVA-spezifische T-Zellantwort auslöst⁷⁶. Als OVA-tolerantes Mausmodell wurde die λ -OVA-Maus generiert, die OVA spezifisch in ihrem B-Zell-Kompartiment exprimiert. Anhand von zwei verschiedenen OVA-exprimierenden Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit transplantierten Chemotherapie-resistenten *bcl-2*-überexprimierenden Tumoren nach Chemotherapie und adoptivem T-Zelltransfer von OVA-SIINFEKL-spezifischen OT-1-T-Zellen einen deutlichen Überlebensvorteil aufweisen und mehrheitlich sogar eine anhaltende Remission erreichen. Dieser Überlebensvorteil zeigte sich, wenngleich auch weniger stark ausgeprägt, ebenfalls bei ersten Versuchen mit *p53*-defizienten Tumoren.

Im autochthonen Tumormodell wurde untersucht, ob spontan auftretende Tumore der λ -OVA x λ -Myc-Maus durch Chemotherapie und adoptiven T-Zelltransfer kurierbar sind. In diesem Fall handelte es sich um primäre Lymphome, die gut auf die Chemotherapie ansprachen und zum Zeitpunkt des OT-1-T-Zelltransfers nicht mehr tastbar waren. Insgesamt zeigte sich nach Behandlung mit Chemotherapie und adoptivem T-Zelltransfer keine Verbesserung zur Chemotherapie allein. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass innerhalb der Gruppe der mit T-Zelltherapie behandelten Lymphome zwei Untergruppen existieren: Das Ansprechen auf T-Zelltherapie war abhängig von der vorausgegangenen Tumoraltenz, d.h. spät auftretende Lymphome zeigten sich empfindlicher gegenüber adoptiver T-Zelltherapie.

4.1 Antigenverlust bei transplantierten *bcl-2*-überexprimierenden Lymphomen nach Chemotherapie und adoptivem T-Zelltransfer

Rezidive bei behandelten *bcl-2*-überexprimierenden Lymphomzellen sowie in der Kontrollgruppe ohne *bcl-2*-Überexpression waren auf die Selektion von Antigenverlustvarianten zurückzuführen. Der Verlust des Antigens OVA hatte nicht nur in den Zelllinien stattgefunden, die durch retrovirale Transduktion mit dem OVA-Plasmid hergestellt worden waren (291OVA-Bcl2, 291OVA), sondern

auch in Lymphomzellen, in denen OVA ursprünglich als Transgen vorgelegt hatte (110Bcl2, 110PC, 110GFP). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von OVA durch den Abbruch der OVA-Transkription eingestellt wurde. In einer aktuellen Studie wurden vergleichbare Versuche mit adoptivem Transfer von OT-1-T-Zellen bei retroviral transduzierten OVA-exprimierenden B16-Tumoren (Melanom) durchgeführt. Kaluza et al.⁷⁷ konnten nachweisen, dass in den resultierenden Antigenverlustvarianten das gesamte OVA-Gen deletiert war. Da auch das an OVA gekoppelte Resistenzgen fehlte, war davon auszugehen, dass ein Verlust der gesamten OVA-Plasmidsequenz stattgefunden hatte. Ähnlich war auch in unseren Versuchen das mit OVA über die interne Ribosomeneintrittsstelle fusionierte GFP-Gen mit betroffen. Kaluza et al. zeigten, dass der Verlust des Antigens aktiv durch den Einfluss der OT-1-T-Zellen ausgelöst wurde. Sie wiesen nach, dass die in B16-Zellen vorliegende, genomische Instabilität durch den T-Zellkontakt noch erhöht wurde. Den Verlust der Plasmidsequenz erklärten sie damit, dass dieser möglicherweise in besonders fragile chromosomale Bereiche integriert hatte. Dementsprechend könnten diese Bereiche besonders empfänglich für Rearrangements – ausgelöst durch T-Zelldruck – sein. Dies könnte in dieser Arbeit nicht nur für die retroviral transduzierten OVA-Zellen zutreffen, sondern auch für die OVA-transgenen Zelllinien aus der Kreuzung der ACTB-OVA x λ -Myc-Maus. In beiden Fällen liegt das OVA-Gen nur hemizygot vor, was den Antigenverlust begünstigen würde. In weiteren Versuchen muss daher geprüft werden, ob das OVA-Gen noch vorhanden ist. Alternativ könnte auch DNA-Methylierung der Grund für den Transkriptverlust sein. Mehrere Studien haben bereits einen durch Methylierung bedingten Antigenverlust gezeigt, der durch den Einsatz demethylierender Agenzien rückgängig gemacht werden kann⁷⁸⁻⁸⁰. Auch die Aquirierung von Punktmutationen könnte zum Antigenverlust führen. Bei den Antigenverlustvarianten der *bcl-2*-überexprimierenden Zelllinien und den dazugehörigen Kontrollen müsste das OVA-Gen so betroffen sein, dass auch die Transkription des nachgeschalteten GFPs verhindert wird. Dies wäre zum Beispiel durch Punktmutationen in der Promoterregion möglich, wie es in einer Studie bei Tet-TagLuc-Tumoren mit Dox-regulierter Onkogenabhängigkeit beobachtet wurde⁸¹.

4.2 Einfluss von *bcl-2*-Überexpression auf die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Antigenverlustvarianten

