

Aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Berlin-Buch

DISSERTATION

**Einfluss der Deletion von EBAG9 auf die zytotoxische Effektor-
funktion von CD8⁺-T-Lymphozyten im E.G-7 Tumormodell**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christof Peter Bauer

aus Bad Ischl, Österreich

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	VI
Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Maligne Tumore - epidemiologisch relevante Erkrankungen	1
1.2 Immuntherapie von Neoplasien	2
1.2.1 Ansätze in der Immuntherapie maligner Neoplasien	3
1.3 Tumorantigene als Grundlage für die spezifische Immuntherapie	6
1.3.1 Tumorspezifische Antigene	6
1.3.2 Tumorassoziierte Antigene	6
1.3.3 Minor-Histokompatibilitäts Antigene	7
1.4 CD8⁺-zytotoxische T-Zellen	8
1.4.1 Funktion von CD8 ⁺ -zytotoxischen T-Zellen	8
1.4.2 Differenzierung von naiven CD8 ⁺ -T-Zellen zu CD8 ⁺ -zytotoxischen T-Zellen	8
1.4.3 Effektormechanismen der CTLs	9
1.4.4 Zellbiologie der Effektoraktivität von CD8 ⁺ -zytotoxischen T-Zellen	9
1.5 T-Zell Engineering	12
1.5.1 Eradikation von Tumorzellen mittels modifizierter TZRs und CARs	12
1.5.2 Aktivierung oder Inhibition von zytotoxischen T-Zellen	12
1.5.3 Verstärkung der Effektorfunktionen von zytotoxischen T-Zellen	13
1.5.4 Hindernisse und Risiken des adoptiven T-Zell Transfers	13

1.6 Estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9 (EBAG9)	14
1.6.1 Das Protein EBAG9	14
1.6.2 Die Funktion von EBAG9 in CD8 ⁺ -zytotoxischen T-Zellen.....	15
1.7 Aufgabenstellung	16
2. Materialien	18
2.1 Mäuse	18
2.2 Zelllinien	18
2.2.1 E.G-7	18
2.2.2 Plat-E.....	18
2.3 Verwendete Mikroorganismen	19
2.4 Antikörper	19
2.4.1 Primäre Antikörper für die Durchflusszytometrie	19
2.4.2: Primäre Antikörper für Westernblot	20
2.4.3: Sekundärer Antikörper für Westernblot	20
2.4.5:Antikörper zum Beschichten von Platten und Stimulieren von Splenozyten/T-Zellen	20
2.5 Zellkultur Medien	20
2.5.1 Rezepte für die Zellkulturmedien	20
2.5.2 Einzelkomponenten der Zellkulturmedien:.....	21
2.6 Medien und Einzelkomponenten für Transformation und Plasmidproduktion mittels kompetenter Zellen	21
2.7 Verwendete Puffer und Stocklösungen	21
2.8 Gele für Protein-Gelelektrophorese	22
2.9 Chemikalien	23
2.10 Verwendete Zytokine	23
2.11 Verwendete Kits	23
2.12 Laborgeräte & Verbrauchsmaterialien	23
2.13 Verwendete Software	25

3. Methoden.....	26
3.1 Zellbiologische Methoden	26
3.1.1 Sterile Entnahme von inguinalen Lymphknoten und Mäusemilzen	26
3.1.2 Sterile Herstellung einer Zellsuspension aus inguinalen Lymphknoten und Milz	26
3.1.3 Stimulation einer Zellsuspension aus Milz und Lymphknotenzellen mit SIINFEKL ..	26
3.1.4 Kultivieren von E.G-7 Zellen	26
3.1.5 Einfrieren von Zellen	27
3.1.6 Steriles Auftauen von eingefrorenen Zellen	27
3.1.7 Sterile Präparation von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark	27
3.1.8 Kultivieren der Plat-E Zellen	28
3.1.9 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer	28
3.1.10 Durchflusszytometrie	28
3.1.11 Anreichern von transduzierten Zellen mittels Durchflusszytometrie	30
3.2 Tierexperimentelle Methoden	30
3.2.1 Applikation subkutaner Tumore	30
3.2.2 Vakzinierung mit SIINFEKL-gepulsten dendritischen Zellen	31
3.2.3 <i>In vivo</i> Killing Assay	31
3.2.4 Adoptiver T-Zell Transfer.....	31
3.2.5 Bestimmung des Tumorumfanges als Indikator für die Krankheitsprogression	32
3.3 Proteinbiochemische Methoden	33
3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Lymphozyten	33
3.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine	33
3.3.3 Blotting der aufgetrennten Proteine auf eine Membran	34
3.3.4 Entwickeln des Blots.....	34
3.4 Molekularbiologische Methoden	35
3.4.1 Transformation von XL-1 Blue kompetenten Zellen mit shRNA-Plasmid	35
3.4.2 Erstellen von Maxiprep-Kulturen	35

3.4.3 Plasmidpräparation aus Maxiprep-Kultur	35
3.4.4 Calcium-Phosphat-Transfektion von Plat-E Zellen und Produktion retroviraler Überstände	36
3.4.5 Virusernte von transfizierten Plat-E Zellen	37
3.4.6 Auftauen und Einfrieren von Virusüberständen	37
3.4.7 Retrovirale Transduktion von Maussplenozyten	37
4. Ergebnisse	40
4.1. <i>In vivo</i> Killing Assay	40
4.2 Etablierung von Wachstumskinetik, Kontrollintervallen und Kontrollgruppe des Wachstums der E.G-7 Tumorzellen in C57BL/6 Mäusen	42
4.2.1. Etablierung einer Wachstumskinetik der E.G-7 Tumorzellen in C57BL/6 Mäusen ...	42
4.2.2 Etablierung einer Kontrollgruppe aus C57BL/6 Mäusen	43
4.3 Tumorwachstum von E.G-7 Zellen in Wt und EBAG9^{-/-} C57BL/6 Mäusen.....	44
4.4 Abstoßung von E.G-7 Tumorzellen nach Vakzinierung.....	46
4.5 Analyse der Gedächtnis-T-Zellbildung in DC-vakzinierten Tieren	47
4.6 Polyklonaler Transfer von zytotoxischen T-Zellen mit DC-Unterstützung.....	50
4.7 Analyse der Memory-Bildung nach polyklonalem adoptiven T-Zelltransfer.....	54
4.8 Kontrolle der OT-I Tiere auf Expression des OT-I-Rezeptors	57
4.9 Monoklonale adoptive T-Zelltransferversuche.....	58
4.9.1 Dosisfindung für monoklonale OT-I Transferexperimente	60
4.9.2 Vergleich der Wirksamkeit von OT-I Wt CTLs versus EBAG9 ^{-/-} OT-I CTLs	62
4.9.3 Transfer von 5x10 ⁵ OT-I Wt CTLs versus 5x10 ⁵ OT-I EBAG9 ^{-/-} CTLs.....	64
4.10 shRNA vermittelte Herunterregulation von EBAG9 in murinen T-Zellen	67
4.10.1 Virusproduktion in der Verpackungszelllinie Plat-E.....	67
4.10.2 Transduktion von primären Maus T-Zellen.....	68
4.10.3 Anreicherung der transduzierten primären CD8 ⁺ /GFP ⁺ Zellen mittels Zellsorter.....	70
4.10.4 Quantifizierung der EBAG9 Expression in den transduzierten CD8 ⁺ -T-Zellen.....	71

5. Diskussion.....	73
5.1 EBAG9^{-/-} CTLs verfügen <i>in vivo</i> über eine effektivere zytotoxische Funktion als Wt CTLs	74
5.2 Etablierung der Wachstumskinetik von E.G-7 Tumorzellen in C57BL/6 Mäusen.....	75
5.3 EBAG9^{-/-} Mäuse zeigen ein Wt Tieren vergleichbares Wachstum der E.G-7 Tumorzellen	75
5.4 Vakzinierte Wt und EBAG9^{-/-} Mäuse verfügen über eine vergleichbare Effektivität bei der Abstoßung von E.G-7 Tumorzellen.....	77
5.5 Polyklonaler Transfer von CTLs mit unterstützender DC-Vakzinierung führt in Wt und EBAG9^{-/-} Tieren zu einem vergleichbaren Antitumoreffekt.....	78
5.6 Monoklonale adoptive T-Zelltransferversuche.....	79
5.6.1 ATzT mit 5x10 ⁶ OT-I EBAG9 ^{-/-} CTLs führt zu einer effizienten Antitumorantwort ..	80
5.6.2 ATzT von OT-I Wt bzw. EBAG9 ^{-/-} CTLs führt zu einem vergleichbaren, potenten Antitumoreffekt.....	80
5.6.3 ATzT mit 5x10 ⁵ Wt vs EBAG9 ^{-/-} OT-I CTLs führt zu einem vergleichbarem Antitumoreffekt.....	85
5.7 Transduktionsversuche	85
5.7.1 Virusproduktion mit der Verpackungszelllinie Plat-E.....	85
5.7.2 Transduktion von primären Maus-CD8 ⁺ -T-Zellen	86
5.7.3 Anreicherung der transduzierten Zellen mittels Zellsorter	87
5.7.4 Westernblotanalyse der EBAG9-Expression in den transduzierten und angereicherten T-Zellen.....	88
6. Literaturverzeichnis.....	90
Lebenslauf	101
Danksagung.....	103
Eidesstattliche Versicherung.....	104

Zusammenfassung

CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage, antigenspezifisch Tumorzellen direkt zu lysieren sowie durch die Sekretion von IFN- γ und dessen Wirkung auf Stromazellen die Elimination der Tumore zu initiieren. EBAG9 ist als Negativregulator am Transport zytotoxischer Effektormoleküle zu den sekretorischen Lysosomen in CD8⁺-T-Zellen beteiligt. Eine Defizienz an EBAG9 führt zu einer verbesserten zytolytischen Funktion der CD8⁺-T-Lymphozyten gegen Suspensionszellen bzw. hämatopoetische Zellen *in vitro* und *in vivo*. Die IFN- γ Sekretion bleibt hingegen unbeeinflusst.

Es wurde im E.G-7/OT-I Modell untersucht, ob durch EBAG9-Defizienz in T-Lymphozyten gegenüber Wt T-Zellen im Rahmen adoptiver T-Zelltherapie eine verbesserte Elimination solider Tumore erreicht werden kann.

Nach subkutaner Applikation von E.G-7 Zellen kam es in C57BL/6 Wt und EBAG9^{-/-} Empfänger-mäusen gleichermaßen zum Auswachsen solider Tumore. Wurden die Tiere zuvor gegen das dominante Peptidantigen der Tumorzellen, SIINFEKL, immunisiert, so kam es in beiden Gruppen zur erfolgreichen Abstoßung der Tumorzellen. EBAG9^{-/-} Mäuse sind wie Wt Tiere in der Lage, ein funktionierendes immunologisches Gedächtnis auszubilden.

Beim adoptiven Transfer von voraktivierten 1×10^6 Wt bzw. EBAG9^{-/-} OT-I zytotoxischen T-Zellen in tumortragende C57BL/6 Tiere konnte bezüglich Tumorprogression und Überleben kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. In beiden Gruppen kam es nach initial gutem Therapieansprechen zu Rezidiven und erneuter Tumorprogression. Dennoch ließ sich ein Trend zugunsten der EBAG9-deletierten OT-I T-Zellen nachweisen. Dieser wurde ersichtlich durch rascheres Erreichen der Remissionen sowie eine stärkere Reduktion des mittleren Tumolvolumens nach Transfer verglichen mit Wt Tieren.

Obwohl die direkte Granzym und Perforin vermittelte Lyse von Tumorzellen durch CTLs einen postulierten Mechanismus zur Kontrolle solider Tumore durch das Immunsystem darstellt, konnte trotz nachgewiesener stärkerer zytolytischer Kapazität gegen hämatopoetische Zielzellen kein statistisch messbarer relevanter Vorteil von EBAG9^{-/-} CTLs gegenüber Wt CTLs im soliden E.G-7/OT-I Tumormodell festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass andere Mechanismen, wie z.B. die Sekretion von IFN- γ und die dadurch vermittelte Hemmung der Angiogenese im Tumorgewebe, im Kontext solider Tumore eine wichtigere Rolle spielen könnten. Auch ein funktioneller Antagonismus von TGF- β gegenüber der Defizienz an EBAG9 kommt als Ursache in Frage.

Zur Entwicklung eines technologischen Ansatzes mit dem Ziel, eine verminderte Expression von EBAG9 auch in adoptiv zu transferierenden T-Zellen ohne genetische Defizienz zu ermöglichen,

wurden für EBAG9 retrovirale Transduktionen von shRNAs in primären Maus T-Lymphozyten durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Anreicherung der transduzierten Zellen durch Zellsortierverfahren sowie eine Analyse mittels Westernblot. Dabei konnte durch die retrovirale Transduktion eine Herunterregulation von EBAG9 in primären T-Zellen um bis zu 42.4% erreicht werden. Dies demonstriert die prinzipielle Eignung dieses Verfahrens für die therapeutische Modulation der Effektorstärke bei adoptiven T-Zelltransfers.

Summary

CD8⁺ T-cells promote tumor rejection via direct cellular cytotoxicity and IFN- γ mediated effects on neoplastic and stromal cells upon antigen-specific activation. The deficiency of EBAG9, a molecule involved in intracellular protein trafficking and the biogenesis of the lytic granules, significantly enhances the cytotoxic capacity of CD8⁺ T-cells against single cell suspension *in vitro* and *in vivo*. Secretion of IFN- γ on the contrary remains unaffected.

To investigate, whether a lack of EBAG9 translates into a desirable advantage against solid cancer compared to EBAG9⁺ CD8⁺ T-cells the E.G-7 tumor model was used together with the OT-I TCR for adoptive T-cell therapy.

Subcutaneous inoculation with E.G-7 cells and subsequent monitoring of tumor-growth by caliper revealed comparable tumor incidence, progression and overall survival in naive C57BL/6 EBAG9^{+/+} and EBAG9^{-/-} mice. When vaccinated against the dominant tumor antigen prior to tumor cell challenge, both groups showed a comparable capacity for rejecting the inoculated E.G-7 cells. This clearly demonstrated that loss of EBAG9 does not impede the formation of an efficient immunologic memory response.

In the context of adoptively transferred 1x10⁶ OT-I EBAG9^{+/+} and 1x10⁶ OT-I EBAG9^{-/-} T-cells into tumor-bearing mice, no significant benefit with respect to tumor progression or overall survival could be observed. However, careful analysis of the acquired data demonstrated a strong trend in favour of EBAG9-deficient OT-I CD8⁺ T-cells especially in early stages of adoptive transfer. The EBAG9^{-/-} OT-I transfer group showed a faster onset of remissions and stronger reduction of the mean tumor volumes compared with the respective OT-I Wt transfer group.

Even though EBAG9^{-/-} cytotoxic T-cells possess enhanced cytolytic capacity and direct Granzyme/Perforin mediated lysis of cancer cells is a postulated mechanism for tumor cell rejection, no significant advantage for EBAG9-deficient T-cells could be detected. This result could be explained by more recent discoveries, that IFN- γ secretion by CD8⁺ T-cells and its capacity to inhibit neoangiogenesis within solid tumors might play a more pivotal role for tumor rejection than

direct cellular toxicity. Another plausible explanation could be a functional antagonism between tumor-associated TGF- β action, which is the reduction of protein expression of the cytotoxic gene molecules on the one hand, and the EBAG9 knock-out effect with increases intracellular protein-trafficking on the other.

In order of achieving EBAG9 downregulation without genetic deficiency in T-cells designated for adoptive transfer, retroviral transductions with shRNAs for EBAG9 were performed in primary mouse T-cells. Enrichment of transduced cells via fluorescence assisted cell sorting and assessment of EBAG9 expression levels by Western Blot analysis revealed a decrease of EBAG9 protein levels up to 42.4%. This demonstrates in principal the feasibility of this approach for modulating T-cell cytolytic capacity.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF488	Alexa Fluor 488
AF647	Alexa Fluor 647
AF700	Alexa Fluor 700
ALV	antigen loss variants
APC	Allophycocyanin
APCs	antigenpräsentierende Zellen
AP	Adapterprotein
APs	Adapterproteine
AS	Aminosäure
ASS	Aspirin
ATzT	adoptiver Transfer von zytotoxischen T-Zellen
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BFA	Brefeldin A
BLOC-1	biogenesis of lysosome-related organelles complex-1
BSA	Rinderserumalbumin Fraktion IV
CARs	chimäre Antigenrezeptoren
Cbl-b	Casitas B lymphoma-b protein
COX-2	Cyclooxygenase 2
CMV	Cytomegalievirus
CpG	cytosine triphosphate deoxynucleotide phosphodiester guanine triphosphate deoxynucleotide
cSMAC	central supramolecular activation cluster
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTLs	zytotoxische T-Zellen

DC	dendritische Zelle
DCs	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBAG9	Estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9
EBV	Epstein-Barr-Virus
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie (engl. "fluorescence assisted cell sorting")
FasL	Fas Ligand
Fas	Fas Rezeptor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FRS	fetales Rinderserum
G418	Geneticin 418
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	graft versus host disease
GvL	graft vs leukemia
GvT	graft vs tumor
HV450	HorizonV450
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LAMP	lysosomal-associated membrane protein
LFA-1	lymphocyte function-associate antigen 1
LPS	Lipopolysacharid
LRO	lysosome-related organells
MACS	magnetische Zellsortierung (engl. "magnetic cell seperation")

MDC	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
mHA _g	Minor-Histokompatibilitätsantigen
MHC	major histocompatibility complex
MM	Mausmedium
MTOC	microtubule-organizing center
MVB	multivesicular bodies
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
NK-Zellen	natürliche Killer Zellen
OVA	Ovalbumin
PB	Pacific Blue
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death protein 1 ligand
PE	R-phycoerythrin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pSMAC	peripheral supramolecular activation cluster
Rat	Ratte
RCAS1	receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
s.c.	subcutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	small hairpin ribonucleic acid
SNP	single nucleotide polymorphisms
TAA	tumorassoziertes Antigen
Tab.	Tabelle
TGF- β	tumor growth factor β

TGN	trans Golgi network
Tregs	regulatorische T-Zellen
TSA	tumorspezifischen Antigenen
TZR	T-Zell-Rezeptor
Wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Todesursachen nach Krankheitsart 2013.....	1
Abb. 2: Prinzip des ATzT	4
Abb. 3: Aktivierung einer CD8 ⁺ -zytotoxischen T-Effektorzelle	11
Abb. 4: Sekretionsweg in CTLs	16
Abb. 5: Verbessertes spezifisches Killing in EBAG9 ^{-/-} Tieren verglichen mit Wt Mäusen	41
Abb. 6: Vorexperiment zum Wachstum der E.G-7 Tumorzelllinie in C57BL/6 Mäusen	42
Abb. 7: Tumorwachstum in und Überleben von unbehandelten C57BL/6 Mäusen	43
Abb. 8: Tumorinzidenz, Tumorwachstum und Überleben in Wt und EBAG9 ^{-/-} Tieren.....	45
Abb. 9: Tumorinzidenz in vakzinieren Wt und EBAG9 ^{-/-} Mäusen.....	47
Abb. 10: Repräsentative Darstellung des Auswertungsprozesses zur Identifikation der CD8 ⁺ /CD44 ⁺ /IFN- γ ⁺ Zellen	48
Abb. 11: Quantifizierung der CD8 ⁺ -Effektorzellpopulation nach Vakzinierung und Tumorapplikation	49
Abb. 12: Aufbau des polyklonalen Transfersversuches mit einer CTL-Gabe.....	51
Abb. 13: Tumorwachstum und Überleben bei einmaligem DC-unterstütztem Transfer polyklonaler Wt und EBAG9 ^{-/-} CTLs.....	52
Abb. 14: Versuchsaufbau des polyklonalen Transfers mit zweimaliger CTL-Gabe	52
Abb. 15: Tumorwachstum und Überleben nach zweimaligem polyklonalen Transfer von Wt und EBAG9 ^{-/-} CTLs mit DC-Unterstützung	53
Abb. 16: Quantifizierung der CD8-Effektorzellpopulation nach einmaligem (A, B, C) und zweimaligem (D, E, F) polyklonalen CD8 ⁺ -T-Zell Transfer mit DC-Vakzinierung	56
Abb. 17: Repräsentative Darstellung für das Screening der OT-I transgenen Mäuse im Blut	57
Abb. 18: Repräsentative Darstellung einer FACS-Analyse für CD8 ⁺ -Zellen nach MACS-Anreicherung von Milzzellen.....	59

Abb. 19: Austestung einer effektiven OT-I EBAG9 ^{-/-} T-Zelldosis für die Kontrolle des Tumorwachstums	61
Abb. 20: Tumorwachstum und Überleben bei Transfer von 1x10 ⁶ OT-I Wt oder OT-I EBAG9 ^{-/-} CTLs.....	63
Abb. 21: Vergleich der Tumorkinetik in 1x10 ⁶ OT-I Wt und EBAG9 ^{-/-} transferierten Tieren.....	64
Abb. 22: Tumorentwicklung und Überleben nach Transfer von 5x10 ⁵ OT-I CTLs Wt und EBAG9 ^{-/-} am Tag 8 und Vergleich von 5x10 ⁵ OT-I EBAG9 ^{-/-} CTLs am Tag 8 mit 5x10 ⁵ OT-I EBAG9 ^{-/-} am Tag 14	66
Abb. 23: Repräsentative Darstellung einer FACS-Kontrolle zum Transfektionserfolg der Plat-E Zellen.....	68
Abb. 24: Durchflusszytometrische Analyse der retroviral transduzierten murinen CD8 ⁺ T-Zellen	69
Abb. 25: Präparative Durchflusszytometrie zur Anreicherung retroviral transduzierter CD8 ⁺ -T-Zellen.....	71
Abb. 26: Westernblotanalyse nach retroviraler Transduktion und Anreicherung von CD8 ⁺ T-Zellen.....	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelltransfer und Gruppeneinteilung für die einmalige polyklonale CTL-Gabe.....	51
Tabelle 2: Zelltransfer und Gruppeneinteilung des zweimaligen polyklonalen Transfers	53
Tabelle 3: Analyse der Effektorzellpopulation nach polyklonalem Transfer von CTLs	55
Tabelle 4: Ergebnis der Auswertung der Transferexperimente mit 1x10 ⁶ OT-I CTLs.....	62
Tabelle 5: Zeitverlauf der Remissionen bei Transferexperimenten mit 1x10 ⁶ OT-I CTLs	63
Tabelle 6: Ergebnis der Auswertung des Transferexperiments mit 5x10 ⁵ OT-I CTLs an Tag 8..	65
Tabelle 7: Vergleich des ATzT mit 5x10 ⁵ EBAG9 ^{-/-} OT-I CTLs am Tag 8 vs Tag 14	66

1. Einleitung

1.1 Maligne Tumore - epidemiologisch relevante Erkrankungen

Während Erkrankungen des Herzkreislaufsystems weiterhin die häufigste Todesursache in unserer modernen Gesellschaft darstellen, spielen maligne Neoplasien zunehmend eine bedeutendere Rolle als zum Tode führende Erkrankungen (1). Alleine in Deutschland ließen sich 2013 25% der Todesfälle auf neoplastisch bedingte Grundleiden zurückführen (s. Abb. 1) (2).

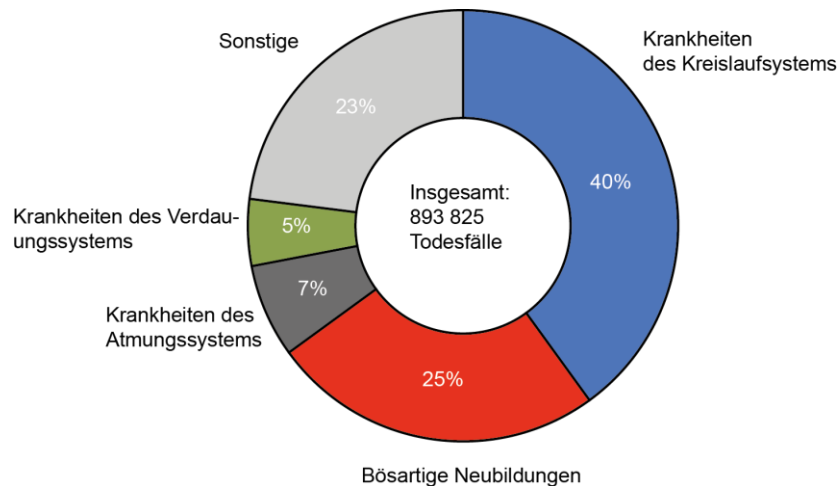


Abb. 1: Todesursachen nach Krankheitsart 2013

Prozentuale Verteilung der häufigsten Todesursachen 2013 in Deutschland. Führend sind dabei Herzkreislauferkrankungen auf Platz 1, gefolgt von malignen Neoplasien auf Platz 2 sowie sonstigen Erkrankungen. Entnommen und modifiziert nach: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>; Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2014.

Damit rangierten Krebs bedingte Sterbefälle auf Platz 2 der Todesursachenstatistik innerhalb Deutschlands, hinter den Herzkreislauferkrankungen. Auch stieg der Anteil an malignombedingten Todesfällen in den letzten Jahren immer weiter an (2).

Durch große Fortschritte auf dem Gebiet der Tumorthherapie in den letzten Jahren sind viele neue Therapieansätze und Medikamente, wie Antikörpertherapie oder zelluläre Therapie, entwickelt worden. Hierdurch konnten die Therapiemöglichkeiten für viele Entitäten der Malignome stark verbessert werden. Dennoch ist die Prognose für einige Tumortypen, wie z.B. Glioblastome oder Lungenkarzinome, weiterhin schlecht (3-5). Auch sind fortgeschrittene oder metastasierte Krankheitsstadien oft nicht kurativ behandelbar und mit einer schlechten Prognose assoziiert (5).

Ein weiteres Problem der modernen Tumortherapien stellen die toxischen Nebenwirkungen der Medikamente dar. Übelkeit, Erbrechen und Appetitlosigkeit führen zu einer starken Minderung der Lebensqualität des Patienten (6, 7). Organotoxische Effekte von Chemotherapeutika wie z.B. Cisplatin können schwere Schäden an verschiedenen Organsystemen verursachen und zu Niereninsuffizienz, Myelosuppression und Ototoxizität führen (8). Das Ausmaß der Nebenwirkungen kann die therapeutischen Optionen stark einschränken und ggf. therapielimitierend wirken (9).

Selbst nach erfolgreicher Therapie belasten Folgeerscheinungen und irreparable Schäden wie Polyneuropathie, Mundtrockenheit, Geschmacksstörung, Infertilität und eine langwierige Tumornachsorge die Betroffenen oft noch Monate oder Jahre (6). Insbesondere eine Therapie im Kindesalter oder bei besonders jungen Patienten birgt ein stark erhöhtes Risiko für Zweitmalignome (6), welche eine erneute Intervention erfordern.

Aufgrund der Nebenwirkungen und oft noch unzureichenden Krankheitskontrolle sollte es ein wichtiges Ziel in der Tumorforschung sein, effektivere und weniger toxische Therapieansätze zu entwickeln. Nur so können das Überleben und die Lebensqualität der Patienten verbessert und Langzeitkomplikationen durch die Therapie vermindert oder gar vermieden werden. Viele Ansätze neuartiger Therapieverfahren zielen darauf ab, die Therapie noch spezifischer werden zu lassen und nur gezielt die Tumorzellen zu schädigen.

Insbesondere Verfahren der Immuntherapie haben in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Hierbei wird versucht, das körpereigene Immunsystem für die Tumorthherapie nutzbar zu machen (10, 11). Ein toxischer Effekt auf gesunde und am Tumorgeschehen nicht beteiligte Körperzellen soll vermieden werden. Dadurch erhofft man sich weniger Toxizität für den Organismus und somit weniger Nebenwirkungen. Ein wesentlicher Forschungsansatz ist der adoptive Transfer von zytotoxischen T-Zellen (ATzT; engl. "adoptive T cell therapy"). Dabei werden *ex vivo* aktivierte, expandierte und modifizierte zytotoxische T-Zellen (CTLs, engl. "cytotoxic T-lymphocytes") in einen tumorerkrankten Empfänger transferiert. Dieser und andere Ansätze der Immuntherapie werden im Rahmen der Einleitung näher erläutert. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die zelluläre Therapie, insbesondere den ATzT, gelegt.

1.2 Immuntherapie von Neoplasien

Immuntherapie von Tumoren beschreibt den Versuch, die Fähigkeiten und Mechanismen des Immunsystems des Patienten zu beeinflussen und sich diesen Einfluss für therapeutische Zwecke zu Nutzen zu machen. Bereits während der Entstehung eines Tumors kommt es zur Interaktion zwischen den neoplastischen Zellen und dem Immunsystem. Es existiert die Vorstellung, dass dies meist auch zur Bildung einer adaptiven Immunreaktion führt (12). Diese kann entweder zur Zerstörung der Tumorzellen führen, oder die resultierende Immunantwort ist nicht ausreichend um das Wachstum der malignen Zellen zu verhindern (12).

Das Immunsystem des Patienten zu unterstützen, seine Funktion wiederherzustellen und eine Elimination der malignen Zellen zu erreichen sind Aufgaben verschiedenster Ansätze in der Immuntherapie. Es werden z.B. monoklonale Antikörper, ATzT, Vakzinierung mit dendritischen Zellen (DCs) und die Verabreichung von Zytokinen angewendet. Ein großer Vorteil der Immuntherapie

ist ihr großes Potential für Tumor-gerichtete Spezifität. Idealerweise werden neoplastische Zellen, welche das Zielantigen exprimieren, abgetötet und normale Zellen, welche das Zielantigen nicht besitzen, verschont (13).

1.2.1 Ansätze in der Immuntherapie maligner Neoplasien

1.2.1.1 Therapie mit monoklonalen Antikörpern

Antikörper finden in der Therapie von Tumoren eine breite Anwendung in den unterschiedlichsten Entitäten. Zum einen können sie direkt therapeutisch eingesetzt werden, um die malignen Zellen zu bekämpfen, wie z.B. Antikörper gegen CD20 bei der Therapie von malignen Lymphomen. Des Weiteren können Antikörper zur Immunmodulation verwendet werden. Die Applikation aktivierender Antikörper gegen kostimulatorische Moleküle bzw. inhibierender Antikörper gegen koinhibitorische Moleküle auf der Oberfläche von T-Zellen verbessert deren Aktivierung und so die Immunantwort (14). Ein Beispiel hierfür sind der Einsatz von "cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4" (engl., CTLA-4) inhibierenden Antikörpern (15) sowie blockierende Antikörper gegen "programmed cell death protein 1" (engl., PD-1) (16). Diese Ansätze bezeichnet man auch als "immune checkpoint" Kontrolle (17).

1.2.1.2 Adoptiver Transfer zytotoxischer T-Zellen

Bei der adoptiven T-Zell Immuntherapie macht man sich die Fähigkeit der Immunzellen zu Nutze, entartete Zellen zielgenau zu erkennen und zu zerstören. Es werden hierbei T-Zellen aus dem Patienten isoliert, *ex vivo* aktiviert, expandiert und anschließend reinfundiert (18) (s. Abb. 2). ATzT ermöglicht die Applikation von großen Mengen spezifischer und aktivierter T-Zellen (19). Die potentesten Effektorzellen sind dabei CTLs (18). Nach ihrer Entnahme können die isolierten CTLs auch weiter modifiziert werden. Eine mögliche Modifikation stellt die retrovirale Transduktion mit einem T-Zell Rezeptor (TZR) der gewünschten Spezifität dar. Anschließend werden die manipulierten Zellen ebenfalls vermehrt und dem Patienten verabreicht (20). Des Weiteren können T-Zellen auch mit chimären Antigenrezeptoren (CARs) ausgestattet werden (21).

Entscheidend für eine erfolgreiche adoptive T-Zell Therapie ist vor allem die Selektion von spezifisch gegen Tumorantigene gerichteten Lymphozyten für den Transfer. Versuche mit Transfers von Antigen-unabhängig, unspezifisch aktivierten Lymphozytenpopulationen (z.B. mittels CD3 Antikörper, Interleukin-2 (IL-2)) hingegen waren wenig erfolgreich (18). Die Generierung von ausreichenden Mengen tumorspezifischer CTLs bildet oft noch eines der Hauptprobleme des ATzT (18). Einerseits stellt es eine große Herausforderung dar, Lymphozyten mit einer ausreichenden Spezifität -v.a. gegen Tumore welche keine viralen Proteine exprimieren- zu induzieren und isolieren. Andererseits bietet auch die *in vitro* Kultivierung und Vermehrung funktionsfähiger

Lymphozyten in ausreichenden Mengen für die klinische Anwendung noch logistische Hindernisse. Diese Probleme müssen gelöst werden, bevor eine breite Anwendung des ATzT für die Therapie solider Neoplasien möglich wird (18).

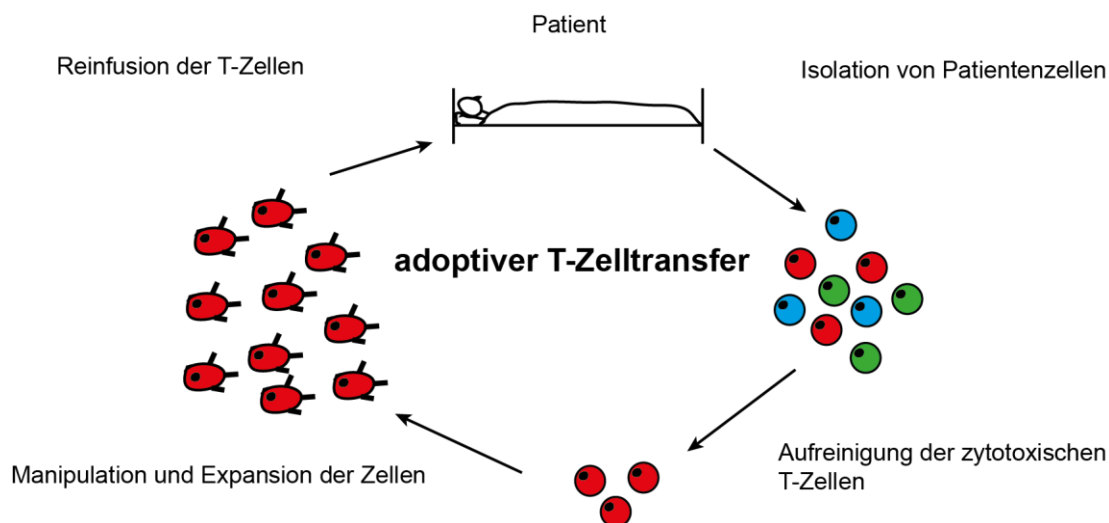


Abb. 2: Prinzip des ATzT

T-Zellen werden aus dem peripheren Blut (engl., "peripheral blood mononuclear cells", PBMC) des Patienten gewonnen. Die so isolierten CTLs werden *in vitro* antigenspezifisch aktiviert oder durch retrovirale bzw. lentivirale Transduktion modifiziert und vermehrt. Anschließend werden die so gewonnenen CTLs aufbereitet und wieder in den Patienten infundiert. Die Modifikation der CTLs mittels Einbringen neuer Rezeptoren stellt aktuell noch eher die Ausnahme dar. Meist wird eine polyklonale antigenspezifische Aktivierung und Expansion durchgeführt. Abb. frei modifiziert nach Turtle, Cameron J. et al., 2012.

Zusätzlich zum ATzT können unterstützende Maßnahmen angewandt werden, welche die Erfolgsrate verbessern. Hierzu zählt z.B. Lymphodepletion vor dem Transfer durch Bestrahlung oder Chemotherapie (22). Eine Lymphodepletion vor dem Transfer der CTLs verstärkt deren homöostatische Proliferation und Persistenz in den Empfängern. Dadurch kann eine bessere Antitumoraktivität erreicht werden (23, 24). Weiterhin wurden supportive Verfahren, z.B. die Gabe von unterstützenden Zytokinen wie IL-2, DC-Vakzinierung oder die Eliminierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) vor Transfer, zur Anwendung gebracht (22).

ATzT eignet sich besonders für die Therapie von Virus-assoziierten Erkrankungen in immunsupprimierten Patienten (25). Ein Beispiel für einen Erfolg des Verfahrens stellt die Behandlung der Epstein-Barr-Virus (EBV)-induzierten Posttransplantations lymphoproliferativen Erkrankung mit EBV-spezifischen Donorlymphozyten dar (18, 26). Auch Cytomegalievirus (CMV)-Infektionen nach Stammzelltransplantation und Immunsuppression können mittels ATzT virusspezifischer CTLs erfolgreich behandelt werden (25, 27).

Ein erfolgreicher Mechanismus für adoptiven T-Zelltransfer bzw. die Knochenmark-Stammzelltransplantation im Rahmen der Tumorthherapie ist der "graft vs leukemia" (engl., GvL) Effekt. ATzT allogener T-Zellen im Rahmen der Leukämietherapie stellt zur Zeit den am besten etablierten, kurativen Ansatz der Immuntherapie bei nicht Virus-assoziierten Tumorerkrankungen dar.

Dieser GvL Effekt entsteht durch eine Immunreaktion der T-Lymphozyten des Spenders gegen die Leukämiezellen des Empfängers (19). Hierbei macht man sich eine Alloerkennung zu Nutze, die meist entweder gegen Haupt-Histokompatibilitätskomplexantigene (engl. "major histocompatibility complex", MHC) oder Minor-Histokompatibilitätsantigene (engl., "minor histocompatibility antigens", mHAg) gerichtet sein kann (28).

Eine wichtige Nebenwirkung der adoptiven T-Zelltherapie bzw. der Knochenmark-Stammzell-Transplantation stellt die graft vs host Erkrankung (engl. "graft versus host disease", GvHD) dar. Diese beruht wie der GvL Effekt auf einer Reaktion der Spenderlymphozyten gegen MHC-Antigene bzw. mHAg des Empfängers. Anders als beim GvL werden bei der GvHD jedoch nicht die Tumorzellen, sondern die gesunden Organe des Empfängers wie etwa Haut, Darm und Leber von den Spenderlymphozyten attackiert (29).

1.2.1.3 Peptid-Vakzinierung

Das Grundprinzip einer Impfung besteht darin, mittels Applikation eines Antigens und ggf. von Adjuvantien eine adaptive Immunantwort gegen dieses Antigen im Wirt zu erzeugen. Bei Vakzinierungen im Rahmen von Tumortherapien wird versucht, eine vor allem T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen Tumorantigene auszulösen (30). Hierzu kommen verschiedenste Strategien zum Einsatz. Es werden inaktivierte Tumorzellen, auf Tumorzellen basierende Impfstoffe oder mit Peptiden aus Tumorantigenen beladene und aktivierte DCs zur Impfung verwendet. Zusätzlich können immunmodulatorische Zytokine, Adjuvantien oder immunmodulatorische Antikörper eingesetzt werden, um die Vakzinierung zu unterstützen (13). Das Ziel besteht dabei darin durch verstärkte Aktivierung sowie Antigenpräsentation über DCs a) eine Rekrutierung von naiven antigenspezifischen CTLs, b) eine Reaktivierung von antigenerfahrenen Gedächtnis-CTLs zu erreichen (31). Bei etablierten soliden Tumoren, wie etwa dem metastasierten Melanom, wird hierdurch oft nur eine vorübergehende Regression der Malignome erreicht (13, 18).

1.2.1.4 Unspezifische Ansätze in der Immuntherapie

Als antigenunspezifische Ansätze der Immuntherapie kommen immunregulatorische Zytokine wie Interleukine und Interferone (IFN) zum Einsatz. Auch immunstimulierende Stoffe wie "Bacillus Calmette-Guérin" (BCG), Lipopolysaccharid (LPS) und "cytosine triphosphate deoxynucleotide phosphodiester guanine triphosphate deoxynucleotide" (CpG Oligonukleotide) (32) werden eingesetzt. Des Weiteren werden immunmodulatorische Antikörper gegen regulatorische Oberflächenmoleküle wie etwa CTLA-4 (15) und PD-1 (16) blockierende Antikörper angewendet. Ziel dabei ist es, die verschiedenen Arme des Immunsystems zu aktivieren und die Immunsuppression durch die Tumorzellen zu durchbrechen. Auch direkte zytotoxische Effekte auf die Tumorzellen

kommen dabei vor (32). Außerdem finden immunmodulatorische Wirkstoffe wie Lenalidomid (33) und antiinflammatorische Substanzen z.B. Cyclooxygenase 2 (COX-2) Inhibitoren, wie etwa Nimesulide, das u.a. Tumorzellen gegenüber Todesrezeptorsignalwegen sensibilisiert (34), oder Aminosalicylsäure (ASS) (35) Anwendung.

1.3 Tumorantigene als Grundlage für die spezifische Immuntherapie

Essenziell für gezielte und spezifische Immuntherapien maligner Tumore ist die Identifikation von geeigneten Antigenen als Ziele für die Therapie. Nur so kann eine möglichst nebenwirkungsarme Elimination der entarteten Zellen erreicht werden. Tumorantigene können über unterschiedlichste Mechanismen entstehen, zum Beispiel durch a) Expression allogener, viraler Proteine bei Infektion mit onkogenen Viren, b) Mutation endogener Gene und somit de-novo Entstehung von antigenen Fusionsproteinen sowie Protein-Punktmutationen, c) qualitativ oder quantitativ verändertes Expressionsmuster normaler, körpereigener Proteine (36).

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Unterscheidung zwischen tumorspezifischen Antigenen (TSA) und tumorassoziierten Antigenen (TAA) (19). Auch mHAg stellen bei der Therapie von malignen Erkrankungen, v.a. Leukämien, Zielstrukturen dar (37).

Tumorantigenspezifische T-Zellen können mittels Peptid-MHC-Tetrameren (38) oder Interferon- γ (IFN- γ) Sekretion identifiziert (39) und durch die Anwendung von Durchflusszytometrie sowie magnetischer Zellsortierung (FACS- und MACS Sorting) *in vitro* analysiert und angereichert werden.

1.3.1 Tumorspezifische Antigene

TSA sind Antigene, welche ausschließlich von den Tumorzellen exprimiert werden. Sie ermöglichen die gerichtete und spezifische Beseitigung der tumorös transformierten Zellen durch verschiedenste Ansätze der Immuntherapie. TSA haben dabei den Vorteil, dass idealerweise keine wesentliche Beteiligung gesunden Gewebes, sogenannte "off-Target Effekte", befürchtet werden muss. Eine große Einschränkung von TSA ist eine oft mangelnde Präsentation über MHC-I Moleküle durch die Tumorzellen, wodurch diese von den CTLs nicht erkannt werden können (19).

1.3.2 Tumorassoziierte Antigene

Als TAA werden normale körpereigene Proteine bezeichnet, welche in Tumorzellen selektiv oder in großer Menge überexprimiert werden, aber auch in anderen gesunden körpereigenen Geweben vorkommen können (40). Das relevante Merkmal besteht in der quantitativen Überexpression des Antigens durch die Tumorzellen verglichen mit anderen Körperzellen. TAAs stellen die häufigste

Form von Tumorantigenen dar (19). Gegen diese Zielstrukturen besteht häufig eine zentrale Toleranz (40). Dies führt dazu, dass CTLs, die gegen TAA, also Selbstantigene gerichtet sind, in der Regel nur eine niedrige Avidität besitzen (41). Je nach Verteilungs- und Expressionsmuster sind TAA oft nur bedingt für eine gerichtete Immuntherapie geeignet, da als Nebeneffekt eine starke Toxizität auf gesundes Körpergewebe auftreten und den Organismus schädigen kann (40). Wichtig ist daher herauszufinden, welche der TAAs als Zielstrukturen für die gezielte Immuntherapie geeignet sind (42).

1.3.3 Minor-Histokompatibilitäts Antigene

mHAg sind per Definition Alloantigene, die im Empfänger eines adoptiven T-Zelltransfers trotz MHC-Übereinstimmung mit dem T-Zell Spender eine allogene T-Zellreaktion auslösen können (43). Es handelt sich dabei um MHC-restringierte Peptide, welche von den Zellen des Empfängers, jedoch nicht von Zellen im Körper eines T-Zell Donors exprimiert werden (44) und gegen die somit keine Toleranz besteht (45). Dies ermöglicht eine antigenspezifische, MHC-abhängige Immunreaktion durch Donorlymphozyten (45).

mHAg entstehen meist aufgrund von Einzelnukleotidmutationen (SNP, engl.: "single nucleotide polymorphism") zwischen zwei Individuen einer Spezies (37). Daraus resultierende minimale Veränderungen in der Proteinsequenz können die proteolytische Entstehung von Polypeptidvarianten mit unterschiedlichem Bindungsverhalten an die MHC-Moleküle und so die Generierung von mHAg fördern (45). Es besteht keine zentrale Toleranz von Donorlymphozyten gegenüber den mHAg des Empfängers durch Negativselektion im Thymus (44).