Da Rezidive immer nur im Zusammenhang mit Antigenverlust auftraten, ließ sich schlussfolgern, dass die seltener rezidivierenden *bcl-2*-überexprimierenden Tumore Eigenschaften besitzen, die diesen Prozess weniger wahrscheinlich machen. Veränderung im Zellgenom, die zufällig zu Antigenverlust führen, können nur bei genetischer Instabilität und häufiger Zellteilung

vorkommen. Möglich wäre also, dass *bcl-2*-überexprimierende Zellen durch verringerte Teilungsgeschwindigkeit bzw. Wachstumsarrest nach Behandlung mit Chemotherapie weniger genetischen Veränderungen ausgesetzt sind. Viele Studien weisen darauf hin, dass Bcl-2 neben der Funktion als Apoptoseinhibitor auch Einfluss auf die Zellzyklusprogression nehmen kann (Überblick^{3,82}). Bei einem der ersten Experimente, in denen dieser Zusammenhang auffiel, wurde erwartet, dass *bcl-2*-Überexpression p53-vermittelten Wachstumsarrest *in vitro* wieder aufhebt. Überraschenderweise aber bewirkte Bcl-2 selbst, ähnlich wie p53, eine Unterdrückung des Zellwachstums⁸³. In Versuchen mit Serumentzug und gleichzeitiger *myc*-Aktivierung konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 den Eintritt in die S-Zellzyklusphase verzögert. Dabei wurde vermutet, dass *myc*-Aktivität über die Hochregulation von p27, einem Inhibitor von Zyklin und Zyklin-abhängige-Kinasen (CDK), ähnlich wie p16 und p21, unterdrückt wurde⁸⁴. In vielen Studien erwies sich *bcl-2*-Überexpression generell ohne Einfluss auf die Proliferationsrate und bewirkte erst bei suboptimalen Kulturbedingungen einen Wachstumsarrest⁸⁴⁻⁸⁷. Wenn das Zellkulturmedium erst spät erneuert wurde, zeigten *bcl-2*-überexprimierende Zelllinien dieser Arbeit anschließend häufig einige Tage lang Proliferationsarrest (Daten nicht gezeigt), während andere Zelllinien ungehindert weiter proliferierten. Dieses Phänomen könnte darauf hinweisen, dass die *bcl-2*-überexprimierenden Zellen zur Sicherung des Überlebens bei Nährstoffentzug in der G₀/G₁-Zellzyklusphase verblieben waren. Dieser Wachstumsarrest hielt sogar noch einige Zeit über den Stressauslöser hinaus an. Ähnlich könnte der Vorgang auch *in vivo* nach EDX-Behandlung, wie auch schon für andere Apoptose-induzierenden Agenzien gezeigt⁸⁶, ablaufen. *Bcl-2*-überexprimierende Zellen könnten auf den Stressfaktor Chemotherapie mit dem vorübergehenden Verharren in der G₀/G₁-Zellzyklusphase reagieren. Dadurch wird ein längeres proliferationsfreies Intervall geschaffen, das die Entstehung von Antigenverlustvarianten verzögert und eine effektivere Elimination des Lymphoms durch spezifische T-Zellen ermöglicht. Dieser Effekt wäre angesichts der oben beschriebenen Studien von Kaluza et al., die auf eine erhöhte durch T-Zelldruck ausgelöste genomische Instabilität hinweisen, von enormer Bedeutung. Um diese Vermutungen experimentell zu überprüfen, sollte in zukünftigen Versuchen die Zellzyklusphase *bcl-2*-exprimierender Zellen kurz nach Chemotherapie und ihre p27-Expression untersucht werden.

Inzwischen gibt es auch Hinweise dafür, dass humane Tumore mit *bcl-2*-Überexpression durch zytotoxische T-Zellen eliminiert werden können. So haben Godal et al.⁸⁸ *in vitro* gezeigt, dass humane *bcl-2*-überexprimierende B-Zelllymphome durch zytotoxische T-Zellen lysiert werden können. Diese Ergebnisse werden unterstützt von der Beobachtung, dass die allogene Stammzelltransplantation bei chemorefraktären Bcl-2-positiven folliculären Lymphomen durchaus Erfolge zeigt⁸⁹. Losgelöst von adoptivem T-Zelltransfer weisen Studien auf Bcl-2 als positiven

prognostischen Faktor hin. So ist *bcl-2*-Überexpression bei kolorektalem Karzinom (nach Chirurgie)⁹⁰, bei Brustkrebs (unabhängig von der Behandlungsart)⁹¹, bei malignem peritonealem Mesotheliom (nach Chirurgie und Chemotherapie)⁹² und weiteren Krebsarten mit günstigerem Ausgang assoziiert. Erklärungen gibt es dafür bisher kaum, vermutet wird jedoch ein verlangsamtes Wachstum der Tumore durch die Rolle des Bcl-2-Proteins bei der Regulation des Zellzyklus. Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom⁹³ konnte gezeigt werden, dass die Expression von *bcl-2* die Neoangiogenese des Tumors herunter reguliert. Auch solche Funktionen des Bcl-2-Proteins könnten zur Erklärung der Ergebnisse dieser Arbeit beitragen.

Statt des erwarteten Phänomens der Seneszenz bei *bcl-2*-überexprimierenden Tumoren *in vivo* konnten in den hier beschriebenen Versuchen, kaum dauerhaft arretierte Zellen nachgewiesen werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass seneszente Zellen durch antigenspezifische zytotoxische T-Zellen erkannt und lysiert werden können. Zieht man in Betracht, dass Antigenverlust in unserem Modell vermutlich durch vorübergehenden Bcl-2-vermittelten Zellzyklusarrest eingeschränkt wurde, so ist anzunehmen, dass die *in vivo* auftretenden seneszenten Zellen ebenfalls ein gutes Ziel für T-Zellvermittelte Eliminierung darstellen.

4.3 Rolle der *p53*-Defizienz für das verbesserte Überleben von Tumoren nach Chemotherapie und adoptivem T-Zelltransfer

Als zweiter Einfluss von Apoptosedefekten auf adoptiven T-Zelltransfer wurde der Verlust des Tumorsuppressorproteins *p53* untersucht. In den Versuchen mit transplantierten *p53*^{-/-}-Lymphomzellen zeigte sich nach Chemotherapie und adoptivem Transfer auch bei diesem Defekt eine verbesserte Remission, aber im geringeren Ausmaß als bei *bcl-2*-Überexpression. Inwiefern *p53*-Verlust zum seltenerem Auftreten von Antigenverlustvarianten beitragen könnte, ist unklar. Die Tatsache, dass *p53* nur in seiner funktionellen Form Zellzyklusarrest vermitteln kann, schließt eine ähnliche Ursache – wie oben bei *bcl-2*-überexprimierenden Lymphomen vermutet – aus. Nachteilig für die hier gezeigten Untersuchungen war, dass aufgrund des Ursprungs der *p53*-negativen Zelllinie als Kontrolle nur die *p53*-profiziente Zelllinie 291OVA zur Verfügung stand. Auch müssen die Versuche zur Bestätigung der Ergebnisse mit einer zweiten *p53*-negativen Linie durchgeführt werden.