Die minimalen Unterschiede im Muster der mHAg zwischen zwei Individuen sind auch dafür mitverantwortlich, dass trotz eines komplett MHC identischen Spender-Empfänger Paares im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation eine GvHD auftreten kann. Bei der GvHD attackieren Donorlymphozyten das körpereigene, gesunde Gewebe des Empfängers. Gleichzeitig ermöglichen mHAg den Donorlymphozyten, Leukämie-Zellen zu erkennen und abzutöten. Sie sind also auch für den GvL-Effekt verantwortlich (29). Sowohl GvHD als auch "graft vs tumor" (engl., GvT)-Effekt werden daher von alloreaktiven Donorlymphozyten vermittelt (44). Je nach Gewebeverteilung und Spezifität der mHAg können diese ggf. ein geeignetes Ziel für T-Zell Engineering und ATzT darstellen (29).

1.4 CD8⁺-zytotoxische T-Zellen

1.4.1 Funktion von CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen

CTLs bilden einen wichtigen Teil der zellulären Immunität des adaptiven Immunsystems. Ihre Aufgabe besteht in der Abwehr von intrazellulären Erregern wie Viren und intrazellulär vorkommenden Bakterien sowie in der Eliminierung von tumorös transformierten Zellen (46). CTLs erkennen ihre Zielzellen, welche antigene Peptide über MHC-I exprimieren, mit Hilfe ihres TZR. TZRs von CTLs können ausschließlich über MHC-I dargebotene Peptide erkennen, was auch als MHC-I Restriktion bezeichnet wird (47). Die Vorläuferzellen der CTLs entspringen aus dem Knochenmark, wandern in den Thymus und entwickeln sich über mehrere Differenzierungsschritte zu naiven CD8⁺-T-Zellen. Dabei durchlaufen sie die Prozesse der positiven und negativen Selektion, um ihre Funktionsfähigkeit sicherzustellen und eine autoimmune Reaktionsfähigkeit zu verhindern.

1.4.2 Differenzierung von naiven CD8⁺-T-Zellen zu CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen

Naive CD8⁺-Zellen besitzen noch keine effektive zytotoxische Aktivität. Erst nach Aktivierung und Differenzierung in CTLs erfolgt die Synthese der Effektormoleküle sowie die Befüllung und Reifung der zytolytischen Granula (48). Für die Aktivierung von naiven CTLs zu Effektor-CTLs und Gedächtnis-CTLs sind mindestens zwei Signale nötig: 1) die Präsentation eines antigenen Peptides über MHC-I und dessen Erkennung über den TZR sowie 2) die zusätzliche Stimulation durch weitere kostimulatorische Signale (z.B. CD28-CD80, CD86 Interaktion) (49).

Die Präsentation des Antigens zusammen mit kostimulatorischen Molekülen erfolgt meist durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) wie etwa DCs. MHC-I Moleküle präsentieren 8-9 Aminosäuren lange Peptide aus endogen synthetisierten Proteinen. Alternativ können die APCs auch Peptide aus endozytierten Proteinen über den Mechanismus der Kreuzpräsentation den naiven CD8⁺-Zellen darbieten (47). Meist ist für eine potente Aktivierung von naiven CD8⁺-Zellen und für die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses die Hilfe durch CD4⁺-T-Helfer-Zellen nötig (46).

Die Aktivierung von naiven CD8⁺-T-Zellen nach Antigen-Erkennung erfolgt in den sekundären lymphatischen Organen und benötigt in etwa 6-8 Tage. Dabei kommt es zur Proliferation und Differenzierung der naiven CD8⁺-Zellen zu Effektor- und ggf. Vorläufer-Gedächtnis-CTLs. Des Weiteren erfolgt die Synthese von Effektormolekülen wie Granzym und Perforin und die Reifung der sekretorischen Lysosomen (48). Die so entstandenen CTLs sind nun in der Lage bei Antigenkontakt über MHC-I/TZR-Interaktion ihre zytotoxische Effektorfunktion auszuüben.

1.4.3 Effektormechanismen der CTLs

Aktiviert CTLs verwenden für ihre Effektorfunktion drei grundlegende Mechanismen: a) Sekretion von zytotoxischen Granula, b) Expression von Todesrezeptor-Liganden, c) Sekretion von Zytokinen, v.a. IFN- γ .

a) Sekretion von zytotoxischen Granula

Eines der Hauptmerkmale von CTLs ist das Vorhandensein von sekretorischen Lysosomen, welche die zytotoxischen Effektormoleküle enthalten. Die direktionale Exozytose von zytotoxischen Granula in Richtung der Zielzelle dient der Induktion von Apoptose in der Zielzelle (48).

b) Expression von Todesrezeptor-Liganden auf den CTLs

Die Expression von z.B. Fas Ligand (FasL) ermöglicht es CTLs bestimmte Tumorzellen, welche den Fas Rezeptor (Fas) exprimieren, abzutöten (50). Jedoch können sie selbst als Fas exprimierende Zellen auch von FasL exprimierenden Tumorzellen über das Fas-FasL-System abgetötet werden (50). Die Expression des Todesrezeptor-Liganden FasL dient bei gleichzeitiger Expression des Todesrezeptors Fas auf den CTLs auch der Regulation und Homöostase der Immunantwort (51). Es soll dadurch eine überschießende Proliferation der CTLs bei wiederholter Stimulation verhindert werden (51).

c) Sekretion von Zytokinen, v.a. IFN- γ

Eine weitere Effektorfunktion der CTLs besteht in der konstitutiven Sekretion von IFN- γ nach Aktivierung. Dieser Effekt ist wesentlich an der Antitumorfunktion der CD8⁺-T-Zellen beteiligt. Wichtig ist dabei u.a. die Hemmung der Angiogenese oder die Zerstörung bestehender Gefäße im Tumor durch das sezernierte IFN- γ (52). Neben der Gefäßzerstörung dient die Sekretion von IFN- γ auch der Aktivierung von Makrophagen und DCs (53-55). Des Weiteren ist IFN- γ direkt in der Lage die Virusreplikation in infizierten Zellen zu unterdrücken (56, 57).

1.4.4 Zellbiologie der Effektoraktivität von CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen

CTLs induzieren in ihren Zielzellen Apoptose durch die gerichtete Exozytose von zytotoxischen Granula in Richtung der Zielzelle (48). Nach ihrer Aktivierung und Differenzierung in Effektorzellen zirkulieren CTLs im Körper und wandern an Orte mit immunogenen Stimuli.

Bei der Begegnung zwischen Zielzelle und CTLs kommt es vorerst nur zu einer lockeren, antigenspezifischen Interaktion, welche durch interzelluläre Adhäsionsmoleküle wie "lymphocyte function-associate antigen 1" (engl., LFA-1) und CD2 vermittelt wird (58). Während dieser kurzen Interaktion scannt die T-Zelle mittels ihres TZR für ihren spezifischen Peptid-MHC-I Komplex

(59). Erkennt eine CTL ein passendes Peptid im Kontext von MHC Klasse I Molekülen, so kommt es zur Auslösung der zytolytischen Effektoraktivität.

Die TZR-Stimulierung führt zur Aktivierung einer spezifischen Signaltransduktionskaskade, welche zu einer festeren Adhäsion der CTL an ihre Zielzelle führt. Dabei kommt es zur Ausbildung der immunologischen Synapse (59). Sie besteht aus Adhäsionsmolekülen, Antigen-präsentierenden Molekülen und Antigenrezeptoren (48). Es existiert konzeptionell eine große Ähnlichkeit zwischen der Freisetzung von zytolytischen Granula an der immunologischen Synapse und der Sekretion von Neurotransmittervesikeln an der neurologischen Synapse (48).

Im Zentrum der immunologischen Synapse liegt der "central supramolecular activation cluster" (engl., cSMAC), welcher aus TZR/Peptid-MHC-I Komplexen besteht. Um den cSMAC bildet sich ein Ring aus Adhäsionsmolekülen, mit deren Hilfe die CTL an der Zielzelle anhaftet, auch genannt "peripheral supramolecular activation cluster" (engl., pSMAC) (59). Der zentrale Abschnitt der immunologischen Synapse beinhaltet des Weiteren eine sekretorische Domäne, welche dem Spalt zwischen cSMAC und pSMAC gegenüberliegt und vom cSMAC abgegrenzt werden kann. An der sekretorischen Domäne erfolgt die Exozytose der zytolytischen Granula in den Spalt zwischen cSMAC und pSMAC (60). Der pSMAC selbst dient nicht nur der festeren Adhäsion der CTL an der Zielzelle, sondern ermöglicht auch die Konzentrierung der zytotoxischen Effektormoleküle lokal an der immunologischen Synapse. Es werden so Kollateralschäden auf benachbarte Zellen reduziert sowie das Töten durch die CTLs verbessert (59).

Während die immunologische Synapse gebildet wird, kommt es innerhalb der T-Zelle zu Umbauten am Zytoskelett. Das "microtubule-organizing center" (engl., MTOC) wird hin zur Synapse verlagert (48). Die zytotoxischen Granula werden entlang der Mikrotubuli zu ihrer Freisetzungsstelle, der sekretorischen Domäne in der Nähe des cSMAC, transportiert und vorbereitet (engl., primed). Insgesamt kommt es zu einer Polarisation der CTL in Richtung der Zielzelle (48). Anschließend erfolgt die Freisetzung der zytolytischen Effektormoleküle Granzym und des porenformenden Moleküls Perforins in den "synaptischen Spalt" zwischen cSMAC und pSMAC (48). Dieser schrittweise Ablauf der CTL-Effektorfunktion ist stark vereinfacht in Abb. 3 dargestellt.

Es wird immer nur ein Teil der zytotoxischen Granula freigesetzt, sodass eine CTL rasch mehrere Zellen eliminieren kann (48). Der Inhalt der sekretorischen Lysosomen wird durch Neusynthese infolge TZR-Aktivierung ersetzt (61). Erkennung einer Zielzelle sowie Ausbildung der immunologischen Synapse und Induktion der Apoptose geschehen in einem Zeitraum von etwa 20-30 Minuten im Gewebe (48).

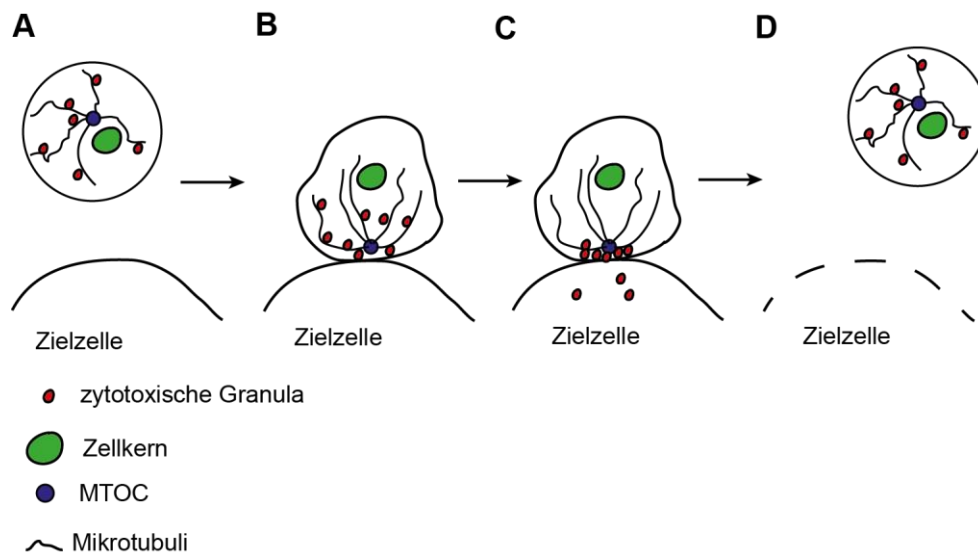


Abb. 3: Aktivierung einer CD8⁺-zytotoxischen T-Effektorzelle

A) Unpolarisierte T-Effektorzelle vor Kontakt mit der Zielzelle. Vor Antigenkontakt ist das MTOC perinukleär lokalisiert. Die Mikrotubuli gehen radiär vom MTOC in die Zelle aus und die sekretorischen Granula liegen entlang der Mikrotubuli im Zytoplasma verteilt. **B)** Bildung der immunologischen Synapse und Polarisation der T-Effektorzelle in Richtung der Zielzelle bei Antigenkontakt. Das MTOC wandert zur Kontaktzone an der immunologischen Synapse und die sekretorischen Granula werden ebenfalls zur Kontaktzone transportiert. **C)** Abgeschlossene Polarisation der T-Effektorzelle in Richtung der Zielzelle und Exozytose der zytolytischen Effektormoleküle an der Kontaktzone. **D)** Lösen der T-Zelle von der apoptotischen Zielzelle. Abb. frei modifiziert nach De Saint Basil, Geneviève et al. Nat. Rev. Immun. 2010.

1.4.5 Sekretorische Lysosomen und zytotoxische Granula

Die sekretorischen Lysosomen bilden einen essenziellen Bestandteil der CTLs und verleihen diesen die charakteristische zytolytische Aktivität (62). Sekretorische Lysosomen beinhalten Anteile von späten Endosomen und Lysosomen. Sie gehören zu den sogenannten "lysosome-related organelles" (engl., LRO) und erfüllen eine Doppelrolle innerhalb der Zellen (61). Einerseits erfüllen sie eine degradierende Funktion ähnlich der von Lysosomen, andererseits kann ihr Inhalt bei entsprechendem Stimulus sezerniert werden (61, 63). Die sekretorischen Lysosomen der CTLs können in einen elektronenmikroskopischen dichten Kern- (dense core) Abschnitt, indem sich die zytolytischen Enzyme, wie Granzyme und Perforin, befinden, und in Abschnitte mit "multi-vesicular bodies" (engl., MVB) gegliedert werden (64-66).

Granzyme gehören zu der Familie der Serin-Proteasen. Zwei wichtige Vertreter der Granzymproteine sind Granzym A und Granzym B (48). Granzym A induziert Caspase-unabhängig Apoptose in Zielzellen (67). Granzym B induziert Caspase-abhängig Apoptosewege in Zielzellen (68). Ein weiteres bekanntes Effektormolekül für die Funktion von CTLs ist Perforin. In den sekretorischen Lysosomen liegt es aufgrund des niedrigen pH-Werts inaktiviert vor. Nach seiner Sekretion dient Perforin dem Einschleusen von Granzymen in das Zytoplasma der Zielzelle (48).

Die Proteine Granzym A und Granzym B werden am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert, zum Golgi-Apparat transportiert und dort weiter modifiziert (69). Im Golgi-Apparat

binden viele für die Lysosomen bestimmte zytolytische Enzyme über ein zuvor angebrachtes Erkennungssignal - einen Mannose-6-Phosphat-Rest - an sogenannte Sortingproteine, die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (M6PR). Der Komplex aus M6PR und gebundenem Protein wird nun mithilfe von Adapterproteinen (APs) weiter zu den Lysosomen transportiert (70). Für den Transport von Effektorproteinen zu den sekretorischen Lysosomen der CTLs spielt z.B. AP-1 eine wichtige Rolle. Unter Mitwirkung weiterer, mit dem intrazellulären Transport assoziierter Proteine führt AP-1 zur Bildung von sogenannten Clathrin-coated vesicles, welche u.a. die M6PR gebundenen Proteine zu den sekretorischen Lysosomen transportieren (71).

Der Sortingprozess für Perforin ist noch nicht genau geklärt (48). Weitere Proteine und Protein-Komplexe, welche in CTLs bei der Bildung der sekretorischen Lysosome mitwirken, sind Proteine der "lysosomal-associated membrane protein" (engl., LAMP) Familie, der "biogenesis of lysosome-related organelles komplex-1" (engl., BLOC-1-Proteinkomplex), der "endosomal sorting complex required for transport" (engl., ESCRT-Proteinkomplex) sowie "estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9" (engl., EBAG9) (61). Siehe Abb. 4 für eine vereinfachte Darstellung.

1.5 T-Zell Engineering

Die Modifikation von T-Zellen mittels Retroviren, RNA-Transfektion (z.B. Elektroporation) oder des Transposon-Systems ermöglicht es, Gene spezifisch für TZR, CARs, kostimulatorische Moleküle oder Zytokine in diese einzuschleusen. Dadurch können die gezielte Erkennung von malignen Zellen gefördert sowie die Aktivierung der T-Zellen verbessert werden (20, 72, 73).

1.5.1 Eradikation von Tumorzellen mittels modifizierter TZR und CARs

Durch das Einbringen von spezifischen TZR oder CARs in T-Zellen ist es möglich, gezielt tumorreaktive CTLs zu generieren (20). TZR/CARs werden häufig mittels retroviraler oder lentiviraler Transduktion in T-Lymphozyten eingebracht (72-74). Als Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz solcher transduzierten T-Zellen müssen die TZR aufgrund der MHC-Polymorphismen entsprechend an den MHC-Haplotypen des Patienten angepasst werden (19). Eine weitere Herausforderung für die Generierung von therapeutischen TZR ist die Identifikation von hoch aviden TZR, welche Peptid-MHC-I Komplexe erkennen, die a) häufig bei Tumoren in der Bevölkerung vorkommen, b) eine spezifische Zytotoxizität gegen die Tumorzellen erlauben (19).

1.5.2 Aktivierung oder Inhibition von zytotoxischen T-Zellen

Eine weitere Möglichkeit, den Antitumoreffekt von T-Zellen durch Gentransfer zu verbessern, besteht darin, Überleben und Proliferation der CTLs zu steigern sowie ihre Empfänglichkeit gegenüber immunsuppressiver Mechanismen durch die Tumorzellen zu reduzieren. Zu diesem

Zweck können T-Zellen mit Genen modifiziert werden, welche die Resistenz gegenüber Apoptose (z.B. B-cell lymphoma 2 (engl., Bcl-2) Überexpression) erhöhen, eine verstärkte autokrine Stimulation, Aktivierung sowie Proliferation bewirken (z.B. Zytokinüberexpression wie z.B. IL-2) oder eine Resistenz gegen immunsuppressive Faktoren (z.B. Tregs, TGF- β) vermitteln (25).

"Tumor growth factor β " (engl., TGF- β) ist ein Zytokin, welches viele verschiedene Funktionen besitzt. Je nach Zielgewebe und Expression von Rezeptoren kann es Zellproliferation, Wachstumsstop, Differenzierung oder Apoptose auslösen. In vielen Tumoren besitzt TGF- β eine immunsuppressive Funktion. Es verhindert die Elimination der entarteten Zellen durch antigenspezifische T-Zellen, z.B. durch die Differenzierung von immunsuppressiven FoxP3⁺/CD25⁺ Tregs (25). Weiterhin hemmt TGF- β die Synthese von Granzymen und Perforin in CTLs (75).

1.5.3 Verstärkung der Effektorfunktionen von zytotoxischen T-Zellen

Mittels T-Zell Engineering kann auch direkt die Effektorfunktion der CTLs manipuliert werden. Ein Beispiel hierfür ist das "Casitas B lymphoma-b" Protein (Cbl-b), welches als E3 Ubiquitinligase (76) und als AP verschiedene intrazelluläre Signalwege wie die TZR-Signalkaskade beeinflusst (77). Cbl-b ist ein wichtiger Negativregulator der peripheren Aktivierung von T-Lymphozyten (76), indem es die Aktivierungsschwelle von CTLs nach TZR-Ligation moduliert (78). Im Falle einer TZR-Bindung ohne simultane Kostimulation über CD28 inhibiert Cbl-b die Aktivierung der T-Zelle (77). Es kommt zur Induktion von Anergie und zur peripheren Entstehung von Toleranz gegenüber dem Antigen (77, 78).

Die Deletion von Cbl-b führt zu einer verbesserten Aktivierung mit erhöhter IFN- γ und IL-2 Produktion (79) und Proliferation von CTLs (77), da diese keine kostimulatorischen Signale wie CD28 mehr benötigen (77, 80). Des Weiteren führt der Verlust von Cbl-b zu einer verminderten immunsuppressiven Wirkung von TGF- β (81) und Tregs auf die CTLs (76). Durch die so verstärkte Aktivität und Funktion der Cbl-b-defizienten Zellen kann sowohl in spontanen Abstößungsversuchen als auch in ATzT-Versuchen eine verbesserte Elimination von transplantierbaren Tumoren, z.B. der EL-4 und E.G-7 Zelllinien, gegenüber Wt CTLs erreicht werden (79).

Ein Nachteil des Fehlens von Cbl-b besteht in einer gestörten Induktion von Anergie *in vivo* und in einer T-Zell Hyperaktivierung (82). Als Konsequenz sind die Tiere anfälliger für spontane sowie antigeninduzierte Autoimmunität (76).

1.5.4 Hindernisse und Risiken des adoptiven T-Zell Transfers

Die Induktion von hoch-aviden tumorspezifischen T-Zellen alleine reicht für eine erfolgreiche T-Zelltherapie oft nicht aus. Die Zellen müssen auch in die Lage versetzt werden, im tumorösen Gewebe ihre Effektorfunktion ausüben zu können (25). Ein Problem ist die kurze Persistenz und

auf Dauer meist schlecht erhaltene Effektorantwort der transferierten CTLs (83). Einen wichtigen Faktor hierfür stellt die Qualität der verwendeten Zellen dar. Hierbei scheint eine kurze Stimulation *in vitro* für 2-3 Tage mit zügigem Transfer einer ausgedehnten *in vitro* Kultivierung und Expansion überlegen (83). Antigen-spezifische T-Zellen stellen keine homogene Gruppe dar. Es werden verschiedenen Subtypen unterschieden wie a) naive CD8⁺-T-Zellen, b) Effektor-CD8⁺-T-Zellen (CTLs), c) CD8⁺-T-Effektor-Memory-Zellen, d) zentrale CD8⁺-T-Memory-Zellen. Diese unterscheiden sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktion, zytotoxischen Kapazität und ihrer unterschiedlichen Expression von Homingrezeptoren sowie kostimulatorischer Moleküle (84). Die Zusammenhänge und Verknüpfungen der einzelnen Typen untereinander in der ATzT sind noch nicht hinreichend untersucht (85). Weniger stark differenzierte und *ex vivo* kultivierte Zellen scheinen besser für ATzT geeignet zu sein. Auch sind zentrale T-Memory-Zellen möglicherweise geeigneter für die Etablierung einer erfolgreichen Effektorantwort gegen Tumore als CD8⁺-T-Effektor-Memory-Zellen (86). Vor allem T-Memory-Zellen mit Stammzelleigenschaften scheinen nach ATzT zu persistieren (22). Es ist noch nicht hinlänglich geklärt, welche T-Zelllinie sich am besten für genetische Manipulation und anschließenden erfolgreichen adoptiven Transfer eignet (22).

Weitere Mechanismen, welche Persistenz und Effektorfunktion der Immunantwort bei ATzT beeinflussen, sind verminderte Expression von MHC Molekülen, die Expression von "programmed cell death protein 1 ligand" (PD-L1) auf Tumorzellen, die Rekrutierung von Tregs durch die Tumorzellen und die Expression von PD-1 auf den tumorinfiltrierenden CTLs (87).

Wichtig für eine erfolgreiche ATzT bezüglich des therapeutischen Effekts und der Zellpersistenz ist nicht nur die Art der transferierten T-Zellen, sondern auch in welche Umgebung die Zellen transferiert werden. So kann z.B. der kombinierte Transfer mit CD4⁺-T-Helfer Zellen, die unterstützende Gabe von Zytokinen wie IL-2 und IL-7, welche Proliferation und Überleben der transferierten Zellen erhöhen, sowie eine vorherige Lymphodepletion des Empfängers das Ergebnis verbessern (36). Es scheint klar zu sein, dass ein guter Zeitpunkt für adoptiven T-Zelltransfer nach maximaler Reduktion der Tumormasse besteht, da sich so ein besseres Verhältnis von CTLs zu Tumorzellen ergibt und das immunsuppressive Milieu des Tumors stark reduziert wurde (44).

1.6 Estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9 (EBAG9)

1.6.1 Das Protein EBAG9

"Estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9" (engl., EBAG9), auch genannt "receptor binding cancer antigen in SiSO cells" (engl., RCAS1) liegt beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 8: 8q23 (88). Das Protein EBAG9 hat ein Molekulargewicht von 32 kDa. Seine Expression kann durch Östrogen induziert werden (89). Als wichtiges Strukturmerkmal besitzt

EBAG9 eine N-Terminal gelegene Transmembrandomäne und eine C-Terminal gelegene Coiled-Coiled Domäne. Es ist ein Typ II Membranprotein (90).

EBAG9 wird annähernd ubiquitär in vielen verschiedenen Organen exprimiert (89). Im Immunsystem ist EBAG9 ein Inhibitor der zytotoxischen Effektoraktivität von CD8⁺-T-Zellen, indem es den Transport von zytolytischen Proteinen zu den sekretorischen Lysosomen hemmt und so deren Freisetzung vermindert (91). Umgekehrt führt die Deletion von EBAG9 zur erhöhten Freisetzung von zytotoxischen Effektormolekülen und zu einer besseren zytolytischen Aktivität der CTLs (91). EBAG9 kommt nicht nur im Menschen vor, sondern besitzt auch ein Ortholog in der Maus. Die Aminosäuresequenzen des humanen und murinen EBAG9 sind stark konserviert, sie gleichen einander zu 98%. Das Maus EBAG9 Gen besteht aus ca. 30 kb mit 7 Exons (90). EBAG9 defiziente Mäuse zeigen keinerlei Anzeichen von Fehlbildungen und sind in ihrer Reproduktion nicht eingeschränkt. Es konnte keine gesteigerte Neigung zu Autoimmunreaktionen bzw. Autoimmunerkrankungen beobachtet werden. Auch die normale Entwicklung von Lymphozyten scheint in EBAG9^{-/-} Mäusen nicht gestört zu sein (91).

1.6.2 Die Funktion von EBAG9 in CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen

Einige physiologische Funktionen von EBAG9 in zytotoxischen T-Zellen wurden von Rüder et al., (2009) mit Hilfe eines EBAG9^{-/-} Mausmodells aufgedeckt. In ruhenden T-Zellen ist EBAG9 v.a. um den Golgi-Apparat lokalisiert. Nach Aktivierung wird ein Teil an die Plasmamembran verlagert (91). Der Verlust von EBAG9 in CTLs führt zu einer Verbesserung der zytolytischen Aktivität. Dies konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden (91). Während die Proliferation der T-Zellen selbst nicht beeinflusst wird, kommt es durch die Deletion zu einer erhöhten Freisetzung von zytotoxischen Effektormolekülen wie Granzym A (91).

Dabei führt der Mangel an EBAG9 nicht zu einer vermehrten Fusion der sekretorischen Lysosomen mit der Plasmamembran, sondern beeinflusst den Transport von Effektorproteinen vom trans Golgi-Komplex zu den zytotoxischen Granula (91). Während EBAG9 selbst inhibitorisch auf den Transport der zytotoxischen Effektormolekülen wirkt, führt umgekehrt das Fehlen von EBAG9 zu einem gesteigerten Transport von Molekülen zu den sekretorischen Lysosomen. So wird z.B. in EBAG9^{-/-} CTLs Granzym B vermehrt in die sekretorischen Lysosomen transportiert (91). Ein einzelnes sekretorisches Lysosom enthält mehr Effektormoleküle (91). Die Funktion von EBAG9 und dessen Einfluss auf den intrazellulären Transportweg der für die Sekretion bestimmten zytotoxischen Enzyme ist in Abb. 4 schematisch abgebildet.

Als mögliche Interaktionspartner von EBAG9 im Rahmen des intrazellulären Proteintransports scheinen γ 2-Adaptin und BLOC-1 zu dienen (91). γ 2-Adaptin und BLOC-1 sind in den Transport

Es wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Zeigt sich der Vorteil der erhöhten zytolytischen Aktivität von EBAG9^{-/-} CTLs gegenüber EBAG9^{+/+} CTLs auch in einem HY⁺ mHAg Mismatch System *in vivo*?
2. Bestehen bereits Unterschiede im spontanen Krankheitsverlauf zwischen naiven EBAG9^{+/+} und naiven EBAG9^{-/-} Mäusen nach s.c. Inokulation von E.G-7 Tumorzellen?
3. Sind vakzinierte EBAG9^{-/-} Mäuse vergleichbar oder sogar besser in der Lage, s.c. inokulierte Tumorzellen abzustößen als vakzinierte EBAG9^{+/+} Mäuse?
4. Besteht in einem polyklonalen ATzT-Ansatz oder einem Transfer mit tumorspezifischen monoklonalen CTLs im Rahmen des syngeneten E.G-7 Tumormodells ein Vorteil von EBAG9^{-/-} CTLs gegenüber EBAG9^{+/+} CTLs?
5. Wie effizient ist die Herunterregulation von EBAG9 auf Proteinebene in primären Maus-T-Lymphozyten durch "small hairpin ribonucleic acid" Moleküle (engl., shRNA)?

2. Materialien

2.1 Mäuse

C57BL/6 Mäuse aus der eigenen Zucht am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) und gekauft von Charles River

C57BL/6 EBAG9^{-/-} Mäuse aus der eigenen Zucht am MDC

C57BL/6 OT-I Mäuse aus der eigenen Zucht am MDC

C57BL/6 EBAG9^{-/-} OT-I transgene Mäuse aus der eigenen Zucht am MDC

Zur Generierung von OT-I/EBAG9^{-/-} Mäusen wurde der EBAG9^{-/-} Stamm mit dem OT-I Stamm gekreuzt. Dies fand am MDC in der Gruppe von Armin Rehm statt.

Die Mäuse wurden im Alter von 6-8 Wochen für die Experimente verwendet. Die fachgerechte Auswahl, Verwaltung und Betreuung der Mäuse, die Einhaltung der Tierversuchsrichtlinien, sowie die Beantragung der Tierversuchsverordnungsanträge wurde von Dr. med. Armin Rehm am MDC betreut und kontrolliert. Intravenöse (i.v.) Injektionen wurden von Dr. rer. nat. Uta Höpken durchgeführt. Die Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin genehmigt: G 0331/05, Bescheid vom 14.02.2006 und G0089/10, Bescheid vom 12.08.2010.

2.2 Zelllinien

2.2.1 E.G-7

E.G-7 ist die Zelllinie eines murinen T-Zelllymphoms der C57BL/6 Maus (ATCC-Nummer: CRL-2113). Sie entstand durch die stabile Expression von Ovalbumin (OVA) in der EL-4 Thymomzelllinie. Die E.G-7 Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche über MHC-I Moleküle (H2-K^b Kontext) das antigene Peptid des Ovalbumin: OVA₂₅₇₋₂₆₄, SIINFEKL (93). Somit können die E.G-7 OVA Zellen von OT-I TZR exprimierenden CTLs erkannt und eine spezifische Immunantwort eingeleitet werden. Die Zelllinie kann im Brutschrank in Kultur gehalten werden. Des Weiteren wurde gleichzeitig mit der Expression von OVA eine Resistenz gegen Geneticin 418 (G418) eingefügt. Diese Resistenz ist an die Expression von OVA gekoppelt und kann in Zellkulturen dazu verwendet werden, auf OVA⁺/G418 resistente Zellen zu selektionieren. So kann die Expansion von Zellklonen, welche OVA verloren haben, verhindert werden.

2.2.2 Plat-E

Plat-E ist eine stabil mit den retroviralen Proteinen Env, Gag und Pol transduzierte Zelllinie auf Basis einer HEK293 Zelllinie. Sie können zur Verpackung und Produktion von ecotropen Retroviren verwendet werden, die in der Lage sind, murine Lymphozyten zu infizieren.

2.3 Verwendete Mikroorganismen

XL-1 Blue kompetente Escherichia coli Zellen zur Produktion von Plasmiden.

Genotyp: "recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1 lac[F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]". Die aufgelisteten Gene zeigen mutierte Gene an. Die Gene des F'-Episoms sind Wt Gene, außer explizit anders angegeben (94).

2.4 Antikörper

2.4.1 Primäre Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Firma
CD3ε	Allophycocyanin (APC)	armenischer Hamster IgG1	145-2C11	BD Pharmingen
CD4	Alexa Fluor 488 (AF 488)	Ratte (Rat) IgG2a	RM4-5	Biolegend
CD4	R-phycoerythrin (PE)	RatIgG2b	GK1.5	Biolegend
CD4	Pacific Blue (PB)	RatIgG2a	RM4-5	Biolegend
CD4	APC	RatIgG2b	GK.15	Biolegend
CD4	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	RatIgG2a	RM4-5	Biolegend
CD8a	PE	RatIgG2a	53-6.7	Biolegend
CD8a	APC	RatIgG2a	53-6.7	Biolegend
CD8a	Alexa Fluor 700 (AF 700)	RatIgG2a	53-6.7	Biolegend
CD8a	PB	RatIgG2a	53-6.7	BD Bioscience
CD8a	FITC	RatIgG2a	53-6.7	Biolegend
CD8a	Alexa Fluor 647 (AF 647)	RatIgG2a	53-6.7	Biolegend
B220	PB	RatIgG2a	RA3-6B2	Biolegend
B220	APC	RatIgG2a	RA3-6B2	Biolegend
B220	HorizonV450 (HV450)	RatIgG2a	RA3-6B2	BD Bioscience
B220	PE	RatIgG2	RA3-6B2	Biolegend
B220	FITC	RatIgG2a	RA3-6B2	BD Bioscience
CD16/32	unkonjugiert	RatIgG2a	93	Biolegend
CD44	HV450	RatIgG2b	IM7	BD Bioscience
TZRV _{α2}	FITC	RatIgG2	B20.1	BD Bioscience
TZRV _{β5.1}	PE	Maus (Ms) IgG1	MR9-4	Biolegend

IFN- γ	APC	RatIgG1	XMG1.2	BD Pharmingen
---------------	-----	---------	--------	---------------

2.4.2: Primäre Antikörper für Westernblot

Antigen	Konjugat	Herkunft	Antikörpertyp	Firma
Calnexin	Kaninchen	Kaninchen-anti-Maus	polyklonaler Antikörper	Enzo life science
EBAG9	Kaninchen	Kaninchen-anti-Maus	polyklonaler Antikörper	AG Rehm (MDC)

2.4.3: Sekundärer Antikörper für Westernblot

Antigen	Konjugat	Herkunft	Art des Antikörpers	Firma
Kaninchen	Meerrettich-peroxidase	Ziege-anti-Kaninchen	polyklonaler Antikörper	Southern Biotech

2.4.5: Antikörper zum Beschichten von Platten und Stimulieren von Splenozyten/T-Zellen

Antigen	Konjugat	Herkunft	Klon	Firma	Anmerkung
Purified CD3	ohne	Ratte	17A2	Biolegend	LEAF, low endotoxin, no azide
Purified CD28	ohne	Hamster	37.51	Biolegend	LEAF, low endotoxin, no azide

2.5 Zellkultur Medien

2.5.1 Rezepte für die Zellkulturmedien

Maus-Medium: 500 ml RPMI1640, 50 ml fetales Rinderserum (=FRS), 5 ml (=MM) Penicillin/Streptomycin 100x, 5 ml Glutamin 200 mM, 5 ml Natrium-Pyruvat 100 mM, 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren 100x, 500 μ l β -Mercaptoethanol 20 mM.

E.G-7 Medium: 500 ml RPMI1640, 50 ml FRS, 5 ml Penicillin/Streptomycin 100x, 5 ml Glutamin 200 mM, 5 ml Natrium-Pyruvat 100 mM, 5 ml HEPES 1 M, 500 μ l β -Mercaptoethanol 20 mM.

Zur E.G-7 Kultur wurde zu Selektionszwecken mit frischem Medium jeweils extra 0,5 mg/ml G418 in die Zellkulturflaschen zugegeben.

Plat-E Medium: 500 ml high glucose DMEM, 50 ml FRS, 5 ml Penicillin/Streptomycin 100x, 5 ml Glutamin 200 mM, 5 ml Natrium-Pyruvat 100 mM.

Einfriermedium: 90% FRS (v/v), 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO).

2.5.2 Einzelkomponenten der Zellkulturmedien:

β -Mercaptoethanol 20 mM (Gibco), FRS (PAA), Glutamin 200 mM (PAA), G418 (PAA), HEPES 1 M (PAA), high glucose DMEM (PAA), Natrium-Pyruvat 100 mM (PAA), nicht essentielle Aminosäuren 100x (PAA), Penicillin/Streptomycin 100x (PAA), RPMI1640 (PAA/GE Healthcare).

2.6 Medien und Einzelkomponenten für Transformation und Plasmidproduktion mittels kompetenter Zellen

LB-Medium: in 1 l destilliertem oder deionisiertem Wasser lösen: 10 g BACTO-Tryptone, 5 g Yeast-Extract, 10 g NaCl, 100 μ g/ml Ampicillin Endkonzentration.

LB-Agar: zu 1 l LB-Medium: 15 g BACTO-Agar zugeben, 100 μ g/ml Ampicillin Endkonzentration.

SOB-Medium: 2 g Tryptone, 0,5 g Yeast-Extract, 0,2 ml 5 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, in 90 ml deionisiertem Wasser lösen, pH=7,0 einstellen und mit deionisiertem Wasser auf 100 ml auffüllen, autoklavieren, 1 ml steriles 1 M $MgCl_2$ und 1 ml steriles 1 M $MgSO_4$ zugeben.

SOC-Medium: 100 ml steriles SOB-Medium, 2 ml sterile 1 M Glukose zugeben, aliquotieren und bei -20°C lagern.

BACTO-Tryptone (BD), Yeast-Extract (BD), BACTO-Agar (BD), Ampicillin (Roth).

2.7 Verwendete Puffer und Stocklösungen

PBS-Stock: (10x) auf 1 l: 2.10 g KH_2PO_4 , 90.00 g NaCl, 8.50 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, mit deionisiertem Wasser auf einen Liter auffüllen. Auf pH=7,3 mit HCl oder NaOH einstellen.

PBS: (1x) auf 1 l: 0.21 g KH_2PO_4 , 9.00 g NaCl, 0.85 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, mit deionisiertem Wasser auf einen Liter auffüllen. Auf pH=7,3 mit HCl oder NaOH einstellen. (Alternativ 10x PBS 1:10 verdünnen, anschließend pH-Wert kontrollieren und ggf. auf 7,3 anpassen).

FACS-Puffer: auf 1 l: 0.05% (v/v) NaN_3 , 0,5% (w/v) Rinderalbumin Fraktion V (BSA), mit PBS auf einen Liter auffüllen. Auf pH=7.3 mit HCl oder NaOH einstellen.

MACS-Puffer: für 1 l: 0,5% (w/v) BSA, 2 mM EDTA, mit PBS auf einen Liter auffüllen. Auf pH=7.3 mit HCl oder NaOH einstellen, steril filtrieren und entgasen.

Erythrozyten-Lyse-Puffer: 10x auf 1 l: 1.67 M (89.9 g) NH_4Cl , 100 mM (10.0 g) KH_2PO_4 , 1.26 mM (370 mg) EDTA, mit deionisiertem Wasser auf einen Liter auffüllen. pH=7.3 (mit KOH einstellen), autoklavieren und vor Gebrauch 1:10 mit sterilem deionisiertem Wasser verdünnen.

Präzipitations-Puffer (=2xHEBS): Doppeltkonzentriert für Calcium-Phosphat-Transfektion 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4 , in deionisiertem Wasser ansetzen. pH=7,05+/-0,05; aliquotieren und bei -20°C einfrieren.

Fixations-Puffer (Biolegend)

Permeabilisations-Waschpuffer 10x (Biolegend)

Western-Blot Transfer-Puffer: 1 l: 3 g Tris, 14,4 g Glycin, 0.2 l Methanol, 0.8 l doppelt-destilliertes (dd) Wasser

Upper-Tris: (4x) 1 l: 1.5 M (181.71 g) Tris, 0.4% (4 g) Natriumdodecylsulfat (SDS), mit deionisiertem Wasser auf einen Liter auffüllen. pH=8.8.

Lower-Tris: (4x) 1 l: 1.5 M (181.71 g) Tris, 0.4% (4 g) SDS, mit deionisiertem Wasser auf einen Liter auffüllen. pH=6.8.

Laemmli-Puffer: (10x) 2 l: 0.5 M (60.57 g) Tris, 3.8 M (285.27 g) Glycin, 1% (20 g) SDS mit deionisiertem Wasser auffüllen.

SDS-Probenpuffer: (2x) 125 mM Tris-Cl; 20% (v/v) Glycerol; 8% (w/v) SDS; 10% (v/v) β -Mercaptoethanol; pH=6,8.

HEPES (PAA)

RIPA-Lysepuffer: 1 l: 50 mM Tris-Cl, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% (v/v) NP-40, 0.25% (w/v) Natriumdesoxycholat, mit deionisiertem Wasser auf einen Liter auffüllen. pH=7.5 mit HCl einstellen, jeweils frisch vor Anwendung in Verbrauchsaliquot zusetzen: 5 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) .

Chloroquin: 25 mM in PBS (0,645 g auf 50 ml PBS), in deionisiertem Wasser ansetzen aliquotieren und bei -20°C lagern.

CaCl_2 : 2,5 M (7,4 g) in deionisiertem Wasser ansetzen, auf 20 ml aliquotieren und bei -20°C lagern.