Interessant war in diesem Fall, dass in den Rezidiven ein von GFP entkoppelter Antigenverlust stattgefunden hatte. Damit ist der Verlust der gesamten retroviral transduzierten Plasmidsequenz ausgeschlossen. Da das GFP-Gen im Plasmid dem OVA-Gen nachgeschaltet ist, entfallen als

Ursachen ebenfalls Methylierungen oder Punktmutationen in Promotersequenzen. Möglich wären Punktmutationen im OVA-Gen, die zu einem veränderten Protein führen. Wahrscheinlicher erscheint die Möglichkeit, dass OVA zwar exprimiert, aber nicht präsentiert wird, z.B. durch Verlust des Mechanismus für die Antigenprozessierung. Durch das Fehlen des p53-Proteins als „Hüter des Genoms“, z.B. als Vermittler von DNA-Reparaturmechanismen, ist davon auszugehen, dass die genetische Instabilität der *p53*-defizienten Zellen im Vergleich zu *p53*-profizienten Zellen deutlich erhöht ist.

Interessant wäre es zu ermitteln, ob *bcl-2*-Überexpression bei Behandlung *p53*-defizienter Tumore zu weiteren Verbesserungen führt. Unabhängig von adoptivem T-Zelltransfer hat sich die Kombination von *bcl-2*-Überexpression und *p53*-Verlust bei kolorektalem Karzinom schon als positiver prognostischer Faktor erwiesen⁹⁰.

4.4 Antigenverlustvarianten und Tumorgroße

Je größer der Tumor desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass zum Zeitpunkt der Behandlung schon von selbst Varianten mit Antigenverlust entstanden sind⁹⁴ bzw. desto größer ist der Zeitgewinn der Tumorzellen solche Varianten zu entwickeln, ehe sie von Effektor-T-Zellen eliminiert werden. Da sich die Heterogenität von Tumoren ab einer Zellzahl von 10^9 entwickelt, was etwa einer Tumorgroße von 10 mm Durchmesser entspricht und erst dann die Rede von einem klinisch relevanten Tumor sein kann⁹⁵, muss als Kritikpunkt angebracht werden, dass die transplantierten Tumore zum Zeitpunkt der Behandlung für dieses Kriterium zu klein waren. Die Tendenz dafür, dass große Tumore kaum regredieren oder schnell Rezidive entwickeln, konnte auch in den Versuchen dieser Arbeit beobachtet werden. Studien von Spiotto et al. und Schietinger et al. weisen darauf hin, dass Antigenverlustvarianten durch Eliminierung des Tumorstromas auch bei großen Tumoren lysiert werden können^{96,97}. Dies war aber nur mit tumorspezifischen $CD8^+$ -Zellen in Abhängigkeit von $CD4^+$ T-Zellen möglich⁹⁷. Da in unserem Modell im T-Zellkompartiment durch zentrale OVA-Toleranz keine OVA-spezifischen $CD4$ -T-Zellen vorhanden waren, konnten diese auch nicht dazu verhelfen Antigenverlustvarianten zu eliminieren. Um Rezidive dadurch zu verhindern dass große Tumore schneller lysiert werden, könnten in zukünftigen Versuchen höhere OT-1-T-Zellzahlen eingesetzt werden und T-Zellen über IL-2 und OVA-Vakzinierung zusätzlich stimuliert werden⁹⁸. Eine weiterführende Möglichkeit mit Antigenverlustvarianten umzugehen, wäre T-Zellen auf ein zweites Antigen, zum Beispiel das tumortreibende *Myc*⁹⁹ anzusetzen. Es wurde schon gezeigt, dass der Einsatz zweier

unterschiedlicher T-Zell-Populationen, OT-1 und gp100-spezifische Pmel-T-Zellen, bei B16OVA-Tumoren deutlich mehr Antigenverlust-Variationen verhindern konnte¹⁰⁰.

4.5 T-Zelltoleranz im autochthonen Tumormodell

Da B-Zellen im autochthonen Modell nicht nur OVA exprimieren, sondern auch *myc* überexprimieren, kommt es in diesem Modell spontan zur Entwicklung neoplastischer B-Zellen. Das heißt, dass auch nach erfolgreicher Behandlung eines Lymphoms ohne Rezidiv ein neues Lymphom auftreten kann. Der Memory-Effekt der transferierten T-Zellen war hier deshalb besonders wichtig. Allerdings zeigte sich schon an der nach dem T-Zelltransfer wieder zunehmenden Zahl normaler B-Zellen im peripheren Blut, dass diese B-Zellen entweder nicht erkannt wurden oder dass keine funktionellen OT-1-Gedächtniszellen vorhanden waren. Zellen rezidivierter Lymphome im autochthonen Modell konnten, von einer Ausnahme abgesehen, *in vitro* zumindest kurzzeitig OT-1-Zellen aktivieren. Dies zeigte, dass es sich nicht um Antigenverlustvarianten handelte. Nur in einem rezidivierten Lymphom konnte nach einer langen Remission von 294 Tagen der Verlust der OVA-mRNA durch qPCR nachgewiesen werden. Rezidive ohne Antigenverlust weisen auf die Induktion von T-Zelltoleranz hin.