2.8 Gele für Protein-Gelelektrophorese

Sammelgel: 1.9 ml Acrylamid, 3.1 ml Upper-Tris (s. Puffer), 7.5 ml Wasser, (18 cm x 3 cm) 90 μl Ammoniumperoxodisulfat (APS), 8 μl Temed

Trenngel (12.5%): 20.75 ml Acrylamid, 12.5 ml Lower-Tris (s. Puffer), 16.75 ml Wasser,
(18 cm x14 cm) 250 µl APS, 25 µl Temed

2.9 Chemikalien

- Roth: Albumin Fraktion V, Ammoniumchlorid, EDTA, Ethanol, Glycin, Isopropanol, Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natriumhydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat, Milchpulver, Roti-Histofix 4%, Rotiphorese-Gel 30 (Acrylamid), SDS ultra pure, Temed, Tris, Tween, Xylol, APS
- Sigma: Calciumchlorid-dihydrat, Brefeldin A (BFA), Ionomycin, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
- Biozym: BiozymLE Agarose
- PAA: G418-Sulfat, Trypsin-EDTA 10x
- Becton Dickinson: 7-AAD

2.10 Verwendete Zytokine

Peprotech: rekombinantes, murines IL-2, IL-7, IL-15, IFN- γ

2.11 Verwendete Kits

EndoFree Plasmid Maxi-Kit, Quiagen

CD8⁺ negative-selection-Kit, Miltenyi Biotec

T-Cell Activation/Expansion Kit mouse, Miltenyi Biotec

2.12 Laborgeräte & Verbrauchsmaterialien

- CO₂ Brutschrank Binder, Serie CB210
- Cell-Strainer 40 µm, steril, BD Falcon
- Eppendorf-Gefäß 1.5 ml, Rotilabo-Reaktionsgefäß, Roth
- Eppendorfgefäß 0.5/0.65 ml Multi-SafeSeal tubes, Roth
- FACS-Platte 96-Well, Techno Plastic Products Ag
- Falcon-Tubes 15 ml, steril mit konischem Boden, Greiner BioOne
- Falcon-Tubes 15 ml, steril aus Polystyrene mit konischem Boden, BD
- Falcon-Tubes 50 ml, steril mit konischem Boden, Greiner BioOne
- Incubator Steri-Cult 200, forma Scientific Inc.
- Kryotubes 2 ml, steril Simport
- Kryotubes 4 ml, steril Simport

- Laborwaage BP2100S, Sartorius AG
- Mikroskop IMT-2, Mikroskop Olympus
- Mikroskop Nikon EclipseTS100, Nikon
- Mikroskop Olympus IX50, Olympus
- Neubauerzählkammer, Marienfeld
- Pipetman P1000N 100-1000 µl, Gilson
- Pipetman P200N 20-200 µl, Gilson
- Pipetman P10 1-10 µl, Gilson
- Pipette 25 ml steril-serologisch, Greiner BioOne
- Pipette 10 ml steril-serologisch, Sarstedt
- Pipette 5 ml steril-serologisch, Sarstedt
- Pipettenspitzen 100-1000 µl, Sorenson BioScience Inc.
- Pipettenspitzen 1-200 µl, Roth
- Pipettenspitzen 0,1-10 µl, Roth
- Schüttelinkubator Infors Ag
- Schüttler Titramax 100, Heidolph Instruments
- Sicherheitswerkbank MaxiSafe 2020 Thermo Scientific
- Sicherheitswerkbank Safe 2020, Thermo Scientific
- Spectrophotometer DU 640, Beckmann
- Spritze, steril 20 ml, Braun
- Spritze steril 5 ml, Braun
- Spritze steril 0,01 ml/1 ml, Braun
- Spritzen-Kanüle 0.5 x 16 mm 25G Sterican Spritze, Braun
- Sterile 96-Well-Platte mit konischem Boden, TPP
- Sterile 96-Well-Platte mit flachem Boden, TPP
- Syring-Filter 0.2 µm, steril, hydrophil Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH
- Thermomixer KompACT, Eppendorf
- Ultraschallbad Sonorex super RK102H, Bandelin
- Vortex-Genie 2, Scientific Industries (Vortexer)
- Vakuumfiltration 500 "rapid"-Filtermax TPP
- Wiegeinkubator Duomax 1030, Heidolph Instruments
- Zellkulturflaschen Cellstar 50 ml steril, rote Standardkappe, Greiner Bio-One

- Zellkulturflaschen 250 ml Cellstar steril, rote Standardkappe, Greiner Bio-One
- Zellkulturflaschen Cellstar 500 ml steril, rote Standardkappe, Greiner Bio-One
- Zellkulturplatte steril 6 Well, tissue-culture treated TPP
- Zellkulturplatte steril 6 Well, non tissue-culture treated TPP
- Zellkulturplatte steril 12 Well, tissue-culture treated BD Falcon
- Zellkulturplatte steril 24 Well, non-tissue culture treated, BD Falcon
- Zellkulturschalen Cellstar 60 x 15 mm steril, Greiner Bio-One
- Zellkulturschalen Cellstar 100 x 20 mm steril, Greiner Bio-One
- Zellkulturschalen 150 x 20 mm steril, TPP
- Zentrifuge Avanti J-25, Beckmann
- Zentrifuge Heraeus Biofuge fresko, 1999, Kendro Laboratory Products
- Zentrifuge Heraeus Megafuge 40R, 2009, Thermofisher Scientific
- Zentrifuge Heraeus Biofuge pico, Baujahr 1998, Kendro Laboratory Products
- Zentrifuge Heraeus Varifuge 3.0R, Sepatech GmbH
- Zentrifuge L-60 Ultracentrifuge, Beckmann
- Zentrifugen Rotoren: JA-14, SW28, Beckmann

2.13 Verwendete Software

FACSDiva Software, BD

Flowjo, 887

ImageJ (95), 1.43u

Graphpad Prism, 5.01

Adobe Illustrator, CS5.1

Microsoft Word, 2007

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Sterile Entnahme von inguinalen Lymphknoten und Mäusemilzen

Die Tiere wurden mit Isofluran oder mittels Genickbruch getötet. Anschließend erfolgte über einen medianen Bauchschnitt die sterile Entnahme der Milz bzw. der inguinalen Lymphknoten. Die entnommenen Organe wurden in steriles PBS auf Eis überführt und anschließend zum Herstellen einer Zellsuspension verwendet.

3.1.2 Sterile Herstellung einer Zellsuspension aus inguinalen Lymphknoten und Milz

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank. Milz und Lymphknoten wurden mechanisch, unter mehrfachem Spülen mit PBS oder Medium, durch einen 40 µm Cell-Strainer mit einem Spritzenstempel in ein 50 ml Falcontube homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Lyse der Erythrozyten mit Erythrozytenlysepuffer für 5 min. bei Raumtemperatur. Die Lyse wurde durch mehrfaches Waschen in PBS beendet und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden je nach Experiment weiter kultiviert. Bei Präparation von Lymphknoten wurde auf die Erythrozytenlyse verzichtet. Zentrifugationsschritte erfolgten bei 300 g und Raumtemperatur für 6 Minuten.

3.1.3 Stimulation einer Zellsuspension aus Milz und Lymphknotenzellen mit SIINFEKL

Es wurden die Milzen und inguinalen Lymphknoten von 4-5 OT-I Mäusen bzw. von 3-4 OT-I EBAG9^{-/-} Mäusen verwendet, um ausreichend Zellen für einen ATzT mit ca. 6 Empfängertieren je Gruppe zu generieren. Nach Herstellung der Zellsuspensionen wurde ein Inkubationsmedium zur Voraktivierung der SIINFEKL spezifischen OT-I- und OT-I EBAG9^{-/-} CTLs angesetzt. Dazu wurden 1-2 µg/ml SIINFEKL und 20-40 U/ml IL-2 zu 30 ml Mausmedium für das Material von 2-3 Tieren zugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation in 250 ml Zellkulturflaschen stehend über zwei Tage im Brutschrank bei 37 °C. Danach wurden die so aktivierten CTLs nach MACS-Anreicherung aus der Kultur für die Transferversuche verwendet.

3.1.4 Kultivieren von E.G-7 Zellen

Die verwendete E.G-7 Zelllinie von ATCC stammte aus eigenen Beständen, zudem aus Beständen der AG Blankenstein sowie von PD Uta Höpken, welche uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Die E.G-7 Stammkulturen wurden vor dem Wegfrieren für eine Woche mittels G418 selektioniert. Zur Vermehrung wurde die Suspensionszelllinie E.G-7 in Zellkulturflaschen im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage und bei Bedarf 1:2 bis 1:4 gesplittet

und mit frischem Medium versorgt. Zu frischem Medium wurde jeweils 0.5 mg/ml G418 zu Selektionszwecken hinzugegeben. Um lange Kulturzeiten und dadurch den eventuellen Verlust des OVA Transgenproduktes der Zellen möglichst zu vermeiden, wurden regelmäßig frische Zell-Batches aufgetaut. Diese wurden für maximal 7-14 Tage unter Selektionsdruck kultiviert. Vor der Anwendung frischer E.G-7 Stammkulturen in Tierversuchen wurden die Zellen für mindestens 5 Tage nach dem Auftauen kultiviert.

3.1.5 Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren von Zellen wurde Einfriermedium angesetzt und bereits auf Eis vorgekühlt. Die gewünschten Zellen wurden in ein Falcontube transferiert, durch Zentrifugation bei 4 °C pelletiert, der Überstand abgenommen und in vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Nach dem Einstellen der gewünschten Konzentration (1×10^6 für E.G-7; ca. 2×10^6 für DCs) je ml Einfriermedium wurden die Zellen zu je 1 ml in 2 ml Kryotubes transferiert und auf Eis gestellt. Die Kryotubes wurden in einem speziellen Gefrierbehälter für mindestens 24 h im -80 °C Kühlschrank gelagert und anschließend in den flüssigen Stickstofftank transferiert.

3.1.6 Steriles Auftauen von eingefrorenen Zellen

Das Kryotube wurden aus dem flüssigen Stickstofftank entnommen und auf Trockeneis in einen Styroporbehälter gepackt. Im Wasserbad wurden die Zellen bei 37 °C rasch aufgetaut. Mit den letzten Eisresten erfolgte unter der Sicherheitswerkbank der Transfer in frisches RPMI1640. Es wurde einmal in RPMI1640 gewaschen, um das kryoprotektive, jedoch bei 37 °C zytotoxische DMSO des Einfriermediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen im entsprechenden Medium vorsichtig resuspendiert und weiterkultiviert.

3.1.7 Sterile Präparation von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Anschließend wurden Ober- und Unterschenkelknochen der Hinterbeine steril entnommen. Unter der Sicherheitswerkbank wurden die Knochen an beiden Enden eröffnet und das Knochenmark mithilfe einer Spritze durch Spülung gewonnen. Die so erhaltene Zellsuspension wurde über einen 40 µm Filter passiert und auf einer 6 cm Schale in 5 ml RPMI1640 für 1 h im Brutschrank inkubiert. Makrophagen setzten sich während der Inkubation auf dem Boden der Schale ab. Anschließend wurden die im Überstand suspendierten Zellen abgenommen und in MM mit 20 ng/ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) auf 6 Well-Platten im Brutschrank über Nacht inkubiert. Noch anhaftende Zellen wurden verworfen. Nicht adhärente Zellen wurden am nächsten Tag mit dem Überstand

abgenommen und verworfen. Es wurde den Kulturen frisches MM mit 20 ng/ml GM-CSF zugesetzt. Dies wurde alle 2 Tage wiederholt. Die so entstandenen dendritischen Zellen wurden am Tag 7-8 geerntet, mittels Neubauerzählkammer gezählt und eingefroren. Eine Qualitätskontrolle der DCs bezüglich Reinheit und Reifegrad wurde mittels FACS auf CD11c/MHC-II sowie CD11c/CD86 doppelt positive Zellen (96, 97) durchgeführt. Dabei wurden mehr als >80 % doppelt positive Zellen (CD11c⁺/CD86^{high}, sowie CD11c⁺/MHC Klasse II^{high}) generiert.

3.1.8 Kultivieren der Plat-E Zellen

Es wurden frische Plat-E Stammkulturen aus flüssigem Stickstoff aufgetaut, welche vor dem Einfrieren für eine Woche mittels Blastocidin (10 µg/ml) und Puromycin (1 µg/ml) selektioniert worden waren. Während des Kultivierens zur Virusproduktion selbst waren die Zellen keinem Selektionsdruck ausgesetzt, da dies die Virusproduktion einschränken kann. Eine Plat-E Charge wurde für maximal 6-8 Wochen kultiviert und zur Virusproduktion verwendet. Die Zellen wurden für Kultivierung und Anreicherungs Zwecke regelmäßig alle 2-3 Tage gesplittet. Es wurde darauf geachtet, möglichst keine 100 % Konfluenz zu erreichen, um Veränderungen der Zellen zu verhindern und die Produktionsfähigkeit für Retroviren aufrecht zu erhalten. Da es sich um eine adhären wachsende Zelllinie handelt, mussten die Zellen beim Umsetzen erst mit Trypsin-EDTA abgelöst werden. Anschließend wurden sie in Falcontubes übertragen, in Medium gewaschen und erneut auf frischen Zellkulturschalen ausplattiert. Für die Transfektion wurde am Abend zuvor so ausplattiert, dass am nächsten Morgen möglichst 70-80 % Konfluenz erreicht war. Für die Kultivierung und Anreicherung wurde ca. 40 % Konfluenz nach dem Ausplattieren angestrebt. Die Kultivierung erfolgte je nach Bedarf auf 10 cm (Transfektion) oder zur Anreicherung auf 15 cm Zellkulturschalen bzw. in Zellkulturflaschen.

3.1.9 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer

Die Verwendung der Kammer erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Ein Volumen von 10 µl einer ggf. entsprechend vorverdünnten Zellsuspension wurde aufgetragen. Es wurden 4 Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl errechnet sich:

$$\left(\frac{\text{Summe der Zellzahl von 4 Großquadraten}}{4} \right) * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

3.1.10 Durchflusszytometrie

3.1.10.1 Färbung von Oberflächenproteinen

Als Ausgangsmaterial dienten Zellsuspensionen aus Primärzellen oder Zellkulturen. Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen, mittels Neubauerzählkammer gezählt, in FACS-Puffer überführt und in einer Konzentration von 5×10^5 - 1×10^6 Zellen/Well auf eine 96-Well-Platte verteilt. Es

wurde erst mit einer Anti-CD16/32 Antikörpermischung (1:100 in FACS-Puffer) zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen der Fc-Domäne von Immunglobulinen an CD16/32-Molekülen für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde einmal in FACS-Puffer gewaschen und unter Alufolie für 30 min. mit dem gewünschten Fluoreszenz-markierten Antikörper (1:100 in FACS-Puffer) für 30 min. auf Eis inkubiert. Vor ihrer Anwendung wurden die verdünnten Antikörperlösungen bei 13.000 Upm für 5 min. zentrifugiert und der Überstand verwendet, um Präzipitate zu entfernen. Abschließend wurden die gefärbten Zellen dreimal in FACS-Puffer gewaschen, für die Messung in Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer analysiert. Zur Auswertung wurde die Software FACSDiva und Flowjo verwendet.

3.1.10.2 Identifikation der OT-I transgenen Mäuse mittels Oberflächen-FACS

Die C57BL/6 OT-I Mäuse besitzen fast ausschließlich CD8⁺-T-Lymphozyten, welche den OT-I TZR exprimieren. Der OT-I TZR ist ein transgener TZR, welcher das V α 2 Segment und das V β 5.1 Segment enthält (98, 99). Dieser transgene TZR ist in der Lage, über MHC-I im H2-K^b Kontext präsentiertes Peptid SIINFEKL zu erkennen und eine CTL-Antwort auszulösen (98). Gegen die beiden Segmente des OT-I Rezeptors: V α 2 Segment und das V β 5.1 existieren spezifische Antikörper, sodass OT-I spezifische CTLs über FACS-Färbung identifiziert werden können (98). Für die Analyse wurde durch retroorbitale Punktion gewonnenes Blut der Tiere verwendet.

3.1.10.3 Färbung von intrazellulären Antigenen

Es wurden dabei intrazelluläre Färbungen mit Oberflächenfärbungen kombiniert. Für Oberflächenfärbung siehe oben 3.1.10.1. Nach erfolgter Färbung der gewünschten Oberflächenantigene wurde dreimal in FACS-Puffer gewaschen und die Zellen wurden anschließend in 100 μ l Fixationspuffer/Well für 20 min. bei Raumtemperatur unter Alufolie fixiert. Nun wurde dreimal in Permeabilisations-Waschpuffer gewaschen und mit einer Anti-CD16/32-Antikörpermischung (1:100 in Permeabilisations-Waschpuffer) für 30 min. auf Eis inkubiert, um unspezifische intrazelluläre Fc-Bindungsstellen zu blockieren. Nach einmal Waschen in Permeabilisations-Waschpuffer folgte eine Inkubation für 30 min. auf Eis mit den gewünschten intrazellulären Anti-Zytokin-Antikörpern (1:100 in Permeabilisations-Waschpuffer) unter Alufolie. Vor ihrer Anwendung wurden die verdünnten Antikörperlösungen bei 13.000 Upm für 5 min. zentrifugiert und der Überstand verwendet, um Präzipitate zu entfernen. Abschließend wurde dreimal in FACS-Puffer gewaschen, die Zellen für die Messung in Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer analysiert.

3.1.10.4 Intrazelluläre Detektion von IFN- γ

Um bereits antigenerfahrene CD8⁺-T-Zellen identifizieren zu können, wurde eine intrazelluläre Färbung für IFN- γ durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die CTLs antigenspezifisch mittels 1-5 μ g SIINFEKL und 10-25 U/ml IL-2 im Brutschrank 1-2 Tage stimuliert. Vor der Färbung wurde für 4 h zusätzlich mit 5 μ g/ml Brefeldin A (BFA) inkubiert, um den Proteintransport aus dem Golgi-Apparat zu hemmen. Dies führte dazu, dass das normalerweise konstitutiv sezernierte IFN- γ intrazellulär akkumulierte. So konnte es anschließend in einer intrazellulären Färbung mit Anti-IFN- γ -Antikörpern dargestellt werden. Für die einzelnen Schritte der Färbung siehe oben 3.1.10.1 und 3.1.10.3. Als Positivkontrolle wurde zu einem Ansatz bei der Inkubation 1 μ g/ml Ionomycin und 40 ng/ml PMA hinzugegeben. Dies führte zu einer unspezifischen Stimulation und Proteinsynthese in aktivierten CTLs.

3.1.11 Anreichern von transduzierten Zellen mittels Durchflusszytometrie

Am Zellsorter wurde die Zielpopulation, definiert als CD8⁺/GFP⁺ Zellen, isoliert. GFP war in allen verwendeten retroviralen Vektoren enthalten und wurde daher von erfolgreich transduzierten Zellen exprimiert. Untransduzierte Zellen synthetisierten kein GFP. Zusammen mit einer Färbung gegen das CD8-Oberflächenantigen erlaubten diese beiden Marker eine sichere Identifikation der Zielpopulation. Für die CD8-Markierung wurde eine rasche Oberflächenfärbung durchgeführt. Dazu wurden die transduzierten Zellen aus der Kultur in Falcontubes gepoolt und zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurde mit Anti-CD16/32 Antikörpern 1:100 für 15 min. im Falcontube auf Eis inkubiert, um unspezifischen Fc-Bindungen zu blockieren. Danach wurde mit Anti-CD8-APC 1:400 für 15 min. auf Eis in einer sterilen 96-Well-Platte mit konischem Boden gefärbt. Vor dem Sortieren wurden die vorbereiteten Zellen über einen 40 μ m Filter filtriert, um mögliche Klumpen zu entfernen. Anschließend folgte die Anreicherung der CD8⁺/GFP⁺ Zielpopulation am Zellsorter. Es wurde gekühlt sortiert. Die erhaltenen Zellen wurden zweimal in MM gewaschen und entweder rekultiviert oder direkt für Proteinanalysen lysiert. Für die weitere Kultivierung erfolgte eine Resuspension in frischem Medium angereichert mit 50 U/ml IL-2 und 50 U/ml IL-7. Anschließend wurden die Proben auf kleine 15 ml Zellkulturflaschen verteilt und für 1-2 Tage im Brutschrank weiter versorgt.

3.2 Tierexperimentelle Methoden

3.2.1 Applikation subkutaner Tumore

E.G-7 Zellen wurden aus der Kulturflasche in Falcontubes gepoolt, zweimal in PBS gewaschen, mittels Neubauerzählkammer gezählt und die gewünschte Konzentration (i.d.R. 1-2x10⁵ Zellen/100 μ l) in PBS eingestellt. Die benötigte Menge an E.G-7 Zellen wurde in Eppendorfgefäße

aliquotiert und bis zur Injektion auf Eis kühlgestellt. Die Mäuse wurden mittels Isofluran kurz anästhesiert, das Fell mit 70 % Ethanol desinfiziert und die Zellen in einem 100 µl Bolus s.c. injiziert. Die Injektion erfolgte möglichst im Drainagegebiet des linken inguinalen Lymphknoten am Rücken der Tiere.

3.2.2 Vakzinierung mit SIINFEKL-gepulsten dendritischen Zellen

Um die Mäuse mithilfe von SIINFEKL zu immunisieren, wurden DCs aufgetaut. Die aufgetauten DCs wurden einmal in RPMI1640 gewaschen und in RPMI 1640 mit 1 % (v/v) FRS und 1 µg/ml SIINFEKL für 4h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die SIINFEKL-gepulsten DCs zweimal in PBS gewaschen, mittels Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt und die gewünschte Konzentration der DCs in PBS oder RPMI 1640 (ohne Zusätze) eingestellt. Die Zellen wurden in ein steriles Eppendorfgefäß übertragen und bis zur zügig erfolgenden s.c. Injektion auf Eis gestellt. Die s.c. Injektion erfolgte unter Isofluran-Kurzanästhesie (s. 3.2.1).

3.2.3 *In vivo* Killing Assay

Weibliche EBAG9^{-/-} und Wt C57BL/6 Mäuse wurden am Tag 0 mit 5x10⁶ männlichen (HY⁺) Splenozyten intraperitoneal immunisiert. Sowohl Empfängertiere als auch die transferierten Zellen exprimierten CD45.2. Die Immunisierung wurde an Tag 6 oder 7 wiederholt. Am Tag 11 nach der ersten Immunisierung wurde der *in vivo* Killing Assay durchgeführt. Dazu wurden Splenozyten aus CD45.1 Donortieren mit eFluor 670 (eBioscience) markiert. Männliche Splenozyten (HY⁺) erhielten eine hohe Dosis an eFluor 670, weibliche Splenozyten (HY⁻) eine niedrige Dosis. Anschließend wurden je 1x10⁷ markierte männliche und weibliche Splenozyten 1:1 vermischt. Die i.v. Injektion der Splenozytenmischung erfolgte mit 2x10⁷/100 µl in die immunisierten Tiere. Eine nicht immunisierte Maus wurde als Negativkontrolle ebenfalls injiziert. Die FACS-Analyse der Milzen der Empfängertiere erfolgte nach 14-15 h. Dabei wurde auf CD45.1/ eFluor 670 doppelt positive Zellen ein Gate gesetzt und das Verhältnis der beiden Populationen untereinander verglichen.

3.2.4 Adoptiver T-Zell Transfer

3.2.4.1 Adoptiver T-Zell Transfer von vorstimulierten Zellen mit MACS-Separation

Die gemäß 3.1.3 stimulierten Splenozyten wurden gepoolt, zweimal in sterilem PBS gewaschen und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Mit Hilfe eines CD8⁺ MACS negative Selection Kits wurde die Zellkultur gemäß den Angaben des Herstellers von den CD8-negativen Zellpopulationen depletiert, um eine möglichst reine Population an CTLs transferieren zu können. Die Zahl der so angereicherten CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen wurde mittels Neubauerzählkammer

bestimmt und die gewünschte Konzentration der CD8⁺ Zellen/100 µl entsprechend, je nach Transferexperiment, in PBS oder RPMI 1640 Medium eingestellt. Anschließend wurde die so vorbereitete Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß transferiert und in 100 µl Boli i.v. in die Schwanzvene von tumortragenden Empfängertieren injiziert. Für das Einstellen der Zellkonzentration für den Transfer wurden beim Zählen ausschließlich große, blastäre und damit aktivierte Zellen berücksichtigt. Nach der MACS-Aufreinigung wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, um die Qualität der CD8⁺-T-Zellpopulation zu überprüfen. Dabei wurde eine durchschnittliche Reinheit von >90 % CD8⁺-T-Zellen erreicht.

3.2.4.2 Transfer von polyklonalen CTLs mit unterstützender DC-Vakzinierung

Für den polyklonalen Transfer von naiven CD8⁺-T-Zellen in Kombination mit einer DC Vakzinierung wurden die DCs wie in 3.2.2 beschrieben aufgetaut und mit SIINFEKL beladen. Zusätzlich wurde während der 4 h Inkubation im Brutschrank 100-150 ng LPS zugesetzt, welches vor dem Transfer der DCs durch gründliches Waschen in PBS (mindestens 3x) entfernt wurde. Durch die Zugabe von LPS sollte die Reifung der DCs verbessert werden. Alle weiteren Schritte wurden wie in 3.2.2 durchgeführt. Als Empfänger für die DCs waren C57BL/6 Wt vorgesehen. Diese Tiere hatten 6 Tage zuvor s.c. 2×10^5 E.G-7 Zellen erhalten. Die DCs wurden einen Tag vor den polyklonalen T-Zellen s.c. appliziert. Die CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen wurden am Tag des Transfers wie in 3.1.1 und 3.1.2 von den Donortieren gewonnen. Mit Hilfe eines CD8-negative Selection Kits wurde die Zellkultur gemäß der Angaben des Herstellers für CD8⁺-T-Zellen angereichert. Die Zahl der angereicherten CD8⁺-T-Zellen wurde mittels Neubauerzählkammer bestimmt und die gewünschte Konzentration der CD8⁺-T-Lymphozyten/100µl entsprechend in PBS oder RPMI 1640 Medium eingestellt. Anschließend wurde die vorbereitete Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß transferiert und in 100 µl Boli i.v. in die Schwanzvene injiziert. Auch hierbei wurde nach der MACS-Aufreinigung eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, um die Qualität zu überprüfen. Eine durchschnittliche Reinheit von >90 % CD8⁺-T-Zellen wurde erreicht. In diesem Versuchsaufbau wurden die polyklonalen T-Zellen, anders als in den monoklonalen Transferexperimenten, nicht vor dem Transfer *in vitro* aktiviert.

3.2.5 Bestimmung des Tumorumfanges als Indikator für die Krankheitsprogression

Als Endpunkt für manche Versuche war das bloße Anwachsen von Tumoren in den Mäusen definiert. Dies wurde durch regelmäßige Tastuntersuchungen am Injektionsort kontrolliert. Als positiv gewertet wurden eindeutig palpable bzw. schon sichtbare Tumore. Für die Beurteilung des Therapieerfolges respektive der Krankheitsprogression wurde das Volumen des soliden Tumors in der Maus bestimmt. Dazu wurden Länge und Breite des Tumors mithilfe einer Schiebelehre an den

Mäusen erhoben. Dabei wurde darauf geachtet, die Tumore möglichst nicht zu komprimieren. Die Messungen wurden möglichst vom selben Untersucherpaar durchgeführt, um potenzielle Fehler oder Schwankungen zwischen den Untersuchungen zu minimieren. Anschließend wurde das Tumolvolumen in mm³ nach der modifizierten Ellipsoidformel bestimmt:

$$(Länge * Breite^2) * \frac{1}{2} (100)$$

Das Tumolvolumen stellte oft den eigentlichen Verlaufsparemeter dar und wurde zur Beurteilung des Therapieansprechens verwendet. Konnten bei Tieren keine Tumore gemessen werden, wurden sie einer genauen Tastuntersuchung unterzogen, um ggf. vorhandene, kleinere Befunde feststellen zu können.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Lymphozyten

Als Ausgangsmaterial wurden mittels Zellsorter angereicherte CD8⁺/GFP⁺ Lymphozyten verwendet. Die Zellzahl wurde nach der Anreicherung mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Zum Herstellen von Proteinlysaten wurden die Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt, zweimal in PBS gewaschen und dann der Lysepuffer angesetzt: 1000 µl RIPA, 10 µl PMSF, 5 µl Aprotinin. Es wurden 1x10⁷ Zellen in 200 µl Lysepuffer aufgenommen. War weniger Zellmaterial vorhanden, so wurde die Menge an verwendetem Lysepuffer entsprechend angepasst, sodass vergleichbare Konzentrationen an lysierten Zellen/µl erzielt wurden. Da ausschließlich Zellen des gleichen Typs lysiert wurden, entsprachen gleiche Zellmengen näherungsweise gleichen Proteinmengen. Dadurch wurden Lysate generiert, die bei gleichen Volumenmengen entsprechende Proteinmengen beinhalteten. Nach Resuspension der Zellen im Lysepuffer wurde 30 min. bei 4 °C auf einem Drehrad unter ständigem Mischen lysiert. Anschließend wurden nicht lysierte, zelluläre Bestandteile durch Zentrifugation bei 13.000 Upm, 4 °C für 10 min. pelletiert. Der Überstand, welcher die Proteinlysate der Zellen enthielt, wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und bei -20 °C eingefroren.

3.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine

Die Proteinlysate wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für das Gießen der Gele wurde eine Gelform aus Glasplatten und Spacern vorbereitet und mithilfe von Klammern fixiert. Die Form wurde mittels gelöster 1 % (w/v) Agarose/Wasser, welche durch kurzes Erhitzen in der Mikrowelle verflüssigt wurde, abgedichtet. Danach wurde das 12,5 % Trenngel angesetzt und in der Gelform für 20-30 min. bei Raumtemperatur ausgehärtet. Anschließend wurde

das Sammelgel vorbereitet und ebenfalls in die Form gegeben. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die vorbereiteten Proben wurden nun aufgetaut und 1:1 mit zweifach reduzierendem Probenpuffer vermischt. Danach wurde für 5 min. bei 95 °C erhitzt und kurz bei 13.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in das Gel aufgetragen. Dabei wurde auf gleiche Volumengen, welche gleichen Proteinmengen entsprachen, geachtet. Es wurde ein Größengewichtsstandard mit aufgetragen und leere Taschen wurden mit Sample-Puffer beladen. Das Gel wurde bei 55-60 Volt über Nacht laufen gelassen und am anschließenden Tag geblottet.

3.3.3 Blotten der aufgetrennten Proteine auf eine Membran

Für das Blotten der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde das sogenannte Tankblot-Verfahren verwendet. Dabei handelt es sich um ein Nass-Blot-Verfahren. Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entfernt und entsprechend den interessierenden Bereichen zugeschnitten. Gel und Membran wurden in mit Transferpuffer befeuchteten Schwämmen und Blottingpapier eingefügt und in eine geeignete Blotkassette eingespannt. Anschließend wurde die Kassette in die Kammer gestellt und die Kammer mit Transfer-Puffer aufgefüllt. Dabei wurde auf eine adäquate Orientierung von Gel und Membran im elektrischen Feld geachtet, um die Proteine in Richtung der Membran (Anode) laufen zu lassen. Es wurde 2 h bei 400 mA geblottet.

3.3.4 Entwickeln des Blots

Die geblottete Membran wurde für 2 h in 5 % (w/v) Milchpulver in PBS/Tween bei Raumtemperatur auf dem Wiegeinkubator behandelt. Dies diente dazu, unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend wurde mit einem primären Antikörper 1:2000, in 1 % (w/v) Milchpulver in PBS/Tween gelöst für 1-2 h bei Raumtemperatur auf dem Wiegeinkubator inkubiert. Nach Waschen in PBS/Tween für 30 min. und dabei mehrmals erfolgtem Wechseln der Waschlösung (4-5x) wurde mit einem sekundären, Meerrettichperoxidase (=HRP) -gekoppelten Antikörper 1:2000 in 1 % (w/v) Milchpulver in PBS/Tween für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Wiegeinkubator inkubiert. Danach wurde 1 h bei mehrmaligem Wechseln der Waschlösung auf dem Wiegeinkubator gewaschen. Im Anschluss an die Waschschrte wurde die Membran auf Plastikfolie transferiert und mit einem Lumineszenzreagenz (ECL Western-Blotting Reagenz) für 2 min. behandelt. Von der Membran wurden in der Dunkelkammer Filme mit unterschiedlichen Expositionszeiten angefertigt und anschließend sofort maschinell entwickelt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Transformation von XL-1 Blue kompetenten Zellen mit shRNA-Plasmid

Die Bakterien wurden aus dem -80 °C Gefrierschrank auf Eis gepackt und langsam über 20-30 min. aufgetaut. 1 µl des zu transformierenden Plasmids (Konzentration: 3 µg/µl) wurde zu den Bakterien (1 µl:100 µl) zugegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze verrührt. Anschließend wurde für 20 min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 60s und anschließend wurde weitere 2-3 min. auf Eis inkubiert. Je Ansatz wurden 250-500 µl SOC-Medium (37 °C) zugegeben und es wurde für 60 min. auf dem Schüttelinkubator bei 37 °C, 180 Upm inkubiert. Unter einer Sicherheitswerkbank wurden 25-50 µl der Bakterienlösung auf eine auf 37 °C vorgewärmte Ampicillin-Agarplatte (100 µg Ampicillin/ml) pipettiert. Der Glasspatel wurde kurz mithilfe von Ethanol abgeflammt und die Bakterien wurden auf dem Agar gleichmäßig ausgestrichen und verteilt. Anschließen wurden die inokulierten Agarplatten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Klone für das Ansetzen einer Maxiprep-Kultur gepickt, die Platten gut mit Parafilm abgedichtet und im 4 °C Raum gelagert.

3.4.2 Erstellen von Maxiprep-Kulturen

Zuerst wurde eine Vorkultur angelegt. 5 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin wurden in ein Reagenzglas gefüllt. Mit Hilfe eines Zahnstochers wurde ein Klon von den angelegten, transformierten Kulturen gepickt und zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 6-8 h auf dem Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 Upm. Für die Maxiprep-Kultur wurden 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in einen 1 l Plastik-Erlenmeyerkolben gefüllt. Die am besten proliferierte Vorkultur wurde ausgewählt und in den Ansatz für die Maxi-Kultur übertragen. Es wurde weiter auf dem Schüttelinkubator bei 37 °C, 180 Upm über Nacht inkubiert. Am anschließenden Morgen wurde die Maxiprep-Kultur in entsprechend geeignete Zentrifugationsbehälter überführt und die Bakterien wurden bei 5000 Upm, 4 °C 5 min. pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet entweder sofort für die Plasmid-Präparation verwendet oder bei -20 °C bis zur Präparation der Plasmide eingefroren.

3.4.3 Plasmidpräparation aus Maxiprep-Kultur

Die Präparation erfolgte mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von Quiagen gemäß der Angaben des Herstellers. Nach der Präparation erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA mittels Absorptionsspektroskopie anhand der Absorption bei 260 nm (A₂₆₀). Hierzu wurde für die Analyse am Photometer eine 1:100 Vorverdünnung in Milliporewasser verwendet. Eine Absorption von 1.0 bei 260 nm entspricht dabei näherungsweise einer Menge von

50 µg/ml dsDNA (101). Die Berechnung der Konzentration der Plasmid-DNA in µg/µl erfolgte daher folgendermaßen:

$$\text{DNA in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260} \times 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ dient der Bestimmung der Reinheit der DNA-Lösung. Idealerweise sollte dieses Verhältnis bei 1,8-2,0 liegen (101). Anschließend wurden die Plasmide in Eppendorfgläser bei -20 °C gelagert.

3.4.4 Calcium-Phosphat-Transfektion von Plat-E Zellen und Produktion retroviraler Überstände

Die Transfektion erfolgte steril unter der Sicherheitswerkbank. Plat-E Zellen wurden am Vorabend der Transfektion auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät, so dass am nächsten Morgen möglichst 70-80 % Konfluenz erreicht wurde (ca. $3-4 \times 10^6$ Zellen je 10 cm Schale). Dazu wurden die adhären wachsenden Zellen mittels Trypsin-EDTA von den Platten gelöst, kurz gewaschen, gezählt und umgesetzt. Die Transfektion fand am folgenden Morgen statt. Es wurde für jede zu transfizierende 10 cm Platte ein eigener Transfektions-Ansatz pipettiert. Zuerst wurde ein 15 ml Polystyrene Falcontube mit 300 µl Präzipitationspuffer (2x HEBS) für jeden einzelnen Ansatz vorbereitet. Je Konstrukt wurden nun in sterile Eppendorfgläser Transfektionsansätze pipettiert. Dazu wurden 10 µg des gewünschten Konstrukt-Plasmids, 10 µg pGagPol, 2 µg pEnv (Plasmid-DNA der Hüllproteine) und 30 µl CaCl₂ (2,5 M) in ein Eppendorfglas gegeben und mit Milliporewasser auf 300 µl aufgefüllt. Es wurde dabei immer zuerst das Wasser in die Eppendorfgläser vorgelegt. Anschließend wurden die Plasmide pipettiert und zuletzt erst das CaCl₂ zugegeben. Nun wurde der Ansatz gut auf dem Vortexer vermischt und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für jeden Ansatz ein 15 ml Polystyrene Falcontube mit 300 µl 2x Präzipitationspuffer auf den Vortexer gesetzt. Unter permanentem Vortexen wurde der Plasmidansatz aus dem Eppendorfglas mit der 1000 µl Pipette langsam hineingetropt. Es wurde nun für 20 min. bei Raumtemperatur im Falcontube inkubiert. Inzwischen wurde das Medium von den Schalen mit Plat-E Zellen durch frisches Plat-E Medium mit 25 µM/ml Chloroquin (Stock 25 mM) ersetzt, ohne dabei die Zellen vom Untergrund zu lösen. Nach den 20 min. wurden die fertigen Transfektionsansätze unter ständigem Schwenken der Platte auf die Plat-E Zellkulturen getropft. Die so behandelten Zellkulturschalen wurden nun für 6-8 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach 6 h wurde das Medium auf den Zellen abgesaugt und durch frisches MM ersetzt (ca. 10 ml je Platte). Nun wurden die Platten bis zur anschließenden Virusernte 48 h inkubiert. Der Transfektionserfolg konnte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop abgeschätzt oder mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden, da

die Plasmid-Konstrukte auch GFP enthielten, welches nach erfolgreicher Transfektion ebenfalls von den Plat-E Zellen exprimiert wurde.

3.4.5 Virusernte von transfizierten Plat-E Zellen

Nach 48 h Inkubation konnten Retrovirus-haltige Überstände von den transfizierten Plat-E Zellen geerntet werden. Dazu wurden die Überstände unter der Sicherheitswerkbank in eine sterile 20 ml Spritze aufgenommen und durch einen 0,2 µm Filter in ein steriles 15 ml Falcontube sterilfiltriert. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um a) die Virusüberstände zellfrei zu machen und b) sicherzugehen, dass mit 100 % sterilen Überständen weitergearbeitet werden konnte. Die geernteten Überstände wurden sofort verwendet oder auf Eis gestellt und gekühlt. Anschließend wurden die restlichen, vorgekühlten Überstände bis zum weiteren Gebrauch im -80 °C Gefrierschrank gelagert. Je nach Zustand der Plat-E Zellen auf den Platten wurde für eine zweite Virusernte erneut 10 ml frisches MM auf die Zellkulturplatten gegeben und nach 24 h geerntet.

3.4.6 Auftauen und Einfrieren von Virusüberständen

Die geernteten Überstände wurden aliquotiert und auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Virusüberstände bei -80 °C eingefroren. Zum Auftauen wurden die Überstände aus dem -80 °C Gefrierschrank genommen und rasch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Vor Anwendung wurden die Überstände nochmal kurz durch Schwenken gemischt. Verwendung von frischem Virus gegenüber eingefrorenem Virus brachte in den hier durchgeführten Experimenten mit unseren Viren nur kleine Vorteile für die Transduktionseffizienz, v.a. beim MP71-Vektor war kaum ein Unterschied zu erkennen.

3.4.7 Retrovirale Transduktion von Maussplenozyten

Zur Transduktion von primären Mauszellen mit retroviralen Überständen wurden Milzzellsuspensionen hergestellt, voraktiviert und anschließend zweimal mittels retroviraler Überstände transduziert. Die retroviralen Überstände wurden zur Transduktion frisch von der Platte geerntet oder aus dem -80 °C Gefrierschrank aufgetaut.

Zur Stimulation der für die Transduktion bestimmten Zellen wurden sterile, zellkulturbehandelte 6-Well-Platten mit 3 µg/ml Anti-CD3- und 2 µg/ml Anti-CD28-Antikörpern beschichtet. Die Azid-freien, aufgereinigten und unkonjugierten Antikörper wurden in PBS gelöst und jedes Well mit 1 ml der CD3/CD28-Antikörperlösung benetzt. Anschließend wurden die Platten in Plastikfolie gewickelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde vor Anwendung der Platten abgenommen und bei -20 °C zur einmaligen Wiederverwendung eingefroren.

Tag 0: Präparation und Stimulation der Splenozyten

Pro 6-Well-Platte wurde für die Stimulation Zellsuspensionsmaterial aus Milz und inguinalen Lymphknoten je einer Maus eingesetzt. Die Zellsuspension wurde dazu in 24 ml MM + 40 U/ml IL-2 aufgenommen und davon 4 ml/Well, auf einer zuvor mit Anti-CD3-/Anti-CD28-Antikörper beschichtete Platte verteilt. Der Ansatz wurde nun im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ über Nacht inkubiert.

Tag 1: I. Transduktion

Zu den über Nacht stimulierten Zellen wurden nun pro Well 6 ml Virusüberstände + 40 U/ml IL-2 hinzugegeben. Anschließend wurde in jedes Well 4 µg/ml Protaminsulfat pipettiert. Währenddessen wurde die Zentrifuge auf 32 °C vorgewärmt. Nun wurden die Transduktionsansätze für 90 min. bei 32 °C mit 800 g zentrifugiert und anschließend wieder im Brutschrank inkubiert. Nach 6-8 h wurden je Well 5 ml Überstand vorsichtig abgenommen und durch frisches Medium + 40 U/ml IL-2 ersetzt und über Nacht weiter inkubiert. Für die zweite Transduktion am darauffolgenden Tag wurden unbehandelte 6-Well-Zellkultur-Platten mit Retronektin beschichtet. Dazu wurden 20 µg/ml Retronektin vorsichtig in PBS gelöst und 1 ml der Retronektinlösung in jedes Well pipettiert. Anschließend wurden die Platten mit Plastikfolie umwickelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tag 2: II. Transduktion

Zuerst wurde die Beschichtung der Zellkulturplatten mit Retronektin abgeschlossen. Dazu wurde die Retronektin-Lösung von den Platten abgenommen und bei -20 °C weggefroren. Die Lösung wurde einmal wiederverwendet. Es wurde mit 2 ml 2 % (w/v) BSA-Lösung (BSA in PBS gelöst) pro Well für 30 min. bei 37 °C blockiert und anschließend kurz mit 6-8 ml PBS + 25 mM HEPES pro Well gewaschen. Die am Vortag transduzierten Zellen wurden nun vorsichtig von den Platten resuspendiert, in Falcontubes überführt und einmal in vorgewärmtem Medium gewaschen. Anschließend wurden sie erneut in 24 ml Maus Medium + 40 U/ml IL-2 überführt und a 4 ml/Well gleichmäßig auf die mit Retronektin beschichteten Platten verteilt. Nun wurden 6 ml Virusüberstand + 40 U/ml IL-2 je Well zugegeben und erneut bei 32 °C mit 800 g für 90 min. zentrifugiert. Nach erneuter Inkubation im Brutschrank für 6-8 h wurden wieder 5 ml abgenommen, 5 ml frisches Medium + 40 U/ml IL-2 zugegeben und über Nacht inkubiert.

Bei diesem Vorgehen an Tag 2 handelte es sich um eine Variante des eigentlichen Verfahrens, bei dem die Retronektin behandelten Platten erst durch Zentrifugation noch zusätzlich mit retroviralen Überständen beschichtet werden, bevor Zellsuspension und Protaminsulfat zugegeben werden. Das Retronektin dient dabei als Kontaktvermittler zwischen den Zellen und den Retroviren. Da

mit unserer Variante ausreichend hohe Transduktionsraten erzielt werden konnten, wurde das Verfahren im Laufe der Arbeit so beibehalten, um die Versuchsbedingungen konstant zu halten.

Tag 3: Umsetzen und kultivieren der transduzierten Zellen

Die transduzierten Zellen wurden resuspendiert, in ein Falcontube überführt und einmal in warmem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in frisches MM + 50 U/ml IL-2 und 50 U/ml IL-7 in Zellkulturflaschen umgesetzt und weiterkultiviert. Dabei wurden 2-3 Wells in eine Flasche zusammengeführt. Je nach Bedarf wurden die Zellen mit frischem Medium + 50 U/ml IL-2 und 50 U/ml IL-7 versorgt und wenn nötig gesplittet. Am 6. Tag wurde der Transduktionserfolg mittels Durchflusszytometrie überprüft. Die erfolgreich transduzierten Zellen wurden am 3-5. Tag nach Transduktion durch das fluorescence activated cell sorting (FACS) -Verfahren angereichert.

4. Ergebnisse

4.1. *In vivo* Killing Assay

Um die zytolytische Aktivität von EBAG9^{-/-} CTLs gegenüber Wt CTLs zu vergleichen, wurde ein *in vivo* Killing Assay durchgeführt. Dieser Ansatz wurde gewählt, da zur verlässlichen Beurteilung der zytotoxischen Aktivität von CD8⁺-T-Zellen *in vivo* Assays den *in vitro* Assays in ihrer Aussagekraft überlegen sind (102). Die bereits von Rüder et al., (2009) (91) publizierte, verbesserte zytolytische Kapazität von EBAG9-defizienten CTLs *in vivo* gegen Listerien infizierte Zellen und gegen das SV40 Large T-Antigen sollte in einem Minor Histokompatibilitäts-Mismatch System *in vivo* überprüft werden.

Weibliche EBAG9^{-/-} und Wt C57BL/6 (CD45.2⁺) Mäuse wurden am Tag 0 mit 5x10⁶ männlichen (HY⁺; CD45.2⁺) Splenozyten intraperitoneal immunisiert. Die Immunisierung wurde an Tag 6 oder 7 wiederholt. Am Tag 11 nach der ersten Immunisierung wurde der *in vivo* Killing Assay mit kongenen Splenozyten aus CD45.1 Donortieren durchgeführt. Männliche (HY⁺) und weibliche (HY⁻) Splenozyten wurden mit einer unterschiedlich hohen Dosis an eFluor 670 markiert, 1:1 vermischt und i.v. als 2x10⁷/100 µl Splenozyten-Bolus in die immunisierten Tiere injiziert. Eine nicht immunisierte Maus wurde als Negativkontrolle ebenfalls injiziert. Die FACS-Analyse der Milzen der Empfängertiere auf CD45.1/eFluor 670 doppelt positive Zellen erfolgte nach 14-15 h (s. 3.2.3). Der Versuchsaufbau sowie ein repräsentatives Beispiel der FACS-Analyse sind in Abb. 5 A und B dargestellt.

Es konnte eine erhöhte spezifische Zytotoxizität in EBAG9^{-/-} Mäusen gegen die männlichen Zielzellen im Vergleich zu den immunisierten Wt Mäusen festgestellt werden (siehe Abb. 5 C). In den nicht immunisierten naiven C57BL/6 Tieren, welche als Kontrollen dienten, war ein spezifisches Killing praktisch nicht detektierbar. Diese Ergebnisse und die Daten aus Rüder et al 2009 bestätigten die verbesserte zytolytische Kapazität der CTLs nach Deletion von EBAG9 auch gegen immunrezessive Antigene im Kontext von hämatopoetischen Zielzellen.

Des Weiteren weisen auch Daten aus noch unpublizierten Experimenten innerhalb der Abreitsgruppe von A. Rehm (persönliche Mitteilung) auf eine verbesserte zytolytische Aktivität von EBAG9^{-/-} CTLs gegenüber Wt CTLs hin. Daher wurde ein starker Vorteil der EBAG9-defizienten CTLs gegenüber Wt CTLs in einem soliden Tumormodell erwartet.

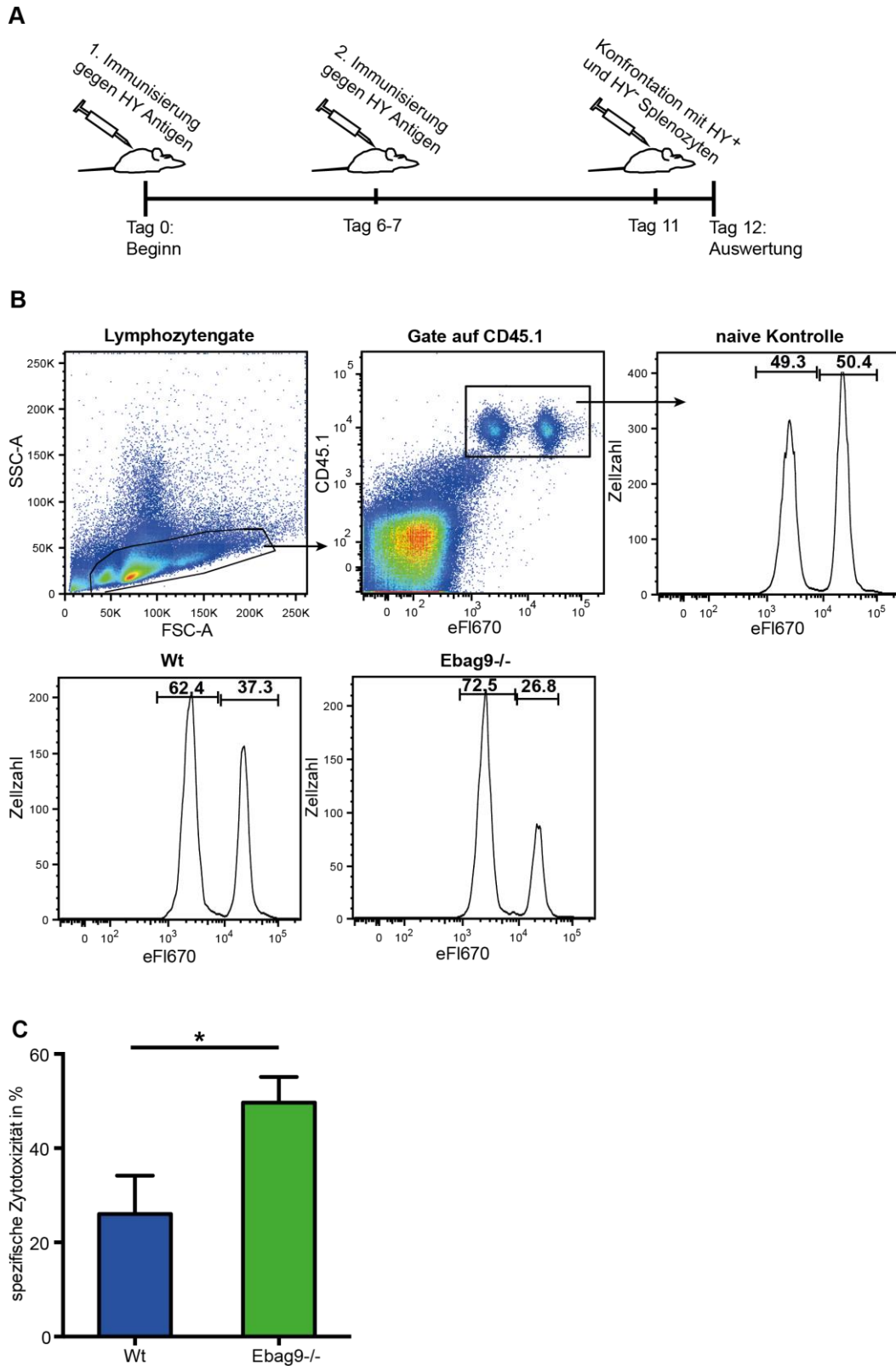


Abb. 5: Verbessertes spezifisches Killing in EBAG9^{-/-} Tieren verglichen mit Wt Mäusen

Weibliche Mäuse wurden am Tag 0 und Tag 6 mit jeweils 5×10^6 HY⁺ männlichen Splenozyten i.p. immunisiert. Am Tag 11 wurden die immunisierten Tiere mit eFluor670 markierten, kongenen (CD45.1) männlichen und weiblichen Splenozyten im Verhältnis 1:1 konfrontiert. Als Kontrollen dienen nicht immunisierte, naive Tiere. Nach ca. 16 h wurden die Tiere getötet, und das Verhältnis der eFluor670^{niedrig} zu eFluor670^{hoch} markierten Donorlymphozyten wurde mittels FACS bestimmt. **A)** Zeitlicher Ablauf des Versuches. **B)** Setzen der Gates für die Analyse. **C)** Dargestellt ist die prozentuale Rate der spezifisch abgetöteten männlichen Donorlymphozyten. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Wt und EBAG9^{-/-} Gruppe: Student's t-test: $p=0,0356$. Wt: $n=8$, EBAG9^{-/-}: $n=7$. $n=2$ unabhängige Versuche. *: $p<0,05$.

4.2 Etablierung von Wachstumskinetik, Kontrollintervallen und Kontrollgruppe des Wachstums der E.G-7 Tumorzellen in C57BL/6 Mäusen

4.2.1. Etablierung einer Wachstumskinetik der E.G-7 Tumorzellen in C57BL/6 Mäusen

Es wurde zunächst die Wachstumskinetik der zur Verfügung stehenden Tumorzelllinie E.G-7 in C57BL/6 Mäusen untersucht. Dies diente der Festlegung von Kontrollintervallen für das Monitoring der Tumorprogression. Durch s.c. Injektion wurden 1×10^5 Tumorzellen in C57BL/6 Mäuse appliziert. Anschließend wurden die Tiere dreimal pro Woche kontrolliert.

Eine Kontrollfrequenz von 3x/Woche ab Tag 7 nach Tumorzellgabe erwies sich als ausreichend, um einen guten Verlauf des frühen und mittleren Tumorwachstums aufzeichnen zu können. Dies entsprach dem gewünschten Beobachtungszeitraum der geplanten Experimente (s. Abb. 6). Für die Beurteilung des tumorwachstums wurde das tumorvolumen wie in 3.2.5 beschrieben bestimmt. Um Ulzerationen der Tumore zu vermeiden, wurden die Tiere spätestens ab einem maximalen Durchmessers von etwa 15 mm aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet.

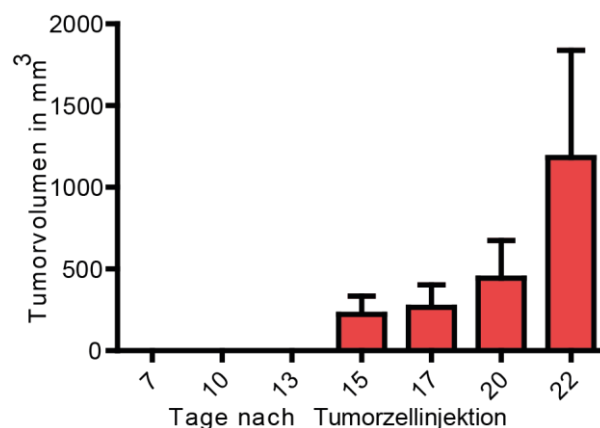


Abb. 6: Vorexperiment zum Wachstum der E.G-7 Tumorzelllinie in C57BL/6 Mäusen

Es wurden 1×10^5 Tumorzellen s.c. appliziert. Das Größenwachstum wurde mittels Schieblehre gemessen. Die Berechnung des Tumorvolumens erfolgte gemäß Formel im Methodenteil. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM. n=3 Tiere aus 1 Experiment.

Mit dem frühen Kontrollbeginn an Tag 7 sollte auch die biologische Variabilität des Tumorwachstums mit erfasst werden. Dadurch gelang es die Kinetik der E.G-7 Tumorzellen besser einschätzen zu können. Zusammen mit Daten aus anderen Experimenten wurde folgendes Wachstumsverhalten beobachtet: I.d.R. entstanden nach der s.c. Injektion von $1-2 \times 10^5$ E.G-7 Zellen ab Tag 7-10 gut palpable Tumore. Ab Tag 10-12 waren die Tumore mittels Schieblehre messbar und es hatten fast alle Tiere einer Versuchsgruppe Tumore entwickelt. Bei Tieren, die bis dahin noch keine Tumor entwickelt hatten, kam es meist auch im längeren Verlauf nicht mehr zu einem Auswachsen von Tumoren.

4.2.2 Etablierung einer Kontrollgruppe aus C57BL/6 Mäusen

Als Kontrollen für den Erfolg der Transferversuche wurden unbehandelte C57BL/6 Tiere verwendet. Für die Erstellung der Kontrollgruppe wurden Tiere, welche keinen Transfer oder DCs erhalten hatten, aus 6 unterschiedlichen Experimenten (inklusive des Vorexperimentes aus 4.2.1) zu einer Referenzgruppe zusammengefasst. Dies ermöglicht den Vergleich nicht nur von Wt und EBAG9^{-/-} behandelten Tieren untereinander, sondern auch mit nicht therapierten Tieren. Diese stellen den natürlichen Krankheitsverlauf dar und gestatten die Beurteilung eines Therapieansprechens. Für die Wahl der Kontrolltiere wurden die gleichen Kriterien zur Auswertung wie für die transferierten Tiere verwendet. Es kam im Rahmen der Experimente immer wieder vor, dass Tiere bis zum Start des ATzT keine Tumore entwickelt hatten. Diese Tiere wurden sowohl für die Transfers als auch für die Kontrollen aus der Auswertung genommen. Es sollten nur Tiere mit sicher etablierten Tumoren behandelt und gewertet werden.

Betrachtet man die Progression des mittleren Tumorumfanges in unbehandelten Tieren, so zeigt sich zwar eine variable, aber dennoch stetige Größenzunahme. Die temporäre Reduktion, welche bei Tieren mit ATzT beobachtet werden konnte, blieb aus. Auch eine längere Stagnation und fehlende Progression fehlte (s. Abb. 7 A). Es kann somit ein Ansprechen auf den ATzT anhand der Kontrollpopulation gut nachvollzogen werden.

Für die Auswertung des Überlebens wurde aus Tierschutzgründen nicht der Tod der Tiere verwendet. Stattdessen wurde als Grenzwert für das Überleben i.d.R. ein Tumorumfang von 1000 mm³ definiert (>1000 mm³ = Tod des Tieres). Diese Grenze wurde bei unbehandelten Tieren in 9/9 Fällen bis Tag 26 erreicht (s. Abb. 7 B).

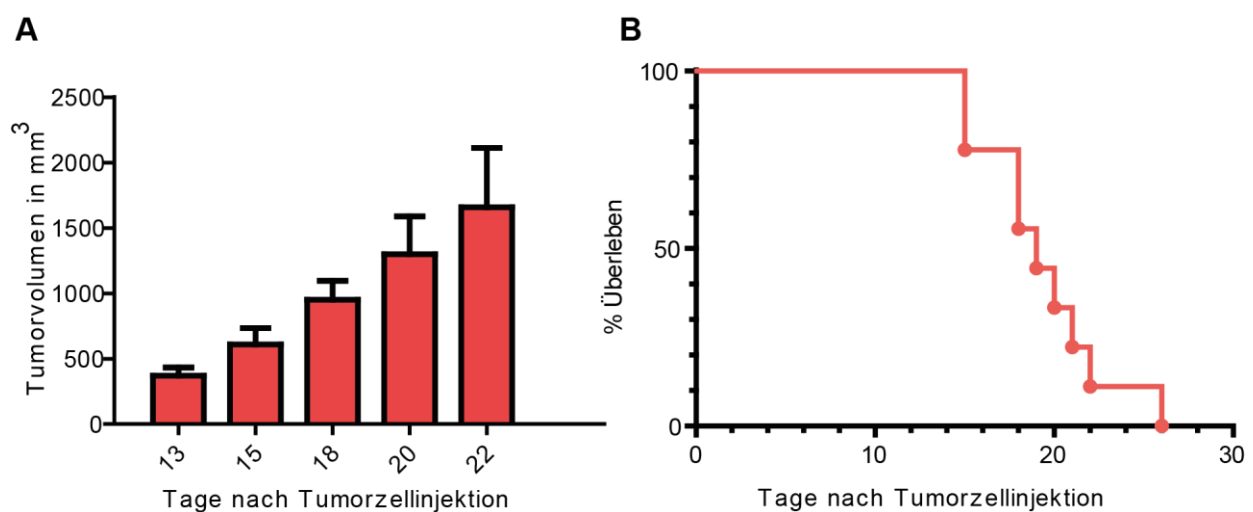


Abb. 7: Tumorwachstum in und Überleben von unbehandelten C57BL/6 Mäusen

A) Tumorwachstum in unbehandelten C57BL/6 Tieren. Den Tieren wurden s.c. Tumore mit $1-2 \times 10^5$ E.G-7 Zellen gesetzt. $n=9$ Tiere aus $n=6$ unterschiedlichen Experimenten. Ab Tag 20 $n=8$ und ab Tag 22 $n=7$ Mäuse. Mittelwerte mit SEM **B)** Überleben der unbehandelten Tiere nach Injektion der Tumorzellen mit 1000 mm^3 als Überlebensgrenze definiert. $n=9$ Tiere aus $n=6$ unterschiedlichen Experimenten.

4.3 Tumorwachstum von E.G-7 Zellen in Wt und EBAG9^{-/-} C57BL/6 Mäusen

Es wurde untersucht, ob die Deletion von EBAG9 in Mäusen alleine bereits ausreicht, um E.G-7 Zellen besser abstoßen zu können. Wt C57BL/6 Mäuse sind nicht in der Lage, E.G-7 Tumorzellen ausreichend abzutöten, sodass es in der Regel zum Auswachsen von soliden Tumoren am Injektionsort kommt (79). Dies stellt ein viel benutztes Tumormodell in der Erforschung der T-Zell abhängigen antigenspezifischen Kontrolle von soliden Tumoren dar.

Es wurden zwei Versuchsgruppen gebildet. Eine Gruppe aus C57BL/6 Wt Mäusen sowie eine weitere aus C57BL/6 EBAG9^{-/-} Mäusen (hier und im Folgenden auf C57BL/6 Stammhintergrund). Den Tieren wurde jeweils am gleichen Tag s.c. $1,5 \times 10^5$ E.G-7 Zellen injiziert. Anschließend wurde das Tumorwachstum ab dem 7. Tag nach Injektion der Tumorzellen alle 2-3 Tage überprüft. Es wurden 2 Beobachtungsziele definiert: a) Beginn des detektierbaren Tumorwachstums als primärer Endpunkt b) als sekundärer Endpunkt Vergleich des Wachstumsverlaufs der Tumore, bis die ersten Mäuse abgetötet werden müssen, auch als Überleben definiert.

Am Tag 9 nach Applikation der Tumorzellen hatten 5/9 Wt und 3/7 EBAG9^{-/-} Tieren bereits Tumore entwickelt. Bis zum Tag 12 nach Injektion der Tumorzellen kam es bei 7/7 der EBAG9^{-/-} Mäuse und bei 7/9 der Wt Mäuse zu einem sicher feststellbaren Anwachsen der Tumorzellen. Die restlichen beiden Wt Mäuse entwickelten erst am Tag 14 und 16 schließlich Tumore. Am Tag 16 war mit 9/9 Wt und 7/7 EBAG9^{-/-} tumorpositiven Tieren der primäre Endpunkt des Versuches erreicht (Abb.8 A). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,6809$) zwischen Wt und EBAG9^{-/-} Tieren. Bei zwei der Wt Mäuse, welche nur kleine Tumore entwickelt hatten, kam es zum spontanen Regress und zur vollständigen Remission bis zum Ende des Versuches.

Nach Erreichen des primären Endpunktes des Versuches wurden die Tiere noch weitere 7 Tage beobachtet und das Tumorwachstum sowie das Überleben anhand des Tumolvolumens untersucht. Dadurch sollten etwaige Unterschiede im Wachstumsverlauf der Tumore zwischen Wt und EBAG9^{-/-} Mäusen aufgedeckt werden. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Abweichung der Tumorprogression zwischen den beiden Gruppen, exemplarisch an Tag 12, 16 und 21 getestet (Tag 12 $p=0,9945$; Tag 16 $p=0,5838$; und Tag 21 $p=0,6968$; Wt: $n=9$, EBAG9^{-/-}: $n=7$; Abb. 8 B). Zur Untersuchung hinsichtlich des Überlebens der beiden Gruppen wurde ein Tumolvolumen von 1000 mm^3 als Überlebensgrenze definiert. Dabei konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-} Tieren beobachtet werden ($p=0,4137$; Wt: $n=9$, EBAG9^{-/-}: $n=7$; Abb. 8 C).

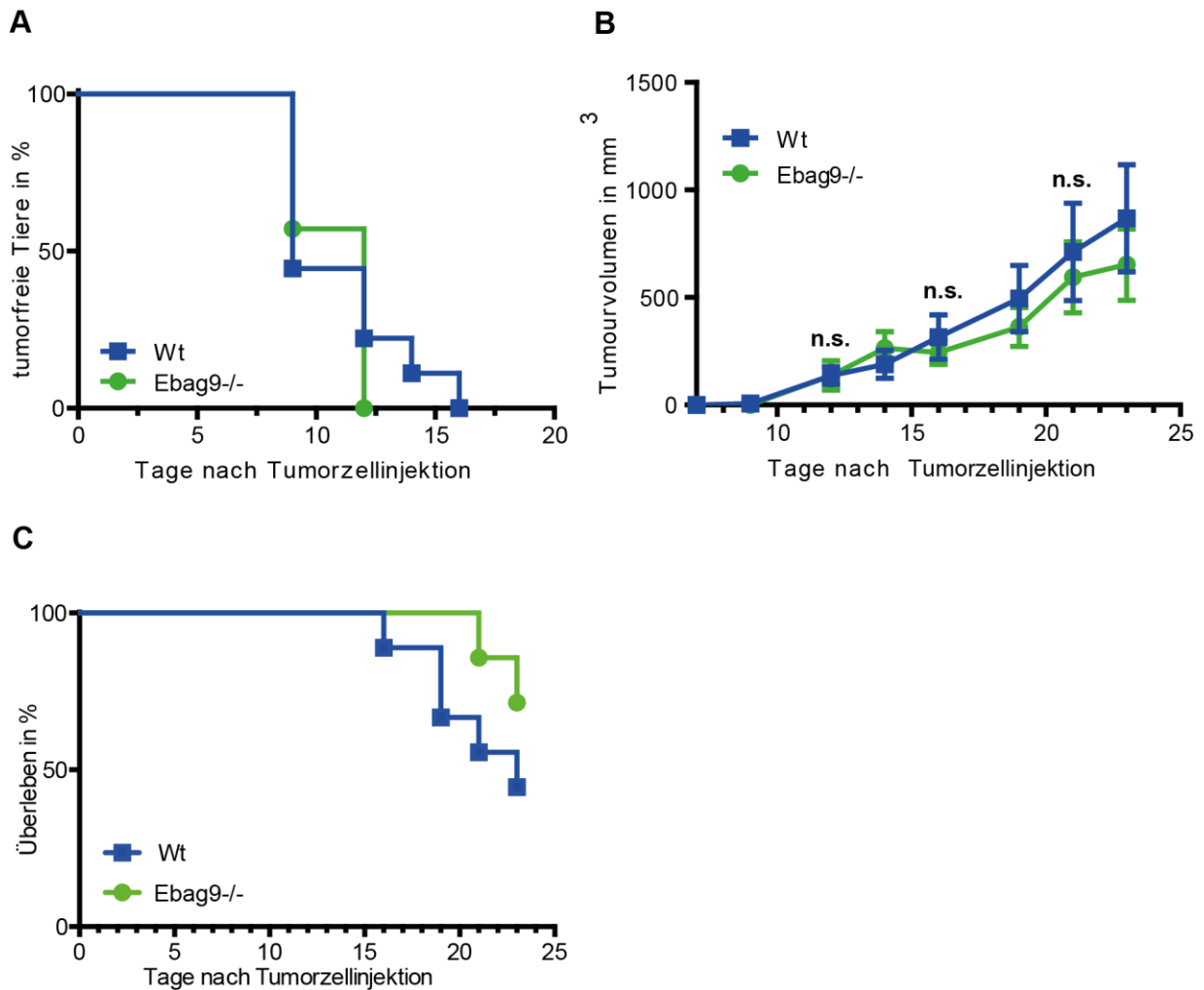


Abb. 8: Tumorzinzidenz, Tumorwachstum und Überleben in Wt und EBAG9^{-/-} Tieren

A) Tumorzinzidenz in Wt und EBAG9^{-/-} Tieren. Es wurden $1,5 \times 10^5$ E.G-7 Zellen s.c. appliziert. Anschließend wurde die Tumorzinzidenz mittels Palpation überprüft. Dargestellt ist die Tumorfreiheit definiert als das Fehlen von palpablen s.c. Knoten. WT: n=9 und EBAG9^{-/-}: n=7. Log-Rank Test: p=0,6809 **B)** Tumorwachstum in Wt und EBAG9^{-/-} Tieren. Das Größenwachstum wurde mittels Schiebelehre gemessen. Die Berechnung des Tumolvolumens erfolgte gemäß Formel im Methodenteil. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Wt: n=9 und EBAG9^{-/-}: n=7. Tag 23: 6/7 EBAG9^{-/-} da ein Tier bereits abgetötet. Student's t-Test: Tag 12 p=0,9945; Tag 16 p=0,5838; und Tag 21 p=0,6968 **C)** Überleben Wt vs EBAG9^{-/-}. Tod definiert als Erreichen eines Tumolvolumens von 1000 mm³. Wt: n=9 und EBAG9^{-/-}: n=7. Log-Rank Test p=0,2253.

Unter den gewählten Konditionen scheint die Defizienz an EBAG9 und die daraus resultierende verbesserte zytolytische Aktivität der CTLs (91) keinen Vorteil zu erbringen. Als eine mögliche Ursache für den fehlenden Vorteil der EBAG9^{-/-} Tiere mag die ursprünglich niedrige Frequenz an antigenspezifischen T-Zellen gegen die Tumorzellen eine Rolle spielen. Trotz nachgewiesener erhöhter zytolytischer Kapazität der EBAG9^{-/-} CTLs gegen hämatopoetische Zielzellen und nach Vakzinierung kann die Effektorantwort dem raschen Wachstum der im soliden Verband organisierten E.G-7 Tumorzellen möglicherweise nicht ausreichend folgen. Um diesen Einflussfaktor, nämlich eine geringe Frequenz an antigenspezifischen T-Zellen gegen die Tumorzellen näher zu untersuchen, wurden Experimente mit vakzinieren Tieren durchgeführt.

4.4 Abstoßung von E.G-7 Tumorzellen nach Vakzinierung

Ziel war es herauszufinden, ob durch Vakzinierung der Mäuse mittels Peptid-gepulster DCs die Abstoßung der Tumorzellen verbessert werden kann. Dabei wurde erwartet, dass CTLs von C57BL/6 EBAG9^{-/-} Mäusen das Anwachsen der E.G-7 Tumorzellen besser verhindern können als die CTLs von C57BL/6 Wt Mäusen.

Zu diesem Zweck wurden zwei Gruppen aus Wt Mäusen und EBAG9^{-/-} Mäusen gebildet. Um die Frequenz der antigenspezifischen CD8⁺-T-Zellen zu erhöhen, wurden die Tiere zweimal mittels s.c. Gabe von SIINFEKL gepulsten DCs ($2-3 \times 10^5$ DCs) gegen das von den E.G-7 Zellen exprimierte OVA Antigen immunisiert. Zwischen den einzelnen Impfungen sowie der ersten Applikation der Tumorzellen wurde je 3-4 Wochen Abstand eingehalten, um die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses zu ermöglichen. Anschließend wurden die Tiere dreimal mit steigenden Dosen E.G-7 Zellen (s.c. $1-2 \times 10^5$; 5×10^5 ; $5-6 \times 10^5$) konfrontiert (s. Abb. 9 A).

Primärer Endpunkt war das Auswachsen eines soliden Tumors. Die Mäuse wurden anfangs 2-3x wöchentlich kontrolliert. Später wurden die Kontrollintervalle verlängert. Beendet wurde der Versuch 6 Wochen nach der letzten Tumorzellgabe, da nicht mehr mit einem Auftreten von Tumoren gerechnet wurde. Bis zum Ende des Versuches kam es lediglich bei einer Wt Maus zum Auswachsen eines Tumors. Diese Maus wurde daraufhin abgetötet und fließt in die Auswertung des primären Endpunktes mit ein. Allerdings konnte sie später jedoch nicht mit den anderen zusammen durchflusszytometrisch analysiert werden. Bei der weiteren Aufarbeitung der Mäuse wurde bei einer EBAG9^{-/-} Maus von außen ein vergrößerte Lymphknoten getastet. Dieser stellte sich bei Präparation als tumorverdächtiges Gewebe heraus. Somit traten Tumore bei 1/8 C57BL/6 Wt und 1/8 C57BL/6 EBAG9^{-/-} Mäusen auf. Alle anderen Mäuse blieben im Beobachtungszeitraum und bis zur Aufarbeitung tumorfrei (s. Abb. 9 B).

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Tumorinzidenz zwischen der vakzinierten Wt und EBAG9^{-/-} Gruppe ($p=0,9624$).

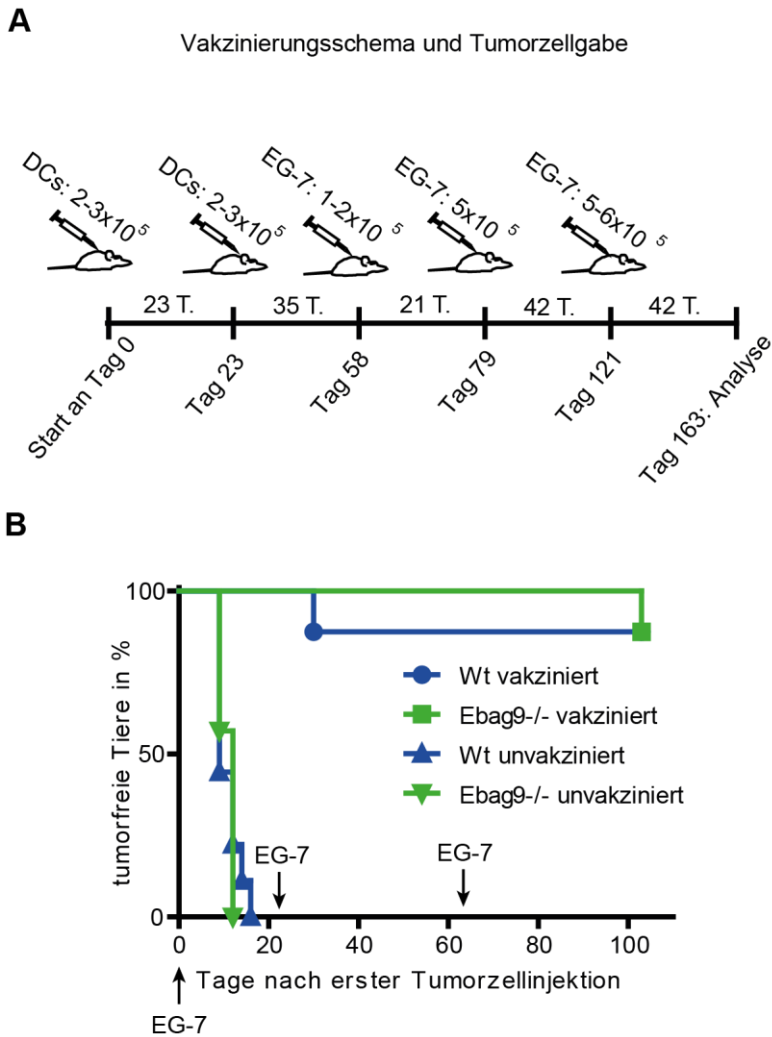


Abb. 9: Tumorzellinzidenz in vakzinierten Wt und EBAG9^{-/-} Mäusen

A) Vakzinierungsschema und Applikation der Tumorzellen. Es wurden zweimal $2-3 \times 10^5$ SIINFEKL gepulste DCs s.c. im Abstand von 23 Tagen verabreicht. Anschließend erfolgte dreimal die s.c. Injektion von E.G-7 Tumorzellen. Erste Gabe 35 Tage nach der 2. Impfung. Je Gruppe wurden $n=8$ Tiere behandelt. **B)** Tumorzellinzidenz der vakzinierten Tiere nach erster Gabe der E.G-7 Zellen. Es wurden je Gruppe $n=8$ Tiere ausgewertet. Zum Vergleich sind die nicht vakzinierten Tiere aus 4.3 mit aufgeführt: Wt: $n=9$ und EBAG9^{-/-}: $n=7$. Diese hatten nur E.G-7 Zellen zum Zeitpunkt 0 erhalten. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden vakzinierten Gruppen: Log-Rank Test: $p=0,9624$.

4.5 Analyse der Gedächtnis-T-Zellbildung in DC-vakzinierten Tieren

Nach dem Beenden des Versuches wurden Wt und EBAG9^{-/-} Tiere mittels Durchflusszytometrie auf mögliche Unterschiede in der antigenspezifischen Memoryfrequenz ihrer CTLs untersucht. Es wurde versucht die Zielpopulation der Memory-CTLs mittels einer Oberflächenfärbung für CD8 und CD44 kombiniert mit einer intrazellulären Färbung auf IFN- γ^+ nach antigenspezifischer Stimulation darzustellen. Dazu wurden die inguinalen Lymphknoten der Tiere, welche gleichzeitig die tumordrainierenden Lymphknoten darstellten, aufgearbeitet. Die Zellsuspensionen wurden über Nacht mit $5 \mu\text{g/ml}$ SIINFEKL und 10 U/ml IL-2 antigenspezifisch stimuliert und 3-4 h mittels BFA blockiert. Anschließend erfolgten die Färbung und Analyse am Durchflusszytometer (s. Abb. 10).

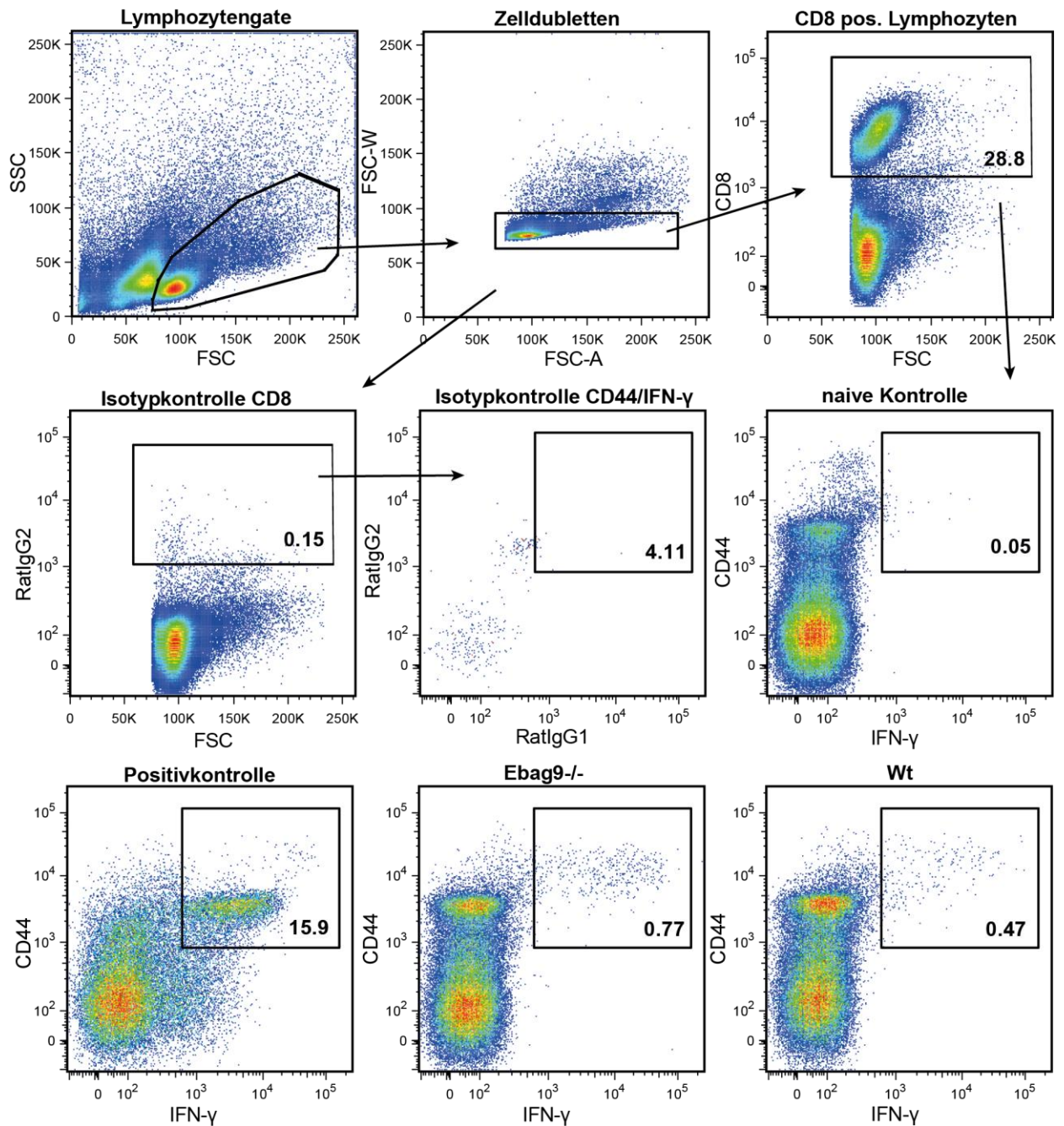


Abb. 10: Repräsentative Darstellung des Auswertungsprozesses zur Identifikation der CD8⁺/CD44⁺/IFN-γ⁺ Zellen

Analysiert wurden die beiden inguinalen Lymphknoten der vakzinierten Tiere. Die Lymphozytensuspensionen wurden über Nacht mit 5 µg/ml SIINFEKL und 10 U/ml IL-2 stimuliert. Am nächsten Tag wurde für 4 h BFA hinzugegeben und die Positivkontrolle mit BFA/PMA/Ionomycin behandelt. Anschließend erfolgte eine Oberflächen- und Intrazellulärfärbung. Bei der Auswertung wurde erst mittels Lymphozytengate und nach Ausschluss von Zelldubletten die Zielpopulation näher eingegrenzt. Anschließend wurden die CD8⁺-Zellen identifiziert und auf ihre Expression von CD44 und IFN-γ untersucht. Isotypkontrollen dienen zur Überprüfung von unspezifischem Färbeverhalten der verwendeten Antikörper. Die naive Kontrollmaus diente als Negativkontrolle für das Setzen der Gates auf die antigenerfahrenen Zellen. Die hier ermittelten Frequenzen an CD8⁺/CD44⁺/IFN-γ⁺ Zellen wurden zur näherungsweisen Berechnung der absoluten Anzahl antigenerfahrener CTLs anhand der Zellzahl nach Präparation verwendet. Die Zahlen in den Gates geben den prozentualen Anteil der Zielpopulation wieder. Es wurden naive Kontrollen: n=4, Wt n=7 und EBAG9^{-/-} n=8 Tiere ausgewertet.

Anhand der Anzahl der aus den inguinalen Lymphknoten präparierten Zellen und dem prozentualen Anteil der CD8⁺/CD44⁺/IFN-γ⁺ Memory CTLs wurde näherungsweise die absolute Zahl an antigenspezifischen CD8⁺/CD44⁺/IFN-γ⁺ Gedächtniszellen für jedes Tier errechnet. Es wurden

keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl nach Präparation der inguinalen Lymphknoten ($p=0,0739$), der Frequenz der antigenspezifischen CTLs ($p=0,1094$) sowie der errechneten absoluten Anzahl an antigenspezifischen CTLs ($p=0,9334$) zwischen EBAG9^{-/-} und Wt Mäusen entdeckt (s. Abb. 11).

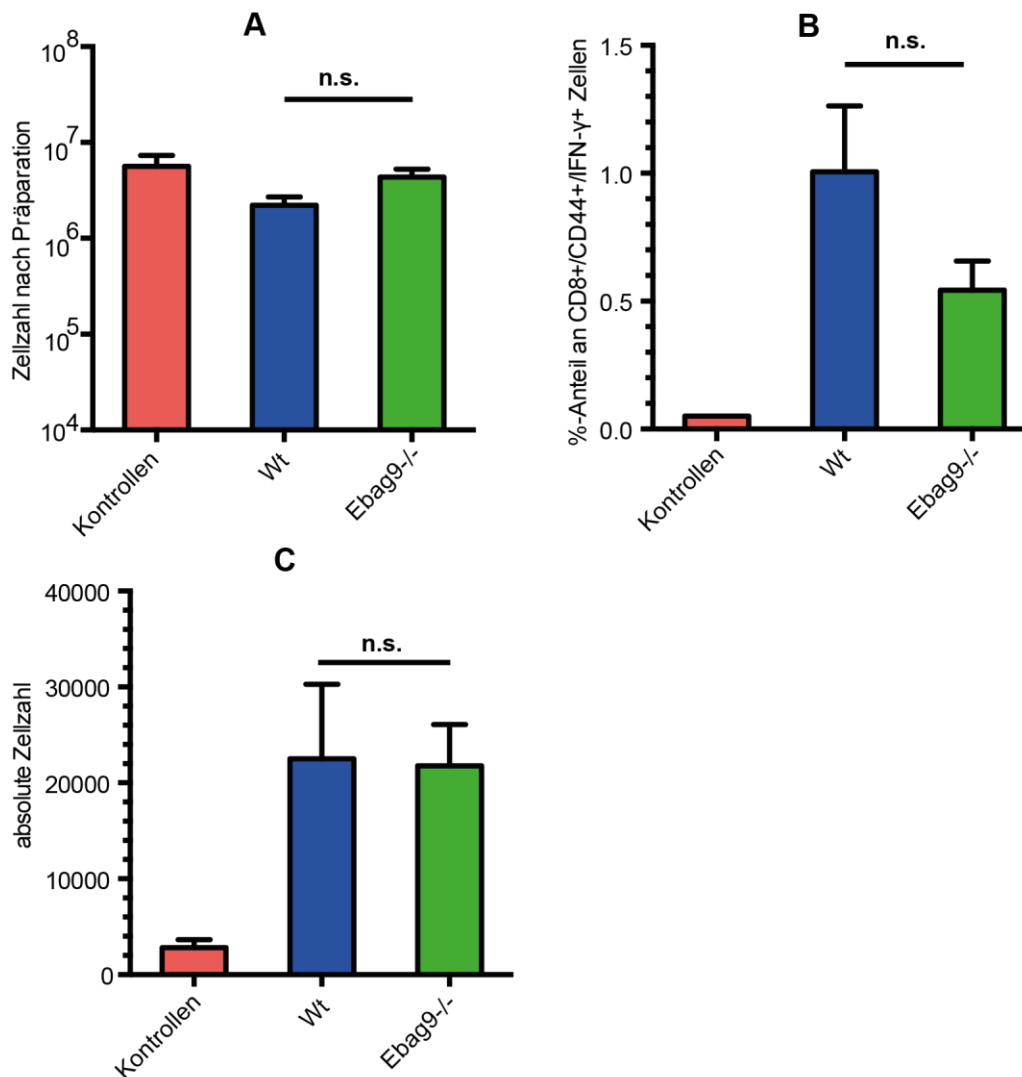


Abb. 11: Quantifizierung der CD8⁺-Effektorzellpopulation nach Vakzinierung und Tumorapplikation

A) Zellzahl nach der Präparation der inguinalen Lymphknoten. Kein signifikanter Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-}, unpaired t-test: $p=0,0739$ B) Frequenzen der antigenspezifischen CD8⁺-Zellen. Bestimmt durch durchflusszytometrische Analyse, siehe oben Abb. 10. Kein signifikanter Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-}, unpaired t-test: $p=0,1094$ C) Absolute Anzahl an antigenspezifischen CTLs. Errechnet aus Zellzahl nach Präparation und den durchflusszytometrisch bestimmten Frequenzen. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-} Tieren, unpaired t-test: $p=0,9334$. Kontrollen: $n=4$, Wt: $n=7$ und EBAG9^{-/-}: $n=8$. $n=1$ Versuch.

Unter den gewählten Bedingungen und mit den verwendeten Analysemethoden bestand in vakzinieren EBAG9^{+/+} und vakzinieren EBAG9^{-/-} Mäuse eine vergleichbar potente Immunität gegenüber E.G-7 Tumorzellen. In beiden Populationen wurde durch die Vakzinierung die Bildung eines funktionierenden immunologischen Gedächtnisses induziert, welches dauerhaft in der Lage war, das Auswachsen von s.c. injizierten E.G-7 Zellen zu verhindern. Auch gelang es, nach Beendigung

des Versuches mittels Durchflusszytometrie dieses immunologische Gedächtnis gegen das immunogene Peptidantigen aus E.G-7 Zellen nachzuweisen. Bei den Kontrolltieren, welche das Antigen nie gesehen hatten, kam es nach Stimulation zu keiner Reaktion und somit zu fehlender IFN- γ Produktion. In diesem Langzeitversuch konnten keine Unterschiede in der Frequenz der antigenspezifischen CTLs im Gedächtniszellpool zwischen den beiden untersuchten Populationen gefunden werden.

4.6 Polyklonaler Transfer von zytotoxischen T-Zellen mit DC-Unterstützung

Aus den vorherigen Versuchen konnte entnommen werden, dass es keine Unterschiede im Anwachsen sowie in der Progression von E.G-7 Tumoren zwischen Wt und EBAG9^{-/-} C57BL/6 Empfängertieren zu geben scheint. Es kommt nicht zur spontanen Abstoßung der s.c. wachsenden soliden Tumore. Dies könnte darauf beruhen, dass in beiden Gruppen in antigenunerfahrenen Mäusen die Frequenzen der antigenspezifischen T-Zellen zu gering sind, um einen messbaren Antitumoreffekt zu erzeugen. Die alleinige Deletion von EBAG9 könnte diesen Umstand nicht oder nicht ausreichend kompensieren. In 4.4 wurde beobachtet, dass eine Vakzinierung mit DCs ein sehr potentes Mittel ist, um einen erfolgreichen Antitumorschutz in EBAG9^{+/+} und EBAG9^{-/-} Mäusen zu vermitteln. Jedoch kam es aufgrund des guten Erfolges der Vakzinierung in keiner Gruppe zu einem vermehrten Auswachsen der Tumore. Ein Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-} Mäusen konnte somit nicht dargestellt werden.

Um mögliche Unterschiede zwischen EBAG9-exprimierenden und defizienten T-Zellen im Rahmen der Kontrolle des Auswachsens solider Tumore weiter zu untersuchen, sollte ein polyklonaler T-Zelltransfer in Kombination mit einer DC-Peptidvakzinierung durchgeführt werden. Die DC-Vakzinierung sollte hierbei die Frequenzen der antigenspezifischen T-Zellen durch effektives Priming verbessern helfen.