Bei Transferversuchen von OT-1-T-Zellen in λ -OVA-Mäuse wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass OT-1-Zellen trotz vorhandenem Zielantigen auf den B-Zellen nicht expandierten. Erst der Transfer nach Chemotherapie ermöglichte die Proliferation der OT-1-Zellen. Über die negative Selektion, d.h. die Eliminierung autoreaktiver T-Zellen im Thymus, wird die zentrale Toleranz geschaffen (Überblick¹⁰¹). Diese liegt auch in unserem λ -OVA-Mausmodell für das OVA-Protein vor, da es als Selbstantigen von B-Zellen exprimiert wird. Da prinzipiell über negative Selektion nicht alle autoimmunen T-Zellen erfasst werden, können T-Zellen auch über Toleranzmechanismen der peripheren Organe inaktiviert werden (Überblick¹⁰²). Dieser Vorgang wurde durch adoptiven Transfer spezifischer T-Zellen gegen ein Selbstantigen im Mausmodell nachgewiesen¹⁰³. Die in der vorliegenden Arbeit transferierten OVA-spezifischen OT-1-Zellen werden in der λ -OVA-Maus somit ebenfalls als autoimmune T-Zellen erkannt und inhibiert. Allgemein werden dendritische Zellen (dendritic cells, DCs), die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen^{104,105}, als Vermittler für periphere Toleranz verantwortlich gemacht. Doch es konnte gezeigt werden, dass auch B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen in der Lage sind T-Zellen zu inhibieren¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Dieser Effekt war nur bei persistierender Antigenpräsentation zu beobachten. Mit Hilfe eines chimären Mausmodells mit retroviral veränderten OVA-exprimierenden B-Zellen zeigten Werner-Klein et al.¹⁰⁹, dass diese

antigenpräsentierenden B-Zellen in OT-1-Zellen direkt Toleranz induzieren. Toleranz zeigte sich in klonaler Deletion nach kurzzeitiger Aktivierung der T-Zellen sowie in Anergie der transferierten T-Zellen.

Präliminäre Daten aus Kokulturversuchen mit den Rezidiven weisen bei rezidierten Lymphomen kurzer Latenzzeit auf die Fähigkeit hin, CD8-Effektor-Aktivität zu inhibieren. OT-1-T-Zellen zeigten 20 h nach Kontakt mit rezidierten Lymphomzellen kurzer Latenzzeit Expansion und IFN γ -Sekretion, aber nur zum Teil die Hochregulation des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und keine Lyse. Möglich wäre, dass alle OT-1-Zellen der Kokultur zu Beginn aktiviert waren, aber innerhalb von 20 h durch immunsuppressive Wirkungen der Lymphomzellen schon wieder deaktiviert wurden. Hingegen stimulierten die rezidierten Lymphomzellen langer Latenzzeit (bis auf die Ausnahme mit Antigenverlust) alle OT-1-Zellen zu CD69-Hochregulation, IFN γ -Sekretion, Proliferation und Lyse der Lymphomzellen. Weshalb diese Lymphome rezidierten, obwohl sie selber keine immunsuppressive Wirkung vermittelten, musste im Einfluss des Stromas bzw. anderer Wirtszellen, wie zum Beispiel der normalen B-Zellen, begründet sein. Der Unterschied zwischen TEOfrüh-Rezidiven und TEOspät-Rezidiven könnte also darin bestehen, dass die B-Lymphomzellen kurzer Latenzzeit noch in der Lage sind direkt T-Zellen zu tolerisieren, während diese Funktion bei Lymphomen später Latenzzeit nicht mehr oder verlangsamt vorhanden ist. Möglicherweise nimmt die Fähigkeit der B-Zellen bzw. des Immunsystems allgemein periphere Toleranz zu induzieren mit dem Alter ab. Dies würde erklären, weshalb OT-1-T-Zellen bei Lymphomen langer Latenz noch Einfluss auf das rezidivfreie Überleben nehmen konnten und sogar ein Rezidiv mit Antigenverlust bewirkten.

Auch regulatorische T-Zellen (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-Zellen) sind dafür bekannt, dass sie periphere Toleranz vermitteln¹¹⁰. Da die Depletion dieser Zellen durch den Antikörper PC61 in der λ -OVA-Maus keine Änderung nach OT1-Transfer bewirkte (Daten nicht gezeigt), konnte davon ausgegangen werden, dass diese Zellen höchstens eine untergeordnete Rolle spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die hier beobachtete T-Zelltoleranz durch B-Zellen vermittelt wird. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass auch andere Zellen wie DCs bzw. weitere Mechanismen daran beteiligt sind.

4.6 Aggressivität von Lymphomen in Abhängigkeit ihrer Latenzzeit

In dieser Arbeit wurde bei autochthonen Tumoren mit langer Tumorlatenz nach Behandlung mit Chemotherapie und antigenspezifischen T-Zellen eine verlängerte Remission beobachtet. Diese

könnte nicht nur darauf zurückzuführen sein, dass T-Zelltoleranz-induzierende Mechanismen mit dem Alter abnehmen, sondern auch darauf, dass Tumore mit kurzer Latenzzeit aggressiver wachsen als solche, die erst später auftreten. Bei einem Großteil humaner Neoplasien wurde im Gegenteil beobachtet, dass Tumore in älteren Patienten aggressiver sind (Überblick¹¹¹). Insgesamt ist die Aggressivität für Tumore eines Krebstyps zwischen Jugend und Alter aber schlecht vergleichbar, da Tumore in älteren Patienten oft weniger aggressiv therapiert werden und unterschiedliche genetische Veränderungen aufweisen. An den genetischen Hintergrund anknüpfend könnte eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse dieser Arbeit auch in unterschiedlichen B-Zelllymphomarten je nach B-Zell-Differenzierungsstatus liegen. Im E μ -MYC-Mausmodell, das ursprünglich für ein lymphoblastisches B-Zelllymphom-Modell gehalten wurde, konnten je nach Zeitpunkt des Auftretens des primären Tumors genetische Signaturen für unterschiedliche Lymphomarten identifiziert werden¹¹². Die Heterogenität der Rezidive des λ -OVA x λ -MYC-Mausmodells könnte darauf hinweisen, dass λ -OVA x λ -MYC-Mäuse bzw. die λ -MYC-Maus ebenfalls verschiedene Lymphom-arten repräsentieren, die sich nach unterschiedlichen Latenzzeiten entwickeln. Da die *myc*-Überexpression allein die B-Zellen noch nicht in Krebszellen umwandelt, sind weitere Transformationen der Zellen nötig⁵⁹. Möglich wäre, dass bei Lymphomen kurzer Latenzzeit früh eine entartende Mutation mit großem Einfluss auf die Aggressivität der Zellen stattfindet, während Lymphome späterer Latenzzeit mehrere Mutationen mit geringerem Einfluss ansammeln bis die Umwandlung zur Malignität stattfindet.

4.7 Vergleich der Tumormodelle

Am besten vergleichbar mit dem autochthonen Modell ist die Behandlung der transplantierten 110PC-Tumore in der λ -OVA-Maus. Diese produzierten ähnlich wenig OVA-mRNA wie λ -OVA x λ -MYC-Tumore (vgl. Abbildung 26 und Abbildung 33). OVA stellte in beiden Fällen ein Selbstantigen dar. Zum Zeitpunkt des T-Zelltransfers lagen normale B-Zellen, die möglicherweise Toleranz vermitteln, durch die Chemotherapie depletiert vor. Während Rezidive im Transplantationsmodell Antigenverlustvarianten waren, die darauf hinwiesen, dass OVA-positive Tumorzellen von den OT-1-T-Zellen eliminiert werden konnten, waren Rezidive des autochthonen Modells mit einer Ausnahme immer noch antigenpositiv. Ein wichtiger Unterschied bestand darin, dass λ -OVA x λ -MYC-Tumore deutlich sensitiver auf Chemotherapie reagierten. Es ist daher anzunehmen das mögliche Antigenverlustvarianten des Primärlymphoms vorerst gemeinsam mit OVA-positiven Lymphomzellen durch die Chemotherapie eliminiert werden. Nach Regeneration der toleranzinduzierenden B-Zellen kann in den Rezidiven oder sekundären Lymphomen des

autochthonen Modells keine Selektion von Antigenverlustvarianten mehr stattfinden. Im Transplantationsmodell hingegen werden nach OT-1-Transfer alle OVA-positiven Lymphomzellen eliminiert. Chemotherapie-resistente Antigenverlustvarianten bleiben zurück und bilden die Grundlage für Rezidive. Die Regeneration des B-Zellkompartiments nach T-Zelltransfer spricht in beiden Modellen dafür, dass kein T-Zellgedächtnis ausgebildet werden konnte. Dafür spricht ebenfalls die Beobachtung, dass für diesen Vorgang die Hilfe von spezifischen CD4-Zellen nötig ist^{103,113}, welche durch zentrale Toleranz der CD4-Zellen gegen OVA ausgeschlossen ist.

4.8 Fazit

Adoptiver T-Zelltransfer verspricht in vielerlei Hinsicht Fortschritte in der Behandlung aggressiver maligner Erkrankungen. Auch in den Untersuchungen dieser Arbeit konnten mit Hilfe des Transfers tumorspezifischer T-Zellen zum Teil dauerhafte Remission und ein verlängertes Überleben erreicht werden. Der Chemotherapie-Resistenz-fördernde Apoptoseinhibitor Bcl-2 erwies sich in diesem Zusammenhang als begünstigender Faktor. Viele Strategien gehen dahin, Apoptoseinhibitoren der Bcl-2-Familie auszuschalten (Überblick^{3,114}), um die Empfindlichkeit gegenüber Chemo-oder Strahlentherapie wieder herzustellen. Ein anderer Ansatz, der sich aus den Ergebnissen dieser Arbeiten ergibt, wäre stattdessen *bcl-2*-Überexpression für Heilungsversuche über adoptiven T-Zelltransfer auszunutzen.

In Kombination ergeben das Transplantationsmodell und das autochthone Tumormodell interessante einander ergänzende Werkzeuge zur Untersuchung der Mechanismen des Antigenverlusts und der T-Zelltoleranz. Das autochthone Tumormodell zeigt, dass die Induktion von T-Zelltoleranz ein primäres Problem für den Erfolg des adoptiven T-Zelltransfers mit B-Zellspezifischem bzw. tumorassoziiertem Zielantigen darstellt. Für den adoptiven Transfer sollten daher T-Zellen eingesetzt werden, die unempfindlich für die Vermittlung von T-Zelltoleranz sind. Ein Beispiel für solche T-Zellen sind, die schon erwähnten, CAR-T-Zellen, welche schon erfolgreich gegen B-Zellspezifische Malignitäten eingesetzt wurden^{54,115}. Zudem weisen die Ergebnisse der Chemo-Immuntherapie im autochthonen Modell darauf hin, dass das Alter des Patienten zum Zeitpunkt des primären Tumoraufretens, einen wichtigen Einflussfaktor für den Erfolg dieser Behandlung darstellt.

5. Referenzen

1. Schmitt, C.A. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1775, 5-20 (2007).
2. Vogelstein, B., *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546-1558 (2013).
3. Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S. & Campone, M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nature Reviews Cancer* 13, 455-465 (2013).
4. Li, H.L., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J.Y. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501 (1998).
5. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X.D. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490 (1998).
6. Lowe, S.W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315 (2004).
7. Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J. & Bar-Sagi, D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature Cell Biology* 1, 20-26 (1999).
8. Marchenko, N.D., Zaika, A. & Moll, U.M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria - A potential role in apoptotic signaling. *Journal of Biological Chemistry* 275, 16202-16212 (2000).
9. Mihara, M., *et al.* p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell* 11, 577-590 (2003).
10. Li, F.P. & Fraumeni, J.F., Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Annals of internal medicine* 71, 747-752 (1969).
11. Malkin, D., *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast-cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science* 250, 1233-1238 (1990).
12. Wallace-Brodeur, R.R. & Lowe, S.W. Clinical implications of p53 mutations. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 64-75 (1999).
13. Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E. & Croce, C.M. The t(14,18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 229, 1390-1392 (1985).
14. Cleary, M.L. & Sklar, J. Nucleotide-sequence of a t(14,18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome-18. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 7439-7443 (1985).