Am Tag 6 nach Inokulation der Tumorzellen in Wt Empfängertiere wurden SIINFEKL-gepulste und zusätzlich mittels LPS aktivierte DCs s.c. appliziert. Am darauffolgenden Tag erhielten die Tiere, nach Einteilung in größenangepasste Gruppen, i.v. die polyklonalen T-Zellen aus Wt oder EBAG9^{-/-} Donortieren. Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen wäre alleine auf den Transfer von EBAG9^{-/-} CTLs vs Wt CTLs zurückzuführen.

Da bei einem polyklonalen T-Zelltransfer ein geringerer Effekt als bei einem monoklonalen Transfer zu erwarten war, wurde früh nach Tumorinduktion und mit hoher T-Zellzahl therapiert. Die CTLs wurden im Rahmen des polyklonalen Transfers nicht *in vitro* voraktiviert, sondern direkt nach Entnahme aus der Milz mittels MACS aufgereinigt und injiziert. Abb. 12 und Tab. 1 zeigen den Aufbau des Transferexperiments, bei dem nur einmal polyklonale CTLs übertragen wurden.

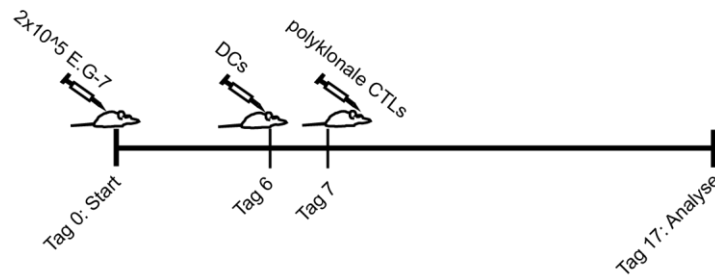


Abb. 12: Aufbau des polyklonalen Transferversuches mit einer CTL-Gabe

Gruppen	Tag 6	Tag 7
EBAG9 ^{-/-} : n=5	2-3x10 ⁵ DCs	4x10 ⁶ EBAG9 ^{-/-} polyklonale CTLs
Wt: n=4	2-3x10 ⁵ DCs	2x10 ⁶ Wt polyklonale CTLs
Kontrollen: n=4	2-3x10 ⁵ DCs	Kein Transfer

Tabelle 1: Zelltransfer und Gruppeneinteilung für die einmalige polyklonale CTL-Gabe

Für beide Gruppen war eine Dosis von 4-5x10⁶ CTLs geplant. Aus technischen Gründen konnte diese für die Wt Gruppe leider nicht durchgeführt werden. Die Dosis der Ebag9^{-/-} Gruppe wurde bewusst nicht angepasst, um die zu transferierende CTL-Zahl für eine Wiederholung besser einschätzen zu können. Dies schränkt die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen leider erheblich ein.

Das durchschnittliche Tumervolumen betrug zum Zeitpunkt des T-Zelltransfers: 166 mm³ in der Wt, 234 mm³ in der EBAG9^{-/-} sowie 258 mm³ in der Kontrollgruppe.

Ursprünglich war für beide Gruppen eine T-Zelldosis von 4-5x10⁶ CTLs geplant. Aus technischen Gründen konnte diese Dosis am Transfertag für die Wt Gruppe nicht durchgeführt werden. Da unklar war, ob eine Dosis von 2x10⁶ polyklonaler CTLs im gewählten Modell eine für die Analyse ausreichende biologische Antitumoraktivität besitzt, wurde bewusst keine Dosisanpassung der EBAG^{-/-} Gruppe durchgeführt. Dies schränkt zwar die direkte Vergleichbarkeit der beiden Gruppen ein, ermöglicht jedoch eine bessere Einschätzung der für den Transfer nötigen CTL-Mengen für eine Wiederholung des Versuches.

Insgesamt konnte nur ein moderates Ansprechen bei 3/5 EBAG9^{-/-} Tieren und 2/4 der Wt Gruppe beobachtet werden. Die unbehandelten Kontrollen wurden nur bis Tag 14 (s. Abb. 13 A) gemessen, da 3 von 4 Tieren aus Tierschutzgründen abgetötet werden mussten. Die Kontrollgruppe konnte daher leider nicht mehr sinnvoll bezüglich des Überlebens ausgewertet werden.

Zwischen den Therapiegruppen konnte beim Tumorwachstum kein Unterschied festgestellt werden. Des Weiteren bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden polyklonalen Transfergruppen (p=0.8496) bezüglich des Überlebens (s. Abb. 13 B).

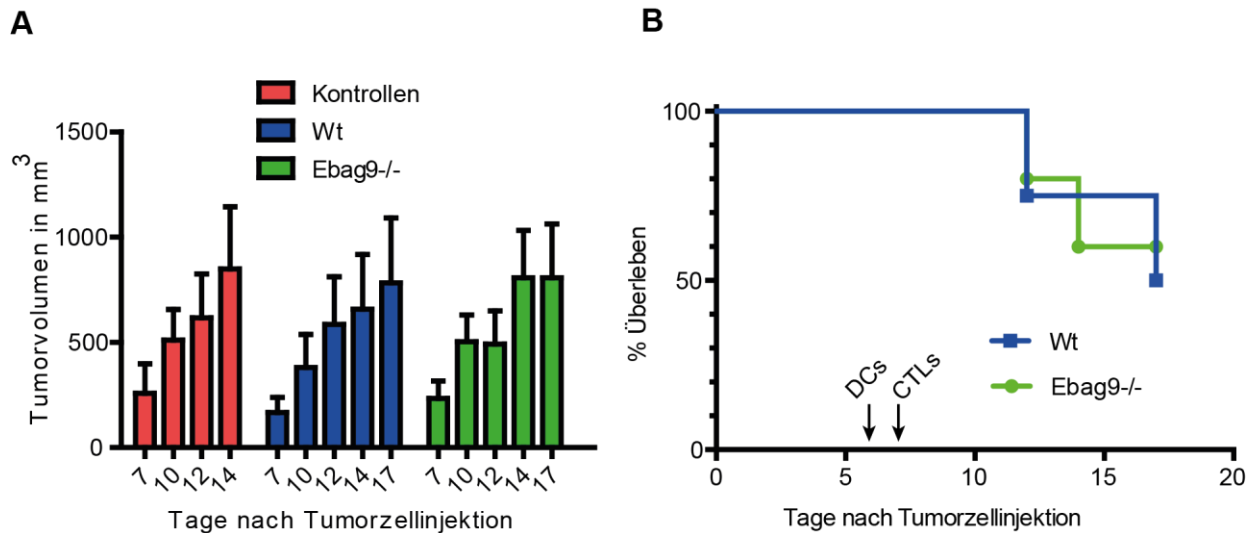


Abb. 13: Tumorwachstum und Überleben bei einmaligem DC-unterstütztem Transfer polyklonaler Wt und EBAG9^{-/-} CTLs
 Es wurden s.c. Tumore mittels Injektion von 2×10^5 E.G-7 Zellen (=Tag 0) gesetzt. Anschließend erfolgte die s.c. Gabe von SIIN-FEKL gepulsten DCs an Tag 6 und der Transfer der polyklonalen CTLs an Tag 7. Die Tumorprogression wurde mittels Palpation und Schiebelehre bestimmt. Als Grenzwert für das Überleben wurden 1000 mm³ Tumorumfängen definiert. Die Vergleichbarkeit der beiden Versuchsgruppen ist aufgrund der unterschiedlich übertragene Zellzahlen leider stark eingeschränkt.
A) Tumorwachstum der transferten Tiere und der intrinsischen Kontrollen des Versuches. EBAG9^{-/-}: n=5, Wt: n=4 und Kontrollen: n=4. Mittleres Tumorumfang mit SEM dargestellt. **B)** Überleben der polyklonaltransferten Tiere. EBAG9^{-/-}: n=5, Wt: n=4. Kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Transfergruppen: Log-Rank: p=0.8496. Die Pfeile markieren jeweils den Zeitpunkt der DC und CTL-Gabe.

Da bei einem einmaligen DC-gestützten polyklonalen Transfer in beiden Gruppen kaum ein Antitumoreffekt festgestellt werden konnte wurde beschlossen, den Versuch mit einer höheren Anzahl transferten CTLs im Rahmen eines zweiten Transfers zu wiederholen. Durch die erhöhte Zellzahl sollte ein Ansprechen auf die Therapie besser beobachtet und verglichen werden können. Dies sollte verhindern, einen möglichen Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-} transferten Tieren aufgrund des geringen Therapieansprechens zu übersehen.

Die Wiederholung wurde mit zweimaligem DC-gestützten Transfer polyklonaler CTLs durchgeführt und nach den gleichen Kriterien ausgewertet. Es wurden 2 Gruppen gebildet, welche an Tag 6 und 11 jeweils DCs erhielten. An Tag 7 und 12 erfolgte der Transfer von polyklonalen EBAG9^{-/-} oder Wt CTLs. Als Empfänger dienten Wt C57BL/6 Tiere mit E.G-7 Tumoren. Für den genauen Versuchsaufbau siehe Abb. 14 und Tab. 2.

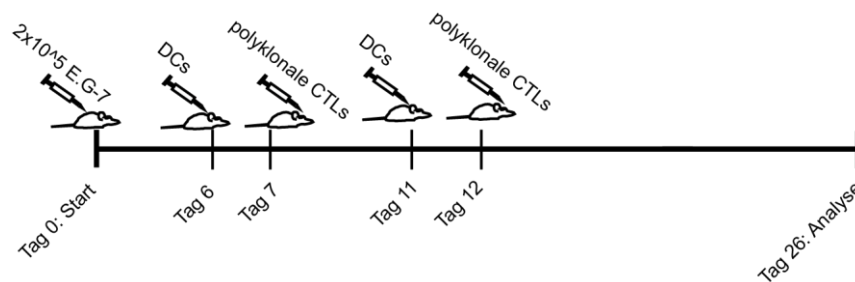


Abb. 14: Versuchsaufbau des polyklonalen Transfers mit zweimaliger CTL-Gabe

Gruppen	Tag 6	Tag 7	Tag 11	Tag 12
---------	-------	-------	--------	--------

EBAG9 ^{-/-} : n=5	2-3x10 ⁵ DCs	5x10 ⁶ polyklonale CTLs	2-3x10 ⁵ DCs	3,5x10 ⁶ polyklonale CTLs
Wt: n=5	2-3x10 ⁵ DCs	5x10 ⁶ polyklonale CTLs	2-3x10 ⁵ DCs	1,6x10 ⁶ polyklonale CTLs

Tabelle 2: Zelltransfer und Gruppeneinteilung des zweimaligen polyklonalen Transfers

Aufgrund von Problemen mit der MACS-Aufreinigung der CD8⁺-Zellen wurden an Tag 12 mehr Ebag9^{-/-} CTLs übertragen, so dass die Vergleichbarkeit ab Tag 12 eingeschränkt ist. Es wurde leider nicht beachtet die Menge der polyklonalen Ebag9^{-/-} CTLs an die der Wt CTLs anzupassen. Es waren 5x10⁶ CTLs für den 2. Transfer beider Gruppen vorgesehen.

Die Tumore waren zum Zeitpunkt des ersten Transfers bei allen Tieren gut palpabel, jedoch zu klein um sinnvoll gemessen zu werden (großer zu erwartender Messfehler). Das mittlere Tumorumfang betrug bei der ersten Messung am Tag 10: Wt: 249 mm³; EBAG9^{-/-}: 107 mm³.

Es war für beide Gruppen eine einheitliche Dosis von 5x10⁶ CTLs beim zweiten Transfer geplant, welche aus technischen Problemen nicht einheitlich durchgeführt werden konnte. Dies schränkt die direkte Vergleichbarkeit der beiden Gruppen ab Tag 12 ein.

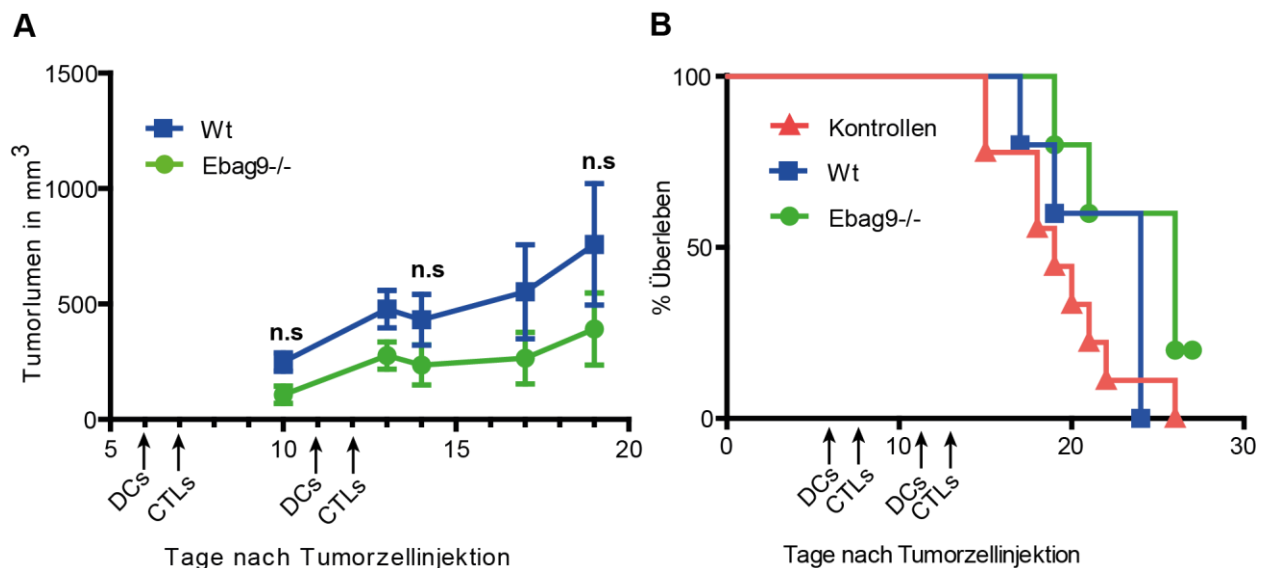


Abb. 15: Tumorwachstum und Überleben nach zweimaligem polyklonalen Transfer von Wt und EBAG9^{-/-} CTLs mit DC-Unterstützung

Es wurden s.c. Tumore mittels Injektion von 2x10⁵ E.G-7 Zellen (=Tag 0) gesetzt. Anschließend erfolgte die s.c. Gabe von SIIN-FEKL gepulsten DCs an Tag 6 und 11, sowie der Transfer der polyklonalen CTLs an Tag 7 und 12. Die Tumorprogression wurde mittels Palpation und Schiebelehre bestimmt. Als Grenzwert für das Überleben wurden 1000 mm³ Tumorumfang definiert. Wt: n=5, EBAG9^{-/-}: n=5. Kontrollen aus 4.2.2 mit abgebildet: n=9 aus 6 verschiedenen Experimenten. Da im Rahmen des 2. Transfers nicht exakt gleiche Mengen an CTLs übertragen wurden ist die Vergleichbarkeit ab Tag 12 nur eingeschränkt möglich.

A) Tumorprogression der beiden Gruppen. Dargestellt sind mittleres Tumorumfang ±SEM. Obwohl zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied besteht, so zeigt sich doch ein Trend zugunsten der EBAG9^{-/-} transferierten Tiere. Mittleres Tumorumfang: Tag 10: Wt 249 mm³, EBAG9^{-/-} 107 mm³; Tag 14: Wt 432 mm³, EBAG9^{-/-} 236 mm³; Tag 19: Wt 758 mm³, EBAG9^{-/-} 392 mm³. Mann-Whitney Test: Tag 10 p=0,0556, Tag 14 p=0,3095, Tag 19 p=0,4206 **B)** Vergleich des Überlebens. Als Kontrollen wurde die unbehandelte Referenzgruppe aus 4.2.2 mit abgebildet. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den polyklonaltransferierten Gruppen: Log-Rank Test: p=0,1516.

Es wurde ein Ansprechen bei 5/5 der EBAG9^{-/-} und 5/5 der Wt Gruppe gesehen. Dieses äußerte sich in einer verlangsamt Progression oder gar leichter Reduktion des Tumorumfangs. Beim direkten Vergleich des mittleren Tumorumfangs an Tag 10 (Wt 249 mm³; EBAG9^{-/-} 107 mm³), 14 (Wt 432 mm³; EBAG9^{-/-} 236 mm³) und 19 (Wt 758 mm³; EBAG9^{-/-} 392 mm³) der beiden Gruppen zeigte sich grafisch eine Tendenz in Richtung der mit EBAG9^{-/-} T-Zellen transferierten

Tiere. Diese erreichte initial beinahe ein signifikantes Niveau (Tag 10 $p=0,0556$), verlor sich im Verlauf jedoch (Tag 14 $p=0,3095$; Tag 19 $p=0,4206$). Der Effekt war bereits am Tag 10 sichtbar, zu diesem Zeitpunkt hatten alle Tiere noch die gleiche Therapiedosis erhalten (s. Abb. 15 A). Die Aussage bezüglich des Trends zugunsten der EBAG9^{-/-} CTLs ist aufgrund der nicht exakt gleich transferierten CTL-Mengen danach (ab Tag 12) jedoch nur eingeschränkt möglich.

Beim Überleben zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden polyklonal transferierten Gruppen ($p=0,1516$; s. Abb. 15 B). In beiden Gruppen wurde jeweils ein Tier aus der Auswertung genommen, da diese aus technischen Gründen nicht doppelt transferiert werden konnten.

Insgesamt zeigte sich im Rahmen der beiden polyklonalen Transferexperimente bei hohem CTL-/Donortier-Bedarf ein vergleichsweise geringer biologischer Antitumoreffekt. Von weiteren Wiederholungen wurde daher abgesehen. Stattdessen wurden monoklonale Transferexperimente durchgeführt um einen möglichen Vorteil der EBAG9^{-/-} CTLs bei stärkerer biologischer Antitumoraktivität besser darstellen zu können.

4.7 Analyse der Memory-Bildung nach polyklonalem adoptiven T-Zelltransfer

Nach dem Terminieren der polyklonalen adoptiven Transferexperimente wurde versucht, tumorspezifische Effektorzellen in den Tieren zu detektieren. Es wurde analysiert, ob diese sich in ihrer Anzahl für Wt und EBAG9^{-/-} T-Zellen transferierte Tiere unterschieden. Eine höhere Anzahl an T-Effektorzellen in den mit EBAG9-defizienten CTLs transferierten Mäusen würde für eine bessere Expansion und Aktivierung der EBAG9^{-/-} T-Zellen sprechen.

Es wurden dazu die inguinalen Lymphknoten nach Ende des Versuches aufgearbeitet und auf die Bildung von CD8⁺/CD44⁺/IFN- γ ⁺ bzw. CD8⁺/IFN- γ ⁺ T-Effektorzellen untersucht. Dabei wurde wie in 4.5 beschrieben vorgegangen. Die Tiere wurden in Durchgängen aus je 3-4 Tieren analysiert und anschließend zur Auswertung für den jeweiligen Versuch zusammengefasst, um eine gute Handhabbarkeit bei der Färbung zu gewährleisten. Es wurde auf Unterschiede der absoluten Anzahl oder des prozentualen Verhältnis der T-Effektorzellen zwischen Wt und EBAG9^{-/-} transferierten Tieren geachtet. Naive Mäuse, welche noch nie das Tumorantigen gesehen hatten, wiesen keine spezifischen CTLs auf. In antigenerfahrenen Wt und EBAG9^{-/-} Tieren war klar die Bildung von SIINFEKL-spezifischen T-Zellen zu erkennen.

Es konnte allerdings kein Unterschied in der Frequenz und absoluten Anzahl an antigenspezifischen T-Zellen zwischen Wt und EBAG9^{-/-} transferierten Tieren gefunden werden. Es muss hierbei auch berücksichtigt werden, dass in den polyklonalen Transferexperimenten nicht exakt gleiche Zellmengen im Rahmen der ATzT übertragen wurden. Dies schränkt die Aussagekraft im

direkten Vergleich zwischen der Wt Gruppe sowie der EBAG9^{-/-} Gruppe ein. Vor allem im Falle des einmaligen polyklonalen Transfers besteht ein verhältnismäßig großer Unterschied (doppelt so viele EBAG9^{-/-} CTLs wie Wt CTLs). Dieser zeigt sich auch grafisch in Abb. 16 B und C durch eine höhere Anzahl antigenspezifischer CTLs in der EBAG9^{-/-} Gruppe, führt jedoch zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Die Deletion von EBAG9^{-/-} scheint damit zumindest in der Primärantwort einerseits keinen wesentlichen Proliferationsvorteil zu bieten, andererseits auch keinen Nachteil für die Generierung einer Immunantwort darzustellen. Sowohl in Wt als auch in EBAG9^{-/-} Tieren ließen sich vergleichbare Frequenzen an Effektor-CTLs entdecken. Ein signifikanter Unterschied konnte in beiden polyklonalen Transferexperimenten nicht detektiert werden (s. Abb. 16). Es ist allerdings stark einzuschränken, dass die Deutung einer Gedächtniszellbildung nur 2-3 Wochen nach adoptivem T-Zelltransfer noch keine endgültigen Schlüsse zulässt, da allgemein frühestens nach mehr als 6 Wochen von einer stabilen Gedächtniszellpopulation auszugehen ist. Daher ist die Messung einer CD44-positiven Population eher auf einen aktuellen Aktivierungszustand hinweisend.

Bei dem Versuchsansatz mit zweimaligem Transfer gab es in der Wt und EBAG9^{-/-} Gruppe je eine Maus, welche nur einmal transferiert werden konnte. Diese Tiere wurden für die Analyse auf antigenspezifische Effektorzellen mit ausgewertet.

Bei einmaligem polyklonalem Transfer von Wt und EBAG9^{-/-} CTLs mit DC-Vakzinierung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Auch bei zweimaligem polyklonalem Transfer von Wt und EBAG9^{-/-} CTLs mit DC-Vakzinierung bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (s. Tabelle 3).

Experiment	Gesamtzellzahl nach Präparation der inguinalen Lymphknoten	Frequenz der antigenspezifischen CTLs	Errechnete absolute Anzahl an antigenspezifischen CTLs
Einmaliger polyklonaler Transfer	p=0,4127	p=0,3252 CD8 ⁺ /CD44 ⁺ /IFN- γ ⁺	p=0,1111
Zweimaliger polyklonaler Transfer	p=0,1450	p=0,1905 CD8 ⁺ /IFN- γ ⁺	p=0,7302

Tabelle 3: Analyse der Effektorzellpopulation nach polyklonalem Transfer von CTLs

Dargestellt sind die Daten aus den beiden polyklonalen Transferexperimenten. Es wird jeweils die Wt transferierte Gruppe mit der EBAG9^{-/-} transferierten Gruppe verglichen. Für die Analysen wurde der Mann Whitney Test verwendet. Für den Ansatz mit einmaligem polyklonalem Transfer wurden: n=4, EBAG9^{-/-}: n=5 Tiere ausgewertet. Für den zweimaligen polyklonalen Transfer wurden: n=6, EBAG9^{-/-}: n=6 für die Zellzahl nach Präparation der Lymphknoten und Wt: n=4, EBAG9^{-/-}: n=5 für die Frequenz und absolute Anzahl ausgewertet. Man berücksichtige die in 4.6 erwähnten Unterschiede an transferierten CTLs in den beiden Gruppen, was nur eingeschränkte Aussagen im direkten Vergleich zulässt.

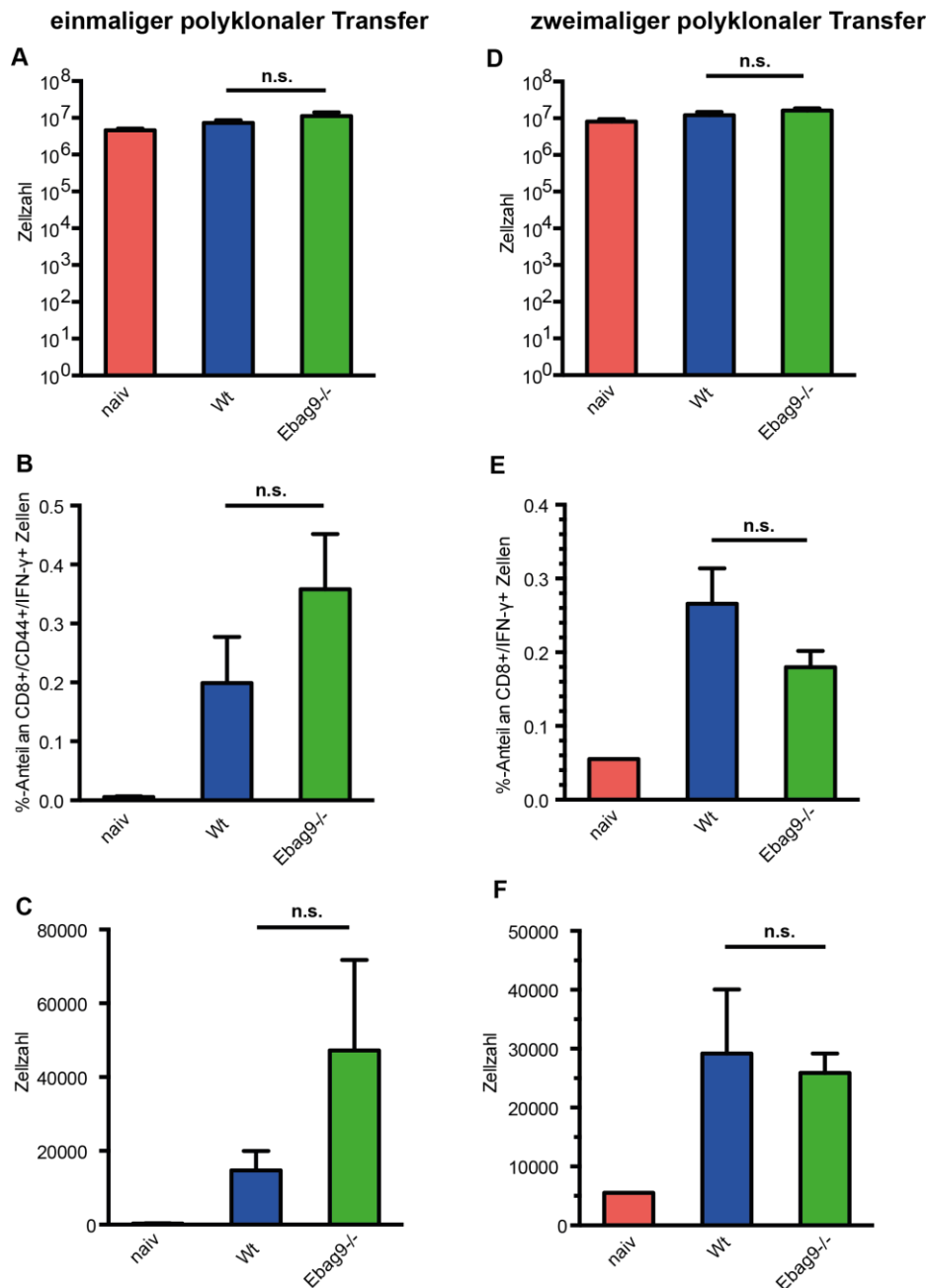


Abb. 16: Quantifizierung der CD8-Effektorzellpopulation nach einmaligem (A, B, C) und zweimaligem (D, E, F) polyklonalem CD8⁺-T-Zell Transfer mit DC-Vakzinierung

Es wurden die inguinalen Lymphknoten bds. der polyklonal CTL transferierten sowie DC-vakzinieren Tiere aufgearbeitet. Als naive Kontrolle wurden Tiere verwendet, welche weder Tumorzellen, CTLs noch DCs erhalten hatten. Die Zellsuspensionen wurden über Nacht mit 5 µg SIINFEKL/ml und 10 U/ml IL-2 stimuliert. Danach folgte eine Inkubation für 3-4 h in BFA und SIINFEKL 5 µg/ml. Als Positivkontrollen wurden mittels BFA/Ionomycin/PMA stimulierte, antigenerfahrene Lymphozytensuspensionen eingesetzt. Anschließend erfolgten die FACS-Färbung und Analyse im Durchflusszytometer. Dargestellt sind jeweils Mittelwert mit SEM. Aufgrund unterschiedlich transferierter CTL-Mengen ist nur ein eingeschränkter direkter Vergleich möglich.

A) Gesamtzahl aller Zellen nach Präparation der inguinalen Lymphknoten bei einmaligem polyklonalem Transfer von Wt und EBAG9^{-/-} CTLs mit DC-Vakzinierung. Naive Kontrolle: n=3, Wt: n=4, EBAG9^{-/-}: n=5. **B)** Frequenz an antigenspezifischen CTLs bestimmt durch Analyse von CD8⁺/CD44⁺/IFN-γ⁺ CTLs bei einmaligem polyklonalem Transfer von Wt und EBAG9^{-/-} CTLs mit DC-Vakzinierung. Naive Kontrolle: n=3, Wt: n=4, EBAG9^{-/-}: n=5. **C)** Näherungsweise berechnete absolute Anzahl an antigenspezifischen CTLs bei einmaligem polyklonalem Transfer von Wt und EBAG9^{-/-} CTLs mit DC-Vakzinierung. Naive Kontrolle: n=3, Wt: n=4, EBAG9^{-/-}: n=5. **D)** Gesamtzahl aller Zellen nach Präparation der inguinalen Lymphknoten bei zweimaligem polyklonalem Transfer von Wt und EBAG9^{-/-} CTLs mit DC-Vakzinierung. Naive Kontrolle: n=3, Wt: n=6, EBAG9^{-/-}: n=6. **E)** Frequenz an antigenspezifischen CTLs bestimmt durch Analyse auf CD8⁺/IFN-γ⁺ CTLs. Es wurde ein zweimaliger polyklonaler Transfer von Wt und EBAG9^{-/-} CTLs sowie DC-Vakzinierung durchgeführt. Naive Kontrolle: n=1, Wt: n=4 und EBAG9^{-/-}: n=5. **F)** Näherungsweise berechnete absolute Anzahl an antigenspezifischen CTLs bei zweimaligem polyklonalem Transfer von Wt und EBAG9^{-/-} CTLs mit DC-Vakzinierung. Naive Kontrolle: n=1, Wt: n=4 und EBAG9^{-/-}: n=5.

4.8 Kontrolle der OT-I Tiere auf Expression des OT-I-Rezeptors

Für die monoklonalen Transferversuche und Zuchtplanung wurden die verfügbaren Mäuse darauf kontrolliert, ob der gewünschte transgene TZR exprimiert wurde. Dazu wurde den Tieren durch retroorbitale Punktion 300-500 μ l Blut entnommen und mittels Durchflusszytometrie auf die Frequenz der $CD8^+$ / $OT-I^+$ T-Zellen untersucht. OT-I TZR^+ zytotoxische Lymphozyten können dadurch erkannt werden, dass sie im FACS $CD8^+$ / $TZRV\alpha_2^+$ / $TZRV\beta_{5.1}^+$ sind. Zur raschen Identifikation von transgenen Tieren ist es jedoch ausreichend, für die Marker $CD8^+$ / $TZRV\alpha_2^+$ Zellen im peripheren Blut zu färben.

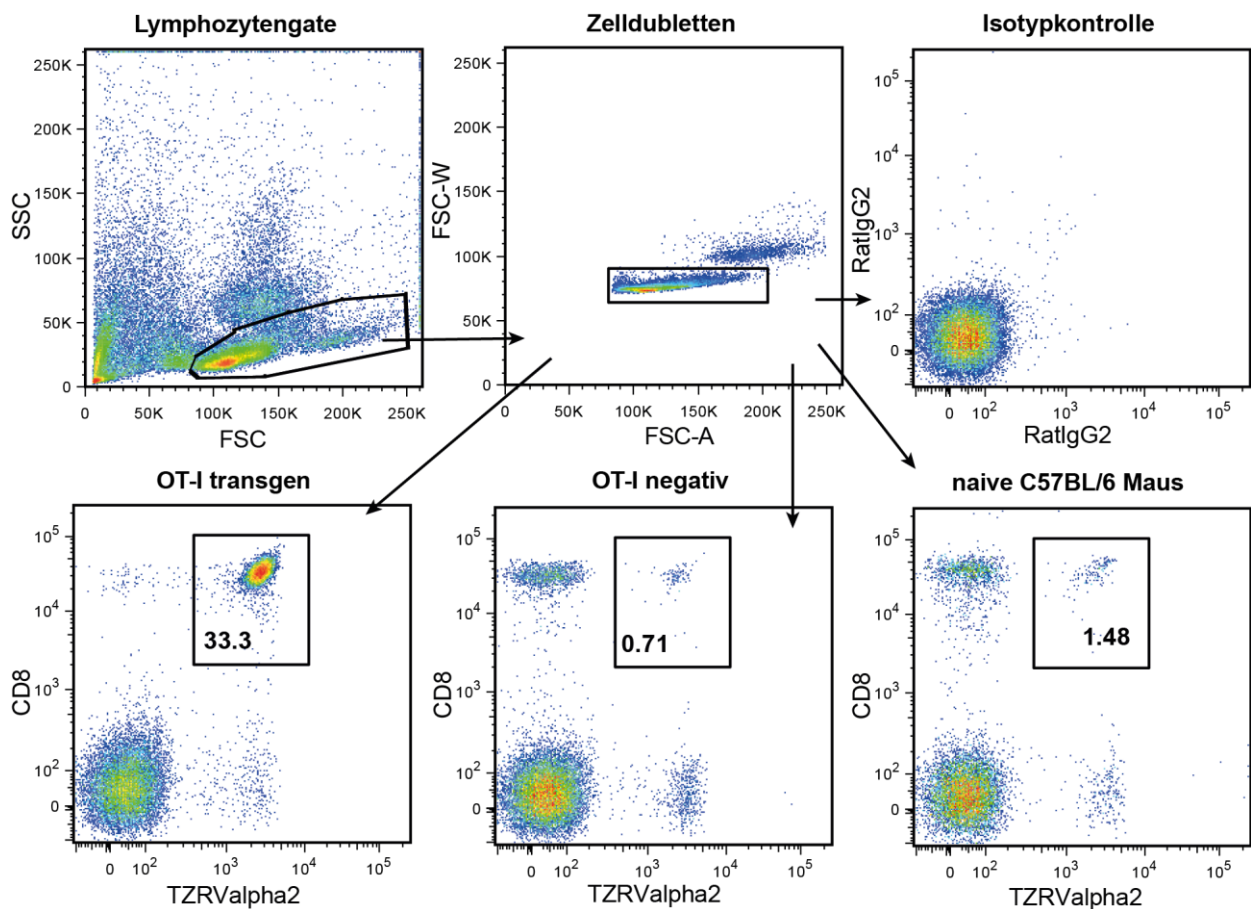


Abb. 17: Repräsentative Darstellung für das Screening der OT-I transgenen Mäuse im Blut

Es wurde Blut der Tiere wie oben und in Methoden beschrieben gewonnen und aufbereitet. Anschließend erfolgte die Analyse der CTLs bezüglich ihrer OT-I Expression im Durchflusszytometer. Die spezifische OT-I/TZR-Färbung wurde mit einer $CD8$ / $TZRV\alpha_2$ Doppelfärbung durchgeführt. Mittels Lymphozytengate und dem Ausschluss von Zelldubletten wurde die Zielpopulation initial eingegrenzt. Anschließend erfolgte die Darstellung der $CD8^+$ / $TZRV\alpha_2^+$ Zielpopulation. Eine Isotypkontrolle in den entsprechenden Farben wurde zum Ausschluss von unspezifischem Färbeverhalten der verwendeten Antikörper mitgeführt. Dargestellt sind eine OT-I transgene Maus und eine OT-I negative Maus (entspricht Wt Maus) aus der Zucht. Zum Vergleich ist eine naive C57BL/6 Wt Maus abgebildet. Die Prozente in den Gates geben den Anteil der $CD8^+$ / $TZRV\alpha_2^+$ Zellen an allen Lymphozyten nach Ausschluss der Doubletten an.

Das $V\alpha_2$ -Segment kommt mit einer natürlichen Frequenz auch in nicht OT-I T-Zellen vor. Diese natürliche Frequenz lag in unseren Experimenten bei maximal ca. 8-10% innerhalb der CTLs, bzw.

1-2% CD8⁺/TZR α_2 ⁺ Zellen an allen Lymphozyten. In transgenen Tieren, welche den OT-I Rezeptor exprimierten, waren hingegen >90-95% der CTLs positiv für das V α_2 -Segment des TZR. Die so identifizierten und überprüften transgene Tiere wurden für die Experimente und Zucht verwendet (s. Abb. 17).

4.9 Monoklonale adoptive T-Zelltransferversuche

Die monoklonalen ATzT Versuche wurden gewählt, da die vorherigen Experimente wie in 4.3 zeigten, dass eine alleinige Deletion von EBAG9^{-/-} in Empfängertieren nicht ausreichte, um das Auswachsen von E.G-7 Zellen zu verhindern. Eine Vakzinierung hingegen induzierte eine zu potente Antitumorantwort mit hohen Effektorfrequenzen. Aufgrund dessen ließen sich in beiden Versuchsansätzen im Vergleich der Wt und der EBAG9-deletierten T-Zellen mögliche Unterschiede der Effektorfunktion nicht demaskieren.

In den Transferversuchen wurden in C57BL/6 Mäusen durch s.c. Injektion von E.G-7 Zellen entstandene Tumore behandelt. Dabei wurde bei den monoklonalen Transferexperimenten großer Wert darauf gelegt, dass die Versuchstiere am Tag des Transfers der CTLs bereits einen sichtbaren oder zumindest tastbaren lokalen Befund besaßen. Tiere, welche zu Therapiebeginn keine durch Inspektion oder Palpation erfassbare Läsion entwickelt hatten, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Ziel war es, nur tumortragende Tiere zu therapieren und verspätetes oder ausbleibendes Anwachsen der Zellen bei der Auswertung auszuschließen. Dieses Vorgehen entspricht am ehesten einem möglichen späteren klinischen Anwendungsbereich, indem Patienten mit inoperablen Neoplasien, mit therapierefraktären Tumoren oder mit minimaler Resterkrankung primär mittels ATzT therapiert werden sollen. Es wurde hier untersucht, ob die Deletion von EBAG9 unter diesen Bedingungen einen therapierelevanten Vorteil bei einem soliden Modelltumor darstellt.

Für die monoklonalen Transferexperimente wurden voraktivierte CTLs verwendet. Dazu wurden diese über zwei Tage auf Anti-CD3/Anti-CD28 beschichteten Platten stimuliert. Anschließend erfolgte eine MACS-Aufreinigung mit Transfer. Dabei wurde üblicherweise eine Reinheit von >90% CD8⁺-T-Zellen erreicht (s. Abb. 18).

Im Anschluss an die ATzTs wurden die Tiere regelmäßig kontrolliert und auf ein Ansprechen der Therapie untersucht. Als Ansprechen und somit Erfolg für die Therapie wurden gewertet: a) komplette Remission des Tumors; b) partielle Remission, d.h. deutliche Reduktion des Tumorumfanges; c) fehlende Tumorprogression über mehrere Tage. Kein Ansprechen bedeutete ein ungebremstes Auswachsen der Läsionen und somit Größenprogression.

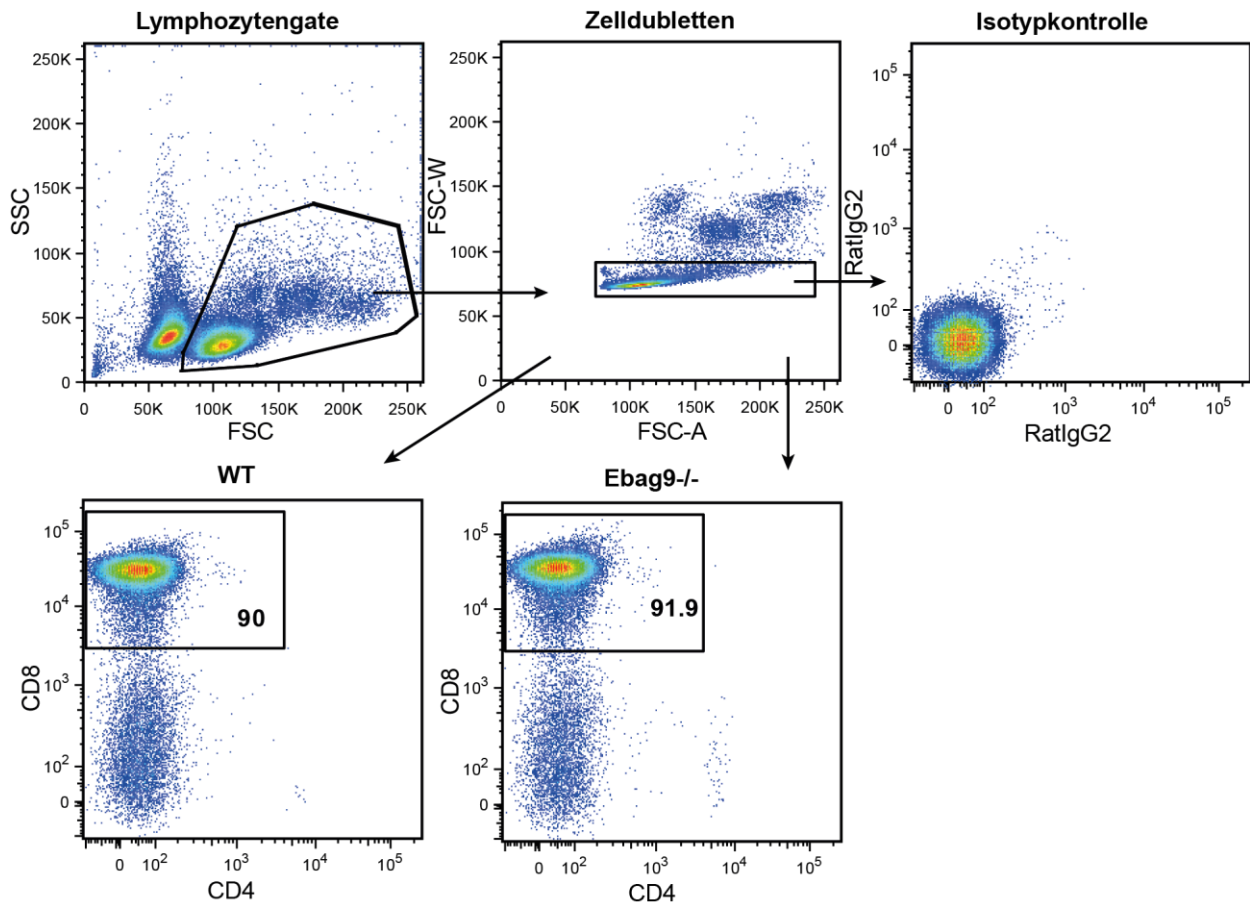


Abb. 18: Repräsentative Darstellung einer FACS-Analyse für CD8⁺-Zellen nach MACS-Anreicherung von Milzzellen

Erst wurde im FSC/SSC Fenster ein Gate auf Lymphozyten gesetzt. Anschließend wurden Zelldubletten mithilfe von FSC-A/FSC-W ausgeschlossen und die Zielpopulation dargestellt. Die Isotypkontrolle dient als Spezifitätskontrolle für die Färbung. Die mit Rechtecken markierten Zellpopulationen zeigen die selektierte Population ("gated") an. Zahlen im Gate sind die prozentualen Anteile der CD8⁺-Zellpopulation den Gesamtlymphozyten.

Es wurden folgende Definitionen wurden festgelegt:

a) komplette Remission

Eine komplette Remission der Läsionen wurde dann festgestellt, wenn zu einem Messzeitpunkt ein Fortbestehen weder durch Inspektion noch durch Palpation bestätigt werden konnte. Spätere Rezidive im Beobachtungszeitraum wurden für die Wertung als Remission nicht berücksichtigt, kamen aber vor.

b) Partielle Remission

Das zweite Kriterium für ein Ansprechen der ATzT-Therapie stellte die transiente Reduktion des Tumorumfanges dar. Oft kam es initial 2-3 Tage nach ATzT zu einer Progression der Läsionsgröße und daraufhin zu einer klaren Reduktion. Die erzielten Reduktionen waren häufig nur temporär.

c) fehlende Tumorprogression

Als drittes Kriterium für einen Erfolg der Therapie wurde eine im Verlauf mehrere Tage anhaltende fehlende Progression der Tumore innerhalb von 3-7 Tagen nach ATzT verwendet. Dies wurde ebenfalls als Ansprechen gewertet.