15. Bakhshi, A., *et al.* Cloning the chromosomal breakpoint of t(14-18) human lymphomas - clustering around JH on chromosome-14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899-906 (1985).
16. McDonnell, T.J., *et al.* Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B-cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57, 79-88 (1989).
17. McDonnell, T.J. & Korsmeyer, S.J. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14, 18). *Nature* 349, 254-256 (1991).
18. Schmitt, C.A., *et al.* A senescence program controlled by p53 and p16(INK4a) contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109, 335-346 (2002).
19. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. & Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* 88, 593-602 (1997).
20. HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621 (1961).
21. Braig, M., *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665 (2005).
22. Chen, Z.B., *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725-730 (2005).
23. Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460 (1990).
24. Rayess, H., Wang, M.B. & Srivatsan, E.S. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer* 130, 1715-1725 (2012).
25. Michaloglou, C., *et al.* BRAF(E600)-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724 (2005).
26. Coppe, J.-P., *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *Plos Biology* 6, 2853-2868 (2008).
27. Sidi, R., *et al.* Induction of senescence markers after neo-adjuvant chemotherapy of malignant pleural mesothelioma and association with clinical outcome: An exploratory analysis. *European Journal of Cancer* 47, 326-332 (2011).
28. Wang, Q., *et al.* Polyploidy road to therapy-induced cellular senescence and escape. *International Journal of Cancer* 132, 1505-1515 (2013).
29. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5, 99-118 (2010).

30. Acosta, J.C., *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 15, 978-990 (2013).
31. Tasdemir, N. & Lowe, S.W. Senescent cells spread the word: non-cell autonomous propagation of cellular senescence. *Embo Journal* 32, 1975-1976 (2013).
32. Beausejour, C.M., *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo Journal* 22, 4212-4222 (2003).
33. Dirac, A.M.G. & Bernards, R. Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral in suppression of p53. *Journal of Biological Chemistry* 278, 11731-11734 (2003).
34. Roberson, R.S., Kussick, S.J., Vallieres, E., Chen, S.Y.J. & Wu, D.Y. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Research* 65, 2795-2803 (2005).
35. Wang, Q., *et al.* Survivin and escaping in therapy-induced cellular senescence. *International Journal of Cancer* 128, 1546-1558 (2011).
36. Gross, L. Intra-dermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res* 3, 326-333 (1943).
37. Foley, E.J. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res* 13, 835-837 (1953).
38. Baldwin, R.W. Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in inbred rats following atrophy and regression of the implanted tumours. *British journal of cancer* 9, 652-657 (1955).
39. Prehn, R.T. & Main, J.M. Immunity to methylcholan-threne-induced sarcomas. *Jour Natl Cancer Inst* 18, 769-778 (1957).
40. Klein, G., Sjogren, H.O., Klein, E.V.A. & Hellstrom, E. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 20, 1561-1572 (1960).
41. Dougan, M. & Dranoff, G. Immune Therapy for Cancer. *Annual Review of Immunology* 27, 83-117 (2009).
42. Coiffier, B., *et al.* CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine* 346, 235-242 (2002).
43. Witzig, T.E., *et al.* Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 20, 2453-2463 (2002).
44. Geisse, J., *et al.* Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: Results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *Journal of the American Academy of Dermatology* 50, 722-733 (2004).

45. Atkins, M.B., *et al.* High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: Analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *Journal of Clinical Oncology* 17, 2105-2116 (1999).
46. Fyfe, G., *et al.* Results of treatment of 255 patients with metastatic renal-cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *Journal of Clinical Oncology* 13, 688-696 (1995).
47. Zhou, J., Sun, X.Y., Stenzel, D.J. & Frazer, I.H. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial-cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 185, 251-257 (1991).
48. Mathe, G., *et al.* Trial treatment of patients afflicted with acute leukemia in remission with total irradiation followed by homologous bone marrow transfusion. *Revue française d'études cliniques et biologiques* 4, 675-704 (1959).
49. Jansen, J. The first successful allogeneic bone-marrow transplant: Georges Mathe. *Transfusion Medicine Reviews* 19, 246-248 (2005).
50. Barnes, D.W., Corp, M.J., Loutit, J.F. & Neal, F.E. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *British medical journal* 2, 626-627 (1956).
51. Weiden, P.L., Sullivan, K.M., Flournoy, N., Storb, R. & Thomas, E.D. Anti-leukemic effect of chronic graft versus host-disease - contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *New England Journal of Medicine* 304, 1529-1533 (1981).
52. Fefer, A. Immuno therapy and chemo therapy of moloney sarcoma virus induced tumors in mice. *Cancer Research* 29, 2177-2183 (1969).
53. Rosenberg, S.A., *et al.* Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 17, 4550-4557 (2011).
54. Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A. & June, C.H. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 365, 725-733 (2011).
55. Shaffer, A.L., Young, R.M. & Staudt, L.M. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol* 30, 565-610 (2012).
56. Harris, A.W., *et al.* The E μ -myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J Exp Med* 167, 353-371 (1988).
57. Kovalchuk, A.L., *et al.* Burkitt Lymphoma in the Mouse. *The Journal of Experimental Medicine* 192, 1183-1190 (2000).
58. Gerbitz, A., *et al.* Deregulation of the proto-oncogene c-myc through t(8;22) translocation in Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 18, 1745-1753 (1999).

59. Hermeking, H. & Eick, D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 265, 2091-2093 (1994).
60. Sander, S., *et al.* Synergy between PI3K Signaling and MYC in Burkitt Lymphomagenesis. *Cancer Cell* 22, 167-179 (2012).
61. Schmitz, R., *et al.* Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490, 116-120 (2012).
62. Wang, Y.S., Szekely, L., Okan, I., Klein, G. & Wiman, K.G. Wild type p53-triggered apoptosis is inhibited by Bcl-2 in a V-myc-induced T-cell lymphoma line. *Oncogene* 8, 3427-3431 (1993).
63. Chiou, S.K., Rao, L. & White, E. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 14, 2556-2563 (1994).
64. Grigg, A. & Ritchie, D. Graft-versus-lymphoma effects: Clinical review, policy proposals, and immunobiology. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 10, 579-590 (2004).
65. Wrench, D. & Gribben, J.G. Stem Cell Transplantation for Non-Hodgkin's Lymphoma. *Hematology-Oncology Clinics of North America* 22, 1051-+ (2008).
66. Hogquist, K.A., *et al.* T-cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27 (1994).
67. Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C. & Levy, D.E. Targeted disruption of the mouse STAT1 results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84, 443-450 (1996).
68. Ehst, B.D., Ingulli, E. & Jenkins, M.K. Development of a novel transgenic mouse for the study of interactions between CD4 and CD8 T cells during graft rejection. *American Journal of Transplantation* 3, 1355-1362 (2003).
69. Jacks, T., *et al.* Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current Biology* 4, 1-7 (1994).
70. Mombaerts, P., *et al.* RAG-1-deficient mice have no mature lymphocytes-B and lymphocytes-T. *Cell* 68, 869-877 (1992).
71. Gerbitz, A., *et al.* Stromal Interferon-gamma Signaling and Cross-Presentation Are Required to Eliminate Antigen-Loss Variants of B Cell Lymphomas in Mice. *Plos One* 7(2012).
72. Morita, S., Kojima, T. & Kitamura, T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Therapy* 7, 1063-1066 (2000).
73. Morgenstern, J.P. & Land, H. A series of mammalian expression vectors and characterization of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Research* 18, 1068-1068 (1990).
74. Shih, C. & Weinberg, R.A. Isolation of a transforming sequence from a human bladder-carcinoma cell-line. *Cell* 29, 161-169 (1982).