Die Kriterien unter a, b und c wurden für die Auswertung als Therapieansprechen zusammengefasst. Komplette Remissionen wurden zusätzlich einzeln ausgewertet und angegeben. Tiere mit vergleichbaren ATzT-Ansätzen wurden aus unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen zusammengefasst und hinsichtlich des Ansprechens ausgewertet. Da nicht immer am exakt gleichen Tag nach Injektion der Tumorzellen gemessen werden konnte, wurden für die grafische Darstellung die Messwerte nahe beieinanderliegender Zeitpunkte (+/- 1 Tag) zusammengefasst. Neben einem Ansprechen auf die Therapie und der Progression des Tumorumfanges wurden die Tierversuche auch auf das Überleben der Tiere hin ausgewertet. Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurden allerdings keine Versuche mit dem Tod der Tiere als Endpunkt durchgeführt. Es wurde das Überschreiten eines Tumorumfanges von max. 1000 mm³ je Tier als Surrogatmarker für das Überleben verwendet. Für die Auswertung wurden alle Tiere aus unterschiedlichen, jedoch vergleichbaren unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

4.9.1 Dosisfindung für monoklonale OT-I Transferexperimente

In einem ersten Ansatz zum adoptiven T-Zelltransfer sollte eine Dosisfindung angestrebt werden. Dabei dienten als Orientierungshilfe Arbeiten, welche das E.G-7 Tumormodell sowie OT-I T-Zellen verwendet hatten (79, 93). Ziel des Versuches hier war es herauszufinden, wie viele OT-I EBAG9^{-/-} T-Zellen in dem verwendeten E.G-7/OT-I EBAG9^{-/-} System transferiert werden müssen, um einen biologisch gut messbaren Effekt zu erzielen. Einerseits sollte vermieden werden, in späteren Experimenten einen ggf. vorhandenen, messbaren Unterschied zwischen OT-I Wt und OT-I EBAG9^{-/-} CD8⁺-T-Zellen durch eine zu kleine Anzahl an transferierten T-Zellen zu übersehen. Andererseits sollte auch vermieden werden, durch eine Überdosierung an CTLs Unterschiede zu verschleiern. Ziel der späteren Experimenten war nicht primär, mittels des Transfers eine komplette Eradikation der Tumore zu erzielen. Es sollte vielmehr in einem Bereich gearbeitet werden, in dem eine therapeutische Wirksamkeit des Transfers mit EBAG9-defizienten CTLs gegeben war. Für die Dosisfindung wurden in C57BL/6 Mäusen s.c 1x10⁵ E.G-7 Tumorzellen appliziert und gewartet, bis die Tumore zu einer durch Palpation sicher feststellbaren Größe herangewachsen waren. Ab diesem Zeitpunkt wurden vorstimulierte CD8⁺-T-Zellen transferiert. Aufgrund vorbestehender Erfahrungen wurden 5x10⁵ CD8⁺-T-Zellen als untere Grenze, an der noch ein messbarer biologischer Effekt zu erwarten wäre, sowie 5x10⁶ CD8⁺-T-Zellen als obere Grenze festgelegt. Relevante Messgröße war das aus den bestimmten Durchmesser errechnete Tumorumfang. Es

wurden drei Gruppen gebildet: n=3 Mäuse mit 5×10^6 CD8⁺-T-Zellen, n=7 Mäuse mit 5×10^5 CD8⁺-T-Zellen, n=1 Maus blieb als Kontrolle unbehandelt. Es wurden hier nur EBAG9^{-/-} CTLs transferriert (s. Abb. 19).

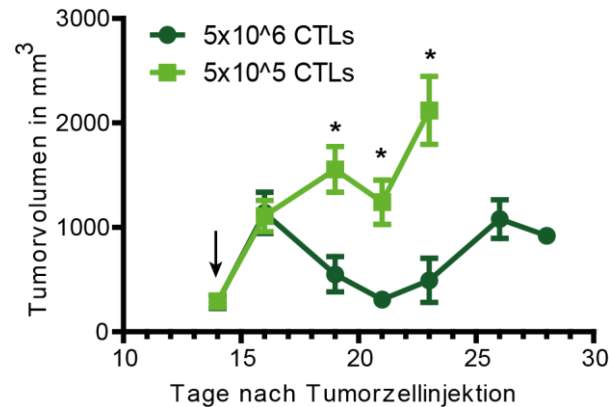


Abb. 19: Austestung einer effektiven OT-I EBAG9^{-/-} T-Zelldosis für die Kontrolle des Tumorwachstums

Applikation von s.c. Tumoren mittels Injektion von 1×10^5 E.G-7 Zellen an Tag 0. Transfer der aktivierten OT-I EBAG9^{-/-} CTLs an Tag 14 (Pfeil). Das Größenwachstum wurde mittels Palpation und Schiebelehre festgehalten. 5×10^6 : n=3, 5×10^5 : n=7. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Es besteht kein signifikanter Unterschied an Tag 14 und Tag 16 (5×10^5 : n=7, 5×10^6 : n=3). Ein signifikanter Unterschied konnte erst im Rahmen des Therapieansprechens an Tag 19: p=0,0476 (5×10^5 : n=6, 5×10^6 : n=3), Tag 21: p=0,0357 (5×10^5 : n=5, 5×10^6 : n=3) und Tag 23: p=0,0357 (5×10^5 : n=5, 5×10^6 : n=3) beobachtet werden. Für die Analysen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. *: p<0,05. Die unbehandelte Kontrollmaus ist nicht dargestellt (Tag 23: 4164 mm³).

Die Gruppe mit 5×10^6 transferrierten Zellen wurde so klein gewählt, da hier ein deutliches Ansprechen erwartet wurde. Das durchschnittliche Tumorzellen am Tag 14 des Transfers betrug: 284 mm³ für die 5×10^6 Gruppe sowie 292 mm³ für die 5×10^5 Gruppe.

In der Gruppe mit den Empfängertieren von 5×10^6 CD8⁺-T-Zellen konnte bei 3/3 Mäusen ein deutliches Ansprechen beobachtet werden. Während die Tumormasse bis zwei Tage nach T-Zell-transfer noch anstieg, erfolgte anschließend eine Reduktion des Tumorzellen um mehr als 50%. Dieser Effekt war allerdings nur von begrenzter Dauer. Es kam zu keiner vollständigen Eradikation und bei allen Tieren stattdessen zum Rezidiv der Tumore ab Tag 21-23.

Auch in der Gruppe mit 5×10^5 transferrierten CD8⁺-T-Zellen wurde ein Ansprechen beobachtet. Bei 5/7 Tieren konnte eine Reduktion bzw. eine transiente Verlangsamung des Tumorwachstums an den Tagen 16-21 festgestellt werden. Bei 2/7 Tieren kam es allerdings zu keinem Ansprechen der Therapie und die Tiere wurden bereits an Tag 19 abgetötet. Eine vergleichbar starke Regression der Tumore wie in der Hochdosisgruppe mit 5×10^6 transferrierten Zellen konnte nicht beobachtet werden. In der Kontrollmaus verlief das Auswachsen des Tumors ungebremst (Graph nicht gezeigt, zum Vergleich für unbehandelte Tiere siehe 4.2.2, Abb. 7).

Vergleicht man das Tumorwachstum zwischen den mit 5×10^5 und 5×10^6 CTLs transferrierten Tieren an den einzelnen Tagen, so besteht kein signifikanter Unterschied des mittleren Tumorzellen an Tag 14 (5×10^5 : 292 mm³; 5×10^6 : 284 mm³) und Tag 16 (5×10^5 : 1109 mm³ n=7, 5×10^6 : 1138 mm³ n=3). Ein signifikanter Unterschied kann erst im Rahmen des Therapieansprechens an

Tag 19: $p=0,0476$ (5×10^5 : 1554 mm^3 $n=6$, 5×10^6 : 549 mm^3 $n=3$), Tag 21: $p=0,0357$ (5×10^5 : 1240 mm^3 $n=5$, 5×10^6 : 308 mm^3 $n=3$) und Tag 23: $p=0,0357$ (5×10^5 : 2120 mm^3 $n=5$, 5×10^6 : 492 mm^3 $n=3$) beobachtet werden.

Da die Tumore zu Beginn der Therapie zwar sicher etabliert messbar, jedoch noch sehr klein waren und aufgrund der hier erhaltenen Daten wurde später für die monoklonalen T-Zelltransfers meist eine Dosis von 1×10^6 CTLs gewählt. Damit sollte verhindert werden, dass bei größeren Ausgangstumoren kein Effekt mehr ersichtlich sein würde.

4.9.2 Vergleich der Wirksamkeit von OT-I Wt CTLs versus EBAG9^{-/-} OT-I CTLs

In diesen Versuchen sollte ein direkter Wirksamkeitsvergleich der T-Zellen mit und ohne EBAG9-Expression auf den Verlauf einer antigenspezifischen Tumorantwort gegen einen soliden Tumor geführt werden. Es wurden E.G-7 tumortragende C57BL/6 Tiere mit 1×10^6 OT-I Wt oder 1×10^6 OT-I EBAG9^{-/-} CTLs transferiert. Der ATzT erfolgte im Durchschnitt an Tag 11,4 (Tag 10-14). Das durchschnittliche Tumolvolumen betrug in diesem Zeitraum 394 mm^3 für die Wt sowie 333 mm^3 für die EBAG9^{-/-} Gruppe.

Insgesamt wurden $n=25$ Tiere für die Wt Gruppe, sowie $n=25$ Tiere der EBAG9^{-/-} Gruppe aus 4 unabhängigen Experimenten zusammengefasst und analysiert. Es konnte bei 24/25 der Wt und 23/25 der EBAG9^{-/-} transferierten Tiere ein meist transientes Ansprechen auf die Therapie beobachtet werden. Dies wurde durch die Entwicklung des Tumolvolumens über die Zeit festgestellt. Dabei traten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wt Gruppe und der EBAG9^{-/-} Gruppe hervor. Bei den Wt Tieren kam es in 8/25 Fällen zu einer kompletten Remission, von denen im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv auftrat. Bei den EBAG9^{-/-} OT-I behandelten Tieren kam es in 11/25 Fällen zu einer kompletten Remission, von denen allerdings 2 Tiere im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv erlitten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Kriterium für Therapieerfolg	Wt	EBAG9 ^{-/-}
Ansprechen	24/25	23/25
Remission	8/25	11/25
Rezidive	1/8	2/11

Tabelle 4: Ergebnis der Auswertung der Transferexperimente mit 1×10^6 OT-I CTLs

Die Remissionsraten am zeitlichen Endpunkt zeigen einen Trend zugunsten der EBAG9^{-/-} behandelten Gruppe. Betrachtet man jedoch das chronologische Erreichen der Remissionen, so zeigt sich am Tag 20 ein stärkerer Trend zugunsten der EBAG9^{-/-} Gruppe. Im weiteren Verlauf nähern sich jedoch die absoluten Remissionsraten beider Gruppen einander an und der Trend wird kleiner bzw. verschwindet. (Siehe Tab. 5).

Tag nach Tumorzellinjektion	Wt: Remissionen/n=25	EBAG9 ^{-/-} : Remissionen/n=25
Tag 18	2	3
Tag 20	4	9
Tag 22	6	9
Tag 25 Endpunkt	8	11

Tabelle 5: Zeitverlauf der Remissionen bei Transferexperimenten mit 1x10⁶ OT-I CTLs

Abb. 20 A zeigt den Verlauf des Tumorwachstums. In beiden Gruppen war eine Reduktion des mittleren Tumolvolumens nach ATzT deutlich zu erkennen (Ausgangswert: 394 mm³ Wt sowie 333 mm³ EBAG9^{-/-}; Reduktion auf 215 mm³ Wt sowie 138 mm³ EBAG9^{-/-} bis Tag 20). Meist bestand dieser therapeutische Effekt nur temporär, sodass es erneut zum Wachstum der Tumore kam (Wiederanstieg: 574 mm³ Wt sowie 352 mm³ EBAG9^{-/-} bis Tag 25). Ein signifikanter Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-} transferierten Mäusen war nicht erkennbar. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede des mittleren Tumolvolumens an Tag 13 (p=0,5754), Tag 15 (p=0,9738), Tag 18 (p=0,2541), Tag 20 (p=0,1847), Tag 22 (p=0,1024) und Tag 25 (p=0,1946).

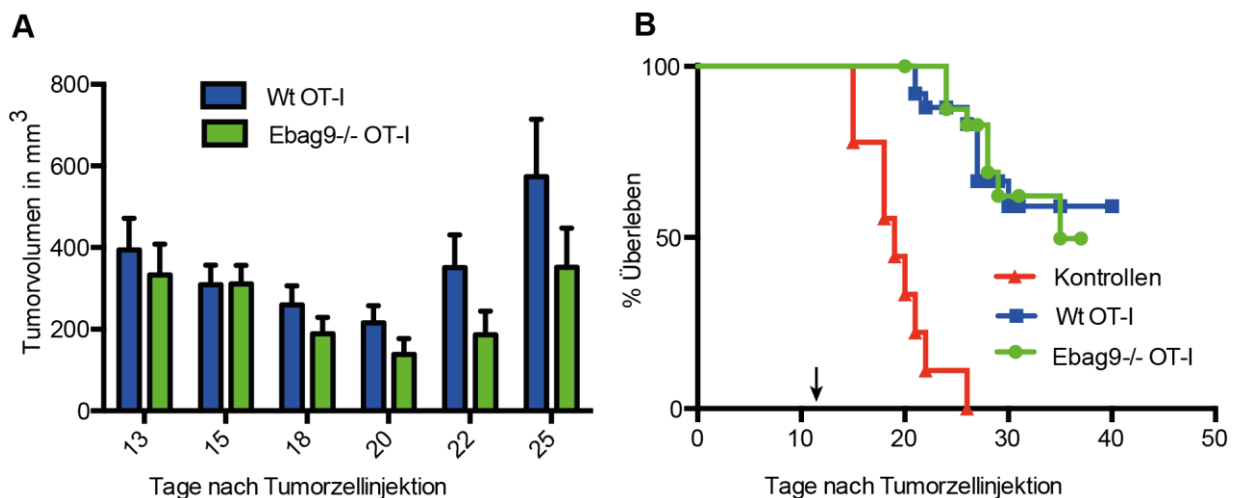


Abb. 20: Tumorwachstum und Überleben bei Transfer von 1x10⁶ OT-I Wt oder OT-I EBAG9^{-/-} CTLs

Es wurden s.c. Tumore durch die Injektion von 1-2x10⁵ E.G-7 Zellen appliziert (=Tag 0) und anschließend an Tag 10-14 (im Mittel an Tag 11,4; Pfeil) OT-I CTLs transferiert. Anschließend wurde das Tumorwachstums mittels Palpation und Schiebelehre überprüft und das Volumen berechnet. Wt: n=25 aus 4 verschiedenen Experimenten, EBAG9^{-/-}: n=25 aus 4 verschiedenen Experimenten. **A**) Vergleich des Tumorwachstums von 1x10⁶ OT-I CTLs Wt und EBAG9^{-/-} transferierten Mäusen. Dargestellt sind mittleres Tumolvolumen mit SEM. Keine signifikanten Unterschiede des mittleren Tumolvolumens am Tag 13, Tag 15, Tag 18, Tag 20 (Wt: n=25; EBAG9^{-/-} n=25), Tag 22 (Wt: n=25; EBAG9^{-/-} n=24) und Tag 25 (Wt: n=23; EBAG9^{-/-} n=24): unpaired t-test: Tag 13 (p=0,5754), Tag 15 (p=0,9738), Tag 18 (p=0,2541), Tag 20 (p=0,1847), Tag 22 (p=0,1024) und Tag 25 (p=0,1946). **B**) Vergleich des Überlebens der mit 1x10⁶ OT-I Wt und EBAG9^{-/-} CTLs transferierten Tiere. Als Überleben wurde ein Tumolvolumen von <1000 mm³ definiert. Wt: n=25 aus 4 verschiedenen Experimenten, EBAG9^{-/-}: n=25 aus 4 verschiedenen Experimenten. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Wt und der EBAG9^{-/-} Gruppe, Log-Rank Test: p=0,9294. Des Weiteren wurde zum Vergleich die Kontrollgruppe aus 4.2.2 dargestellt. Kontrollen: n=9 aus 6 verschiedenen Experimenten. Es bestand ein signifikanter Vorteil der beiden Transfergruppen bezüglich des Überlebens gegenüber den unbehandelten Tieren. Kontrollen vs Wt: Log-Rank Test mit p<0,0001. Kontrollen vs EBAG9^{-/-}: Log-Rank Test mit p<0,0001.

Neben einem Ansprechen auf den ATzT durch Tumorreduktion bzw. verminderte Tumorprogression wurde auch das Überleben als Marker eines Therapieerfolges untersucht. Als Überlebensgrenze wurde ein Tumolvolumen <1000 mm³ definiert. Dabei ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Wt und der EBAG9^{-/-} Gruppe nachweisen (p=0,4251; s. Abb. 20 B).

Vergleicht man die 1×10^6 OT-I CTLs Wt und EBAG9^{-/-} transferierten Gruppen weiter bezüglich Tumorreduktion und Relapse, so zeigen sich grafisch Unterschiede bezüglich Reduktion und Tumorzunahme zwischen den beiden Gruppen (T-Zelltransfer im Mittel an Tag 11,4; s. Abb. 21).

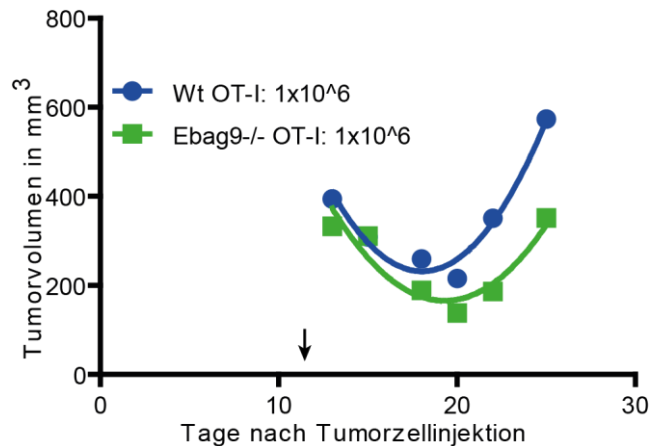


Abb. 21: Vergleich der Tumorkinetik in 1×10^6 OT-I Wt und EBAG9^{-/-} transferierten Tieren

Es wurden die vorhandenen Tumorwachstumsdaten aus Abb. 20 verwendet. Durch die mittleren Tumorzellen an den einzelnen Zeitpunkten wurde mithilfe des Grafikprogramms Graphpad Prism eine Binomialfunktion 2. Ordnung gelegt. Als Zeitpunkte wurden die Mittelwerte der Tage 13, 15, 18, 20, 22 und 25 aufgetragen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des Transfers im Schnitt nach 11,4 (10-14) Tagen. Wt: n=25, EBAG9^{-/-}: n=25. Die beiden Kurven waren nicht deckungsgleich. Es zeigte sich eine Tendenz zugunsten der EBAG9^{-/-} Zellen, v.a. beim Wiederauswachsen des Rezidivs. Dieses verlief in den EBAG9 defizienten Tieren deutlich verlangsamt. Es bestand jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied (siehe Abb. 20).

Die mithilfe von Graphpad Prism erstellten Kurven sind nicht deckungsgleich. Es bestand einerseits eine stärkere Abnahme der EBAG9^{-/-} Kurve bis Tag 20 (Ausgangswert: 394 mm^3 Wt sowie 333 mm^3 EBAG9^{-/-}; Reduktion auf 215 mm^3 Wt sowie 138 mm^3 EBAG9^{-/-} bis Tag 20), und auf der anderen Seite ein steilerer Wiederanstieg der Wt Kurve nach Tag 20 (Wiederanstieg: 574 mm^3 Wt sowie 351 mm^3 EBAG9^{-/-} bis Tag 25). Dies könnte auf eine höhere zytolytische Effektivität der EBAG9-defizienten OT-I T-Zellen hindeuten.

Vergleicht man die beiden 1×10^6 Transfergruppen mit den unbehandelten Kontrollen, so besteht ein deutlicher Unterschied in der Tumorprogression. Während bei den Kontrollen das mittlere Tumorzellen kontinuierlich zunimmt, zeigt sich bei den Transfertieren ein typischer Reduktionsknick (s. Abb. 7 A sowie 20 A). Auch ergibt sich ein signifikanter Vorteil der beiden Transfergruppen bezüglich des Überlebens gegenüber den unbehandelten Tieren (Kontrollen vs Wt: $p < 0,0001$; Kontrollen vs EBAG9^{-/-} $p < 0,0001$; s. Abb. 20 B). Dies belegt ein gutes Ansprechen und somit einen Erfolg des ATzT.

4.9.3 Transfer von 5×10^5 OT-I Wt CTLs versus 5×10^5 OT-I EBAG9^{-/-} CTLs

Es wurde der Effekt des Transfers von 5×10^5 OT-I Wt CTLs bzw. 5×10^5 OT-I EBAG9^{-/-} CTLs bezüglich ihres Einfluss auf das Auswachsen von E.G-7 Tumoren untersucht. Dabei sollte ein möglicher Unterschied zwischen den beiden Populationen aufgezeigt werden. Es wurden E.G-7 tumortragende C57BL/6 Mäuse als Rezipienten verwendet. Aufgrund der geringen T-Zellzahl in diesem

Versuchsansatz wurde der Transfer bereits am Tag 8 nach Tumordinokulation durchgeführt. Dabei wurde versucht die tumortragenden Mäuse in möglichst größengleiche Gruppen einzuteilen. Die Tumore waren zum Zeitpunkt des Transfers bei den Tieren, welche in die Auswertung gingen, gut palpabel. Die erste Messung der Tumorumfänge erfolgte am Tag 9, mit einem durchschnittlichen Tumorumfang von: 314 mm³ in der Wt sowie 166 mm³ in der EBAG9^{-/-} Gruppe. Insgesamt wurden für OT-I Wt n=6 sowie für EBAG9^{-/-} OT-I T-Zellen n=8 Mäuse ausgewertet. Es kam bei 4/8 der EBAG9^{-/-} transferierten Mäuse zu einem klaren Ansprechen der Therapie und bei 1/8 Tieren zu einer kompletten Remission. Bei den Wt Tieren wurde ein Ansprechen in 2/6 Fällen deutlich und eine komplette Remission in 1/6 Fällen beobachtet (s. Tab. 6).

Kriterium für Therapieerfolg	Wt	EBAG9 ^{-/-}
Ansprechen	2/6	4/8
Remission	1/6	1/8

Tabelle 6: Ergebnis der Auswertung des Transferexperiments mit 5x10⁵ OT-I CTLs an Tag 8

Bei der Entwicklung des Tumorumfanges bestand im Verlauf kein signifikanter Unterschied an Tag 14 (Wt: 432 mm³; EBAG9^{-/-}: 312 mm³) und Tag 20 (Wt: 1012 mm³; EBAG9^{-/-}: 731 mm³) (p=0,2284 und p=0,6216). Anstatt des typischen Abfalls im Kurvenverlauf für das Tumorumfang nach ATzT, wie er in den anderen Experimenten mit 1x10⁶ und 5x10⁶ CTLs zu finden war, zeigte sich bei niedriger T-Zellzahl lediglich ein verlangsamtes Auswachsen der Tumore (s. Abb. 22 A). Bei der Auswertung für das Überleben der beiden Gruppen wurde ein Tumorumfang von 800 mm³ als Grenzwert verwendet. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-} Gruppe festgestellt werden (p=0,6400; s. Abb.22 B).

Um den Einfluss eines früheren versus späteren Transfers auf das Tumoranprechen zu untersuchen, wurde mit den am Tag 14 5x10⁵ OT-I EBAG9^{-/-} CTLs transferierten Tieren aus 4.9.1 verglichen. Das mittlere Tumorumfang beider Gruppen an Tag 14 betrug: 312 mm³ in der Tag 8 Gruppe sowie 292 mm³ in der Tag 14 Gruppe. Beim Transfer von 5x10⁵ OT-I EBAG9^{-/-} CTLs (n=7) am Tag 14 konnte bei nur 2/7 der EBAG9 defizienten Tiere ein Ansprechen festgestellt werden, eine komplette Remission wurde nicht mehr erreicht (s. Abb. 22 C, D sowie Tabelle 7). Es bestand dabei ein signifikanter Vorteil des frühen Transfers an Tag 8 gegenüber dem späteren Transfer von EBAG9^{-/-} OT-I T-Zellen am Tag 14 bezüglich des Überlebens (p=0,0210). Das mittlere Tumorumfang beider Gruppen an Tag 20 betrug: 731 mm³ in der Tag 8 Gruppe sowie 1554 mm³ in der Tag 14 Gruppe.

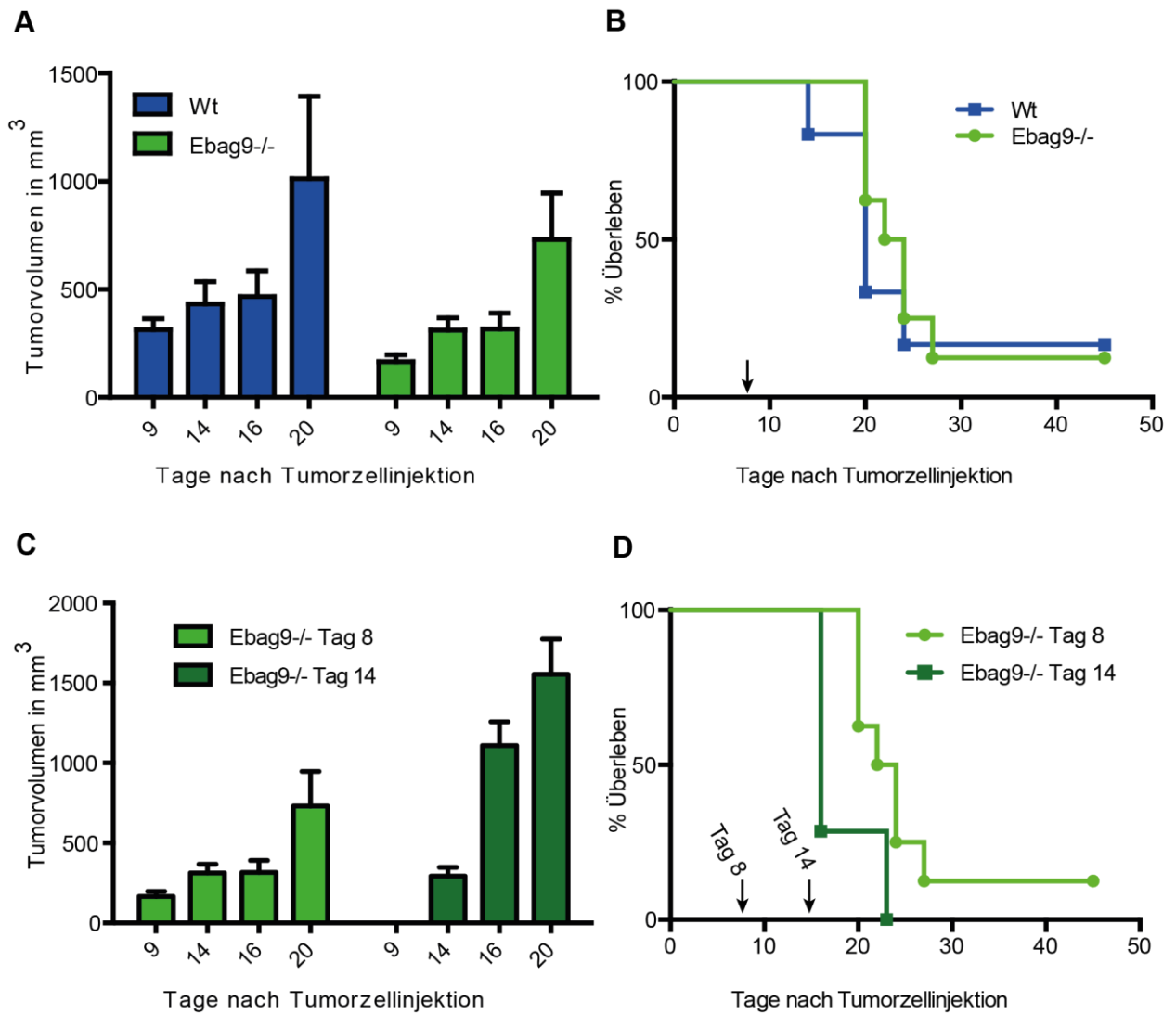


Abb. 22: Tumorentwicklung und Überleben nach Transfer von 5×10^5 OT-I CTLs Wt und EBAG9^{-/-} am Tag 8 und Vergleich von 5×10^5 OT-I EBAG9^{-/-} CTLs am Tag 8 mit 5×10^5 OT-I EBAG9^{-/-} am Tag 14

Es wurden s.c. Tumore durch die Injektion von $1-2 \times 10^5$ E.G-7 Zellen (= Tag 0) appliziert und anschließend OT-I CTLs transferiert. Das Tumorstadium wurde mittels Palpation und Schiebelehre überprüft. Für die Überlebensgrenze wurde ein Tumorstadium von 800 mm^3 definiert. Pfeil markiert jeweils den Transferzeitpunkt.

A) Tumorstadium bei Transfer von 5×10^5 OT-I Wt und EBAG9^{-/-} CTLs am Tag 8. Wt: n=6, EBAG9^{-/-}: n=8. Kein signifikanter Unterschied im Verlauf des Tumorstadiums an Tag 14: p=0,2284 und Tag 20: p=0,6216 (Wt: n=5, EBAG9^{-/-}: n=8). Analysen mit Mann-Whitney Test. **B)** Überleben bei Transfer von 5×10^5 OT-I Wt und EBAG9^{-/-} CTLs am Tag 8. Wt: n=6, EBAG9^{-/-}: n=8. Es besteht kein signifikanter Unterschied: Log-Rank Test: p=0,6400 **C)** Vergleich des Tumorstadiums bei Transfer von 5×10^5 OT-I EBAG9^{-/-} CTLs am Tag 8 (n=8) gegenüber 5×10^5 OT-I Ebag9^{-/-} CTLs am Tag 14 (n=7). **D)** Vergleich des Überlebens bei Transfer von 5×10^5 OT-I EBAG9^{-/-} CTLs am Tag 8 (n=8) gegenüber 5×10^5 OT-I Ebag9^{-/-} CTLs am Tag 14 (n=7). Es bestand dabei ein signifikanter Vorteil des frühen Transfers am Tag 8 gegenüber dem späteren Transfer am Tag 14: Log-Rank Test: p=0,0210.

Kriterium für Therapieerfolg	EBAG9 ^{-/-} Transfer am Tag 8	EBAG9 ^{-/-} Transfer am Tag 14
Ansprechen	4/8	2/7
Remission	1/8	0/7

Tabelle 7: Vergleich des ATzT mit 5×10^5 EBAG9^{-/-} OT-I CTLs am Tag 8 vs Tag 14

4.10 shRNA vermittelte Herunterregulation von EBAG9 in murinen T-Zellen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde versucht, primäre zytotoxische T-Zellen von Mäusen mittels retroviraler Vektoren zu transduzieren, um eine Herunterregulation von EBAG9 zu erreichen. Dabei wurden bereits in der Gruppe vorhandene retrovirale Plasmide, die für shRNAs kodierte, zum Knock-down von EBAG9 verwendet. Diese Plasmide waren von MSc. Markus Biedermann im Rahmen seiner Masterarbeit (2012) hergestellt worden. Ziel war es, eine hohe Transduktionseffizienz zu erreichen und die Herunterregulation von EBAG9 auf Proteinebene mittels Westernblot zu quantifizieren. Der Einsatz von shRNAs sollte eine Translation der EBAG9-Verringerung für die klinische Anwendung von modifizierten CTLs im Menschen ermöglichen.

4.10.1 Virusproduktion in der Verpackungszelllinie Plat-E

Retrovirale Überstände wurden initial für die Konstrukte Leervektor (Negativkontrolle), shRNA 322, 547 und MP71 (Negativkontrolle) generiert und verwendet. Vor der Virusernte wurde der Transfektionserfolg im Fluoreszenzmikroskop überprüft und abgeschätzt. Erfolgreich transfizierte Platten sollten aufgrund des in den Vektoren enthaltenen GFP-Gens mit grüner Fluoreszenz leuchten. Dies wurde nach Virusernte mittels FACS-Analyse der Plat-E Zellen kontrolliert (s. Abb. 23). Hieraus ließ sich grob die Virusproduktion abschätzen.

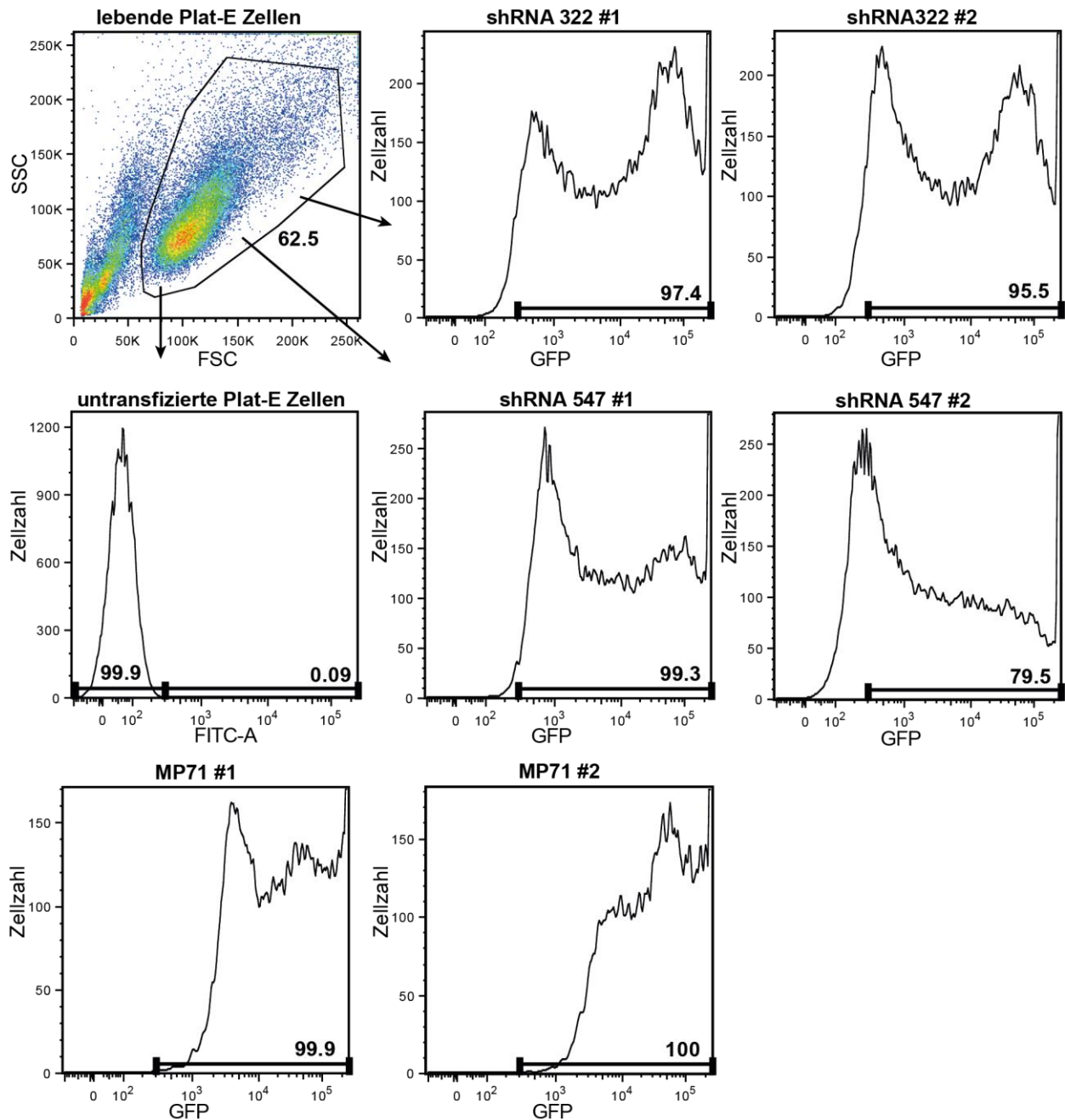


Abb. 23: Repräsentative Darstellung einer FACS-Kontrolle zum Transfektionserfolg der Plat-E Zellen

Plat-E Zellen wurden mittels CaPO₄-Transfektion transfiziert. 24-48 h nach Transfektion erfolgte die Analyse der GFP-Signalarstärke als Maß für den Transfektionserfolg. Es wurde erst auf lebende Zellen ein Gate gesetzt und anschließend in diesem Gate die Stärke des GFP-Fluoreszenzsignals als Histogramm aufgetragen. Verglichen wurde mit untransfizierten Zellen. Dargestellt sind je 2 unterschiedliche Transfektionsansätze, markiert mit #1 und #2, für die Konstrukte: shRNA 322, shRNA 547 und den MP71 Vektor. Die shRNAs wurden im p-super-retro-neoGFP-Vektor transfiziert. Für genaues Vorgehen siehe Methoden. Die Zahl im Gate repräsentiert den prozentualen Anteil der lebenden Plat-E Zellen. Zahlen an den Histogrammen repräsentieren die Frequenz in Prozent der GFP-positiven Zellen.

4.10.2 Transduktion von primären Maus T-Zellen

Für die Transduktionsexperimente in dieser Arbeit wurden verschiedene Protokolle und Modifikationen in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Uckert getestet. Es zeigte sich, dass das unter 3.4.7 dargestellte Protokoll am effizientesten war und zur Grundlage der Ergebnisse in dieser Arbeit wurde.

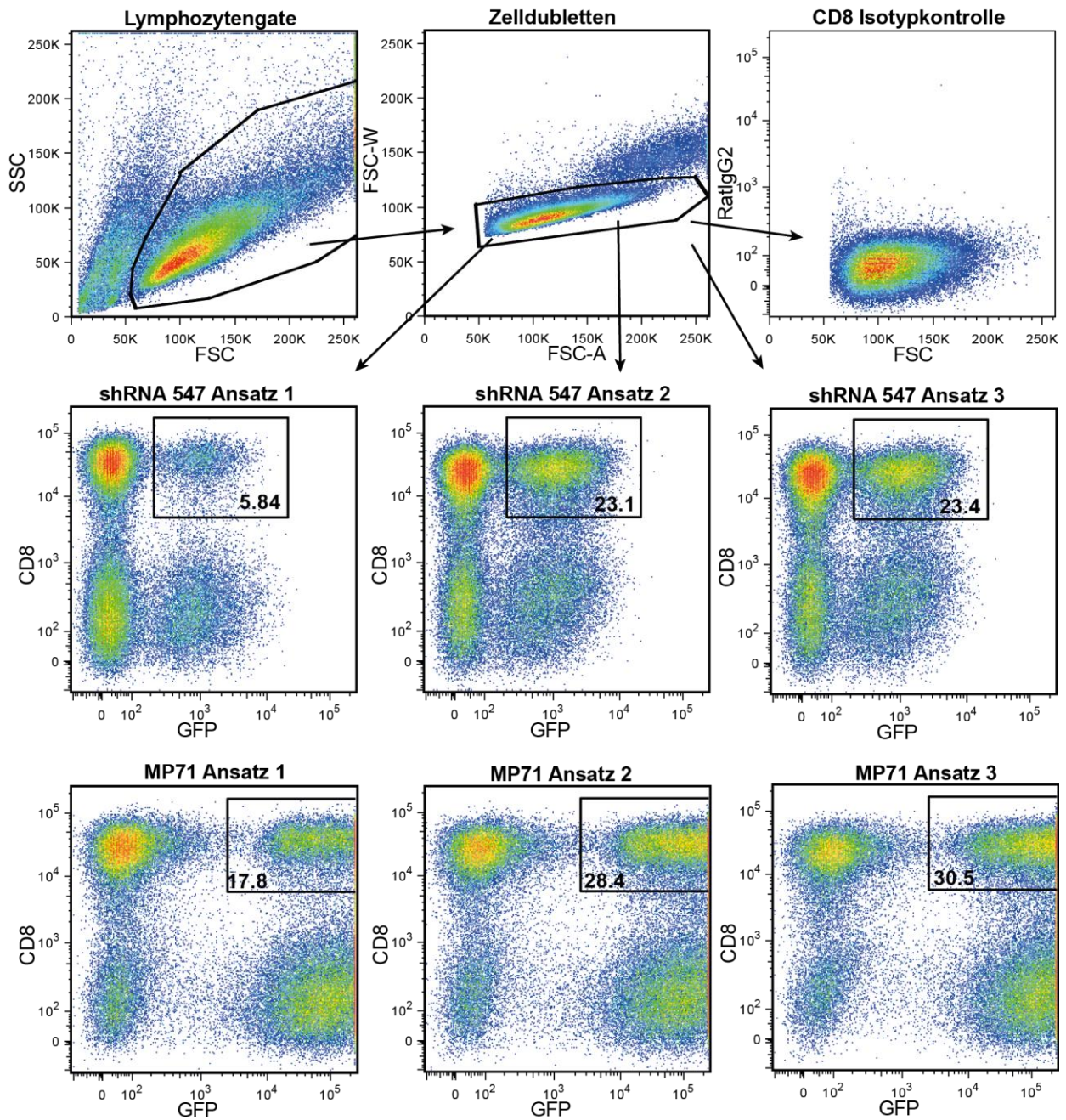


Abb. 24: Durchflusszytometrische Analyse der retroviral transduzierten murinen CD8⁺ T-Zellen

3-5 Tage nach Transduktion wurde der Erfolg anhand des prozentualen Anteils der CD8⁺/GFP⁺ Zellen überprüft. Erst wurde im FSC/SSC Fenster ein Gate auf Lymphozyten gesetzt. Anschließend wurden Zelldoubletten mithilfe von FSC-A/FSC-W ausgeschlossen und die Zielpopulation dargestellt. Die Isotypkontrolle dient als Spezifitätskontrolle für die Färbung. Die mit Rechtecken markierten Zellpopulationen zeigen die selektierte Population ("gated") an. Zahlen im Gate sind die prozentualen Anteile der entsprechenden CD8⁺/GFP⁺ Zellpopulation. shRNA547 n=3 und MP71 n=3 Transduktionsversuche.

Es wurden die shRNAs, welche sich in den Arbeiten von MSc M. Biedermann am geeignetsten für den Knock-down von EBAG9 in murinen Fibroblasten erwiesen hatten, ausgewählt. Dies sind shRNA 322 und 547 im p-super-retro-neoGFP-Vektor (103).

Als Kontrolle wurde der leere MP71-Vektor, welcher ebenfalls GFP, aber keine shRNAs enthält (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Wolfgang Uckert) verwendet. MP71 kam aufgrund seiner sehr guten Transduktionseffizienz als interne Kontrolle des Transduktionsprotokolls, aber auch als biologische Leerkontrolle zum Einsatz.

Ziel der Transduktionsversuche war es zunächst eine ausreichend hohe Anzahl an Zellen zu generieren, um nach der durchflusszytometrischen Anreicherung am Zellsorter mindestens 1×10^6 GFP⁺/CD8⁺ CTLs für einen Westernblot zu erhalten. Mit den in Abb. 24 angegebenen Frequenzen der GFP⁺ CTLs ließ sich errechnen, dass hierzu mindestens 5×10^6 Splenozyten am Zellsorter eingesetzt werden mussten. Die hier dargestellten Ergebnisse dienen nur als repräsentative Beispiele für mehrere (n=14) durchgeführte Transduktionsexperimente. In den Transduktionsexperimenten bestand anfangs eine hohe Variabilität hinsichtlich Zellmengen, Viabilität und Transduktionsraten. Für eine Anreicherung mittels Zellsortingverfahren wurden ein bis zwei 6-Well-Platten je Konstrukt angesetzt und transduziert. Dabei wurden je Platte Splenozyten aus einer ganzen Milz aufbereitet. Über alle Experimente hinweg zeigte sich, dass der MP71 Vektor wesentlich einfacher und besser für die Transduktion der primären T-Zell geeignet war als die auf dem p-super-retro-neoGFP-Vektor beruhenden Konstrukte.