75. Schreiber, K., Rowley, D.A., Riethmuller, G. & Schreiber, H. Cancer immunotherapy and preclinical studies: Why we are not wasting our time with animal experiments. *Hematology-Oncology Clinics of North America* 20, 567-584 (2006).
76. Shastri, N. & Gonzalez, F. Endogenous generation and presentation of the ovalbumin peptide/K(B) complex to T-cells. *Journal of Immunology* 150, 2724-2736 (1993).
77. Kaluza, K.M., *et al.* Adoptive T cell therapy promotes the emergence of genomically altered tumor escape variants. *International Journal of Cancer* 131, 844-854 (2012).
78. Kmiecik, M., Knutson, K.L., Dumur, C.I. & Manjili, M.H. HER-2/neu antigen loss and relapse of mammary carcinoma are actively induced by T cell-mediated anti-tumor immune responses. *European Journal of Immunology* 37, 675-685 (2007).
79. Altevogt, P., Vonhoegen, P. & Schirmacher, V. Immunoresistant metastatic tumor variants can re-express their tumor-antigen after treatment with DNA methylation-inhibiting agents. *International Journal of Cancer* 38, 707-711 (1986).
80. Sanchez-Perez, L., *et al.* Potent selection of antigen loss variants of B16 melanoma following inflammatory killing of melanocytes in vivo. *Cancer Research* 65, 2009-2017 (2005).
81. Anders, K., *et al.* Oncogene-targeting T cells reject large tumors while oncogene inactivation selects escape variants in mouse models of cancer. *Immunology* 137, 718-718 (2012).
82. Zinkel, S., Gross, A. & Yang, E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death and Differentiation* 13, 1351-1359 (2006).
83. Pietenpol, J.A., *et al.* Paradoxical inhibition of solid tumor-cell growth by bcl2. *Cancer Research* 54, 3714-3717 (1994).
84. Greider, C., Chattopadhyay, A., Parkhurst, C. & Yang, E. BCL-x(L) and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 21, 7765-7775 (2002).
85. Huang, D.C.S., Oreilly, L.A., Strasser, A. & Cory, S. The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *Embo Journal* 16, 4628-4638 (1997).
86. Borner, C. Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *Journal of Biological Chemistry* 271, 12695-12698 (1996).
87. Simpson, N.H., Singh, R.P., Emery, A.N. & Al-Rubeai, M. Bcl-2 over-expression reduces growth rate and prolongs G(1) phase in continuous chemostat cultures of hybridoma cells. *Biotechnology and Bioengineering* 64, 174-186 (1999).
88. Godal, R., *et al.* Lymphomas are sensitive to perforin-dependent cytotoxic pathways despite expression of PI-9 and overexpression of bcl-2. *Blood* 107, 3205-3211 (2006).

89. Hamadani, M., *et al.* Feasibility of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for follicular lymphoma undergoing transformation to diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 49, 1893-1898 (2008).
90. Buglioni, S., *et al.* Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: Independent prognostic role of p53 and Bcl-2. *International Journal of Cancer* 84, 545-552 (1999).
91. Callagy, G.M., Webber, M.J., Pharoah, P.D.P. & Caldas, C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *Bmc Cancer* 8, 10 (2008).
92. Pillai, K., Pourgholami, M.H., Chua, T.C. & Morris, D.L. Does the expression of BCL2 have prognostic significance in malignant peritoneal mesothelioma? *American journal of cancer research* 3, 312-322 (2013).
93. Fontanini, G., *et al.* Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *European Journal of Cancer* 34, 718-723 (1998).
94. Goldie, J.H. & Coldman, A.J. A model for tumor response to chemotherapy - an integration of the stem-cell and somatic mutation hypothesis. *Cancer Investigation* 3, 553-564 (1985).
95. Wen, F.T., Thisted, R.A., Rowley, D.A. & Schreiber, H. A systematic analysis of experimental immunotherapies on tumors differing in size and duration of growth. *Oncoimmunology* 1, 172-178 (2012).
96. Spiotto, M.T., Rowley, D.A. & Schreiber, H. Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nature Medicine* 10, 294-298 (2004).
97. Schietinger, A., Philip, M., Liu, R.B., Schreiber, K. & Schreiber, H. Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4(+) and CD8(+) T cells during the effector phase. *Journal of Experimental Medicine* 207, 2469-2477 (2010).
98. Klebanoff, C.A., *et al.* Determinants of Successful CD8(+) T-Cell Adoptive Immunotherapy for Large Established Tumors in Mice. *Clinical Cancer Research* 17, 5343-5352 (2011).
99. Helm, F., *et al.* Targeting c-MYC with T-Cells. *PLoS one* 8, e77375-e77375 (2013).
100. Kaluza, K.M., *et al.* Adoptive Transfer of Cytotoxic T Lymphocytes Targeting Two Different Antigens Limits Antigen Loss and Tumor Escape. *Human Gene Therapy* 23, 1054-1064 (2012).
101. Palmer, E. Negative selection - Clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nature Reviews Immunology* 3, 383-391 (2003).
102. Redmond, W.L. & Sherman, L.A. Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity* 22, 275-284 (2005).
103. Hernandez, J., Aung, S., Redmond, W.L. & Sherman, L.A. Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *Journal of Experimental Medicine* 194, 707-717 (2001).

104. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use makropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class-II compartment - down-regulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine* 182, 389-400 (1995).
105. Albert, M.L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89 (1998).
106. Bennett, S.R.M., Carbone, F.R., Toy, T., Miller, J. & Heath, W.R. B cells directly tolerize CD8(+) T cells. *Journal of Experimental Medicine* 188, 1977-1983 (1998).
107. Raimondi, G., Zanoni, I., Citterio, S., Ricciardi-Castagnoli, P. & Granucci, F. Induction of peripheral T cell tolerance by antigen-presenting B cells. I. Relevance of antigen presentation persistence. *Journal of Immunology* 176, 4012-4020 (2006).
108. Raimondi, G., Zanoni, I., Citterio, S., Ricciardi-Castagnoli, P. & Granucci, F. Induction of peripheral T cell tolerance by antigen-presenting B cells. II. Chronic antigen presentation overrules antigen-presenting B cell activation. *Journal of Immunology* 176, 4021-4028 (2006).
109. Werner-Klein, M., Dresch, C., Marconi, P. & Brocker, T. Transcriptional targeting of B cells for induction of peripheral CD8 T cell tolerance. *Journal of Immunology* 178, 7738-7746 (2007).
110. Suri-Payer, E., Amar, A.Z., Thornton, A.M. & Shevach, E.M. CD4(+)CD25(+) T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *Journal of Immunology* 160, 1212-1218 (1998).
111. de Magalhaes, J.P. How ageing processes influence cancer. *Nature Reviews Cancer* 13, 357-365 (2013).
112. Mori, S., *et al.* Utilization of Pathway Signatures to Reveal Distinct Types of B Lymphoma in the E mu-myc Model and Human Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancer Research* 68, 8525-8534 (2008).
113. Shedlock, D.J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339 (2003).
114. Lessene, G., Czabotar, P.E. & Colman, P.M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 989-1000 (2008).
115. Kalos, M., *et al.* T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Science Translational Medicine* 3(2011).

6. Anhang

Abkürzungen

APC	Allophycocyanin
Bcl-2	<i>B cell lymphoma-2</i>
BSA	<i>Purified Bovine Serum Albumin</i> (Rinderalbumin)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CDK	<i>Cyclin dependant kinase</i>
DF-5	<i>Death factor 5</i>
DISC	<i>Death inducing signalling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FasL	Fas Ligand
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluorothioisocyanat
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukemia
GvT	Graft versus Tumor
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPV	Humanes Papilloma-Virus
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i> (Apoptoseinhibitor)
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
MACS®	<i>Magnetic cell sorting</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MSCV	Mouse Stem Cell Virus
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	<i>Parental cell line, parentale Zelllinie</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin mit Cy7 Konjugat
<i>PerCP</i>	<i>Peridin-Chlorophyll-Protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SASP	<i>Seneszenz-assoziiertes sekretierendes Phänotyp</i>
s.c.	<i>subkutan</i>
TGF-β	<i>Tumor growth factor β</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TIL	<i>Tumor infiltrating lymphocytes</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand</i>
WT	Wildtyp

7. Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Armin Gerbitz bedanken für die Gelegenheit in einem spannenden Forschungsgebiet wie der Tumorimmunologie promovieren zu können, für die Betreuung, Motivation und moralische Unterstützung, auch über die Doktorarbeit hinaus.

Desweiteren geht mein Dank an Prof. Dr. Thomas Blankenstein für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl zu promovieren, seine konstruktive Kritik und hilfreiche Hinweise vor allem während meiner Zeit in Berlin.

Ich danke der tollsten Arbeitsgruppe überhaupt – der „AG Harmonie“ – für die schöne Arbeitsatmosphäre, moralische Unterstützung, Motivation und Hilfe bei vielerlei Dingen, speziell zum Ende der Promotion und für die Kompensation meiner gelegentlichen geistigen Verwirrung. Mein besonderer Dank geht dabei an Heidi Balzer für ganz viel Unterstützung in Labor und Tierstall und die sympathische, unkomplizierte Zusammenarbeit. Danke an Regina Gary für die Hilfe am FACS-Gerät, moralische Unterstützung, die sympathische Palmeria-Gesellschaft und das Know-how speziell für die letzte Phase.

Dank gilt auch Prof. Dr. Andreas Mackensen für die Möglichkeit die Promotion in seiner Abteilung zu Ende zu führen, und vielen anderen Mitarbeitern der Med5-Forschungsgruppe in Erlangen für den guten wissenschaftlichen Austausch und die Hilfe bei der Durchführung vieler Labortechniken. Speziell danke ich Mike Aigner für verständnisvolle, ermutigende Gespräche zum Doktorandendasein.

Mein Dank geht natürlich auch an meine ehemalige Arbeitsgruppe in Berlin. Besonders viel tatkräftige Unterstützung, die Einführung in das tierexperimentelle Arbeiten und gute Gespräche verdanke ich Andrea Wilke. Ich danke Florian Helm für die Einführung in viele Labortechniken und den wissenschaftlichen Austausch. Vielen Dank auch an die „Nachbarn“, Arbeitsgruppe Sieper, speziell an René Maier für immunhistologische Hilfestellung.

Danke an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppen Blankenstein, Schüler und Uckert in Berlin für den lehrreichen Austausch, hilfreiche Kritik, gute Tipps für mein Projekt und die Erweiterung des Horizonts über das Graduiertenkolleg TRR36.

Vielen Dank an Prof. Dr. Georg Bornkamm vom Helmholtz-Zentrum in München für die Begleitung meines Forschungsprojekts, die geduldige Durchsicht und Diskussion der Ergebnisse und die guten

Ratschläge. Ihm und Frank Lehmann gilt auch mein Dank für die Herstellung des λ -OVA-Maus-Konstrukts.

Ich danke PD Dr. Maike Büttner-Herold vom Pathologischen Institut Erlangen für die Hilfe bei der Erstellung und Auswertung immunhistologischer Färbungen.

Nicht zuletzt danke ich den Menschen, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet, ermutigt, und ertragen haben. Danke besonders an meine Familie fürs verständnisvolle Zuhören, an Franzl für viele ermutigende Gespräche und an „Adlerauge“ Marco für viel schöne Ablenkung.