4.10.3 Anreicherung der transduzierten primären CD8⁺/GFP⁺ Zellen mittels Zellsorter

Die wie in 3.4.7 transduzierten Zellen wurden anschließend mittels FACS angereichert. Dabei erfolgte die Anreicherung mittels Zellsortierung frühestens am 3. Tag, spätestens am 5-7. Tag, nach zweiter Transduktion. Es konnten die erfolgreich transduzierten Zellen auf > 90% CD8⁺/GFP⁺ angereichert und anschließend zur Vermehrung rekultiviert oder direkt lysiert werden. Die so hergestellten Proteinlysate wurden für Westernblot-Analysen verwendet (s. Abb. 25 für eine repräsentative Darstellung der präparativen Durchflusszytometrie).

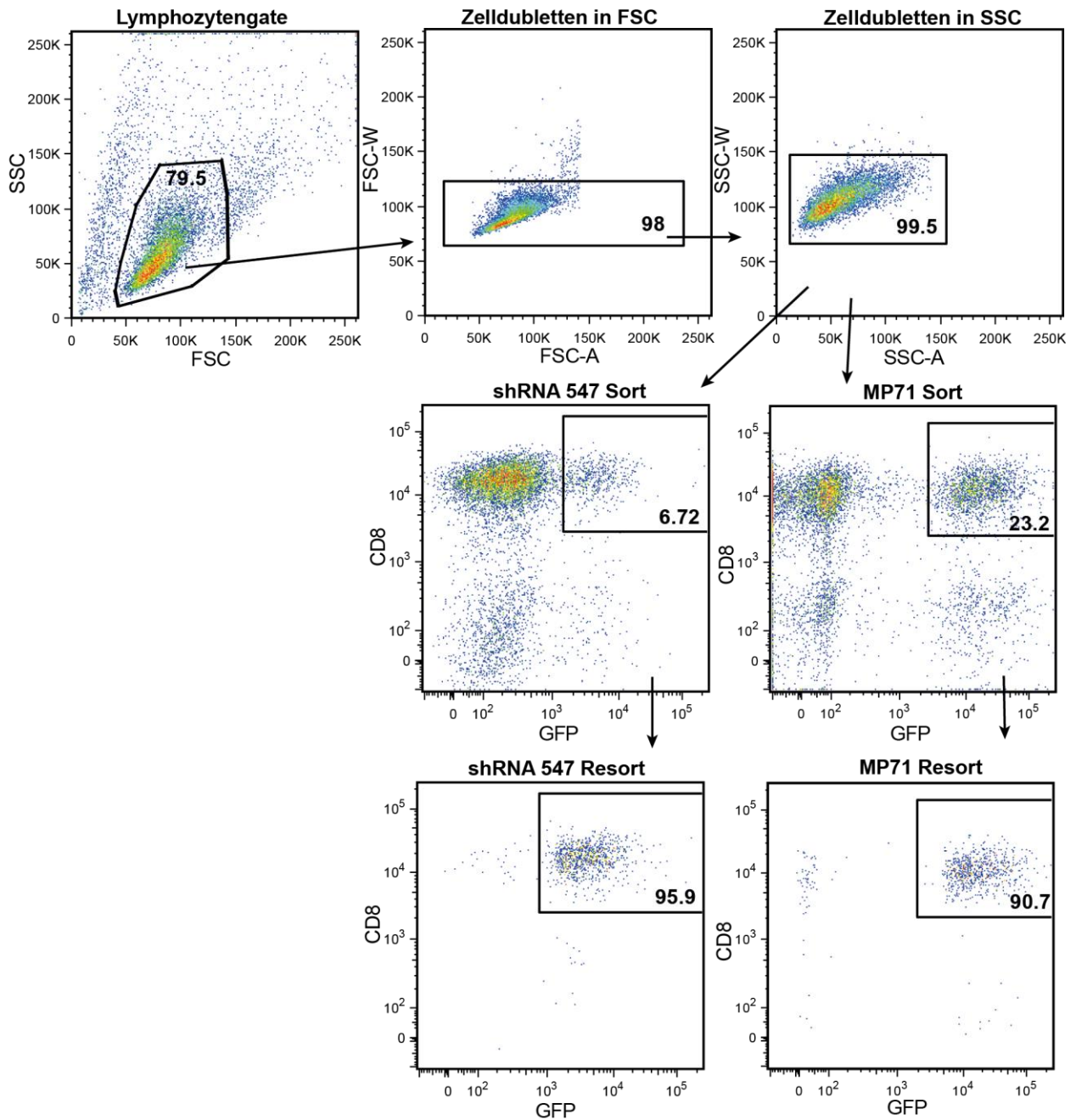


Abb. 25: Präparative Durchflusszytometrie zur Anreicherung retroviral transduzierter CD8⁺-T-Zellen

3-5 Tage nach retroviraler Transduktion wurden die T-Zellen mit anti-CD8 Antikörper gefärbt. Gezeigt ist eine repräsentative Auswertungsstrategie zur Anreicherung CD8⁺/GFP⁺ T-Zellen. Durch das Lymphozytengate und den Ausschluss der Zelldoubletten mittels FSC-A/FSC-W sowie SSC-A/SSC-W wurde die aufzureinigende Zielpopulation näher eingegrenzt. Anschließend erfolgte die Anreicherung der CD8⁺/GFP⁺ Zielpopulation. Der Resort stellt die wiederholte Analyse einer kleinen Menge der aufgereinigten Probe zur Kontrolle dar. Zahlen im Gate sind die prozentualen Anteile der entsprechenden Ziel-Zellpopulation. Es konnten Reinheitsgrade von >90% der CD8⁺/GFP⁺ Zielpopulation erreicht werden.

4.10.4 Quantifizierung der EBAG9 Expression in den transduzierten CD8⁺-T-Zellen

Die angereicherten Zellen wurden lysiert, die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran geblottet. Danach erfolgte die Analyse der Proteinexpression für EBAG9 bzw. Calnexin mit Hilfe spezifischer Antikörper. Beim Lysieren wurde die Menge an Lysemedium an die Zellzahl angepasst, sodass immer konstante Mengen lysierter Zellen pro Vo-

lumeneinheit entstanden. Da immer nur eine einheitliche Population an T-Zellen, jedoch mit verschiedenen Konstrukten transduziert verwendet wurde, konnte auf eine weitere Proteinbestimmung nach Bradford verzichtet werden. Gleiche Zellzahlen entsprachen daher vergleichbaren Proteinmengen.

Insgesamt wurden n=4 unterschiedliche Transduktionsexperimente mit Anreicherung im Zellsortier und anschließender Analyse mittels Westernblot für die shRNA547 ausgewertet (s. Abb. 26 für ein repräsentatives Beispiel der Westernblots). Für die shRNA322 wurde nur n=1 Durchlauf ausgewertet. Für die shRNA547 ergab sich eine durchschnittliche Herunterregulation von EBAG9 gegenüber den kontrolltransduzierten MP71 Zellen von 42.4 % (Mittelwert; Streubreite: 23-56%). In dem für die shRNA 322 durchgeführten Ansatz zeigte sich gegenüber den MP71 transduzierten Zellen eine Herunterregulation von EBAG9 um 40 %. Es konnte somit erfolgreich eine Herunterregulation von EBAG9 für die beiden shRNAs 322 und 547 gegenüber einer Leerkontrolle von MP71 transduzierten Zellen auf Proteinebene in primären T-Zellen erstmals bestätigt werden.

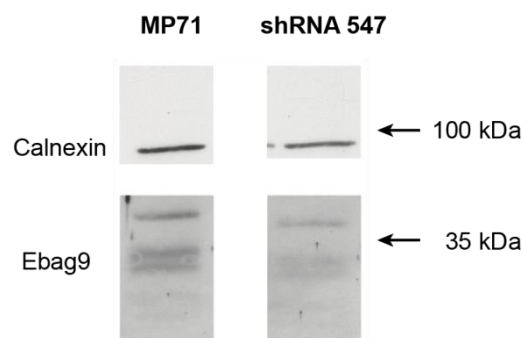


Abb. 26: Westernblotanalyse nach retroviraler Transduktion und Anreicherung von CD8⁺ T-Zellen

Die wie in Abb. 25 angereicherten CD8⁺/GFP⁺ T-Zellen wurden lysiert und die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran und die Markierung mit spezifischen primären Antikörpern gegen Calnexin und EBAG9. Die Darstellung spezifisch gefärbter Banden erfolgte mittels der Chemolumineszenztechnik und durch Verwendung eines Röntgenfilms. Das Mitführen eines Größen-Standards ermöglicht die Erkennung spezifischer Banden. Calnexin als Housekeeping-Genprodukt bildet eine spezifische Bande bei 92 kDa. Für EBAG9 zeigt sich eine charakteristische Doppelbande bei 24 kDa. Die Expressionsstärke von Ebag9 wurde im Verhältnis zur Expressionshöhe von Calnexin gesetzt. Bandenintensitäten wurden densitometrisch mit Hilfe von ImageJ quantifiziert (95). Die einzelne Bande oberhalb der 35kDa Markierung ist eine unspezifisch angefärbte Bande.

5. Diskussion

Ziel der Immuntherapie maligner Neoplasien ist es, eine möglichst gezielte, schonende und nachhaltige Beseitigung der Tumorzellen zu erreichen. Dies wurde für viele Tumorentitäten klinisch bislang in nur sehr wenigen Fällen erreicht. Ausnahmen für erste Erfolge stellen allogene Stammzelltransplantationen, Donorlymphozyten-Infusionen, CAR-T-Zellen und andere immunologische Ansätze bei akuten Leukämien und Lymphomen dar (45, 104).

Immuntherapie ist technologisch sowie biologisch noch unzureichend verstanden. Viele Ansätze bringen Nebenwirkungen in Form von Autoimmunität oder GvHD mit sich. Des Weiteren werden große Mengen an transferierten Zellen benötigt oder tiefgreifende genetische Modifikationen sind erforderlich (105). Für die adoptive T-Zelltherapie sind meist aufwendige Expansionen sowie Manipulationen der Zellen *in vitro* erforderlich, um eine ausreichende Zahl an wirksamen, tumorreaktiven Zellen zu generieren. Dies stellt noch eine große Herausforderung dar (81). Auch werden viele Tumore trotz Erkennung und transients Kontrolle durch CTLs nicht vollständig eradiziert (79). Verschiedenste Mechanismen beeinflussen und hemmen die Abstoßung von Tumoren: mangelnde Erkennung durch CTLs, Sekretion von TGF- β oder löslichen MHC-I Komplexen, Expression von immunsuppressiven Molekülen wie CTLA-4, Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen sowie Immunsuppression durch IL-13 (79). Die therapeutische Effektivität der ATzT wird durch die immunsuppressiven Mechanismen der Tumore oft stark eingeschränkt (81).

Es ist daher nötig neben der verbesserten Erkennung des Tumorgewebes auch Mechanismen zu erforschen, mit denen eine bessere Aktivierung und Effektorfunktion der transferierten Zellen erzielt werden kann. So können unterschiedliche Signalwege und Funktionen, welche der Antigenerkennung durch den TZR nachgeschaltet sind, manipuliert und benutzt werden, um die Therapie effektiver zu machen. Ein Beispiel hierfür stellt das Ausschalten der Ubiquitinligase Cbl-b dar. Cbl-b beeinflusst als negativer Regulator die adaptive Immunität und T-Zell Anergie (105), indem es die Aktivierungsschwelle von CD3⁺ Lymphozyten moduliert (81). Die Inhibition der T-Zellaktivierung durch Cbl-b wird dabei sowohl durch Ubiquitin-abhängige (Ubiquitynylierung) als auch Ubiquitin-unabhängige (multimodales Adapterprotein) Mechanismen vermittelt (82, 106). Cbl-b^{-/-} CTLs sind effizienter in der Tumorabstoßung als Wt CTLs (76). Der adoptive Transfer von polyklonalen, Cbl-b^{-/-} CD8⁺-T-Zellen zusammen mit der Anwendung einer DC-Vakzinierung führt zu einem starken Anti-Tumoreffekt (76). Ein Verlust von Cbl-b erhöht jedoch nicht nur die Reaktivität gegen Tumore, sondern führt als Nebenwirkung zu erhöhter Autoimmunität (81).

Eine andere Möglichkeit, die Aktivität zytotoxischer T-Zellen zu steigern, besteht im Ausschalten von EBAG9 in den T-Zellen. Durch das Fehlen von EBAG9 wird die zytolytische Effektoraktivität

der CTLs verbessert, was zu einer höheren *in vitro* und *in vivo* Aktivität der CD8⁺ Zellen führt (91). Ob diese Form der Modifikation auch in einem Modell solider Tumore mit ATzT einen Vorteil bringt, wurde in dieser Dissertation untersucht.

Auf der Basis verschiedener Experimente und Publikationen innerhalb der AG Rehm am MDC wurde die Hypothese formuliert, dass eine Deletion von EBAG9 zu einer erheblich stärkeren und besseren Antitumorwirkung im Rahmen eines ATzTs führen könnte. EBAG9-defiziente CTLs könnten daher solide Tumore besser abstoßen als EBAG9^{+/+} CTLs.

5.1 EBAG9^{-/-} CTLs verfügen *in vivo* über eine effektivere zytotoxische Funktion als Wt CTLs

Die Deletion von EBAG9 führt zu einer erhöhten zytolytischen Aktivität und einem verbesserten Abtöten der Zielzellen durch CTLs. Dies wurde bereits von Rüder et al (2009) (91) in der Gruppe von Armin Rehm gezeigt. Dabei wurde die Überlegenheit der EBAG9^{-/-} CTLs sowohl *in vitro* gegen allogene P815 Zellen als auch *in vivo* bei der Kontrolle einer *Listeria monocytogenes* Infektion in Mäusen dargestellt. Des Weiteren zeigte sich eine Überlegenheit von EBAG9-defizienten Tieren gegenüber Wt Tieren bei Versuchen im SV40-Large T-Antigen System, in denen vor-immunisierte Tiere mit Peptid IV-beladene Milzzellen lysierten (91). Auch Miyazaki et al (2014) konnten in ihrem EBAG9^{-/-} Mausmodell eine im Vergleich zu Wt CTLs verbesserte zytolytische Aktivität der EBAG9^{-/-} CTLs *in vitro* gegen MB-49 Tumorzellen zeigen (107). In beiden letztgenannten Modellen dienten immundominante Antigene bzw. Peptide als Zielstrukturen.

Im Rahmen des hier unter 4.1 dargestellten *in vivo* Killing-Assays wurde ein mHAag Mismatch Ansatz verwendet. Auch in diesem immunrezessiven Antigenesystem, bei dem rezirkulierende hämatopoetische Zielzellen verwendet wurden, konnte bestätigt werden, dass EBAG9^{-/-} Mäuse gegenüber Wt Mäusen über eine verbesserte spezifische zytolytische Aktivität ihrer CTLs verfügen. Die gesteigerte Effektorfunktion zeigt sich in einer stärkeren Elimination der antigenen Zellen in den EBAG9-defizienten Tieren.

Einer der Mechanismen, durch den CTLs zur Elimination eines Tumorgewebes beitragen, ist die direkte Perforin und Granzym vermittelte Lyse von Tumorzellen (108, 109). Wegen der verbesserten zytolytischen Kapazität von EBAG9^{-/-} CTLs wurde aufgrund der Datenlage ein stärker potenter Antitumoreffekt gegenüber Wt CTLs im E.G-7/OT-I Tumormodell erwartet.

5.2 Etablierung der Wachstumskinetik von E.G-7 Tumorzellen in C57BL/6 Mäusen

In diesem Versuch sollte das Wachstumsverhalten der Tumorzellen abgeklärt werden. Obwohl abstammend von einem hämatopoetischen Tumor, so stellte sich das Wachstumsmuster als subkutane Tumore eher vergleichbar mit dem solider Tumore dar. Dabei wurde für die E.G-7 Zellen ein ähnliches Wachstum wie bereits in der Literatur beschrieben beobachtet (79, 93, 110). Etwa 7 bis 10 Tagen nach s.c. Injektion von $1-2 \times 10^5$ E.G-7 Zellen kam es bei den meisten Tieren zum Auswachsen von detektierbaren Tumoren, sodass diese auch an nicht rasierten Tieren gut erkennbar wurden.

Bei Applikation von $1-2 \times 10^5$ E.G-7 Zellen kommt es, wie bereits auch vorbeschrieben (93), nicht in 100 % der Tiere zum Auswachsen eines soliden Tumors. Um einen langsameren und weniger aggressiven Tumorverlauf zu gewährleisten, wurde sich gegen die Verwendung einer höheren Dosis an Tumorzellen entschieden. Ziel war es, solide Tumore die über mindestens 10 Tage gewachsen waren zu therapieren und die ATzT darauf abzustimmen. Im Mittel wurde bei einer Tumorgroße von ca. 230 mm^3 Volumen therapiert. Es wurden nur Tiere in die Auswertung aufgenommen, welche zum Transferzeitpunkt bereits Tumore entwickelt hatten. Tiere galten bei der Erstellung der Therapiegruppen als tumorpositiv, sobald sie einen sichtbaren oder zumindest gut tastbaren lokalen Befund am Injektionsort zeigten. Das initial etwas langsamere Tumorwachstum ermöglichte es auch, v.a. bei monoklonalen Transfers die CTLs erst etwa ab Tag 10-14 zu verabreichen. Durch den späteren Transferzeitpunkt sollte es den Tumoren ermöglicht werden, eine stärkere Stromaorganisation zu erreichen und damit die Bedingungen solider subkutaner Tumore besser nachzuahmen.

In biologischen Tumorsystemen im Mausmodell ist mit einer gewissen Variabilität bereits beim untherapierten Tumorwachstum zu rechnen. Daher gleichen Wachstumskurven aus verschiedenen Experimenten und unterschiedlichen Arbeiten einander zwar, sie verlaufen i.d.R. jedoch nicht exakt gleich. Mögliche Einflussfaktoren könnten in Unterschieden bei der Passagezahl sowie Handhabung der Zelllinie begründet liegen. In den weiteren Versuchsdurchführungen wurde versucht, die Tiere anhand ihres Tumorumfanges möglichst gleichmäßig auf Wt und EBAG9^{-/-} Gruppen zu verteilen, um vergleichbare Ausgangsbedingungen zu schaffen.

5.3 EBAG9^{-/-} Mäuse zeigen ein Wt Tieren vergleichbares Wachstum der E.G-7 Tumorzellen

Um den genetischen Einfluss von EBAG9 bei der Tumorabstoßung zu studieren, wurden zunächst C57BL/6 Wt und EBAG9^{-/-} Mäuse mit E.G-7 Tumoren s.c. transplantiert. Die Hypothese, dass

EBAG9^{-/-} Tiere die Tumorzellen besser abstoßen als Wt Mäuse, bestätigte sich allerdings nicht. Bei gleichen Ausgangsbedingungen wurde für das E.G-7 Modell kein signifikanter Unterschied bezüglich Tumorinzidenz, Tumorwachstum oder des Gesamtüberlebens zwischen Wt und EBAG9^{-/-} Gruppe beobachtet. Bisher konnte für EBAG9-defiziente Tiere stets ein Vorteil beim Abtöten von Suspensions- bzw. hämatopoetischen Einzelzellen in *in vitro* und *in vivo* Assays gegenüber Wt Tieren gezeigt werden. Da die Tumorzellen nach s.c. Injektion noch nicht in organisiertem malignem Gewebe vorliegen, ähnelt der Versuchsaufbau den Konditionen eines *in vivo* Kill-Assays gegen Einzelzellen. Allerdings werden die Tumore subkutan appliziert und damit zum Ort der T-Zellantwort, während die Begegnungen zwischen Effektorzellen und Suspensions-Zellen in sekundären lymphatischen Organen stattfinden.

Des Weiteren waren weder Wt noch EBAG9^{-/-} Tiere, anders als in den *in vivo* Assays, gegen die E.G-7 Zellen immunisiert, sodass sich eine adaptive Immunantwort erst entwickeln musste. Die Entstehung einer adaptiven T-Zellantwort nimmt jedoch mehrere Tage in Anspruch und erreicht ihren Höhepunkt nach etwa 7-15 Tagen (111). In diesem Zeitraum können sich die s.c. inokulierten E.G-7 Tumorzellen in ein solides Gewebe organisieren und entsprechen somit nicht mehr den Bedingungen von Suspensionszellen.

Dass es zu keiner spontanen Abstoßung der E.G-7 Tumore in naiven Mäusen kommt, wurde erwartet und deckt sich mit Daten aus der Literatur (79, 93, 110). Ein Vorteil EBAG9-defizienter Tiere gegenüber Wt Tieren, sich solide entwickelnde Tumorzellen am Auswachsen zu hindern, war zuvor von Miyazaki et al (2014) an MB-49 Blasenkarzinomzellen demonstriert worden (107). Im Verlauf von 28 Tagen nach s.c. Injektion der MB-49 Tumorzellen kam es zu einer signifikant geringeren Progression des mittleren Tumolvolumens in den EBAG9^{-/-} Mäusen (107).

Warum bestand also trotz der wiederholt belegten, überlegenen zytolytischen Kapazität der EBAG9^{-/-} CTLs kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen im E.G-7 Modell?

Eine wahrscheinliche Ursache könnte in der niedrigen natürlichen Frequenz an antigenspezifischen CTLs gegen die Tumorzellen liegen. Als syngene Zelllinie bieten E.G-7 Zellen hauptsächlich das von OVA abgeleitete Peptid SIINFEKL als immunogenes Antigen. Eine niedrige Anzahl an antigenspezifischen CTLs bedingt eine gewisse Latenz, bis das Immunsystem im Rahmen des Primings eine Antitumorantwort aufbauen kann. Dieses ungünstige Effektor-CTL/Target-Verhältnis durch rasche Tumorzellproliferation und langsame Initiierung einer T-Zellantwort führt zur Etablierung solider Tumore. Aufgrund der langsamen und unzureichenden Aktivierung waren die Immunzellen möglicherweise nicht in der Lage, die rasch proliferierenden Tumorzellen abzutöten. Da sich Wt und EBAG9^{-/-} Tiere nur hinsichtlich ihrer Expression an EBAG9 unterscheiden, betrifft dieses Problem beide Tierstämme. Der mögliche Vorteil der EBAG9^{-/-} Tiere kommt nicht

zum Tragen. Die EBAG9-Defizienz und die dadurch erhöhte zytotoxische Aktivität der CTLs reicht nicht aus, um ein rasches Anwachsen der Tumorzellen zu verhindern.

Dass EBAG9^{-/-} Tiere s.c. MB-49 Blasenkarzinomzellen besser am Auswachsen hindern können als Wt Tiere (107), bezüglich der s.c. E.G-7 Zelllinie jedoch kein Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-} Mäusen besteht, könnte daher z.B. in einer unterschiedlichen Immunogenität der beiden Zelllinien begründet liegen. Außerdem könnten Unterschiede im immunsuppressiven Milieu sowie in der Sensitivität für die durch lytische Granulaaktivität vermittelte Zytotoxizität zwischen den beiden Tumormodellen bestehen. So scheint es möglich zu sein, dass MB-49 Zellen zwar ein aggressiveres Wachstumsverhalten zeigen (Miyazaki et al, 2014; Figure 2) (107), dadurch aber einen potenteren immunogenen Stimulus verursachen könnten. Darüber hinaus scheint der Infektions- bzw. Virusstatus dieser Blasenkarzinomzelllinie unklar. Dies könnte zu einer effektiveren Immunabwehr der Rezipienten führen, in deren Rahmen die verbesserte zytolytische Aktivität der EBAG9^{-/-} CTLs zu tragen kommen könnte. In diesem Modell wurden nicht die Antigene bestimmt, gegen die sich die T Zellantwort richtete. Auch ist es denkbar, dass die Rolle verschiedener Effektormechanismen des Immunsystems wie IFN- γ Sekretion, CD8⁺ Lyse, CD4⁺ T-Zelleffekte etc. in verschiedenen Tumormodellen einen unterschiedlich starken Anteil an der Tumorzellelimination ausmachen (112, 113).

5.4 Vakzinierter Wt und EBAG9^{-/-} Mäuse verfügen über eine vergleichbare Effektivität bei der Abstoßung von E.G-7 Tumorzellen

Normalerweise bilden die E.G-7 Zellen nach s.c. Injektion in C57/BL6 Wt Tieren einen soliden und progredienten Tumor, welcher zum Tod der Mäuse führen würde (93). Gleiches scheint aufgrund der Erkenntnisse aus 4.3 auch für EBAG9^{-/-} Tieren zu gelten. Da kein Unterschied im Auswachsen der E.G-7 Tumorzellen in naiven Wt und EBAG9^{-/-} Mäusen bestand, wurde ein Versuch in zuvor gegen die Tumorzellen vakzinierter Tieren durchgeführt. Hierdurch wurde versucht eine zu niedrige natürliche Frequenz an antigenspezifischen CTLs als mögliche Ursache für fehlende Unterschiede auszuschließen. So sollte verhindert werden, dass niedrige Effektorfrequenzen der CTLs mögliche relevante Abweichungen in der Abstoßung der Tumorzellen zwischen den beiden Gruppen maskierten.

Zu diesem Zweck wurde mittels DC-Peptid-Vakzinierung die Anzahl der antigenspezifischen T-Zellen erhöht. Durch die Vakzinierung waren jedoch die Tiere beider Genotypen gleichermaßen in der Lage, ein Auswachsen der injizierten E.G-7 Zellen zu soliden Tumoren zu verhindern. Das gute tumorfreie Überleben der Mäuse in beiden Gruppen spricht für ein sehr effektives Ansprechen der Impfung. Der Erfolg der DC-Vakzinierung gegen die Tumore deckt sich mit anderen Berichten

der erfolgreichen Anwendung von DCs bei der Tumorthherapie in der Maus. Dabei wurden DCs nicht nur wie hier präventiv, sondern auch therapeutisch bei bereits vorhandenen Tumoren, erfolgreich eingesetzt (1, 114-116). Durch die hohe Effektivität der Vakzinierung kam die verbesserte zytolytische Aktivität der CTLs in den EBAG9^{-/-} Mäusen vermutlich nicht zum Tragen. Es war daher nicht möglich eine Überlegenheit der EBAG9-Defizienz gegenüber Wt Tieren darzustellen. Zwischen Wt und EBAG9^{-/-} Mäusen wurde kein signifikanter Unterschied in der Gedächtnisbildung bezüglich Anzahl und Frequenz der antigenspezifischen CTLs gefunden. Ein Fehlen von EBAG9 scheint unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Gedächtnisbildung zu haben. Ob dennoch Unterschiede in Abhängigkeit von der Art des Antigenstimulus und der Dosis bestehen bleibt damit unbeantwortet. Dies zu erforschen ist Gegenstand weitergehender Untersuchungen in der Arbeitsgruppe. Auch technische Schwierigkeiten mögen dafür verantwortlich sein, mögliche Unterschiede im EG.7/OT-I System nicht aufdecken zu können. Insbesondere wären Färbungen mit spezifischen Pentameren geeigneter, um weitaus sensitiver quantitative Unterschiede zwischen Wt und EBAG9-defizienten Tieren zu erfassen. Es bestehen Hinweise, dass Effektorphase (107) und Gedächtnisphase im Rahmen anderer antigenspezifischer, tumorunabhängiger Immunisierungsprotokolle in Wt und EBAG9^{-/-} Mäusen unterschiedlich verlaufen (A. Rehm, persönliche Mitteilung).

Eine weitere Erklärung, weshalb die Antitumorantwort nach Vakzinierung eine hohe Effektivität erreichte, mag auch die Induktion und Rekrutierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen sein.

Diese spielen allgemein eine große Rolle in der T-Zell vermittelten Immunität und können so zu einem potenten Antitumoreffekt beisteuern(117, 118).

Das Ausschalten von EBAG9 in Empfängertieren scheint unter den gewählten Bedingungen eines solide wachsenden subkutanen Tumors keine entscheidende Rolle zu spielen.

5.5 Polyklonaler Transfer von CTLs mit unterstützender DC-Vakzinierung führt in Wt und EBAG9^{-/-} Tieren zu einem vergleichbaren Antitumoreffekt

Bei einer Injektion von naiven Wt und EBAG9^{-/-} Mäusen wurde eine nicht ausreichende, bei der Injektion von vakzinierten Wt und EBAG9^{-/-} Mäusen hingegen eine zu potente Abstoßung der E.G-7 Tumorzellen erreicht. Dies verhinderte die Aufdeckung eines möglichen Unterschieds zwischen den beiden Genotypen. Daher wurde versucht, die Erfahrungen der beiden vorangegangenen Experimente zu kombinieren. Es wurde ein Transfer naiver, nicht voraktivierter polyklonaler Wt und EBAG9^{-/-} CTLs mit unterstützender DC-Vakzinierung kombiniert. Durch die Kombination des Transfers mit der Vakzinierung sollte: a) einer zu niedrigen Frequenz an antigenspezifischen CTLs vorgebeugt b) ein zu potenter Effekt einer Vakzinierung vermieden werden.

Die Vakzinierung und der Transfer wurden zeitlich früher angesetzt als bei den späteren monoklonalen Experimenten. Damit wurde der Tatsache Rechnung getragen, dass die Frequenz an antigenspezifischen CTLs niedriger ist und die Zellen nicht vorstimuliert wurden. Insgesamt war ein wesentlich geringerer, direkter Antitumoreffekt als bei einem Transfer von voraktivierten, monoklonalen OT-I transgenen CTLs zu erwarten. Der Versuchsaufbau orientierte sich zur besseren Vergleichbarkeit an anderen Arbeiten, welche ebenfalls polyklonale ATzT-Ansätze verwendet haben (110). Die DC-Vakzinierung wurde zusätzlich durchgeführt, um die Aktivierung der CTLs zu verbessern und die rasche Expansion antigenspezifischer Klone zu fördern. Dieses Vorgehen führt zum Beispiel im Falle einer Cbl-b Defizienz zu einem potenten Antitumoreffekt (110).

Anders als bei einem polyklonalen Transfer von Cbl-b-defizienten CTLs mit adjuvanter DC-Gabe (110) kam es im Rahmen der von uns gewählten Bedingungen zu keiner ausreichenden Tumorkontrolle in den beiden Gruppen. Vermutlich ist auch unter den in 4.6 gewählten Bedingungen die Anzahl antigenspezifischer CTLs zu gering, um eine effektive Immunantwort zu ermöglichen. Der Effekt einer EBAG9-Defizienz scheint für einen polyklonalen Ansatz mit unterstützender DC-Vakzinierung nicht ausreichend zu sein, um bei den gewählten Mengen an transferierten Lymphozyten im E.G-7 Modell einen potenten Antitumoreffekt zu bewirken. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Empfängertieren für Wt und EBAG9^{-/-} CD8⁺-T-Zellen konnte nicht beobachtet werden.

Einen alternativen Versuchsaufbau würde eine vorausgehende Vakzinierung von Donortieren darstellen. So könnte bereits vorab die Frequenz der antigenspezifischen CTLs erhöht werden. Bei Transfer und unterstützender DC-Gabe könnte so der Gedächtniseffekt zwischen Wt und EBAG9^{-/-} Tieren verglichen werden. Hierdurch würde wesentlich rascher eine Expansion an antigenspezifischen CTLs erfolgen als bei der Gabe von naiven polyklonalen CTLs, da die naiven CTLs erst aktiviert werden müssen. Es wäre somit eine raschere und potentere Antwort zu erwarten. Eine weitere Möglichkeit wäre der Transfer von CTLs aus E.G-7 tumortragenden Tieren.

Es konnte bezüglich Aktivierung und Effektorzellbildung kein Unterschied zwischen den polyklonal Wt und EBAG9^{-/-} transferierten Tieren festgestellt werden.

5.6 Monoklonale adoptive T-Zelltransferversuche

Bei *in vivo* Maustumormodellen besteht meist eine biologische Variabilität zwischen den Versuchstieren. Trotz eines einheitlichen genetischen Hintergrundes verhalten sich die einzelnen Mäuse und Tumore innerhalb des Modells nicht immer exakt gleich. Für eine bessere Interpretierbarkeit der Ergebnisse wurde daher für die Transferversuche eine Referenzgruppe aus unbehan-

delten C57BL/6 Wt Tieren herangezogen. Zu diesem Zweck wurden Tiere, welche ein gutes Anwachsen der Tumore zeigten, aus sechs unabhängigen Versuchen zusammengefasst. Sie dienen als Referenzwert, um das Ansprechen einer Therapie, den Verlauf des Tumorwachstums oder einen Vorteil bezüglich des Überlebens darzustellen. Es kam im Rahmen der Experimente immer wieder vor, dass Tiere bis zum Start des ATzT keine Tumore entwickelt hatten. Diese Tiere wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Es sollten nur Tiere mit einem sicher etablierten und messbaren Tumor behandelt werden.

5.6.1 ATzT mit 5×10^6 OT-I EBAG9^{-/-} CTLs führt zu einer effizienten Antitumorantwort

Das Ergebnis von 4.9.1 zeigt klar, dass 5×10^6 OT-I EBAG9^{-/-} CTLs in der Lage sind, bei gut etablierten Tumoren einen potenten Antitumoreffekt zu vermitteln. Eine Defizienz für EBAG9 inhibiert daher nicht die Funktion von CTLs gegen solide Tumore. Dies ist gut vereinbar mit den Ergebnissen von Rüder et al 2009 (91), in denen das Fehlen von EBAG9 die zytotoxische Effektorfunktion von CTLs verbesserte.

Aufgrund des hohen Donortierbedarfs war keine ausreichende Anzahl an Mäusen mit 5×10^6 Wt OT-I CTLs transferiert worden, sodass kein aussagekräftiger Vergleich zwischen Wt und EBAG9^{-/-} getroffen werden kann. Ob die Defizienz von EBAG9 in diesem Setting einen Vorteil bietet bleibt daher offen. Um hierfür eine Aussage treffen zu können, wären weitere Experimente mit mehr Wt Tieren nötig. Auf weitere Versuche mit 5×10^6 transferierten CTLs wurde verzichtet, da sich 1×10^6 CTLs als ausreichend herausstellten, um biologische Effekte der Therapie gut nachweisen zu können. Das Primärziel in dieser Arbeit war nicht das Erreichen einer Tumoreradikation, sondern die Herausarbeitung eines therapeutischen Bereiches, bei dem Unterschiede zwischen Wt und Eabg9^{-/-} CTLs sichtbar wurden.

5.6.2 ATzT von OT-I Wt bzw. EBAG9^{-/-} CTLs führt zu einem vergleichbaren, potenten Antitumoreffekt

In den ATzT Versuchen mit 1×10^6 Wt bzw. EBAG9^{-/-} OT-I CTLs konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bei der Tumorprogression oder dem Gesamtüberleben festgestellt werden. Dass T-Zellen, die ein einzelnes spezifische Tumorantigen erkennen, in der Lage sind, eine potente Antitumorantwort zu etablieren, ist bereits aus anderen Arbeiten bekannt (119). Eine komplette Remission konnte jedoch nur bei einem kleinen Teil der therapierten Tiere erreicht werden. Meist war das Ansprechen auf den ATzT nur vorübergehend.

CTLs sind oft nicht in der Lage, etablierte (>10 Tage) und proliferierende Tumore zu eliminieren (120). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Entstehung von Zellklonen der Tumorzellen sein, welche die Expression wichtiger Oberflächenantigene verlieren ("antigen loss variants", engl.

ALV) (120). ALV sind E.G-7 Zellen, welche kein OVA mehr exprimieren und somit auch kein SIINFEKL als spezifisches Antigen über MHC-I Moleküle präsentieren. Die Entstehung von ALV im Rahmen der ATzT wird besonders durch eine niedrige Expression des Zielantigens sowie einer fehlenden Notwendigkeit des Antigens für die Tumorpheriferation begünstigt (119). Da die E.G-7 Tumorzelllinie durch Einbringen einer einzelnen OVA-Genkopie in die EL-4 Zelllinie generiert wurde (121), stellt OVA kein für die Proliferation der Tumorzellen nötiges Antigen dar.

Der statistisch nicht nachweisbare Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-} transferierter Gruppe war im Sinne der Arbeitshypothese unerwartet, da aufgrund der erhöhten zytotoxischen Effektoraktivität der EBAG9-defizienten CTLs gegen hämatopoetische oder Suspensions-Zielzellen eine bessere Wirksamkeit für diese Gruppe erwartet werden durfte.

Dennoch fällt bei genauerer Betrachtung der Daten insbesondere der 1x10⁶ Transfergruppen eine deutliche Tendenz zugunsten der EBAG9-deletierten T-Zellen auf:

1.) Die Mehrzahl der kompletten Remissionen in der EBAG9 Gruppe wurde früher erreicht als in der Wt Gruppe (Tag 20: EBAG9: 9 vs 4 Wt). Im Verlaufe von 5 Tagen näherten sich die Remissionsraten jedoch einander an (Tag 25: EBAG9: 11 vs 8 Wt). Dies könnte auf einen Vorteil der EBAG9-Defizienz v.a. in der frühen Phase des ATzT hindeuten.

2.) Die Regression des Tumolvolumens war stärker ausgeprägt in der EBAG9^{-/-} Gruppe.

3.) Die Wiederanstiegsgeschwindigkeit des Tumolvolumens nach der stärksten Regression war langsamer in den EBAG9^{-/-} Empfängertieren als in den Wt Tieren.

Warum sind diese beobachteten Effekte dennoch geringer als etwa die publizierten signifikanten Unterschiede bei Miyazaki et al (2014) (107)?

Eine mögliche Erklärung für den fehlenden statistisch relevanten Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-} Transfergruppe mag darin liegen, dass die CTL-vermittelte Zytotoxizität bei der Abstoßung solider Tumore eine geringere Rolle spielen mag als bisher angenommen. So mehrten sich in den letzten Jahren die Hinweise darauf, dass Effektormechanismen wie die IFN- γ Sekretion einen wesentlich bedeutenderen Beitrag zur Abstoßung solider Tumore leisten als direktes, Perforin und Granzym vermitteltes zelluläres Killing (98, 122).

Die IFN- γ Sekretion durch CTLs vermittelt z.B. einen potenten Antitumoreffekt für die Abstoßung von soliden Melanomen der B16-OVA Zelllinie. ATzT in tumortragende IFN- γ Rezeptor^{-/-} Tiere führt lediglich zu einer Verzögerung des Auswachsens der Tumore (98). Diese Verzögerung wurde vermutlich durch die direkte, Granzym und Perforin vermittelte, zytolytische Aktivität der CTLs hervorgerufen. Auch unter Verwendung von IFN- γ ^{-/-} CTL Donoren ist die Antitumorantwort

gestört (98). OT-I Zellen müssen IFN- γ produzieren, um die B16-OVA Tumore erfolgreich abstoßen zu können. Ihre zytolytische Aktivität alleine reicht nicht aus. Die Sekretion von IFN- γ durch die CD8⁺-T-Zellen ist eine entscheidende Voraussetzung für die Abstoßung der soliden B16-OVA Tumoren (98). Des Weiteren korreliert die Effektivität mit der CTLs *in vivo* Tumore abstoßen am besten mit ihrer Fähigkeit nach Erkennung ihres Antigens IFN- γ zu sezernieren und weniger mit ihrer direkten zytolytischen Aktivität *in vitro* (98, 122, 123).

Für den Antitumoreffekt von IFN- γ wurden verschiedene Mechanismen postuliert. Einerseits belegen frühere Arbeiten, dass IFN- γ einen direkten Effekt auf die Tumorzellen hat (124, 125). Dabei wurden die Induktion eines Immunoproteasoms mit verstärkter Generierung antigener Peptide sowie die Hochregulation von MHC-I Molekülen mit verstärkter Antigenpräsentation als Wirkmechanismen beschrieben (125, 126). IFN- γ steigert so die Immunogenität der Tumorzellen und unterstützt die Erkennung und Eliminierung der entarteten Zellen. Dieser Effekt trägt zur Abstoßung von etablierten Tumoren bei (124). Eine Hochregulation von MHC-I Molekülen würde EBAG9^{-/-} CTLs mit erhöhter zytolytischer Effizienz jedoch unterstützen, sodass der fehlende Unterschied darüber alleine nicht kausal begründet werden kann.

Des Weiteren wurde auch die Produktion proapoptotischer Moleküle unter Einfluss von IFN- γ in den neoplastischen Zellen als Wirkmechanismen beschrieben (125).

Im Gegensatz dazu zeigen neuere Arbeiten, dass v.a. die Wirkung des sezernierten IFN- γ auf die Stromazellen und weniger direkte Effekte auf Tumorzellen für eine potente antineoplastische Wirkung des ATzT von Bedeutung sind (98). Solide wachsende Tumorzellen sind in ein Stroma von sehr variabler Dichte und Zusammensetzung eingebettet. Dieses Stroma kann manchmal einen Großteil des Tumorgewebes ausmachen. Das Tumorstroma besteht aus vielen verschiedenen Typen normaler Körperzellen z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, T-Zellen usw., aber auch aus extrazellulärer Matrix. Diese werden vom Tumor rekrutiert, um das Wachstum zu fördern (113). Über die IFN- γ Wirkung auf die Stromazellen wird eine Abstoßung der soliden Tumoren initiiert (98). Dabei wird der durch die IFN- γ Wirkung erreichte Effekt auf die Tumorregression u.a. durch Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese erzielt. Wichtig für die Angiogenesehemmung scheint dabei v.a. eine IFN- γ Wirkung auf nicht-hämatopoetische Stromazellen zu sein. Dies ist ein wesentlicher Effektormechanismus für die T-Zell vermittelte Abstoßung von Tumoren (127). Zusätzlich zur Zerstörung der Tumorgefäße durch IFN- γ vermittelten Effekte (119) kommt es mit der Zerstörung des Tumorstromas auch zur Eliminierung von ALV (128). Dieser IFN- γ vermittelte Mechanismus steht im Kontrast zur vorherrschenden Meinung, dass der Hauptmechanismus der Tumorabstoßung durch CTLs v.a. das direkte Abtöten der Zielzellen sein soll (98).

Der fehlende Unterschied zwischen der Wt und EBAG9^{-/-} Gruppe wäre vereinbar mit der Annahme, dass die Sekretion von IFN- γ eine wichtigere Komponente der Elimination solider Tumore durch das Immunsystem darstellt als die Perforin und Granzym vermittelte Zytotoxizität durch CTLs. Schließlich unterscheiden sich Wt und EBAG9^{-/-} CTLs nur in ihrer zytolytischen Kapazität, d.h. dem Effekt, der mittels Granzym-Ausschüttung induziert wird. In der IFN- γ Sekretion unterscheiden sich EBAG9 Wt und EBAG9^{-/-} CTLs jedoch nicht (91). Trotz verbesserter zytolytischer Aktivität in EBAG9-defizienten CTLs besteht so kein Vorteil für das Überleben. Daher wären die Beobachtungen in dieser Arbeit mit der Annahme vereinbar, dass die direkte zytolytische Aktivität bei soliden und gut etablierten Tumoren für das Langzeitüberleben eine nachgeordnete Rolle zu spielen scheint.

Ein möglicher Ansatz dies weiter zu überprüfen wäre z.B. den OT-I CTL Transfer früher durchzuführen, noch bevor es zu einer ausgeprägten Tumorstromaentwicklung gekommen ist. In dem gewählten Modell verändert sich der Aufbau des malignen Gewebes im Laufe der Zeit. Die E.G-7 Tumorzellen werden als Einzelzellsuspension durch s.c. Injektion verabreicht. Um die im Gewebe vereinzelt vorliegenden Tumorzellen herum entwickelt sich ein solides und strukturiertes Tumorgewebe. Während die einzelnen Zellen früh möglicherweise noch gut für direkte Zytotoxizität zugänglich sind, so kann deren Zugänglichkeit für CTLs im Rahmen eines steigenden Organisationsgrades hin zum soliden Tumor abnehmen. Alternativ könnten auch Tumorzellen und OT-I CTLs simultan oder als Gemisch s.c. verabreicht werden. Primärer Endpunkt wäre hierbei das Auswachsen von Tumoren in Wt vs EBAG9^{-/-} transferierten Tieren. Ein Unterschied zugunsten der EBAG9-defizienten CTLs würde dafür sprechen, dass gegen nicht solide Tumore, wie etwa bei Leukämien, direktes Killing einen wichtigen Abwehrmechanismus darstellt.

Bei organisiertem soliden Tumorgewebe hingegen scheinen aber andere Mechanismen zu dominieren. Um den Einfluss der zytotoxischen Effektorfunktion unabhängig von der IFN- γ Sekretion zu untersuchen, könnten auch CTL Transferexperimente mit der kombinierten Gabe von neutralisierenden IFN- γ Antikörpern oder in IFN- γ Rezeptor-defizienten Mäuse durchgeführt werden. Derartige Experimente konnten im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen leider nicht mehr durchgeführt werden.

Eine weitere wichtige Erklärung für einen fehlenden signifikanten Unterschied zwischen Wt und EBAG9^{-/-} CTLs könnte in einem funktionellen Antagonismus von TGF- β gegenüber dem EBAG9-Knock-Out Effekt liegen:

Das E.G-7 Tumormodell wurde durch das Einbringen von einer einzelnen OVA-Genkopie in die EL-4 Zelllinie generiert (121). EL-4 Tumorzellen wurden auch zur Untersuchung der Rolle von TGF- β für die Tumorprogression verwendet (75). EL-4 Zellen hemmen die zelluläre Immunität

durch Sekretion großer Mengen an TGF- β (129) und können möglicherweise auch die TGF- β Produktion aus anderen Gewebequellen stimulieren (75). Ihr Wachstum ist mit der TGF- β Produktion im Tumormilieu assoziiert (130). Eine Reduktion von TGF- β im EL-4 Tumormodell reduziert die Tumorigenität und verbessert die zytotoxische Aktivität (129).

TGF- β ist ein wichtiges immunsuppressives Molekül im Rahmen der ATzT maligner Tumore (75, 131). Seine Sekretion spielt eine entscheidende Rolle beim Immunescape neoplastischer Zellen (75). Es wird von Tumorzellen, DCs, T-/B-Zellen und Makrophagen produziert (131). TGF- β entfaltet seine immunsuppressive Wirkung über verschiedenen Mechanismen wie Förderung von regulatorischen CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen, verminderter Antigenpräsentation und Hemmung der T-Zellproliferation. Des Weiteren inhibiert TGF- β aber auch die Expression von Genen, die für zytotoxische Effektoren in CTLs, wie etwa Granzym A und B sowie Perforin (75, 131) kodieren. Die Antagonisierung von TGF- β *in vivo* stellt die Expression des zytotoxischen Genprogrammes wieder her (75). Durch Blockade des TGF- β 1-Rezeptors kann die Effektivität der ATzT verbessert werden (131). Es stellt sich daher die Frage, ob der TGF- β vermittelte Effekt als möglicher funktioneller Gegenspieler des EBAG9-Knock-Out-Effekts fungieren könnte.

Das Ausschalten von EBAG9 fördert den Transport der zytotoxischen Effektormoleküle wie z.B. Granzym A oder B zu den sekretorischen Lysosomen (91). TGF- β hemmt die Aktivierung der zytotoxischen T-Zell Gene und somit z.B. die Produktion von Granzym A, B und Perforin (75). Es wäre also denkbar, dass die Wirkung von TGF- β durch die verminderte Synthese der zytotoxischen Moleküle funktionell den Effekt der Defizienz an EBAG9 mit einem erhöhten Transport der zytotoxischen Moleküle antagonisiert.

Um diesen postulierten Antagonismus zu überprüfen, könnten erneut ATzT-Versuche im E.G-7 Modell, diesmal jedoch mit zusätzlicher *in vivo* Blockade von TGF- β durchgeführt werden. Sollte sich unter TGF- β Blockade ein deutlicher Unterschied zugunsten der EBAG9^{-/-} CTLs zeigen, wäre dies ein Hinweis auf die Interaktivität von Mikromilieu und zellulärer Funktionalität im Sekretionsverhalten.

Vergleicht man die 5x10⁶ OT-I EBAG9^{-/-} CTL Transfergruppe mit den 1x10⁶ OT-I Transfers, so zeigte sich in der Hochdosisgruppe überraschenderweise kein Vorteil. Es bestand trotz eines vergleichbaren Transferzeitpunkts (5x10⁶ durchschnittlich an Tag 12,7; 1x10⁶ durchschnittlich an Tag 11,4) sogar ein signifikant besseres Überleben für die 1x10⁶ Transfergruppen. Mit einer Reduktion des mittleren Tumolvolumens um ca. 50% von Tag 15 auf Tag 20 bestand in der Hochdosisgruppe auch keine höhere Effektivität. Dabei sollte allerdings berücksichtigt werden, dass das mittlere

Ausgangstumorvolumen an Tag 13 in der Hochdosisgruppe im Vergleich zu der Niedrigdosisgruppe ca. 45% größer war. Dies könnte durchaus ausreichen, um eine bessere therapeutische Wirkung des 5×10^6 Transfers zu maskieren.

5.6.3 ATzT mit 5×10^5 Wt vs EBAG9^{-/-} OT-I CTLs führt zu einem vergleichbarem Antitumoreffekt

Beim Transfer von 5×10^5 OT-I CTLs in tumortragende C57BL/6 Tiere mit ATzT am Tag 8 nach Tumorzellinokulation wurde bei 2/6 Wt und bei 4/8 EBAG9^{-/-}, trotz der geringen Zahl an transferierten Zellen, ein Ansprechen beobachtet. Allerdings zeigten sich kaum Unterschiede im Verlauf des Tumorwachstums zwischen den Wt und EBAG9^{-/-} OT-I CTL transferierten Tieren. Bezüglich des Überlebens bestand zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Die Hypothese, dass EBAG9^{-/-} CTLs potenter in der Abstoßung solider Tumore sind, konnte in diesem Versuch nicht bestätigt werden.

Dass trotz der niedrigen Menge an transferierten CTLs Antitumoreffekte beobachtbar waren, lag vermutlich an dem frühen Zeitpunkt des Transfers. Es bestand so ein günstigeres CTL-Zielzellen Verhältnis. Auch sind die Tumore noch nicht so gut etabliert und leichter zugänglich.

Vergleicht man die Daten der OT-I EBAG9^{-/-} Gruppe (Transfer am Tag 8) mit den Ergebnissen eines anderen Experiments, bei dem erst am Tag 14 5×10^5 OT-I E9^{-/-} CTLs transferiert wurden, so konnte nur mehr ein Ansprechen bei 2/7 Tieren beobachtet werden. Eine komplette Remission blieb aus. Es bestand sogar ein signifikanter Überlebensvorteil für die am Tag 8 transferierte Gruppe, was darauf hinweist, dass bei fortgeschrittenen Tumoren mehr CTLs für einen ausreichenden Effekt transferiert werden müssen. Daraus würde sich die Therapieempfehlung ableiten, dass ATzT zu einem frühen Zeitpunkt durchgeführt werden sollte bzw. bei etablierten soliden Tumoren auf den Transfer einer ausreichend hohen Zellzahl zu achten ist. Es sollten v.a. Ansätze mit adjuvanten Transfers nach chirurgischer Resektion/Chemotherapie bzw. im Stadium minimaler Resterkrankung untersucht werden.

5.7 Transduktionsversuche

5.7.1 Virusproduktion mit der Verpackungszelllinie Plat-E

Es konnten erfolgreich mithilfe der Verpackungszelllinie Plat-E Retroviren zur Transduktion hergestellt werden. Diese enthielten entweder die von Markus Biedermann generierten shRNAs + GFP zur Herunterregulation von EBAG9 oder nur GFP.

Als wichtige Einflussfaktoren für den Erfolg der Transfektion und Virusproduktion wurde sowohl auf die Transfektionsreagenzien als auch die Kultivierung der Plat-E Zellen großes Augenmerk

gelegt. Die Virusproduktions-Zelllinie musste vor der Transfektion zur Virusproduktion entsprechend ausplattiert werden. Dazu sollten, um ideale Bedingungen zu gewährleisten, auf Zellkulturschalen für den Tag der Transfektion ca. 60-70% Konfluenz erreicht werden. Auch wurde darauf geachtet, dass die Zellen in der Kultur möglichst nie konfluierend wachsen. Hierdurch sollte zellulären Stressreaktionen vorgebeugt und somit mögliche Veränderungen in Wachstums und Produktionsverhalten vermieden werden. Bei Verwendung für die Virusproduktion wurden die Zellen keinem Selektionsdruck ausgesetzt. Daher wurden regelmäßige frische Reservekulturen, welche unter Selektionsdruck erstellt worden waren, aufgetaut, um eine gute Qualität der Produktionszellen zu gewährleisten.

Weitere kritische Größen stellten dar: eine unzureichende Versorgung der Zellen mit Medium nach Transfektion, zu hoher mechanischer Stress beim Ablösen und Ausplattieren sowie Mediumverbrauch während der Kultivierung.

Als kritischster Schritt erwies sich neben dem guten Ausplattieren aber v.a. die Durchführung des Transfektionsprozesses. Ein schlechter Transfektionserfolg gemessen am prozentualen Anteil der GFP⁺ Zellen war ein guter negativer Prädiktor für die Qualität der Virusüberstände.

5.7.2 Transduktion von primären Maus-CD8⁺-T-Zellen

Für das Erreichen eines effizienten Transduktionsergebnisses wurden verschiedene Protokolle getestet. Das hier etablierte Protokoll wies eine hohe Reproduzierbarkeit und ausreichend hohe Transduktionsraten auf. Als wichtiger Schritt für ein gutes Ergebnis erwies sich dabei vor allem die zweifache Transduktion, wenn mit dem pSuper.retro.neo-EGFP⁺ Vektor gearbeitet wurde.

Die Transduktionsrate mittels des MP71-Vektorsystems war, verglichen mit dem pSuper.retro.neo-EGFP⁺ Vektorsystem, in der Regel erheblich besser (132). Dies mag darin begründet liegen, dass das pSuper.retro.neo-EGFP⁺ Vektorsystem ursprünglich zur Expression von shRNAs in Säugerzellen entwickelt worden war und nicht gezielt für T-Zellen optimiert wurde. Für die Transgenexpression wird der H1-RNA Promoter verwendet (133). Der MP71 Vektor hingegen verwendet den "myeloproliferative sarcoma virus long terminal repeat" (MPSV LTR) Promoter sowie andere regulatorische Elemente. Er wurde für die Transgenexpression in T-Lymphozyten optimiert und erreicht dadurch in Maus-T-Zellen eine 10x höhere Genexpression als herkömmliche für T-Zellen verwendete Vektoren, die z.B. auf dem "Moloney murine leukemia virus" basieren (132). So wird bei Verwendung des MP71-Vektors selbst bei niedriger Mehrfachinsertion je Zelle ein stärkeres Signal erreicht, als bei hoher Mehrfachinsertion anderer Vektoren (132). Dadurch besitzt der MP71 Vektor eine bessere Expression des gekoppelten GFPs und des ggf.

inserteren Transgens (132). Somit ist zu erwarten, dass dieser Vektor auch für die Herunterregulation von EBAG9 Vorteile bringen kann.

Einen kritischen Einfluss auf die Transduktionseffizienz der T-Zellen hatten vor allem die Voraktivierung sowie die weitere Kultivierung. Für eine effiziente Voraktivierung waren eine gute Stimulation über CD3/CD28 beschichteten Zellkulturplatten, adäquate Versorgung mit Zytokinen wie IL-2, IL-7 sowie eine ausreichende Zelldichte wesentliche Einflussfaktoren. Für eine gute Viabilität der transduzierten Zellen war die Kultivierung und Versorgung mit Medium während der Transduktion entscheidend. Lange Zeiten außerhalb des Brutschrankes und Mangel an frischem Medium wurden möglichst vermieden. Auch sollte die Zellkultur durch Zugabe frischen Mediums nicht zu stark verdünnt werden, da hierdurch die Wirkung der von den Zellen produzierten Wachstumsfaktoren, wie z.B. autokrines IL-2, im Überstand abgeschwächt worden wäre. Des Weiteren galt es mechanischen Stress durch zu hartes Pipettieren, häufiges Umsetzen oder Waschen möglichst zu vermeiden.

5.7.3 Anreicherung der transduzierten Zellen mittels Zellsorter

Die Anreicherung der transduzierten Zellen erfolgte i.d.R. am 3-5 Tag nach Transduktion. Zu einem früheren Zeitpunkt wurde nicht angereichert, um das Sammeln von pseudotransduzierten Zellen zu vermeiden. Pseudotransduzierte Zellen besitzen aufgrund eines nicht genomisch integrierten Plasmids oder in den retroviralen Partikeln enthaltene GFP-Moleküle ein GFP-Signal, sie stellen jedoch nicht stabil transduzierte Zellen dar (134, 135). Da ein anderes Stimulations- und Kultivierungsschema als in der vorangegangenen Arbeit von M. Biedermann gewählt wurde, erfolgte das Zellsorting früher. Bei einem späteren Sorting, etwa am Tage sechs und nachfolgend, wäre eine Restimulation der Zellen nötig geworden. Einfrieren der Zellen vor der Anreicherung wurde vermieden, um Verluste durch weitere Manipulation infolge des Einfrier-Auftau-Prozesses zu vermeiden. Dies hätte ggf. vor einer Anreicherung eine erneute Expansion der transduzierten Zellpopulationen erforderlich werden lassen.

Die Proliferation und Expansion der Zellen nach Transduktion war unter den gewählten Bedingungen gut möglich, was sich v.a. am hohen Mediumverbrauch der Zellkultur zeigte. Es wurde hier meist mit IL-2 und IL-7 stimuliert, teilweise aber auch kurz mit IL-15 weiter kultiviert. IL-2 fördert die rasche Proliferation sowie Effektorfunktion und stellt *in vitro* einen wichtigen Wachstumsfaktor für CTLs dar. IL-7 und v.a IL-15 sind hingegen wichtig für das Überleben von Gedächtnis-CTLs (136, 137). IL-15 führt zu einer starken Proliferation von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen (138). Während IL-2 in CD8⁺-T-Zellen auch Apoptose induzieren und so das Überleben und

die Proliferation von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen limitieren kann, hilft IL-15 eine CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellpopulation zu erhalten und hemmt Apoptose (139).

Durch die Kulturprotokolle im Rahmen dieser Arbeit entspricht der Subtyp der hier analysierten CTLs, aufgrund der vorwiegenden IL-2/IL-7 Stimulation, eher einem Effektorotyp (137, 140). Der Subtyp der CTLs in der Masterarbeit von M. Biedermann entspricht aufgrund der vorwiegenden IL-15 Stimulation, eher einem Gedächtnis-Typ (138, 139). Dadurch ergeben sich mögliche unterschiedliche Proteinzusammensetzungen der Zellen und unterschiedliche Expressionsmengen von EBAG9. Dies könnte sich auf die späteren Westernblotanalysen ausgewirkt haben.

5.7.4 Westernblotanalyse der EBAG9-Expression in den transduzierten und angereicherten T-Zellen

In dieser Arbeit konnte in den mit der shRNA 547 transduzierten CTLs im Vergleich zu mit dem GFP-kodierenden MP71-Vektor transduzierten CTLs eine Herunterregulation der Proteinexpression von EBAG9 um 42.4 % erreicht werden. Dieser Effekt erwies sich als etwas geringer im Vergleich zu der Herunterregulation in B3Z-Zellen oder in NIH3T3 Fibroblasten, wie in der Masterarbeit von M. Biedermann verwendet.

In murinen transduzierten CD8⁺-T-Zellen konnten die shRNAs 322 und 547 Sequenzen auf Transkriptebene die Expression um 32.4% (shRNA322) und 40.3% (shRNA547) senken (103). Diese in der Arbeit von M. Biedermann auf RNA-Ebene gezeigte Herunterregulation der EBAG9-RNA in primären Maus CTLs konnte, im Rahmen dieser Arbeit, für die shRNA547 auf Proteinebene erreicht und bestätigt werden.

Für die beobachteten Unterschiede und Schwankungen kommen mehrere mögliche Ursachen in Betracht. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären T-Zellen verhalten sich in Bezug auf die Transduzierbarkeit anders als die permanente B3Z-Zelllinie oder NIH3T3 Zellen und erlauben möglicherweise geringere Expressionshöhen des Transgens. Weiterhin bestanden Unterschiede im Kultivierungsprotokoll für T-Zellen, insbesondere wurde hier vor allem IL-2 und IL-7 eingesetzt, während M. Biedermann die Kultur mit IL-15 fortführte. Andere Unterschiede bestanden in der Dauer der Kultivierung, sodass sich verschiedene T-Zell Differenzierungsstufen herausbilden konnten. Dies hat Auswirkungen auf den Phänotyp und somit die Proteinzusammensetzung der CTLs (siehe oben) (103, 137-140). Durch das verkürzte Zeitintervall zwischen Transduktion und Anreicherung, wie es im Protokoll dieser Arbeit verwendet wurde, könnte der Anteil an pseudotransduzierten Zellen der hier präsentierten Probe etwas größer gewesen sein. Dies könnte das Ausmaß der Herunterregulation von EBAG9 ebenfalls beeinflusst haben.

Der Vergleich zwischen Genexpression und Proteinexpression, wie hier dargestellt, deutet darauf hin, dass beide Größen nicht deckungsgleich sein müssen. Insbesondere sind die gemessenen mRNA-Spiegel noch weiteren regulatorischen Prozessen unterworfen, bevor es zur Proteintranslation kommt. Umgekehrt können auch Proteine posttranslational modifiziert und transportiert werden, sodass auch hieraus eine Ungleichheit zwischen Gen- bzw. mRNA-Spiegeln und Proteinen resultieren kann. Aufgrund der Regulierbarkeit des EBAG9-Gens durch Östrogen (90, 141) könnte die Expressionshöhe in den verschiedenen Zellkulturen auch durch die Verfügbarkeit von Östrogen im verwendeten Kälberserum mit verursacht sein. Die Menge an Hormonen ist in den FRS-Chargen für die Nährmedien der Zellen nicht immer konstant und kann variieren. Dadurch kann ein Unterschied im Östrogengehalt des Mediums durchaus Auswirkungen auf die EBAG9-Expression haben. Auch wurde die Mediencharge und der Anbieter während der Experimente gewechselt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der shRNA 547 eine Herunterregulation von EBAG9 in primären CTLs auf Proteinebene erreicht werden kann. Diese Senkung mag unter verschiedenen Kulturbedingungen der Zellen variieren. Zu untersuchen bleibt auch noch, inwieweit der Grad der Herunterregulation einen Einfluss auf die biologische Aktivität der CTLs hat. Ein funktioneller direkter Vergleich mit genetisch deletierten CTLs aus EBAG9^{-/-} Tieren wäre erforderlich.

Um die Herunterregulation durch die shRNAs zu verbessern, sollte versucht werden, daraus eine miRNA zu generieren und diese anschließend in den MP71 Vektor einzubringen. Der MP71-Vektor ermöglicht v.a. in T-Lymphozyten eine viel stärkere Expression des inserierten Transgens als herkömmliche Vektoren (z.B. der auf dem Moloney murine leukemia virus basierende Mo-MLV Vektor) (132). Dadurch könnte die Transkription der inhibitorischen RNA und somit möglicherweise die Herunterregulation von EBAG9 verbessert werden. Diese Experimente waren im Rahmen der Arbeit allerdings leider nicht mehr möglich. Sie sind Gegenstand aktueller Forschungen in der Arbeitsgruppe.

6. Literaturverzeichnis

1. Proudfoot O, Pouniotis D, Sheng KC, Loveland BE, Pietersz GA. Dendritic cell vaccination. Expert review of vaccines. 2007 Aug;6(4):617-33.
2. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>. Krebs war 2013 die zweithäufigste Todesursache. Statistisches Bundesamt. 2015 02.02.2015;
3. Woehrer A, Bauchet L, Barnholtz-Sloan JS. Glioblastoma survival: has it improved? Evidence from population-based studies. Current opinion in neurology. 2014 Dec;27(6):666-74.
4. Zeng J, Zhan P, Wu G, Yang W, Liang W, Lv T, Song Y. Prognostic value of Twist in lung cancer: systematic review and meta-analysis. Translational lung cancer research. 2015 Jun;4(3):236-41.
5. Aberle DR, Berg CD, Black WC, Church TR, Fagerstrom RM, Galen B, Gareen IF, Gatsonis C, Goldin J, Gohagan JK, Hillman B, Jaffe C, Kramer BS, Lynch D, Marcus PM, Schnall M, Sullivan DC, Sullivan D, Zylak CJ. The National Lung Screening Trial: overview and study design. Radiology. 2011 Jan;258(1):243-53.
6. Board CNe. Side Effects of Chemotherapy. <http://www.cancer.net/>. 2015 08/2015.
7. Lotfi-Jam K, Carey M, Jefford M, Schofield P, Charleson C, Aranda S. Nonpharmacologic strategies for managing common chemotherapy adverse effects: a systematic review. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2008 Dec 1;26(34):5618-29.
8. Oh GS, Kim HJ, Shen A, Lee SB, Khadka D, Pandit A, So HS. Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. Electrolyte & blood pressure : E & BP. 2014 Dec;12(2):55-65.
9. Redmond K. Advances in supportive care. European journal of cancer care. 1996 Jun;5(2 Suppl):1-7.
10. Olszanski AJ. Principles of immunotherapy. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN. 2015 May;13(5 Suppl):670-2.
11. Kumar S, Mason M. Principles of cancer treatment by immunotherapy. Surgery (Oxford). 2012 4//;30(4):198-202.
12. Blankenstein T, Coulie PG, Gilboa E, Jaffee EM. The determinants of tumour immunogenicity. Nature reviews Cancer. 2012 Apr;12(4):307-13.
13. Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. Nat Rev Immunol. 2003 08//print;3(8):630-41.
14. Gao J, Bernatchez C, Sharma P, Radvanyi LG, Hwu P. Advances in the development of cancer immunotherapies. Trends in immunology. 2013 Feb;34(2):90-8.

15. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*. 2010 Aug 19;363(8):711-23.
16. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England journal of medicine*. 2012 Jun 28;366(26):2443-54.
17. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012 04//print;12(4):252-64.
18. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003 Sep;3(9):666-75.
19. Morris EC, Bendle GM, Stauss HJ. Prospects for immunotherapy of malignant disease. *Clinical and experimental immunology*. 2003 Jan;131(1):1-7.
20. Turtle CJ, Hudecek M, Jensen MC, Riddell SR. Engineered T cells for anti-cancer therapy. *Current opinion in immunology*. 2012 Oct;24(5):633-9.
21. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2013 Apr 18;368(16):1509-18.
22. Stromnes IM, Schmitt TM, Chapuis AG, Hingorani SR, Greenberg PD. Re-adapting T cells for cancer therapy: from mouse models to clinical trials. *Immunological reviews*. 2014 Jan;257(1):145-64.
23. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science (New York, NY)*. 2002 Oct 25;298(5594):850-4.
24. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, Robbins PF, Huang J, Citrin DE, Leitman SF, Wunderlich J, Restifo NP, Thomasian A, Downey SG, Smith FO, Klapper J, Morton K, Laurencot C, White DE, Rosenberg SA. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008 Nov 10;26(32):5233-9.
25. Leen AM, Rooney CM, Foster AE. Improving T cell therapy for cancer. *Annual review of immunology*. 2007;25:243-65.

26. Heslop HE, Ng CY, Li C, Smith CA, Loftin SK, Krance RA, Brenner MK, Rooney CM. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nature medicine*. 1996 May;2(5):551-5.
27. Peggs KS, Verfuert S, Pizzey A, Khan N, Guiver M, Moss PA, Mackinnon S. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet*. 2003 Oct 25;362(9393):1375-7.
28. Vincent K, Roy DC, Perreault C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):2951-9.
29. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nature reviews Cancer*. 2004 May;4(5):371-80.
30. Maher J, Davies ET. Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy. *British journal of cancer*. 2004 Aug 31;91(5):817-21.
31. Palucka K, Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*. 2013 Jul 25;39(1):38-48.
32. Monjazeb AM, Hsiao HH, Sckisel GD, Murphy WJ. The role of antigen-specific and non-specific immunotherapy in the treatment of cancer. *Journal of immunotoxicology*. 2012 Jul-Sep;9(3):248-58.
33. Gribben JG, Fowler N, Morschhauser F. Mechanisms of Action of Lenalidomide in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015 Jul 20.
34. Totzke G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition. *Oncogene*. 2003 Sep 11;22(39):8021-30.
35. Ciombor KK, Wu C, Goldberg RM. Recent therapeutic advances in the treatment of colorectal cancer. *Annual review of medicine*. 2015;66:83-95.
36. Riddell SR. Finding a place for tumor-specific T cells in targeted cancer therapy. *The Journal of experimental medicine*. 2004 Dec 20;200(12):1533-7.
37. Akatsuka Y, Morishima Y, Kuzushima K, Kodera Y, Takahashi T. Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions. *Cancer science*. 2007 Aug;98(8):1139-46.
38. Rubio V, Stuge TB, Singh N, Betts MR, Weber JS, Roederer M, Lee PP. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nature medicine*. 2003 Nov;9(11):1377-82.
39. Ghanekar SA, Nomura LE, Suni MA, Picker LJ, Maecker HT, Maino VC. Gamma interferon expression in CD8(+) T cells is a marker for circulating cytotoxic T lymphocytes that recognize an HLA A2-restricted epitope of human cytomegalovirus phosphoprotein pp65. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2001 May;8(3):628-31.

40. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, Lee CC, Restifo NP, Schwarz SL, Cogdill AP, Bishop RJ, Kim H, Brewer CC, Rudy SF, VanWaes C, Davis JL, Mathur A, Ripley RT, Nathan DA, Laurencot CM, Rosenberg SA. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*. 2009 Jul 16;114(3):535-46.
41. Redmond WL, Sherman LA. Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity*. 2005 Mar;22(3):275-84.
42. Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M. Application of adoptive T-cell therapy using tumor antigen-specific T-cell receptor gene transfer for the treatment of human leukemia. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:521248.
43. Falkenburg JH, van de Corput L, Marijt EW, Willemze R. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Experimental hematology*. 2003 Sep;31(9):743-51.
44. Hambach L, Goulmy E. Immunotherapy of cancer through targeting of minor histocompatibility antigens. *Current opinion in immunology*. 2005 Apr;17(2):202-10.
45. Bleakley M, Riddell SR. Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia. *Immunology and cell biology*. 2011 Mar;89(3):396-407.
46. Zhang S, Zhang H, Zhao J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009 Jul 10;384(4):405-8.
47. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2001 Nov;1(2):126-34.
48. de Saint Basile G, Menasche G, Fischer A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol*. 2010 Aug;10(8):568-79.
49. Williams MA, Bevan MJ. Effector and memory CTL differentiation. *Annual review of immunology*. 2007;25:171-92.
50. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):355-65.
51. Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nature immunology*. 2000 Dec;1(6):469-74.
52. Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer research*. 2003 Jul 15;63(14):4095-100.
53. Green AM, Difazio R, Flynn JL. IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2013 Jan 1;190(1):270-7.
54. Deauvieu F, Ollion V, Doffin AC, Achard C, Fonteneau JF, Verronese E, Durand I, Ghittoni R, Marvel J, Dezutter-Dambuyant C, Walzer T, Vie H, Perrot I, Goutagny N,

- Caux C, Valladeau-Guilemond J. Human natural killer cells promote cross-presentation of tumor cell-derived antigens by dendritic cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015 Mar 1;136(5):1085-94.
55. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of experimental medicine*. 1983 Sep 1;158(3):670-89.
 56. Karupiah G, Harris N. Inhibition of viral replication by nitric oxide and its reversal by ferrous sulfate and tricarboxylic acid cycle metabolites. *The Journal of experimental medicine*. 1995 Jun 1;181(6):2171-9.
 57. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology*. 1997;15:749-95.
 58. Makgoba MW, Sanders ME, Shaw S. The CD2-LFA-3 and LFA-1-ICAM pathways: relevance to T-cell recognition. *Immunology today*. 1989 Dec;10(12):417-22.
 59. Beal AM, Anikeeva N, Varma R, Cameron TO, Norris PJ, Dustin ML, Sykulev Y. Protein kinase C theta regulates stability of the peripheral adhesion ring junction and contributes to the sensitivity of target cell lysis by CTL. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008 Oct 1;181(7):4815-24.
 60. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*. 2001 Nov;15(5):751-61.
 61. Menasche G, de Saint Basile G. EBAG9 tempers lymphocyte killing activity. *The Journal of clinical investigation*. 2009 Aug;119(8):2136-40.
 62. Blott EJ, Griffiths GM. Secretory lysosomes. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002 Feb;3(2):122-31.
 63. Stinchcombe JC, Griffiths GM. Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of cell and developmental biology*. 2007;23:495-517.
 64. Burkhardt JK, Hester S, Lapham CK, Argon Y. The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *The Journal of cell biology*. 1990 Dec;111(6 Pt 1):2327-40.
 65. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, Slot JW, Geuze HJ. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *The Journal of experimental medicine*. 1991 May 1;173(5):1099-109.
 66. Gruenberg J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001 Oct;2(10):721-30.
 67. Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity*. 1999 May;10(5):585-94.
 68. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell death and differentiation*. 2008 Feb;15(2):251-62.

69. Griffiths GM, Isaaz S. Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *The Journal of cell biology*. 1993 Feb;120(4):885-96.
70. Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003 Mar;4(3):202-12.
71. De Matteis MA, Luini A. Exiting the Golgi complex. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008 Apr;9(4):273-84.
72. Smith AJ, Oertle J, Warren D, Prato D. Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for malignant cancers: Summary and perspective. *Journal of Cellular Immunotherapy*. 2016 11//;2(2):59-68.
73. Qin DY, Huang Y, Li D, Wang YS, Wang W, Wei YQ. Paralleled comparison of vectors for the generation of CAR-T cells. *Anti-cancer drugs*. 2016 Sep;27(8):711-22.
74. Bendle GM, Linnemann C, Hooijkaas AI, Bies L, de Witte MA, Jorritsma A, Kaiser AD, Pouw N, Debets R, Kieback E, Uckert W, Song JY, Haanen JB, Schumacher TN. Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nature medicine*. 2010 May;16(5):565-70, 1p following 70.
75. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer cell*. 2005 Nov;8(5):369-80.
76. Wallner S, Gruber T, Baier G, Wolf D. Releasing the brake: targeting Cbl-b to enhance lymphocyte effector functions. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:692639.
77. Paolino M, Penninger JM. Cbl-b in T-cell activation. *Seminars in immunopathology*. 2010 Jun;32(2):137-48.
78. Liu Q, Zhou H, Langdon WY, Zhang J. E3 ubiquitin ligase Cbl-b in innate and adaptive immunity. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2014;13(12):1875-84.
79. Chiang JY, Jang IK, Hodes R, Gu H. Ablation of Cbl-b provides protection against transplanted and spontaneous tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2007 Apr;117(4):1029-36.
80. Paolino M, Penninger JM. E3 ubiquitin ligases in T-cell tolerance. *European journal of immunology*. 2009 Sep;39(9):2337-44.
81. Hinterleitner R, Gruber T, Pfeifhofer-Obermair C, Lutz-Nicoladoni C, Tzankov A, Schuster M, Penninger JM, Loibner H, Lametschwandtner G, Wolf D, Baier G. Adoptive transfer of siRNA Cblb-silenced CD8+ T lymphocytes augments tumor vaccine efficacy in a B16 melanoma model. *PloS one*. 2012;7(9):e44295.
82. Paolino M, Thien CB, Gruber T, Hinterleitner R, Baier G, Langdon WY, Penninger JM. Essential role of E3 ubiquitin ligase activity in Cbl-b-regulated T cell functions. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011 Feb 15;186(4):2138-47.

83. Rolle CE, Carrio R, Malek TR. Modeling the CD8+ T effector to memory transition in adoptive T-cell antitumor immunotherapy. *Cancer research*. 2008 Apr 15;68(8):2984-92.
84. Masopust D, Picker LJ. Hidden memories: frontline memory T cells and early pathogen interception. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012 Jun 15;188(12):5811-7.
85. Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):982-7.
86. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, Palmer DC, Antony PA, Hwang ST, Rosenberg SA, Waldmann TA, Restifo NP. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Jul 5;102(27):9571-6.
87. Zhou Q, Munger ME, Highfill SL, Tolar J, Weigel BJ, Riddle M, Sharpe AH, Vallera DA, Azuma M, Levine BL, June CH, Murphy WJ, Munn DH, Blazar BR. Program death-1 signaling and regulatory T cells collaborate to resist the function of adoptively transferred cytotoxic T lymphocytes in advanced acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Oct 7;116(14):2484-93.
88. Ikeda K, Sato M, Tsutsumi O, Tsuchiya F, Tsuneizumi M, Emi M, Imoto I, Inazawa J, Muramatsu M, Inoue S. Promoter analysis and chromosomal mapping of human EBAG9 gene. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000 Jul 5;273(2):654-60.
89. Ogushi T, Takahashi S, Takeuchi T, Urano T, Horie-Inoue K, Kumagai J, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma. *Cancer research*. 2005 May 1;65(9):3700-6.
90. Tsuchiya F, Ikeda K, Tsutsumi O, Hiroi H, Momoeda M, Taketani Y, Muramatsu M, Inoue S. Molecular cloning and characterization of mouse EBAG9, homolog of a human cancer associated surface antigen: expression and regulation by estrogen. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001 Jun 1;284(1):2-10.
91. Ruder C, Hopken UE, Wolf J, Mittrucker HW, Engels B, Erdmann B, Wollenzin S, Uckert W, Dorken B, Rehm A. The tumor-associated antigen EBAG9 negatively regulates the cytolytic capacity of mouse CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2009 Aug;119(8):2184-203.
92. Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM. Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science (New York, NY)*. 2004 Jul 2;305(5680):55-9.
93. Helmich BK, Dutton RW. The role of adoptively transferred CD8 T cells and host cells in the control of the growth of the EG7 thymoma: factors that determine the relative effectiveness and homing properties of Tc1 and Tc2 effectors. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001 Jun 1;166(11):6500-8.
94. <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200249.pdf>. Data-Sheet: XL1-Blue Competent Cells 200249-11 Revision #074003. Copyright © 2004 by Stratagene.

95. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 2012 Jul;9(7):671-5.
96. Wilson HL, O'Neill HC. Murine dendritic cell development: difficulties associated with subset analysis. *Immunology and cell biology*. 2003 Aug;81(4):239-46.
97. Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R, Linsley PS, Hathcock KS, Hodes RJ, Lowry RP, Pearson TC. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1994 Jun 1;152(11):5208-19.
98. Schuler T, Blankenstein T. Cutting edge: CD8+ effector T cells reject tumors by direct antigen recognition but indirect action on host cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003 May 1;170(9):4427-31.
99. Miyagawa F, Gutermuth J, Zhang H, Katz SI. The use of mouse models to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance. *Journal of autoimmunity*. 2010 Nov;35(3):192-8.
100. Jensen MM, Jorgensen JT, Binderup T, Kjaer A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC medical imaging*. 2008;8:16.
101. Gallagher SR. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al]*. 2011 Jan;Appendix 3:3d.
102. Clemente T, Dominguez MR, Vieira NJ, Rodrigues MM, Amarante-Mendes GP. In vivo assessment of specific cytotoxic T lymphocyte killing. *Methods (San Diego, Calif)*. 2013 Jun 1;61(2):105-9.
103. Biederman M. Beeinflussung des sekretorischen Weges in zytotoxischen T-Lymphozyten zur Regulation ihrer zytolytischen Funktion für eine Krebsimmuntherapie. 2012 April.
104. Batlevi CL, Matsuki E, Brentjens RJ, Younes A. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016 Jan;13(1):25-40.
105. Loeser S, Loser K, Bijker MS, Rangachari M, van der Burg SH, Wada T, Beissert S, Melief CJ, Penninger JM. Spontaneous tumor rejection by cbl-b-deficient CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2007 Apr 16;204(4):879-91.
106. Guo H, Qiao G, Ying H, Li Z, Zhao Y, Liang Y, Yang L, Lipkowitz S, Penninger JM, Langdon WY, Zhang J. E3 ubiquitin ligase Cbl-b regulates Pten via Nedd4 in T cells independently of its ubiquitin ligase activity. *Cell reports*. 2012 May 31;1(5):472-82.
107. Miyazaki T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Kondo T, Takahashi S, Inoue S. EBAG9 modulates host immune defense against tumor formation and metastasis by regulating cytotoxic activity of T lymphocytes. *Oncogenesis*. 2014;3:e126.
108. Seki N, Brooks AD, Carter CR, Back TC, Parsonneault EM, Smyth MJ, Wiltout RH, Sayers TJ. Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas

- ligand-mediated lysis in vitro, but cause tumor regression in vivo in the absence of perforin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002 Apr 1;168(7):3484-92.
109. Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity*. 1994 Aug;1(5):343-6.
 110. Lutz-Nicoladoni C, Wallner S, Stoitzner P, Pircher M, Gruber T, Wolf AM, Gastl G, Penninger JM, Baier G, Wolf D. Reinforcement of cancer immunotherapy by adoptive transfer of cblb-deficient CD8+ T cells combined with a DC vaccine. *Immunology and cell biology*. 2012 Jan;90(1):130-4.
 111. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Advances in Physiology Education*. 2013 06/19/received; 08/31/accepted;37(4):273-83.
 112. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WF, Anderson CC, Lantz O, Matzinger P. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5346-54.
 113. Ibe S, Qin Z, Schuler T, Preiss S, Blankenstein T. Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions. *The Journal of experimental medicine*. 2001 Dec 3;194(11):1549-59.
 114. Andrews DM, Maraskovsky E, Smyth MJ. Cancer vaccines for established cancer: how to make them better? *Immunological reviews*. 2008 Apr;222:242-55.
 115. D HY, Appel S. Current status and future perspectives of dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Scandinavian journal of immunology*. 2013 Aug;78(2):167-71.
 116. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nature medicine*. 1995 Dec;1(12):1297-302.
 117. Toes RE, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *The Journal of experimental medicine*. 1999 Mar 1;189(5):753-6.
 118. Hirschhorn-Cymerman D, Budhu S, Kitano S, Liu C, Zhao F, Zhong H, Lesokhin AM, Avogadri-Connors F, Yuan J, Li Y, Houghton AN, Merghoub T, Wolchok JD. Induction of tumoricidal function in CD4+ T cells is associated with concomitant memory and terminally differentiated phenotype. *The Journal of experimental medicine*. 2012 Oct 22;209(11):2113-26.
 119. Anders K, Buschow C, Herrmann A, Milojkovic A, Loddenkemper C, Kammertoens T, Daniel P, Yu H, Charo J, Blankenstein T. Oncogene-targeting T cells reject large tumors while oncogene inactivation selects escape variants in mouse models of cancer. *Cancer cell*. 2011 Dec 13;20(6):755-67.
 120. Spiotto MT, Rowley DA, Schreiber H. Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. *Nature medicine*. 2004 Mar;10(3):294-8.

121. Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*. 1988 Sep 9;54(6):777-85.
122. Barth RJ, Jr., Mule JJ, Spiess PJ, Rosenberg SA. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1991 Mar 1;173(3):647-58.
123. Becker C, Pohla H, Frankenberger B, Schuler T, Assenmacher M, Schendel DJ, Blankenstein T. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. *Nature medicine*. 2001 Oct;7(10):1159-62.
124. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994 Sep;1(6):447-56.
125. Bohm W, Thoma S, Leithauser F, Moller P, Schirmbeck R, Reimann J. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998 Jul 15;161(2):897-908.
126. Strehl B, Seifert U, Kruger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunological reviews*. 2005 Oct;207:19-30.
127. Qin Z, Blankenstein T. CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*. 2000 Jun;12(6):677-86.
128. Zhang B, Karrison T, Rowley DA, Schreiber H. IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. *The Journal of clinical investigation*. 2008 Apr;118(4):1398-404.
129. Won J, Kim H, Park EJ, Hong Y, Kim SJ, Yun Y. Tumorigenicity of mouse thymoma is suppressed by soluble type II transforming growth factor beta receptor therapy. *Cancer research*. 1999 Mar 15;59(6):1273-7.
130. Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nature medicine*. 2001 Oct;7(10):1118-22.
131. Wallace A, Kapoor V, Sun J, Mrass P, Weninger W, Heitjan DF, June C, Kaiser LR, Ling LE, Albelda SM. Transforming growth factor-beta receptor blockade augments the effectiveness of adoptive T-cell therapy of established solid cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008 Jun 15;14(12):3966-74.
132. Engels B, Cam H, Schuler T, Indraccolo S, Gladow M, Baum C, Blankenstein T, Uckert W. Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Human gene therapy*. 2003 Aug 10;14(12):1155-68.
133. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science (New York, NY)*. 2002 Apr 19;296(5567):550-3.

134. Galla M, Will E, Kraunus J, Chen L, Baum C. Retroviral pseudotransduction for targeted cell manipulation. *Molecular cell*. 2004 Oct 22;16(2):309-15.
135. Nash KL, Lever AM. Green fluorescent protein: green cells do not always indicate gene expression. *Gene therapy*. 2004 Jun;11(11):882-3.
136. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*. 2012 Apr;12(4):269-81.
137. Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):595-602.
138. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity*. 1998 May;8(5):591-9.
139. Klebanoff CA, Finkelstein SE, Surman DR, Lichtman MK, Gattinoni L, Theoret MR, Grewal N, Spiess PJ, Antony PA, Palmer DC, Tagaya Y, Rosenberg SA, Waldmann TA, Restifo NP. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8⁺ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Feb 17;101(7):1969-74.
140. Manjunath N, Shankar P, Wan J, Weninger W, Crowley MA, Hieshima K, Springer TA, Fan X, Shen H, Lieberman J, von Andrian UH. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation*. 2001 Sep;108(6):871-8.
141. Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Molecular and cellular biology*. 1998 Jan;18(1):442-9.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein ganz persönlicher Dank, voller Respekt und tiefste Wertschätzung gilt Herrn Dr. Armin Rehm. Ich möchte mich bedanken, dass er mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen sowie mir das hier vorliegende Projekt als Student der Humanmedizin ermöglicht hat. Seiner grenzenlosen Geduld, unermüdlichen Energie und intensiven Betreuung verdanke ich es, dass ich mich als unerfahrene Laborratte bewähren, an den an mich gestellten Anforderungen wachsen und die Forschungsarbeiten sowie das Schreiben der Arbeit erfolgreich zu Ende bringen konnte. Er hat mir die Möglichkeit gegeben wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen. Er hat mich motiviert wenn Misserfolge auftraten und die Ergebnisse auf sich warten ließen. Ich danke Ihm für seine Führung und Leitung bei der Planung der Experimente sowie für seine exzellenten und ideenreichen Vorschläge und intensive Betreuung beim Schreiben der Arbeit.

Ich möchte mich auch von ganzem Herzen und aufs Tiefste bedanken bei der Technischen Assistentin Kerstin Gerlach, welche mich in labortechnischen Arbeiten unter die Fittiche genommen und ausgebildet hat. Von Ihr habe ich die meisten Techniken sowie Arbeiten im Labor erklärt und mit Engelsgeduld gezeigt bekommen. Trotz meiner initial oft unbeholfenen Bemühung blieb sie immer ruhig und gelassen und stand mir alle Zeit mit Rat und Tat zur Seite.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Kollegen und Mitdoktoranden Dr. Stefanie Herda, Marleen Gloger, Marcel Gätjen sowie Dr. Kristina Heinig und Florian Scholz, bedanken. Sie standen mir als in experimentellen Dingen erfahrenere Naturwissenschaftler immer mit Rat und Tat zur Seite. Es bestand eine wunderbare Teamatmosphäre und ich bin sehr froh, dass ich mit Ihnen arbeiten durfte.

Ich möchte mich auch herzlich bei PD Dr. Uta Höpken für Ihre wissenschaftlichen Verbesserungsvorschläge bei den Work in Progress Seminaren, für Ihre Hilfe bei den Tierexperimenten sowie für Ihre permanente Verfügbarkeit als Ansprechpartnerin bei Fragen und Problemen bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei den Technischen Assistentinnen Kerstin Krüger und Brigitte Wollert-Wulf bedanken, welche mich in kritischen Situationen immer gut mit Materialien, Zellen oder Ratschlägen versorgt haben.

Ein besonderer Dank gilt letztlich und vor allem auch meinen Eltern, welche mich all die Jahre ertragen mussten, mir meine Ausbildung erst ermöglicht haben und sich geduldigst mein Gejammer anhörten, wenn die Experimente mal nicht so gut gelaufen sind. Danke!

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christof Peter Bauer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Einfluss der Deletion von EBAG9 auf die zytotoxische Effektorfunktion von CD8⁺ T-Lymphozyten im E.G-7 Tumormodell" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift