

**Entwicklung und Charakterisierung
von zellulären B7 Vakzinen
sowie Analyse und Manipulation
ihrer Wechselwirkung mit T-Zellen**

vom Fachbereich Biologie der
Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Kai Kronfeld
aus Mainz

Referenten: Prof. Dr. B. Seliger
Prof. Dr. K. Nixdorff
Prof. Dr. F. Pfeifer

Tag der Einreichung: 28.11.03
Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.04

Darmstadt 2004
D17

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Barbara Seliger für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema zu forschen. Ihre Begeisterungsfähigkeit und ständige Diskussionsbereitschaft haben zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Ich danke der kompletten Arbeitsgruppe für die stets hervorragende Atmosphäre und Unterstützung während unserer gemeinsamen Arbeit. Besonders möchte ich hier Frau Simone Mendler, Frau Dr. Jutta Goldschmidt und Frau Manuela Hörner für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Proteomexpressionsanalysen dieser Arbeit danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Freundin Andrea und meine Familie, die mit all ihrer Kraft, Zeit und ständiger Motivation geholfen haben, diese Arbeit zu vollenden.

Ich danke Herrn Dr. Eckhardt und Herrn Dr. Kühlecke von der EUFETS AG, für die Unterstützung bei der Herstellung retroviraler Kulturüberstände und Frau Dr. Juliane Fluck und Prof. Hinrich Akben für ihre Unterstützung bei der Erstellung verschiedener Publikationen.

Vielen Dank sage ich auch der Mildred-Scheel Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ich danke Frau Prof. Kathryn Nixdorff und Frau Prof. Felicitas Pfeifer für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit. Ohne ihre frühe Zusage wäre die Erstellung dieser Arbeit in dieser Form nicht möglich geworden.

Vielen Dank sage ich auch allen meinen Freunden, die mich in den Jahren der Doktorarbeit stets begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	5
1. Immunität als Schutz des Menschen vor Krankheiten	5
2. Entwicklung von T-Zellen	6
3. Die Aktivierung von T-Zellen	7
4. Costimulatorische Moleküle der B7-Proteinfamilie	10
5. Signaltransduktion aktivierter T-Zellen	12
6. <i>Immune escape</i> Mechanismen von Tumorzellen	15
7. Nierenzellkarzinom	16
8. spezifische Immuntherapie	18
9. neue Therapiewege – Retroviren und Ribozyme	21
10. Identifizierung von Biomarkern mittels Proteomanalyse	24
II. Problemstellung und Ziele	26
III. Material	27
1. Geräte und Software	27
2. Verbrauchsmaterialien	28
3. Chemikalien	28
4. Material für die Zellkultur	30
4.1. Zelllinien	30
4.2. Medien und Zusätze	31
4.3. Lösungen für die Zellkultur	32
4.4. Komplettsysteme	32
4.5. Antikörper	33
4.6. Enzyme	34
4.7. retrovirale Kulturüberstände	34
5. Material für die Molekularbiologie	35
5.1. Komplettsysteme	35
5.2. Enzyme	35
5.3. Molekulargewichts- und Längenstandards	35
5.4. Oligonukleotide	36
5.5. Bakterienstamm	39
5.6. Bakterienkulturmedien	39
5.7. Lösungen für die Bakterientransformation	39
5.8. Lösungen für die Plasmidpräparation	40
5.9. Lösungen für Gelelektrophorese von DNA	40
5.10. Basisvektoren und verwendete Expressionsvektoren	41
5.11. Lösungen für Western Blot Analyse	45
5.12. Lösungen für die Proteinaufreinigung	46
5.13. Lösungen für Proteomanalysen	47
IV. Methoden	49
1. Zellkulturmethoden	49
1.1. Allgemeine Methoden der Zellkultur	49
1.2. Kryokonservierung	49
1.3. Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung in einer Zählkammer	49
1.4. Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA	49
1.5. stabiler Gentransfer eukaryotischer Zellen mittels Retroviren	50
1.6. Aufarbeitung von <i>buffy coat</i> Präparationen	51
1.7. Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen	52
1.8. Generierung von professionellen antigenpräsentierenden Zellen	53
1.9. Proliferationstest mittels BrdU-ELISA	55
1.10. Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels MTS-Test	55
1.11. Bestimmung der Zytokinsekretion	55

1.12. Zytotoxizitätstest	55
1.13. Durchflußzytometrie.....	56
2. Molekularbiologie	57
2.1. Vermehrung und Isolierung rekombinanter DNA	57
2.2. Spektralphotometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	58
2.3. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	59
2.4. Native Agarose-Gelelektrophorese von DNA	59
2.5. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	59
2.6. Ligation.....	60
2.7. Sequenzierung von DNA Molekülen	60
2.8. RNA-Präparation aus eukaryotischen Zellen.....	60
2.9. Reverse Transkription und PCR.....	60
2.10. Protein-Präparation aus eukaryotischen Zellen.....	61
2.11. Protein-Konzentrationsbestimmung	61
2.12. Proteinaufreinigung mittels Protein A.....	61
2.13. Glycosidase F Behandlung	61
2.14. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot.....	62
2.15. Proteomanalyse	62
2.16. Generierung von Proteinnetzwerken	65
V. Ergebnisse.....	66
1. Steigerung der Immunogenität von Nierenkarzinomzelllinien durch B7-Genstransfer.....	66
1.1. Untersuchung und Charakterisierung der B7-Klone	67
1.2. Klinische Studie mit B7 modifizierten Tumorzellen	83
2. Neue Wege der Immuntherapie mit Retroviren und Ribozymen ?.....	90
2.1. Etablierung eines B7 retroviralen Transfektionssystems	90
2.2. Einsatz eines retroviralen B7-Transfektionssystems.....	94
2.3. Reduktion der CTLA-4 Expression durch ein anti-CTLA-4 Ribozym.....	96
3. Einfluss von B7-Homologen auf die T-Zell Aktivierung	101
4. Proteomanalyse B7 aktivierter T-Zellen	110
4.1. Analyse des Proteinexpressionsmusters B7 aktivierter T-Zellen.....	110
4.2. Phosphoproteomanalyse B7 aktivierter T-Zellen.....	114
4.3. Neue Biomarker zur Detektion einer erfolgreichen Immuntherapie.....	117
VI. Diskussion	120
1. Costimulation über B7/CD28/CTLA-4	120
2. Optimierung des zellulären B7 Vakzins <i>in vitro</i>	120
3. Klinische Studie – Einsatz des B7-Vakzins <i>in vivo</i>	123
4. Autologes B7 Vakzin mit Retroviren.....	124
5. Verbesserte T-Zell Aktivierung durch ein anti CTLA-4 Ribozym.....	126
6. Costimulation durch B7 Homologe Moleküle.....	127
7. Die optimale Therapie für RC-Patient MZ2003RC.....	129
8. Identifizierung von Biomarkern Vakzin aktivierter T-Zellen	131
9. Ausblick.....	133
VII. Zusammenfassung	135
VIII. Literatur	136
IX. Abkürzungen	158
X. Anhang	161
1. Klassifikation von Nierentumoren	161
2. DNA-Sequenzen	162
3. SOP - Behandlung und Verabreichung des zellulären B7-Vakzins.....	164
4. Liste der identifizierten Proteine der T-Zell Proteomanalyse	168
5. Liste der identifizierten Proteine der T-Zell Phosphoproteomanalyse	173

I. Einleitung

1. Immunität als Schutz des Menschen vor Krankheiten

Der Mensch hat zum Schutz gegen verschiedenste Erkrankungen, wie Krebs oder Infektionen durch krankheitsauslösende Mikroorganismen und Viren, ein ausgeprägtes Immunsystem entwickelt. Aufgrund der komplexen Aufgaben, die das Immunsystem wahrnimmt, setzt es sich aus vielen Komponenten mit multiplen Funktionen zusammen. Dabei unterscheidet man zunächst zwischen den Komponenten der natürlichen, angeborenen Immunität und der spezifischen, erworbenen Immunität.

Die Komponenten der natürlichen Immunität reagieren unspezifisch auf Mikroorganismen oder geschädigte Körperzellen. Die natürliche Immunität gegen in den Körper eindringende Mikroorganismen wird durch physikalisch-chemische Barrieren, wie zum Beispiel Haut oder Schleimhäute, durch das Komplementsystem, Phagozyten (neutrophile Granulozyten und Makrophagen) und durch die von Makrophagen gebildeten Zytokine vermittelt. Im Gegensatz dazu werden defekte oder geschädigte Körperzellen von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) oder Phagozyten erkannt und zerstört (Tab.1).

Die Komponenten der erworbenen Immunität reagieren spezifisch auf fremde Makromoleküle, sogenannte Antigene. Die Stärke der spezifischen Immunantwort ist meist von der Menge des Antigens abhängig: je größer die Antigenmenge im Körper ist, um so stärker fallen die Immunreaktionen aus.

Die spezifische Immunität wird über Antikörper, die von B-Zellen (B-Lymphozyten) produziert und sezerniert werden, und über T-Zellen (T-Lymphozyten), die spezifisch auf Antigene reagieren, die von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden, vermittelt.

Die Reaktion der T-Zellen beinhaltet dabei zum einen eine Abtötung von Tumorzellen oder Zellen, die von Viren bzw. intrazellulären Mikroorganismen befallen sind, und zum anderen eine Produktion und Sezernierung von Zytokinen, die auf andere Zellen des Immunsystems wirken können.

Die spezifische Immunantwort verstärkt die Schutzmechanismen der natürlichen Immunität und ihre Zellen sind in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis für fremde Antigene aufzubauen, um bei erneutem Kontakt effizienter zu reagieren.

Tab.1 Eigenschaften und Komponenten der natürlichen und spezifischen Immunität (Abbas et al., 2003)

	natürliche Immunität	spezifische Immunität
Eigenschaften		
Spezifität	unspezifisch für mikrobielle Oberflächenantigene	spezifisch für mikrobielle, virale und Tumorantigene
Diversität	beschränkt	sehr groß
Gedächtnis	nein	ja
Unterscheidung eigen - fremd	ja	ja
Komponenten		
physikalisch-chemische Barrieren	Haut, Schleimhäute	–
Blutbestandteile	Komplement	Antikörper
Zellen	Phagozyten NK-Zellen	Lymphozyten
Effektormoleküle	z.B. IL-1 β , TNF α	z.B. Perforin, Granzyme, FasL

2. Entwicklung von T-Zellen

Eine wichtige Rolle für die spezifische Immunität bei der Erkennung und Abtötung von Mikroorganismen, virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen spielen die Lymphozyten.

Die Lymphozyten (B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und NK-T Zellen) entwickeln sich wie die anderen Zellen des Immunsystems aus den sich selbsterneuernden Stammzellen des Knochenmarks und stammen dabei von einer gemeinsamen Lymphozyten-Vorläuferzelle ab (Abb. 1).

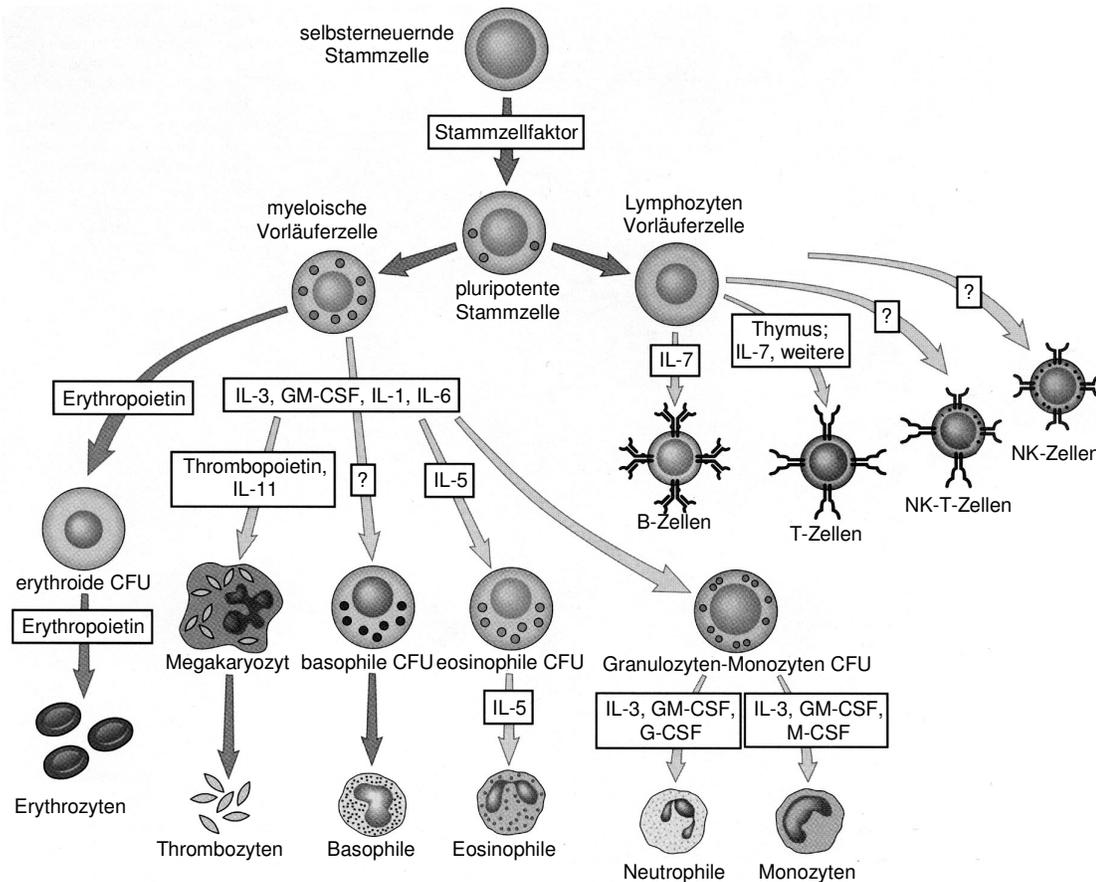


Abb. 1 Die Zellen des Immunsystems entwickeln sich aus den Stammzellen des Knochenmarks

Die Zellen des Immunsystems entwickeln sich alle über verschiedene Zwischenstufen aus den sich selbsterneuernden Knochenmarkstammzellen durch den Einfluss verschiedener Zytokine. Makrophagen entwickeln sich aus den Monozyten *in vivo* beim Eintritt ins Gewebe, *in vitro* kann man diese Differenzierung durch GM-CSF erreichen. Dendritische Zellen (DC) lassen sich *in vitro* mit GM-CSF und IL-4 aus Monozyten differenzieren. *In vivo* ist ihr Entstehungsweg noch nicht genau bekannt.

CFU = colony forming unit

Bevor B- und T-Zellen ihre Aufgaben im menschlichen Immunsystem übernehmen können, müssen sie noch verschiedene Ausreifungsstufen durchlaufen. Die B-Zellen vollziehen diese Reifung schon im Knochenmark (*bone marrow*), während die T-Zellen im Thymus ausreifen.

Aufgabe der ausgereiften B-Zellen ist es, Antikörper gegen mikrobielle, virale oder Tumoranigene zu bilden und so Mikroorganismen oder erkrankte Körperzellen für die Abtötung durch NK-Zellen und Phagozyten zu markieren.

Zur Erkennung fremder Antigene besitzen T-Zellen einen T-Zell Rezeptor (TZR) auf der Zelloberfläche. Die T-Zell Rezeptoren jeder T-Zelle unterscheiden sich, da durch genetische Rekombination verschiedener Elemente auf DNA-Ebene eine Vielfalt von ca. 10^{16} verschiedenen Molekülen gebildet werden kann.

T-Zellen, die einen Rezeptor tragen, der körpereigene Antigene erkennt, werden bei der Ausreifung im Thymus abgetötet. T-Zellen, die Rezeptoren besitzen, die keine eigenen Proteine erkennen, reifen aus und treten in den Körperkreislauf von Blut und lymphatischem System ein, wo sie fremde Antigene binden können.

T-Zellen klassifiziert man in zwei verschiedene Typen:

Die T-Helferzellen, charakterisiert durch das Oberflächenmolekül CD4 (*cluster of differentiation* Protein 4), binden mit ihren Rezeptoren an antigene Peptide, die über MHC-Moleküle der Klasse II präsentiert werden, und regen dadurch B-Zellen zu stärkerer Teilung, Differenzierung und Antikörperproduktion und Makrophagen zu gesteigerter Aktivität an. T-Helferzellen selbst reagieren auf den Kontakt mit fremdem Antigen mit starker Zellteilung und Produktion von Zytokinen.

Die zytotoxischen T-Zellen, charakterisiert durch das Oberflächenmolekül CD8, binden an Komplexe aus fremden Peptiden und MHC-Molekülen der Klasse I und reagieren ebenfalls mit starker Teilung und der Produktion von Zytokinen. Sie töten die virusinfizierten oder tumorartig entarteten Körperzellen ab (Abb. 2).

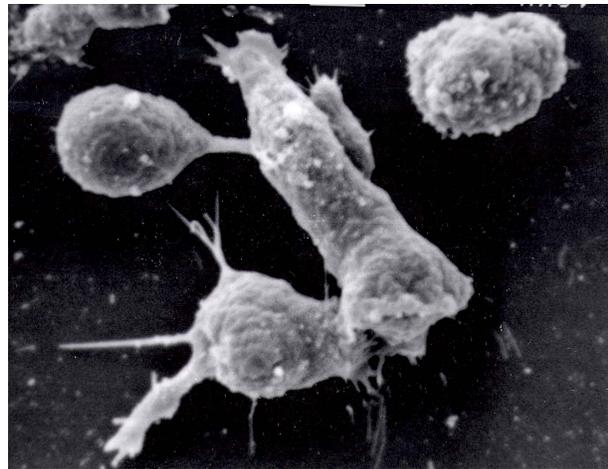


Abb. 2 Zytotoxische T-Zellen töten eine Tumorzelle
Zwei T-Zellen (links) erkennen und attackieren eine Tumorzelle (Mitte).

3. Die Aktivierung von T-Zellen

Damit es zu einer Bindung von T-Zellen an antigenpräsentierende Zellen kommen kann, müssen auf beiden Zellen eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen exprimiert werden, die zusammen die immunologische Synapse bilden.

Neben den Molekülen, die für eine spezifische T-Zell Aktivierung notwendig sind und im weiteren näher behandelt werden, wie MHC-Moleküle, T-Zell Rezeptor und costimulatorische Moleküle, gehören die Adhäsionsmoleküle LFA-3 und ICAM-1 auf Seite der APZ und CD2 und LFA-1 auf Seiten der T-Zellen als essentielle Bestandteile zur immunologischen Synapse (Creusot et al., 2002; Davis, 2002; Dustin und Colman, 2002; Faroudi et al., 2002; Lee et al., 2002; van der Merwe, 2002). Neben der Bindung der verschiedenen Moleküle kommt es zu einer Polarisierung der Zelle, die für eine erfolgreiche Signaltransduktion notwendig ist (Costello et al., 2002; Cullinan et al., 2002; Krummel und Davis, 2002).

Antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) über MHC-Moleküle präsentiert. Dazu werden diese Proteine in kleine Peptide gespalten und dann zusammen mit den MHC-Molekülen auf die Zelloberfläche gebracht.

Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwei verschiedene Antigenprozessierungs- und Präsentationewege.

Jede kernhaltige Körperzelle präsentiert ihre endogen synthetisierten Proteine als Peptide im wesentlichen über MHC-Moleküle der Klasse I und in geringem Maße auch über MHC-Moleküle der Klasse II.

Sogenannte professionelle APZ Zellen präsentieren weiterhin Proteine, die sie über Antikörperbindung (B-Zellen) oder Phagozytose (Makrophagen und dendritische Zellen) aufgenommen haben, über die MHC-Moleküle der Klasse II. Bei Makrophagen und dendritischen Zellen kann es auch zu einer Präsentation aufgenommenener Proteine oder Peptide über MHC-Klasse I Moleküle kommen. Die Aktivierung von T-Zellen über diesen Weg bezeichnet man als *cross-priming*.

Für eine Aktivierung von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen ist eine funktionierende Antigenprozessierung und -präsentation der APZ über die MHC-Moleküle der Klasse I notwendig (Abb. 3).

Dabei werden zelluläre Proteine nach Ubiquitinierung (Ub) durch den Proteasomenkomplex in Peptide gespalten. Diese Peptide gelangen ATP-abhängig über den Peptidtransporter (TAP) in das endoplasmatische Retikulum (ER). Dort werden sie mit Hilfe verschiedener Chaperone (Tapasin, ER60 und Calreticulin) auf MHC-Komplexe der Klasse I (schwere Kette und β_2 -Microglobulin) geladen. Über den Golgi-Apparat und zytoplasmatische Vesikel werden diese auf die Zelloberfläche gebracht, wo sie den $CD8^+$ T-Zellen präsentiert werden (Seliger et al., 2000).

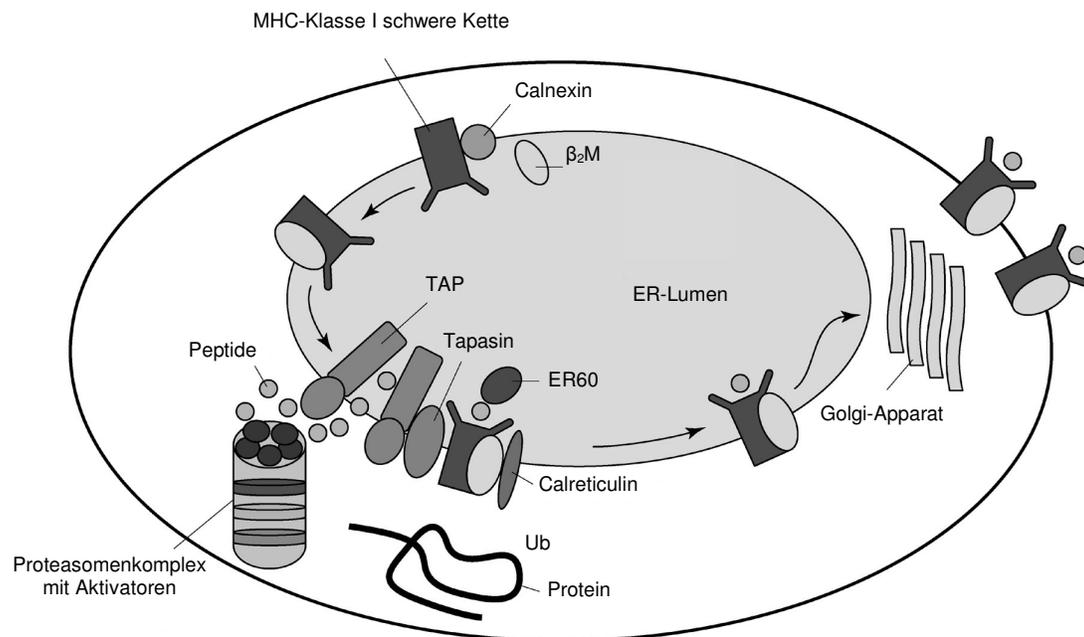


Abb. 3 MHC-Klasse I Antigenprozessierungsweg

Intrazelluläre Proteine werden nach Ubiquitinierung (Ub) vom Proteasomenkomplex in Peptide gespalten und über den Peptidtransporter TAP in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Dort werden die Peptide mit Hilfe verschiedener Chaperone (Tapasin, ER60, Calreticulin) auf MHC-Klasse I Komplexe geladen und zur Zelloberfläche transportiert. β_2 M= β_2 -Mikroglobulin

Durch die Bindung eines MHC-Moleküls mit einem fremden Peptid wird über den T-Zellrezeptor ein erstes Signal in einer ruhenden, naiven T-Zelle ausgelöst. Dieses Signal reicht zu einer funktionellen Aktivierung der T-Zelle jedoch nicht aus (Alegre et al., 2001; Carreno und Collins, 2002). Die T-Zelle benötigt ein zweites, sogenanntes costimulatorisches Signal, das unter anderem über die Bindung eines B7-Moleküls (B7-1 oder B7-2) an den CD28-Rezeptor (Aruffo und Seed, 1987; Lee et al., 1990; Acuto et al., 2003) auf der Oberfläche der T-Zellen (Abb. 4) oder auch durch die Bindung von CD40 und CD40 Ligand ausgelöst werden kann.

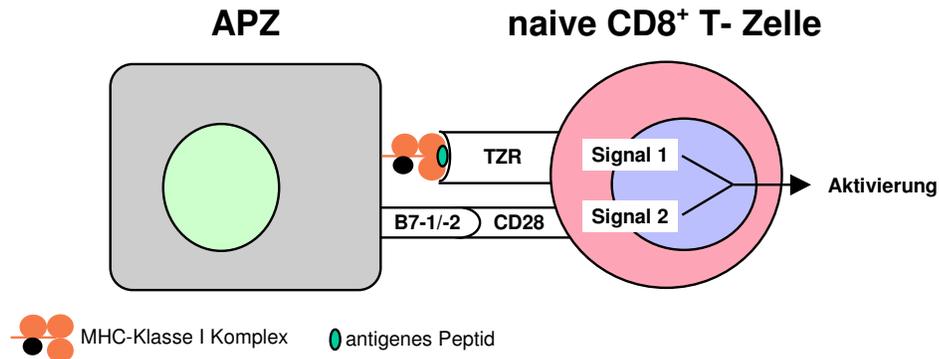


Abb. 4 T-Zell Aktivierung

Eine naive T-Zelle wird durch Bindung eines MHC-Klasse I Komplexes mit antigenem Peptid auf einer antigen-präsentierenden Zelle (APZ) an den T-Zellrezeptor (TZR) und eines B7 Moleküls an den CD28 Rezeptor aktiviert.

Die T-Zellen beginnen mit einer starken Sekretion verschiedener Zytokine wie z.B. $\text{IFN}\gamma$, dass die Antigenpräsentation der APZ erhöhen kann, oder IL-2, dass eine zusätzliche T-Zell Aktivierung vermittelt. Die Aktivierung der T-Zellen löst außerdem eine starke Zellvermehrung aus. Durch diese Proliferation entstehen u.a. viele lytisch aktive T-Zellen, die Tumor- oder virusinfizierte Zellen auch ohne Costimulation abtöten können, da für diese Abtötung eine Bindung über den T-Zellrezeptor ausreicht (Abb. 2, 5; Krammer, 2000; Seki et al., 2002). Diese Abtötung erreichen die T-Zellen zum einen durch osmotische Lyse, indem ausgeschüttete Perforinmoleküle Öffnungen in der Zellmembran der Zielzelle bilden, über die Wasser einströmen kann. Über diese Öffnungen oder auch über Endozytose können zusätzlich Granzyme in die Zellen eindringen und Apoptose auslösen. Als dritten Mechanismus exprimieren lytische T-Zellen den Fas-Liganden, der über Bindung des Fas-Rezeptors auf den Zielzellen ebenfalls Apoptose induziert (Krammer, 2000; Seki et al., 2002).

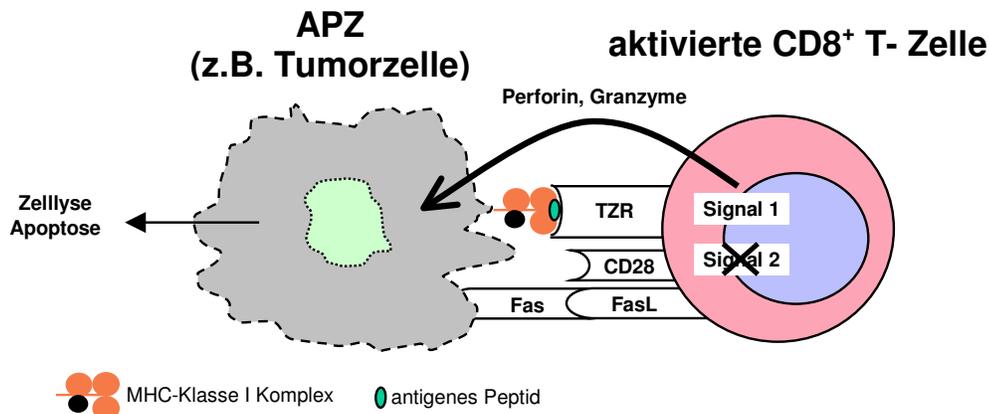


Abb. 5 Lytische T-Zell Attacke

Eine aktivierte T-Zelle zerstört eine APZ (z.B. eine Tumorzelle) durch Apoptoseinduktion über Granzyme bzw. den Fas-Liganden (FasL) und durch eine Störung des osmotischen Gleichgewichts mittels des porenbildenden Perforin. Dazu benötigt sie nur das erste Signal über den T-Zellrezeptor (TZR).

Weiterhin differenzieren einige aktivierte T-Zellen auch zu Gedächtnis (*memory*) T-Zellen, die eine lang anhaltende Immunität vermitteln. Sie haben eine hohe Lebensdauer, teilen sich regelmäßig, zirkulieren viele Jahre durch den Körper und können bei Wiederauftreten von gleichartigen APZ, z.B. Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen, sehr schnell eine Immunreaktion auslösen. Die lytisch aktiven T-Zellen dagegen sterben ohne Stimulation durch Fremdantigene ab (Kaech et al., 2002).

Binden ruhende, naive T-Zellen über ihren TZR an APZ, die keine costimulatorischen Moleküle exprimieren, so werden diese T-Zellen nicht aktiviert, sondern es kommt zur Induktion von Toleranz und Anergy (Abb. 9).

4. Costimulatorische Moleküle der B7-Proteinfamilie

Unter den für eine T-Zell Costimulation notwendigen verschiedenen Mitgliedern der B7-Liganden-Rezeptorfamilie (Tab. 2-3) gibt es große Sequenzhomologien (Carreno und Collins, 2002). Weiterhin fällt die gemeinsame chromosomale Lokalisation von B7-1 und B7-2 sowie CD28, CTLA-4 und ICOS (induzierbarer Costimulator) auf (Tab. 4).

Tab. 2 Proteinidentitäten unter den Liganden der B7-Proteinfamilie

Protein	Proteinidentität (%)				
	B7-2	B7-H1	B7-H2	B7-H3	B7-DC
B7-1	26	25	26	27	23
B7-2		21	23	26	22
B7-H1			25	31	41
B7-H2				33	27
B7-H3					27

Tab. 3 Proteinidentitäten unter den Rezeptoren der B7-Proteinfamilie

Protein	Proteinidentität (%)		
	CTLA-4	ICOS	PD-1
CD28	33	29	15
CTLA-4		18	20
ICOS			13

Tab. 4 Charakteristika der B7-Proteinfamilie

	molekulare Masse	Aminosäuren	chromosomale Lokalisation	pI
B7-1	33kDa	288	3q21	7,6
B7-2	38kDa	329	3q21	6,5
B7-H1	33kDa	290	9p24	6,8
B7-H2	33kDa	302	21q22.3	5,2
B7-H3	34kDa	316	15q23-q24	4,5
B7-DC	31kDa	273	9p24.2	8,2
CD28	25kDa	220	2q33	9,5
CTLA-4	25kDa	223	2q33	6,7
ICOS	23kDa	199	2q33	9,0
PD-1	32kDa	288	2q37.3	8,3

Die T-Zell Costimulation durch die Moleküle der B7-Proteinfamilie beinhaltet positiv stimulatorische Eigenschaften, die z.B. über eine Bindung eines B7-Moleküls (B7-1 oder B7-2) an den CD28 Rezeptor vermittelt werden (Abb. 6) sowie negativ regulatorische Eigenschaften, die z.B. durch die Bindung der beiden B7-Moleküle an den CTLA-4 Rezeptor vermittelt wer-

den (Howard et al., 1991; Egen und Allison, 2002; Egen et al., 2002; Greenwald et al., 2002; Davis et al., 2003).

B7-1 und B7-2 besitzen zwei extrazelluläre Immunglobulindomänen (Ig-Domänen), einen Transmembranbereich und eine kurze zytoplasmatische Domäne. CD28 und CTLA-4 sind charakterisiert durch eine extrazelluläre Ig-Domäne, einen Transmembranbereich und zytoplasmatische Domänen mit verschiedenen Motiven, über die Signale vermittelt werden können (Schwartz et al., 2002).

Auf naiven T-Zellen wird CD28 konstitutiv stark exprimiert, während die konstitutive CTLA-4 Oberflächenexpression bei naiven T-Zellen nur sehr gering ist und durch eine T-Zell Aktivierung hochreguliert wird. CTLA-4 hat eine höhere Affinität für die beiden B7-Moleküle als CD28 und sorgt so nach einer Stimulierung und Aktivierung durch einen *feedback* Mechanismus dafür, dass die T-Zellaktivierung wieder reduziert wird.

Die beiden B7-Moleküle (Selvakumar et al., 1992; Freeman et al., 1993b) haben trotz großer Sequenzhomologie (Tab. 2.) und gleicher Bindestelle für CD28 und CTLA-4 unterschiedliche Eigenschaften. B7-2 ist auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen in geringen Mengen konstitutiv exprimiert und wird nach T-Zellbindung hochreguliert, während B7-1, dass eine höhere Affinität für CD28 und CTLA-4 besitzt, erst später auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Sharpe und Freeman, 2002). Eine typische Bindung zwischen APZ und T-Zelle beginnt mit einer relativ schwachen Bindung zwischen B7-2 und CD28 und geht während der T-Zell Aktivierung in eine 100fach stärkere Bindung zwischen B7-1 und CTLA-4 über (Davis et al., 2003).

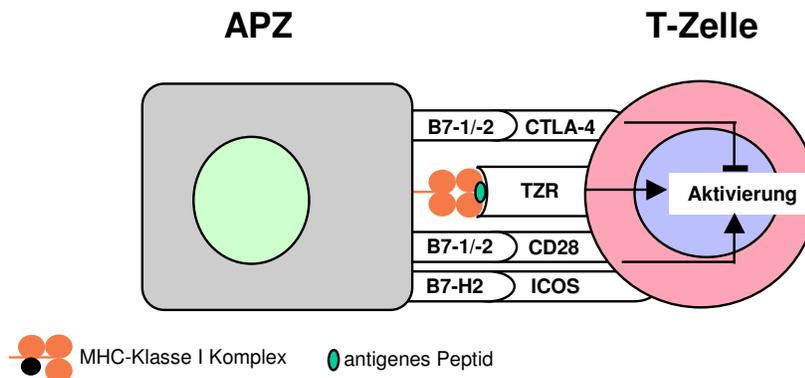


Abb. 6 T-Zell Costimulation

Über die Bindung des MHC-Komplexes an den TZR und die Bindung von B7-1/B7-2 an CD28 bzw. B7-H2 an ICOS wird eine T-Zell Aktivierung ausgelöst bzw. verstärkt. Eine Bindung von B7-1/B7-2 an CTLA-4 hingegen führt zu einer Inhibition der T-Zell Aktivierung.

Parallel dazu kann es zu einer Bindung zwischen dem B7-Homolog B7-H2 (Ling et al., 2000) und dem positiven costimulatorischen Rezeptor ICOS (Hutloff et al., 1999), der nach Beginn der T-Zell Aktivierung auf der T-Zelloberfläche exprimiert wird, kommen.

B7-H2 ist in seinem Aufbau B7-1 und B7-2 sehr ähnlich. B7-H2 gehört ebenfalls zur Ig-Superfamilie und besitzt zwei extrazelluläre Ig-Domänen. Demgegenüber besitzt ICOS in seinem Aufbau starke Ähnlichkeiten mit CD28 und CTLA-4 (Schwartz et al., 2002).

Durch die Bindung von B7-H2 an ICOS wird die T-Zell Proliferation und Zytokinsekretion, vor allem von IL-10, verstärkt. Die Expression von B7-H2 wurde bis jetzt vor allem auf professionellen APZ beobachtet (Yoshinaga et al., 2000; Greenwald et al., 2002; Liang und Sha, 2002).

Neben der Identifizierung von B7-H2 wurden noch drei weitere B7-Homologe gefunden, deren Rollen in der APZ/T-Zell-Wechselwirkung derzeit intensiv untersucht werden:

Das Molekül B7-H1 wurde ebenfalls auf professionellen APZ identifiziert (Freeman et al., 2000). B7-H1 bindet u.a. an den Rezeptor PD-1 (*programmed cell death 1*) und vermittelt ein Signal, das zur Apoptose führt. Da die B7-H1 Expression kürzlich in Tumoren nachgewiesen wurde und damit zur Apoptose von T-Zellen führen kann (Dong et al., 2002; Mazanet und Hughes, 2002), ist die B7-H1 Expression bei der Etablierung von Tumorthérapien zu beachten. So konnte gezeigt werden, dass eine B7-H1 Blockade mit Antikörpern die T-Zell Aktivierung deutlich verbessert (Brown et al., 2003).

Ebenfalls an PD-1 bindet B7-DC und reduziert so eine T-Zell Aktivierung ähnlich der Bindung von B7-H1 (Sharpe und Freeman, 2002). Die Expression von B7-DC kann auf professionellen APZ induziert werden, ist aber nicht auf diese Zellen beschränkt.

B7-H3 wird konstitutiv auf vielen Tumorzelllinien exprimiert, während auf professionellen APZ die Expression durch Zytokine induziert werden kann. Ein Rezeptor ist noch nicht bekannt, aber das Molekül besitzt T-Zell stimulatorische Eigenschaften (Chapoval et al., 2001).

5. Signaltransduktion aktivierter T-Zellen

Durch Bindung der MHC-Klasse I / Peptid-Komplexe und der B7-Moleküle an ihre Rezeptoren auf den T-Zellen werden über verschiedene Signalwege T-Zell Aktivierung, Toleranz etc. ausgelöst (Alegre et al., 2001; Leo und Schraven, 2001).

Damit der TZR das erste Signal weitergeben kann, benötigt er zwei weitere Moleküle. Dies ist zum einen der Corezeptor CD4 (T-Helferzellen) bzw. CD8 (zytotoxische T-Zelle), der die Bindung an die Zielzelle unterstützt und zur eigentlichen Signaltransduktion das CD3 Molekül mit der ζ -Kette und ihren Tyrosin (Y) basierten Aktivierungsmotiven (Abb. 7A).

Durch Bindung des MHC-Komplexes an den TZR kommt es unter Mitwirkung des Corezeptors zur Aktivierung der SRC Kinase Lck und nachfolgender Phosphorylierung des CD3-Komplexes (Zamoyska et al., 2003). Diese CD3-Phosphorylierung führt zur Anlagerung und nachfolgender Phosphorylierung der assoziierten Tyrosinkinase ZAP-70. Über die Phosphorylierung weiterer Adapterproteine führt dies zur Aktivierung der Phospholipase $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$) und der Guanin Triphosphatase RAC. Durch die $\text{PLC}\gamma$ Aktivierung wiederum kommt es zu einem Einstrom von Ca^{2+} und der Aktivierung von RAS (Cantrell, 2003). Alle diese Vorgänge führen über komplexe Signalkaskaden (Alberola-Ila und Hernandez-Hoyos, 2003), die meist über Phosphorylierungen vermittelt werden, zur Aktivierung der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP): extrazellulär Signal-regulierte Kinasen (ERK), c-jun N-terminale Kinasen (JNK) und p38 (Rincon und Pedraza-Alva 2003). Weiterhin werden die Phosphatidyl 3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase B (PKB/Akt) aktiviert. Alle diese Signale fördern die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (u.a. NF- κ B, AP-1 und NF-AT), die dann wiederum die Expression verschiedener Gene verstärken, was zu einer Aktivierung der T-Zell Funktion (Zytokinproduktion, Proliferation) führt (Abb. 7A).

Der B7-1/B7-2 bindende positiv regulatorische Costimulator CD28 benötigt für die Auslösung des zweiten Signals keine zusätzlichen Membranproteine und kann über seine Tyrosinreste (Y) und den Prolin-reichen Carboxyterminus selbst Signalkaskaden auslösen. Im nicht-aktivierten Zustand kann CD28 die Serin/Threoninphosphatase 2A (PP2A) binden und dadurch die T-Zell Aktivierung inhibieren (Abb. 7B).

Bei der Aktivierung durch Bindung von B7 wird CD28 an seinen Tyrosinresten phosphoryliert. Dadurch kommt es zur Dissoziation von PP2A und der Anlagerung von PI3K bzw. *growth factor* Rezeptor Protein 2 (GRB2). Die anschließende Aktivierung von PI3K induziert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (PI) zu Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PIP_3). Dies wiederum fördert die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) und anschließende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dieser löst eine gesteigerte Expression von BCL- X_L aus, was das Überleben der aktivierten T-Zelle fördert. Die PI3K Aktivierung kann

durch das Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN) inhibiert werden (Kane und Weiss, 2003).

Über die Bindung und Aktivierung von Lck an die Prolin-reiche Region könnte CD28 auch die IL-2 Produktion und Proliferation der T-Zelle fördern.

Einen positiven Einfluss von Akt, GRB2 und NF- κ B auf Zytokinproduktion und Proliferation wird diskutiert, konnte aber bisher noch nicht nachgewiesen werden (Abb. 7B).

Wie der negative Regulator CTLA-4 Signale vermittelt bzw. die Signalkaskaden von CD28 und TZR/CD3 blockiert, ist bis jetzt nur zum Teil entschlüsselt.

CTLA-4 besitzt ebenso wie CD28 Tyrosinreste (Y) und Prolin-reiche Regionen, die potentiell Signale weitergeben können. Andererseits zeigten Versuche, bei denen CTLA-4 Mutanten eingesetzt wurden, denen der komplette zytoplasmatische Teil fehlte, ebenfalls eine Inhibition der T-Zell Aktivierung. Somit muss CTLA-4 verschiedene Möglichkeiten besitzen, die T-Zell Aktivierung zu hemmen (Nakaseko et al., 1999; Baroja et al., 2000; Carreno et al., 2000; Cinek et al., 2000; Schneider und Rudd, 2000; Chambers et al., 2001).

Die Untersuchung der Funktion von CTLA-4 wird dabei erschwert, weil die CTLA-4 Oberflächenexpression über Endozytose reguliert wird (Abb. 7C). Im inaktiven, B7 ungebundenen Zustand bindet eine Untereinheit (AP-50) des Endozytose vermittelnden Clathrin Adapterproteins AP-2 an einen der Tyrosinreste von CTLA-4. Dies führt zu einer schnellen Endozytose von inaktivem CTLA-4, was die geringe CTLA-4 Oberflächenexpression erklärt (Davis et al., 2003). Nach der T-Zell Aktivierung über TZR/CD3 und CD28 könnte CTLA-4 z.B. durch Lck phosphoryliert werden. Dadurch wird die Bindung von AP-50 und die damit verbundene Endozytose verhindert, CTLA-4 wird nicht endozytiert und verbleibt somit auf der Oberfläche. Dort kann es seine Expression verstärken, bis es zu einer Inhibition der T-Zell Aktivierung kommt (Alegre et al., 2001; Greenwald et al., 2002; Rudd et al., 2002; Saito und Yamasaki, 2003).

Diese Inhibition kann z.B. durch die Aktivierung der SH2-Domäne beinhaltende Protein-Tyrosin-Phosphatase (SHP-2) und deren Dephosphorylierung der CD3 ζ -Kette vermittelt werden. Auch die Bindung von PP2A und PI3K sind möglich (Abb. 7C).

Die CTLA-4 Aktivierung führt zur Reduktion der Aktivierung von ERK und JNK sowie der Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, AP-1 und NF-AT). Dies resultiert in einem Zellzyklusarrest und Inhibition der Zytokinproduktion.

Viele dieser Möglichkeiten werden noch sehr kontrovers diskutiert (Alegre et al., 2001; Leo und Schraven, 2001; Egen et al., 2002; Davis et al., 2003).

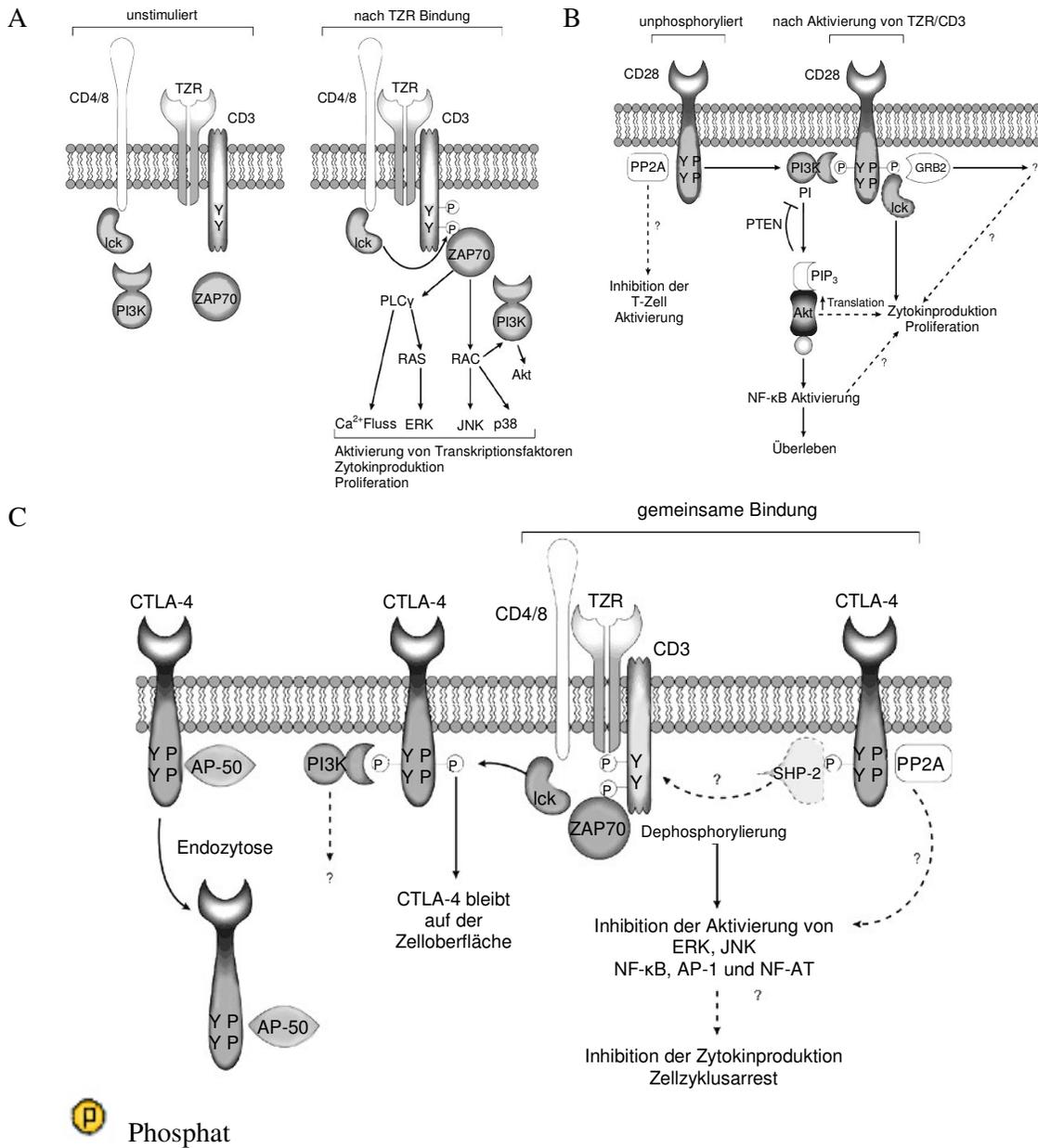


Abb. 7 Signaltransduktion in T-Zellen (verändert nach Alegre et al., 2001)

A Signaltransduktion durch TZR/CD3

Durch TZR Bindung an den MHC-Komplex ist die Phosphorylierung von CD3 ζ möglich. Über verschiedene Signalwege (ZAP70, PLC γ 1 und RAC) werden dadurch abschließend Transkriptionsfaktoren, Zytokinproduktion und Proliferation aktiviert.

B Signaltransduktion durch CD28

Durch B7 Bindung, wird parallel zur Aktivierung über TZR/CD3, CD28 phosphoryliert. Dies führt durch ein Dissoziation von PP2A zum Ende der Inhibition der T-Zell Aktivierung. Weiterhin aktiviert CD28 über PI3K die Zytokinproduktion und Proliferation. Über PI3K, Akt und NF- κ B wird das T-Zell Überleben gefördert.

C Signaltransduktion durch CTLA-4

CTLA-4 wird im B7-ungebunden Zustand schnell endozytiert und verbleibt somit nur kurz auf der Zelloberfläche. Nach Aktivierung der T-Zelle über TZR/CD3 wird CTLA-4 phosphoryliert und verbleibt verstärkt auf der Zelloberfläche. Über verschiedene Wege kann CTLA-4 die Zytokinproduktion blockieren und einen Zellzyklusarrest vermitteln.

Akt = PKB = Proteinkinase B, AP = Adapterprotein, ERK = durch extrazelluläre Signale regulierte Kinasen, GRB2 = *growth factor* Rezeptor Protein 2, JNK = c-jun N-terminale Kinasen, Lck = SRC Kinase, NF- κ B = Nuklearfaktor κ B, NF-AT = Nuklearfaktor aktivierte T-Zellen, P = Prolin-reiche carboxyterminale Region, PI = Phosphatidylinositol, PI3K = Phosphatidyl 3-Kinase, PIP3 = Phosphatidylinositol 3-Phosphat, PLC γ = Phospholipase C γ , PP2A = Serin/Threoninphosphatase 2A, PTEN = Phosphatase und Tensin Homolog, RAC = Guanin Triphosphatase, SHP2 = SH2-Domäne beinhaltende Protein-Tyrosin-Phosphatase, TZR = T-Zell Rezeptor, Y = Tyrosin, ZAP70 = CD3 ζ assoziiertes Protein

6. Immune escape Mechanismen von Tumorzellen

Trotz eines in der Regel gut funktionierenden Immunsystems entkommen Tumorzellen häufig diesem System und lösen Krebs aus. Es gibt dabei mehrere Mechanismen, durch die Tumorzellen eine effektive Immunantwort verhindern können:

Manche Tumore sind in der Lage, die Oberflächenexpression ihrer MHC-Moleküle (beim Menschen HLA *human leucocyte antigen*) zu reduzieren und verhindern somit das 1. Signal, das für eine T-Zell Erkennung sowohl zur Aktivierung als auch für eine Tumorzelllyse benötigt wird.

Tumore können außerdem auch die Menge an präsentierten Tumorantigenen soweit reduzieren, dass sie nur noch schlecht von T-Zellen erkannt werden können.

Andere Tumore haben eine gewisse Resistenz gegen die T-Zell vermittelte Zelllyse entwickelt, indem sie z.B. die Oberflächenexpression des Fas-Rezeptors reduzieren.

Eine anderer Weg dem Immunsystem zu entkommen ist der, verschiedene Moleküle auszuschütten oder auf der Zelloberfläche zu exprimieren, die die T-Zellen in ihrer Aktivität hemmen (z.B. TGF β oder HLA-G) oder in den T-Zellen Apoptose z.B. über den Fas-Liganden auslösen (Tab. 5).

Tab. 5 Aktive und passive *immune escape* Mechanismen von Tumoren

Aktive Mechanismen	Passive Mechanismen
<ul style="list-style-type: none"> • Fas L-Expression • Immunsuppressive Zytokine (z.B. TGF-β_2, IL-10) • Prostaglandine • Inhibitorische Neuropeptide 	<ul style="list-style-type: none"> • niedrige oder fehlende MHC Expression • defiziente Antigenprozessierung z.B.durch Mutationen in TAP • Wachstum von Antigen-negativen Mutanten, Antigen/Epitopverlust (Immenselektion) • Expression von nicht-klassischen MHC-Klasse I Antigenen (z.B. HLA-G) • inadäquate Expression von kostimulatorischen und Adhäsionsmolekülen • Abwesenheit von Fas-Expression oder Defizienzen in der Fas-Signaltransduktion

Ein weiteres Problem für eine effektive T-Zell Aktivierung ist die Tatsache, dass die meisten der bis jetzt identifizierten Tumorantigene (Renkvist et al., 2001) Antigene sind, die aus dem körpereigenen Genrepertoire stammen. Oft handelt es sich dabei um Differenzierungsantigene oder Gene aus der Embryonalentwicklung. Sie sind somit körpereigen, und T-Zellen, die diese Antigene erkennen würden, werden im Thymus abgetötet (Sadelain et al., 2003).

Vielen Tumorzellen fehlt aber vor allem die Expression der costimulatorischen B7-Moleküle (Abb. 8).

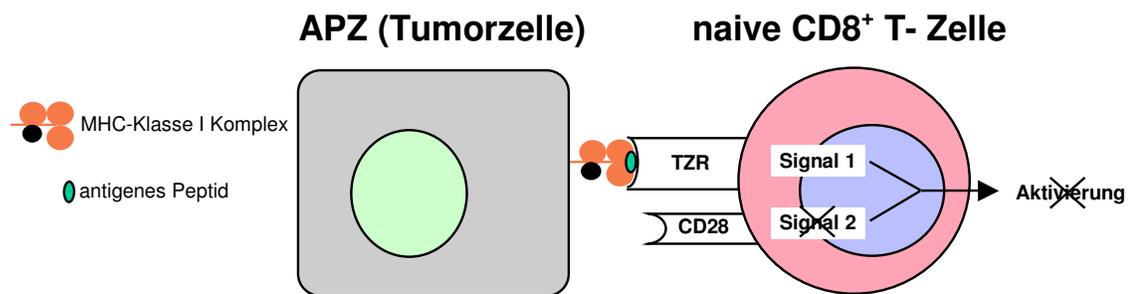


Abb. 8 **Fehlende T-Zell Costimulation**

Eine Tumorzelle exprimiert kein B7 auf ihrer Zelloberfläche. Dadurch fehlt der antigenspezifischen T-Zelle das zweite Signal zur T-Zell Aktivierung trotz der Bindung des TZR an den MHC-Klasse I Komplex mit antigenem Peptid.

Somit fehlen den T-Zellen für eine effektive Aktivierung das zweite Signal. Dadurch verbleiben diese Zellen in ihrem inaktivierten Zustand und es kann auch zur Induktion von Toleranz oder Apoptose kommen (Abb. 9).

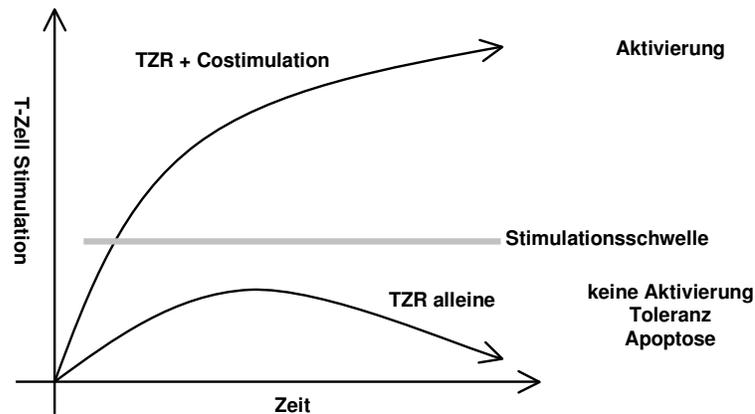


Abb. 9 T-Zell Aktivierung

Für eine T-Zell Aktivierung ist eine Stimulation über TZR und Costimulation notwendig. Wird die T-Zelle nur über den TZR stimuliert, so wird die notwendige Stimulationsschwelle für eine T-Zell Aktivierung nicht erreicht und statt dessen Toleranz oder Apoptose ausgelöst.

7. Nierenzellkarzinom

In Deutschland erkranken jährlich ca. 350.000 Menschen an Krebs. Ein Großteil der Patienten ist bei Diagnose über 60 Jahre alt, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 66 Jahren liegt. Bei Männern sind bösartige Neubildungen im Bereich der Prostata, Lunge und Darm am häufigsten, während Frauen vor allem von Brust- und Darmkrebs betroffen sind.

Auslöser für eine Krebserkrankung sind meist viele Faktoren, die zusammentreffen, nur selten lässt sich eine Krebserkrankung an einer Ursache festmachen. Es gibt allerdings einige vermeidbare Risikofaktoren, bei denen das Rauchen an erster Stelle steht. Bei 25-30% aller Krebstodesfälle ist Zigarettenrauchen die Hauptursache. Ähnlich groß ist der Anteil, der auf falsche Ernährung zurückzuführen ist. Andere Risikofaktoren sind Infektionen, genetische Prädisposition, erhöhter Alkoholgenuss, Exposition am Arbeitsplatz und Umweltfaktoren (Krebs in Deutschland, 2002).

Seit der Mitte der 80er Jahre scheint die Zahl an Krebsneuerkrankungen nicht mehr zuzunehmen und bei den Männern ergibt sich ab Mitte der 90er Jahre scheinbar ein leichter Rückgang. Deutschland dabei liegt bezüglich seiner Zahlenwerte dabei zwischen den Werten der EU-Staaten und der USA.

Diesen Platz nimmt Deutschland auch bei den Prognosedaten ein. Die ersten 5 Jahre nach Krebserkrankung überleben durchschnittlich 53% der Frauen und 40% der Männer, wobei dies natürlich stark von der Krebsart abhängt:

Über 90% der Personen die an malignem Melanom oder Hodenkrebs erkranken überleben die ersten 5 Jahre, wohingegen die Überlebensrate beim Speiseröhrenkrebs unter 10% liegt. Jährlich sterben in Deutschland ca. 210.000 Menschen an Krebs (Quelle: Statistisches Bundesamt Wiesbaden).

Eine sehr geringe 5 Jahresüberlebensrate haben auch Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom. Wenn bereits Metastasen aufgetreten sind, überleben nur 10% der Patienten die ersten 5 Jahre nach Diagnose der Erkrankung (Krebs in Deutschland, 2002; Mejean et al., 2003). 80-90% überleben dagegen die ersten 5 Jahre, wenn die Tumore auf die Niere beschränkt bleiben. Dies zeigt vor allem, wie wichtig eine frühe Diagnose und operative Entfer-

nung des Tumors ist. Bei sehr früher Diagnose kann immer öfter auch von einer kompletten Entfernung der befallenen Niere abgesehen werden.

In Deutschland machen bösartige Nierenzellkarzinome ca. 4% der Neuerkrankungen und 3% der Todesfälle an Krebs aus. Weltweit schätzt man zur Zeit ca. 100.000 Tote durch Nierenkrebs pro Jahr. Nachdem es sowohl bei der Erkrankungsrate als auch bei der Sterberate in Deutschland in den 70er und 80er Jahren zu deutlichen Steigerungen gekommen ist, stagnieren die Zahlen seit Mitte der 90er Jahre. Allerdings liegen die Zahlen im Vergleichsrahmen der EU-Staaten an vorderster Stelle. Risikofaktoren sind neben Rauchen und Übergewicht vor allem die Exposition mit verschiedenen Chemikalien, Schwermetallen oder ionisierender Strahlung. Eine sehr hohes Risiko haben auch Dialysepatienten und Patienten die von der von Hippel-Lindau (VHL) Krankheit betroffen sind (Vogelzang und Stadler, 1998).

Nierentumore (RCC, *renal cell cancer*) unterscheidet man histologisch im wesentlichen in klarzellige, chromophile, chromophobe Tumore und Onkozytome. Klarzellige und chromophile Tumore haben ihren Ursprung im proximalen Tubulus, wobei klarzellige Karzinome, die oft eine Inaktivierung des VHL-Gens zeigen, ca. 80% und chromophile Karzinome ca. 10% aller Erkrankungen ausmachen. Die restlichen Nierentumore wie chromophobe Karzinome oder Onkozytome, haben ihren zellulären Ursprung in den abführenden Sammelgefäße der Niere. Patienten mit einem chromophoben Karzinom haben die höchste Überlebensrate, gefolgt von Patienten die an chromophilen und klarzelligen Nierenkarzinomen erkranken (Motzer et al., 1996; Moch et al., 2000).

Zusätzlich zur histologischen Klassifikation werden die Tumore nach der TMN (*tumor metastasis nodes*)-Klassifikation eingeteilt (Hermanek, 1998; Wittekind et al., 2002). Primärtumor (Abb.10), regionale Lymphknoten, Fernmetastasen, histologisches Grading und dadurch auch Eingruppierung in verschiedene Stadien werden dabei weltweit nach einheitlichen Regeln durchgeführt (Anhang X.1).

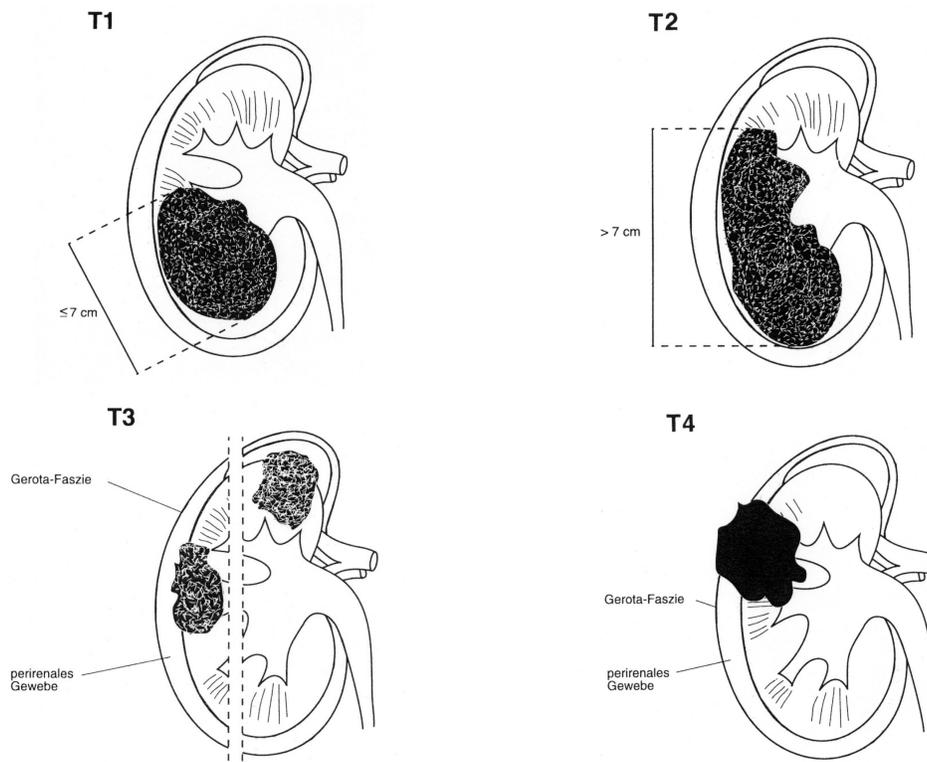


Abb. 10 Klassifikation primärer Nierentumore (Hermanek, 1998; Wittekind et al., 2002)

Nierentumore des Stadiums T1 sind in ihrer größten Ausdehnung ≤ 7 cm und bleiben wie Tumore des Stadiums T2, die in ihrer Ausdehnung 7cm überschreiten, auf die Niere beschränkt. Tumore der Stadien T3 und T4 bleiben nicht auf die Niere beschränkt und infiltrieren die Nebenniere und größere Venen. Im Gegensatz zu Stadium T4 breiten sie sich im Stadium T3 jedoch noch nicht über die Gerota-Faszie hinaus aus.

Wenn der primäre Tumor nicht auf die Niere beschränkt ist (T3, T4), regionale Lymphknotenmetastasen (N1, N2) oder entfernte Metastasen auftreten (M1) steigt die Stadiengruppierung und es sinkt die Überlebensrate deutlich (Guinan et al., 1997). Auch ein geringer Differenzierungsgrad (G3-4) verschlechtert die Prognose für den Patienten.

Neben einer frühen Diagnose und schnellen operativen Entfernung des Tumors sind die Therapiemöglichkeiten sehr eingeschränkt (Motzer und Russo, 2000; Daliani et al., 2002; Zisman et al., 2003). Nierenkarzinomzellen sind sehr resistent gegenüber Radio- und Chemotherapie. Nur für einzelne Chemotherapeutika ist überhaupt eine positive Reaktion berichtet worden. Dauerhafte Heilung wurde bisher nur in wenigen Einzelfällen dokumentiert. Eine etwas bessere Therapiemöglichkeit bietet eine systemische Immuntherapie mit IL-2, IFN α oder IFN γ . Aber auch hier liegen die positiven Reaktionen bei Einzeltherapie unter 20%. Zur Zeit wird eine Kombination aus mehreren Immuntherapeutika z.B. IL-2, IFN α und einem Chemotherapeutikum z.B. Fluorouracil empfohlen, hier ist eine positive Entwicklung der Tumorerkrankung in knapp 30% der Fälle festzustellen (Brinkmann et al., 2002; Ringhoffer und Gschwend, 2002).

8. spezifische Immuntherapie

Zelluläre Immuntherapien geben die Möglichkeit neue Wege zu beschreiten. Ziel ist die Verbesserung der Reaktion des Immunsystems und hier besonders der Immunantwort der T-Zellen.

Durch eine spezifische Stimulation des Immunsystems erwartet man eine gute, langanhaltende Immunantwort, die vor allem wirksam gegen Metastasen sein soll und den Patienten auch lange vor auftretenden Rezidiven schützen kann (Kaech et al., 2002).

Für eine erfolgreiche Immuntherapie ist es zunächst notwendig zu erkennen, wie die Tumorzellen sich dem Zugriff des Immunsystems entziehen (Abken et al., 2002).

Oft sind die Tumorzellen nicht in der Lage, das erste Signal über den die MHC-Klasse I Moleküle oder das zweite costimulatorische Signal zur T-Zell Aktivierung auszulösen.

8.1. Ein spezifisches erstes Signal für die T-Zell Aktivierung

Sind die Tumorzellen nicht in der Lage, das erste Signal zu vermitteln, fehlt ihnen oft entweder die MHC Oberflächenexpression bzw. Antigenpräsentation oder es gibt keine T-Zellen mit passendem TZR, weil es sich z.B. um Selbstantigene handelt (Tab. 6).

Tab. 6 Verschiedene Möglichkeiten der spezifischen Immuntherapie

Tumorescape	Therapie	Vorteile	Nachteile
geringe MHC Expression	IFN γ	Erhöhung der MHC Expression	funktioniert nur bei intakter MHC Expression
keine Antigenpräsentation	antigene Peptide	leichte Herstellung	nur Immunisierung gegen ein Antigen
	DNA/RNA/Lysat	Immunisierung gegen mehrere Antigene	schlechte Präsentation, hoher methodischer Aufwand
	DC-Tumor Fusion	gute Stimulation	schlechte Effektivität
kein passender TZR	TZR Transfektion T-Zell Transfer Stammzelltransplantation	hohe Spezifität	experimentell aufwendig, Immunisierung nur gegen ein Antigen

Fehlt ein ausreichendes erstes Signal aufgrund geringer MHC Expression kann, man diese durch die Gabe von $\text{IFN}\gamma$ steigern und somit eine effiziente Immunantwort erreichen (Seliger et al., 2000).

Bei schwacher Antigenpräsentation muss das Antigen dem Immunsystem auf anderer Weise präsentiert werden. Zur Präsentation bieten sich dabei professionelle antigenpräsentierende Zellen wie B-Zellen oder dendritische Zellen (DC) an, da sie eine hohe Expression von MHC- und costimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche besitzen. Diese Zellen können *in vitro* mit der DNA/RNA von Tumorantigenen/Tumorgewebe transfiziert oder mit antigenen Peptiden/Tumorzelllysat beladen und dann den Patienten verabreicht werden (Abb. 11; Nestle et al., 1998; Dyal et al., 2001; Lambert et al., 2001; You et al., 2001; Heiser et al., 2002; Sullenger und Gilboa, 2002; Thumann et al., 2003).

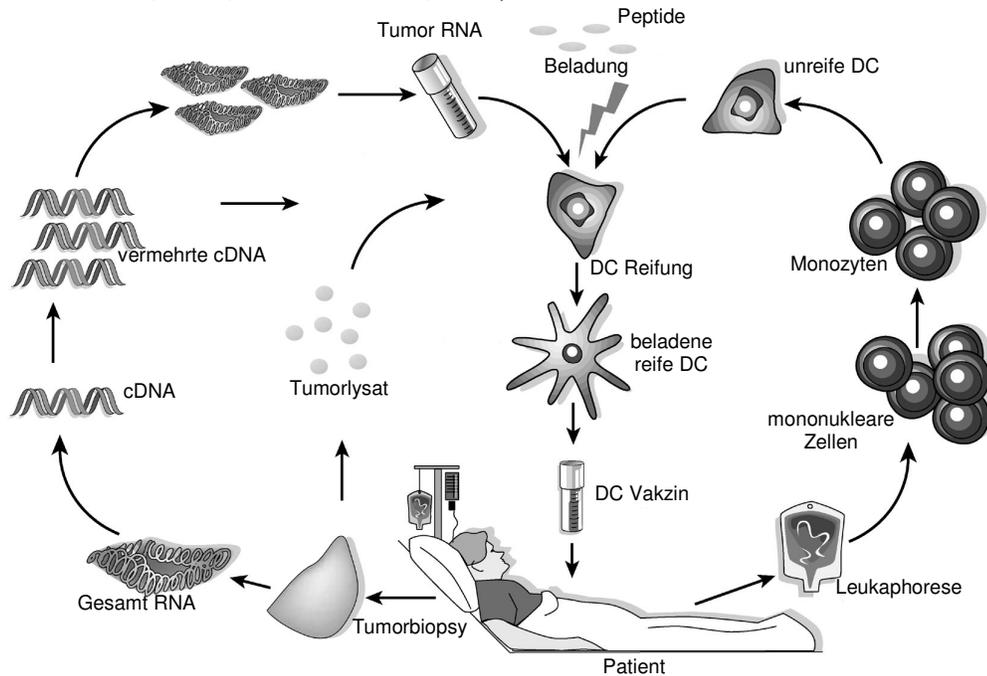


Abb. 11 DC Vakzin – Beladung mit RNA aus Tumorgeweben (Sullenger und Gilboa, 2002)

Aus Tumorbioptiematerial wird die Gesamt-RNA gewonnen und cDNA-Moleküle hergestellt. Nach Vermehrung der cDNA Moleküle können aus diesen wieder RNA-Moleküle hergestellt werden. Somit steht die Tumor-RNA in ausreichender Menge zur Beladung der DC zur Verfügung. Weiterhin können die DC auch mit Tumorlysat, cDNA oder antigenen Peptiden beladen werden. Zur DC Herstellung werden aus Leukaphoresen die mononuclearen Zellen gewonnen und über Monozyten zu unreifen DC differenziert. Diese unreifen DC werden mit Tumorlysat, Tumor cDNA, Tumor RNA oder antigenen Peptiden beladen und ausgereift. Die reifen beladenen DC werden dann dem Patienten als DC-Vakzin verabreicht. Im Patienten sollen diese DC dann die in der Tumor-RNA, Tumor-cDNA, Tumorlysat oder den antigenen Peptiden vorhandenen Tumorantigene für die Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen präsentieren.

Ein anderer Weg ist die Injektion von Peptiden bzw. DNA-Molekülen von Tumorantigenen *in vivo*. Man hofft dabei, dass DC diese Moleküle aufnehmen, dann antigene Peptide präsentieren und somit T-Zellen aktivieren können (Parkhurst et al., 1996; Asea et al., 2000; Castellino et al., 2000; Slansky et al., 2000; Hung et al., 2001; Livingston et al., 2001; Wang et al., 2001; Parmiani et al., 2002).

In unkontrollierten klinischen Studien wurden allogene DC mit Tumorzellen fusioniert und den Patienten verabreicht. Dadurch sollte die Antigenpräsentation der Tumorzellen mit den costimulatorischen Eigenschaften der DC kombiniert werden. Da es bei diesen Versuchen zu Unregelmäßigkeiten kam, sind Effektivität und Nebenwirkungen dieses vielversprechenden Therapieansatzes zur Zeit nicht bekannt (Gong et al., 1997; Kugler et al., 2000; Avigan, 2003).

Fehlen dem Patienten T-Zellen die den passenden Rezeptor tragen, so kann man antigenspezifische T-Zellrezeptoren über Retroviren in T-Zellen des Patienten einbringen und diese dem Patienten verabreichen (Weijtens et al., 2000; Stanislawski et al., 2001; Haynes et al., 2002; Sadelain et al., 2003). Allerdings ist der Einsatz von Retroviren zur Transfektion von T-Zellen zur Zeit nur eingeschränkt möglich (siehe I.9.).

Die allogene Stammzelltransplantation hat in verschiedenen Untersuchungen eine antitumorale Wirkung gezeigt. Durch einen GVT-(*graft versus tumor*) Effekt wurde eine Wachstumsregression von soliden Tumoren und Metastasen beobachtet (Childs und Srinivasan, 2002; Childs, 2002; Drachenberg und Childs, 2003). Intensive Untersuchungen bei Nierentumorpatienten zeigte allerdings nur bei einem von zehn Patienten eine evaluierbare Reduktion des Tumorwachstums (Hentschke et al., 2003).

8.2. Verbesserte Immunantwort durch Costimulation

Nierenkarzinome sind immunogene Tumore, d.h. sie haben meist eine gute MHC Oberflächenexpression und Antigenpräsentation (Motzer et al., 1996; Renkvist et al., 2001). Statt dessen fehlt ihnen aber das zweite costimulatorische Signal. Somit ist es für die Therapie von Nierentumoren sehr wichtig, neben dem ersten Signal über MHC und TZR, den T-Zellen das zweite costimulatorische Signal zur Verfügung zu stellen. Dabei ist ein B7-Genstransfer in Tumorzellen ein vielsprechender Ansatz für die Herstellung eines zellulären Vakzins. Solche gentechnisch veränderten Tumorzellen bieten Möglichkeiten für das bessere Verständnis der T-Zell Costimulation und zur Gewinnung neuer Erkenntnisse für mögliche Immuntherapien.

Es gibt verschiedene Wege, dieses zweite Signal den T-Zellen zur Verfügung zu stellen: Ist das Tumorantigen bekannt, können T-Zellrezeptoren in T-Zellen des Patienten eingebracht werden (Abb. 12), die in der Lage sind, neben dem ersten Signal über eine CD28 Signaldomäne, auch das zweite Signal zu vermitteln (Hombach et al., 2001).

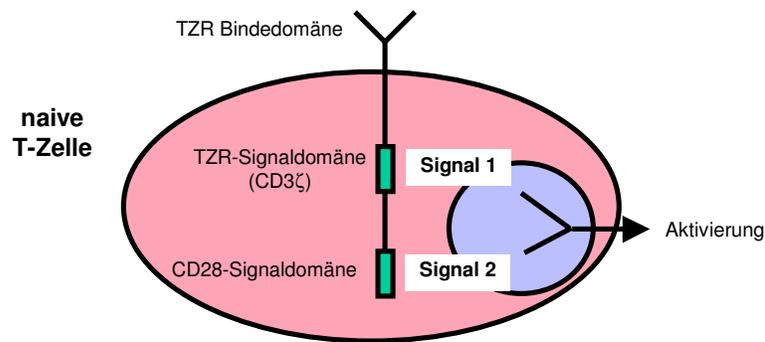


Abb. 12 Einzelstrang TZR mit CD3 ζ und CD28 Signaldomäne

Ein gentechnisch hergestellter einzelsträngiger TZR kann über eine Kombination von TZR (CD3 ζ) und CD28 Signaldomänen beide Signale für eine T-Zell Aktivierung vermitteln.

Ein anderer Weg ist, Tumorzellen mit costimulatorischen B7-Molekülen zu transfizieren und diese Zellen inaktiviert dann als zelluläres Vakzin zu verabreichen (Jung et al., 1999). Diese modifizierten Tumorzellen sind dann in der Lage, im Patienten dessen antigenspezifischen T-Zellen zu aktivieren (Abb. 13). In verschiedenen Mausmodellen wurden solche Ansätze bereits erfolgreich getestet (Akagi et al., 1997; Kerkmann-Tucek et al., 1998; Li et al., 1998; Raes et al., 1998; Wollenberg et al., 1999; Tao et al., 2001). Durch Kombination mit verschiedenen Zytokinen wie GM-CSF oder IL-2 konnten weitere Verbesserungen gezeigt werden (Dunussi-Joannopoulos et al., 1998; Sivanandham et al., 1998; Liu et al., 2000; Van Ginderachter et al., 2000; Wang et al., 2000a; Wu et al., 2001). Auch die Kombination von B7-Molekülen mit Adäsionsmolekülen wie ICAM-1 und LFA-3 führt zu einer verbesserten Immunität (Hodge et al., 2001; Shankar et al., 2001; Greiner et al., 2002; Briones et al., 2003; Hodge et al., 2003; Oh et al., 2003; Schlom et al., 2003).

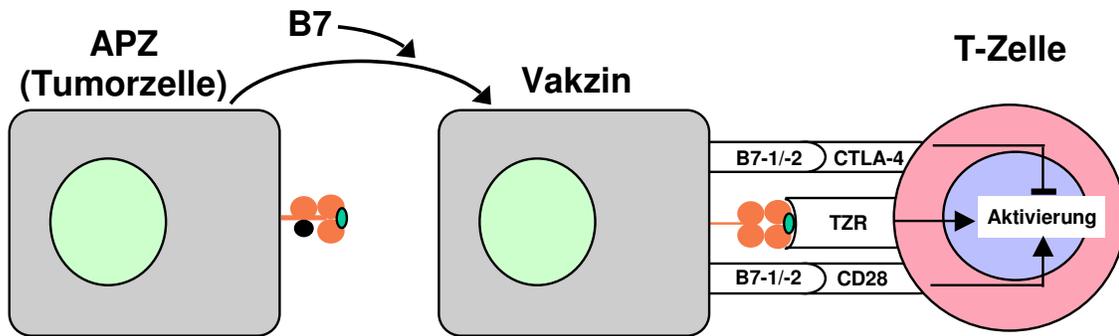


Abb. 13 B7 Gentransfer-Therapieansatz metastasierendes Nierenzellkarzinom

Durch B7-Gentransfer wird die antigenpräsentierende Tumorzelle zu einem zellulären Vakzin, da nun beide Signale für eine T-Zell Aktivierung vermittelt werden können, ebenso wie das *feedback* Signal über CTLA-4.

Verschiedene humane Studien in diesem Bereich wurden bei Adenokarzinomen (Horig et al., 2000; von Mehren et al., 2000; von Mehren et al., 2001), Brustkrebs (Meyer et al., 1999), Melanom (Kaufman et al., 2000) und Nierenkarzinomen (Antonia und Seigne, 2000; Pantuck et al., 2001; Antonia et al., 2002) bereits erfolgreich durchgeführt. In Deutschland sind mehrere Studien in Vorbereitung. Dabei ist zur Zeit der Einsatz von allogenen B7 transfizierten Tumorzellen geplant. Die Patienten erhalten als Vakzin bestrahlte Tumorzellen, die nicht mehr teilungsfähig sind. Durch den Verlust der Teilungsfähigkeit und allogene Abstoßungsreaktionen ist der Patient sehr gut geschützt. Im Vergleich zum Einsatz autologer Tumorzellen können die T-Zellen des Patienten hier allerdings nur Antigene erkennen, die von den zwischen Tumor- und T-Zelle übereinstimmenden MHC-Molekülen (z.B. HLA-A2) präsentiert werden. Durch die schnelle Abstoßungsreaktion bleibt für diese T-Zell Erkennung nur wenig Zeit. Daher wird bei diesen Therapieansätzen die Vakzinverabreichung mehrfach wiederholt, um eine ausreichende T-Zell Aktivierung mit Proliferation und Zytokinsekretion zu erreichen (Seliger und Kronfeld, 2003).

9. neue Therapiewege – Retroviren und Ribozyme

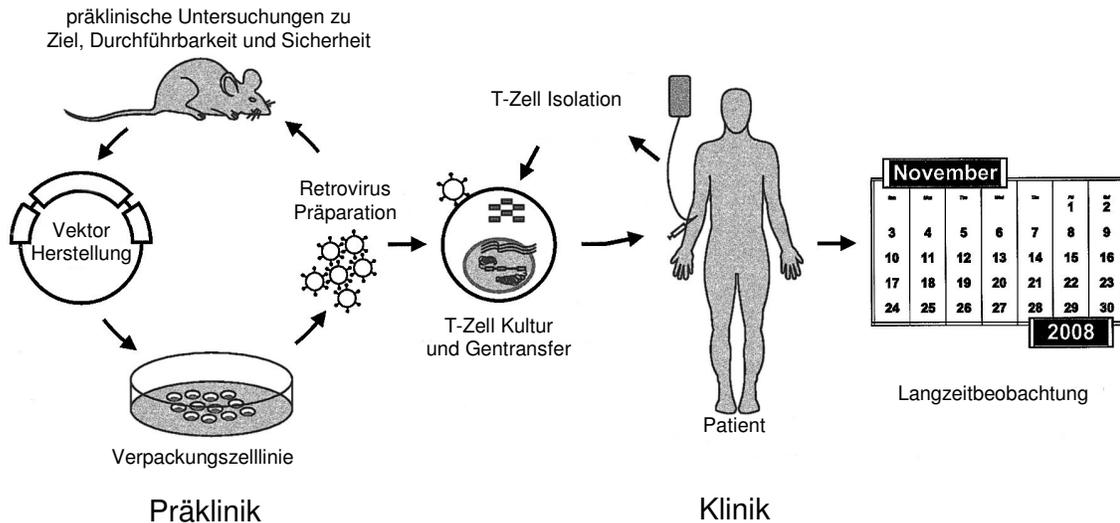
Ein Gentransfer in primäre humane Zellen wie Knochenmarkstammzellen oder T-Zellen, wie er für die Transfektion z.B. zur Expression von TZR-Molekülen notwendig ist, ist im Vergleich zum Gentransfer in etablierte Zelllinien sehr schwierig. Molekularbiologische Standardmethoden, wie Elektroporation und Lipofektion, haben für klinische Anwendungen meist eine zu geringe Effektivität oder gravierende Nebenwirkungen.

Eine schnelle effiziente Methode des stabilen Gentransfers in primäre sich teilende Zellen ist der Einsatz von Retroviren. Hierbei macht man sich die Eigenschaft der Retroviren zu Nutze, sich über zwei identische DNA-Bereiche, die *long terminal repeats* (LTR) stabil in das Genom der infizierten Zellen integrieren zu können. Zwischen diesen beiden LTR Bereichen sitzen beim natürlichen Virus die Gene, die er zur Vermehrung benötigt, hinter der Sequenz, die für die Verpackung der Virus-DNA in die Viruspartikel benötigt wird, der *leader*-Sequenz. In den aus diesen Retroviren entwickelten retroviralen Systemen hat man diese Bereiche getrennt. Die Gene für die Virusvermehrung sind nur im Genom von sogenannten Verpackungszelllinien vorhanden und in den retroviralen Vektor kann man fremde DNA z.B. für B7-Moleküle oder ein Ribozym einbringen (Abb. 14).

**Abb. 14 retroviraler Vektor**

Ein retrovirales Vektorkonstrukt besteht aus 5' und 3'LTR, leader-Sequenz und zu exprimierender fremder DNA. Nach Transfektion dieses Vektors in eine Verpackungszelllinie entstehen infektiöse Partikel, die in der Lage sind, primäre Zellen (z.B. T-Zellen, Tumorzellen) mit der fremden DNA stabil zu transfizieren.

Diese Vektoren mit LTR, leader-Sequenz und fremder DNA werden in Verpackungszelllinien transfiziert, welche diese DNA-Bereiche dann in infektiöse Retroviruspartikel verpacken, die im Gegensatz zum natürlichen Virus ihre eigenständige Vermehrungsfähigkeit verloren haben. Eine eigenständige Vermehrung dieser Retroviren ohne Verpackungszellen ist daher weder *in vivo* noch *in vitro* möglich. Neben diesem Sicherheitsaspekt wurden diese Systeme außerdem so optimiert, dass nur noch die Gene exprimiert werden, die man in die primären Zellen einbringen will. Alle anderen möglichen Translationsinitiationssequenzen (ATG) wurden entfernt (Hildinger et al., 1999) und dadurch die Expression potentiell immunogener Proteine verhindert. So kommen diese retrovirale Systeme (Abb. 15) auch schon in mehreren klinischen gentherapeutischen Anwendungen zum Einsatz (Wong-Staal et al., 1998a; Kühlcke et al., 2002).

**Abb. 15 klinischer Einsatz eines Retrovirus am Beispiel einer T-Zell Transfektion**

Ein retroviraler Vektor wird in eine Verpackungszelllinie transfiziert, diese produziert anschließend infektiöse Retroviren. Mit diesen wird das gewünschte Gen in T-Zellen der Patienten in der Zellkultur stabil eingebracht. Diese transfizierten Zellen werden dem Patienten verabreicht und deren Entwicklung langfristig kontrolliert.

Für unterschiedliche Zelltypen stehen dabei die LTR Bereiche unterschiedlicher Retroviren zur Verfügung. Haupteinsatzgebiet dieser retroviralen Systeme ist die Transfektion von Knochenmarkstammzellen oder anderen Zellen des Immunsystems, z.B. zur Kompensation von Immundefekten (Hacein-Bey-Abina et al., 2003), Vermittlung einer Resistenz gegen Chemotherapeutika (Laufs et al., 2002), Stammzellmarkierung (Bonini et al., 1997; Li et al., 2002) oder Therapie von HIV Infektionen (Wong-Staal et al., 1998a). Während retrovirale Systeme mit den LTR Bereichen des *spleen focus forming virus* (SFFV) gute Genexpressionen in myeloischen Zellen zeigen, sind die LTR Bereiche von myeloproliferativem Sarcomavirus (MPSV) und *moloney murine leukemia virus* (MoMuLV) geeignet für die Transfizierung von Knochenmarkstammzellen oder T-Zellen. Diese Unterschiede werden u.a. verursacht durch gewebespezifische Promotoraktivität, so zeigen z.B. die Promotorbereiche des Zytomegalievirus (CMV), SV40 Virus und MoMuLV hohe Aktivitäten in myeloischen Zellen im Vergleich zu Promotoren von CD11 oder CD34 (Malik et al., 1995; Hu und Pathak, 2000; Ebara et al., 2002; Engels et al., 2003; Ginn et al., 2003).

Durch die hohe Transfektionseffizienz, die sich durch den Einsatz retroviraler Vektoren erreichen lässt, kann man auf den Einsatz störender Selektionsmarker verzichten (Jung et al., 1998).

Im Jahr 2002 traten erste ernsthafte Komplikationen beim Einsatz von Retroviren auf, als bei einer klinischen Studie in Frankreich bei zwei Patienten nach Gentherapie eine Leukämie-ähnliche Krankheit diagnostiziert wurde (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Kinder mit der erblichen Immunschwächekrankheit SCID-X1 wurden mit eigenen, retroviral modifizierten Knochenmarkstammzellen behandelt. Durch Transfer eines intakten Gens wurde dabei die Normalfunktion der Stammzellen wieder hergestellt. Drei Jahre nach Therapiebeginn wurde eine starke Vermehrung von T-Zellen festgestellt, die dieses intakte Gen trugen. Nachdem es einige Monate zuvor in einem Mausmodell ebenfalls gelungen war, durch retroviralen Gentransfer Leukämien auszulösen (Li et al., 2002), wurden zunächst alle klinischen Studien mit Retroviren in Deutschland gestoppt (Paul-Ehrlich-Institut und Bundesärztekammer, 2003). Nach eingehender Prüfung und ethischer Neubewertung wurde einigen Studien die Fortsetzung genehmigt. Für die Fortführung von Studien, die ein ähnliches Prinzip wie die französische Studie benutzen, ist allerdings eine umfassende neue Risikoabschätzung und Korrektur der Studienprotokolle notwendig (Baum et al., 2003).

Nachdem man bis vor 20 Jahren annahm, dass nur Proteine enzymatisch biochemische Reaktionen katalysieren können, entdeckte man in Pflanzen, niederen Eukaryonten, Bakterien und Viren RNA-Moleküle, die in der Lage waren, andere RNA Moleküle zu spalten. Die Fähigkeit dieser Ribozyme wurde analysiert und man kann nun synthetische Moleküle herstellen, die in der Lage sind, spezifisch die mRNAs verschiedener Gene zu zerstören. Dadurch sind verschiedenste therapeutische Ansätze, z.B. für die Therapie nach HIV-Infektion (Wong-Staal et al., 1998a; Feng et al., 2000; Sullenger und Gilboa, 2002), möglich geworden.

Das Ribozym bindet an die Ziel RNA und durch eine Transesterifikationsreaktion wird eine Spaltung der Ziel-RNA vermittelt (Abb. 16). Neben der Ermittlung der idealen Zielsequenz auf der Ziel-RNA ist die Verabreichung des funktionellen Ribozyms von entscheidender Bedeutung. Meist werden zur Expression in T-Zellen retrovirale Vektoren eingesetzt, die das Ribozym in einer Expressionskassette, z.B. für tRNA-Moleküle, tragen.

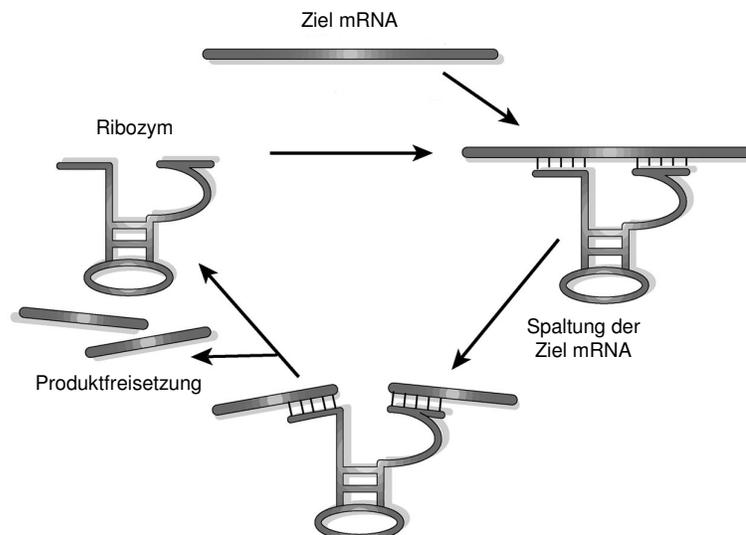


Abb. 16 Zerstörung der Ziel mRNA durch ein sequenzspezifisches Ribozym (Sullenger und Gilboa, 2002)

Das sequenzspezifische Ribozym bindet die Ziel mRNA, spaltet sie und setzt anschließend das Produkt wieder frei.

In Abb. 17 ist ein Therapieablauf dargestellt, wie er zur Zeit in klinischen Studien bei HIV-Patienten eingesetzt wird. Ein Vektor, der in der Lage ist, Ribozyme zu exprimieren, wird in T-Zellen eingebracht, die vorher über Leukapherese aus dem Blut der Patienten isoliert wur-

den. Anschließend erhalten die Patienten die transfizierten T-Zellen infundiert. Das Ribozym unterdrückt hier die Expression des T-Zell Oberflächenrezeptors CCR5, über den der HIV-Virus an CD4⁺ T-Zellen binden und die Zellen infizieren kann (Wong-Staal et al., 1998a). Auch bei der Therapie gegen Krebs gibt es klinische Studien, bei denen z.B. Ribozyme gegen den Angiogenesefaktor VEGF eingesetzt werden (Glade-Bender et al., 2003).

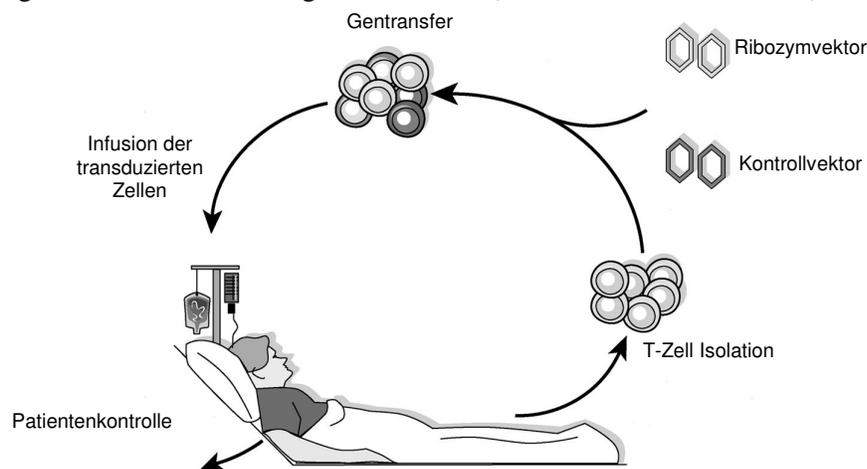


Abb. 17. Klinischer Einsatz eines Ribozyms

In einer klinischen Studie wird die Expression eines ungewünschten Gens über Gentransfer eines spezifischen Ribozyms in T-Zellen oder Knochenmarkstammzellen reduziert oder unterdrückt. Diese transfizierten Zellen werden dem Patienten verabreicht und dessen Entwicklung wird langfristig kontrolliert.

Somit steht für die Entwicklung neuer Therapieansätze und auch für eine Gentherapie auf der T-Zell Seite ein effektives Werkzeug zur Reduktion bzw. Unterdrückung der Expression eines Zielgens zur Verfügung.

10. Identifizierung von Biomarkern mittels Proteomanalyse

Die Analysen von Tumorzellen und T-Zellen können durch Identifizierung neuer Zielgene ebenfalls zur Verbesserung der Therapie verschiedener Tumorerkrankungen führen. Mittels verschiedener neuer Technologien wie Transkriptom-, klassischer Proteom- oder SELDI-Analysen können auf RNA- und Proteinebene Tumormarker und Biomarker erfolgreicher Therapien identifiziert werden. Der Einsatz solcher Marker kann dann durch bessere Früherkennung bzw. frühes Erkennen eines Therapieerfolges oder -versagens zu erheblichen Verbesserungen in der Tumorthherapie führen (Kellner et al., 2002; Falt et al., 2003; Kondo et al., 2003; Li et al., 2003a; Lichtenfels et al., 2003; Ma et al., 2003; Simon et al., 2003; Soltys et al., 2003; Vlahou et al., 2003; Wells et al., 2003; Xiao et al., 2003; Yanagisawa et al., 2003; Yasui et al., 2003).

Die Auftrennung von Proteinproben nach isoelektrischem Punkt und Größe mittels der 2D-PAGE Proteomanalyse bietet die Möglichkeit, eine Vielzahl von Proteinen gleichzeitig zu analysieren. Während man bei Western Blot Analysen nur die Expression einzelner bekannter Proteine untersuchen kann, kann man auf 2D-Gelen alle Proteine einer Zelle betrachten. So lassen sich Zellen in verschiedenen Stadien z.B. stimuliert und unstimuliert oder verschiedene Zelltypen wie Tumor- und Normalgewebe gut vergleichen. Proteinspots, die Unterschiede zwischen verschiedenen Zellstadien oder Zelltypen zeigen, können anschließend weiter analysiert werden. Die Proteine werden aus den Gelen ausgeschnitten, enzymatisch verdaut und anschließend über ihr Fragmentmuster in massenspektrometrischen Analysen gekoppelt mit Datenbankvergleichen identifiziert (Hirosawa et al., 1993; Lottspeich, 1999; Perkins et al., 1999; Mann und Jensen, 2003).

Durch die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms sollten in diesen Datenbanken alle Proteine und deren Fragmentierungsmuster enthalten sein. Ständige Weiterentwicklungen in Proteinauftrennung und Analyse ermöglichen zunehmend erfolgreiche Identifikationen.

Durch die Analyse von Subproteomen, wie der Untersuchung phosphorylierter Proteine, lassen sich weitergehende funktionelle Erkenntnisse, z.B. im Bereich der Signaltransduktion, erhalten (Kaufmann et al., 2001; Larsen et al., 2001; Yamagata et al., 2002).

Durch die Kombination von 2D-PAGE und anschließendem Western Blot mit Tumorpatienten Serum, der PROTEOMEX Analyse, können mögliche Tumormarker identifiziert werden (Kellner et al., 2002; Seliger et al., 2003).

Während sich im Bereich der Tumorimmunologie die Proteomanalysen zumeist mit der Untersuchung der Tumorzellen beschäftigen, liegen zur Zeit nur wenige Analysedaten von T-Zellen vor (Thiede et al., 2000; Nyman et al., 2001; Fratelli et al., 2002; Grolleau et al., 2002). Für die Analyse von Immunantworten und Identifikation von Biomarkern im Rahmen von Vakzinierungen wird der Proteomanalyse ein großes Potential zugeschrieben, dass bis jetzt aber noch nicht ausgeschöpft wurde. Durch die Analyse Vakzin-aktivierter T-Zellen sollte die Entwicklung von Kriterien zur Beurteilung von Immunantworten möglich sein. Diese Analysen können außerdem weitergehende Einblicke in die Art der Immunantwort und zugrunde liegende Regulationsmechanismen geben (Mosca et al., 2003).

II. Problemstellung und Ziele

Jährlich erkranken in Deutschland 14.000 Menschen an Nierenkrebs, 6.300 sterben daran. Für die Behandlung des metastasierenden Nierenzellkarzinoms liegt zur Zeit keine effektive Therapie vor. Da das Nierenzellkarzinom als immunogener Tumor eingestuft wird (Motzer et al., 1996; Motzer und Russo, 2000; Renkvist et al., 2001), bietet sich bei dieser Erkrankung die Möglichkeit der klinischen Umsetzung neuer spezifischer Immuntherapien. Durch Vakzinierung mit gentechnisch B7 modifizierten Tumorzellen sollte eine Therapie mit hoher Spezifität, geringen Nebenwirkungen und guter Prognose für diese Patienten möglich sein, deren 5-Jahres Überlebensrate sonst unter 10% liegt (Krebs in Deutschland, 2002; Mejean et al., 2003).

Von den für den klinischen Einsatz vorgesehenen B7 plasmidbasiert transfizierten Nierenkarzinomzelllinien (Jung et al., 1999) werden Zellklone mit unterschiedlicher B7-Oberflächenexpression selektioniert und in *in vitro* MLTC-Versuchen mit HLA-gematchten und -ungematchten T-Zellen eingesetzt. Durch Analyse von Proliferation, Zytokinsekretion und zytotoxischer Aktivität der T-Zellen können hier grundlegende Erkenntnisse über die costimulatorischen, konzentrationsabhängigen Eigenschaften von B7-1 und B7-2 zur effektiven Stimulierung einer autologen/allogenen T-Zell Antwort gewonnen und deren Konsequenzen für klinische Studien ermittelt werden.

Zur Umsetzung einer klinischen Pilotstudie zur Vakzinierung von Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom sollen die vorliegenden B7 modifizierten allogenen Nierenkarzinomzelllinien eingesetzt werden. Hierbei ist es zunächst die Aufgabe, die GLP-Kontrolle und GMP-Produktion des zellulären Vakzins zu kontrollieren. Weiterhin soll für den klinischen Einsatz des zellulären Vakzins eine SOP (*standard operating procedure*) für den Ablauf Auftauen-Bestrahlung-Verabreichung entwickelt und für die Vorlage des klinischen Protokolls bei der Kommission für somatische Gentherapie der Bundesärztekammer verifiziert werden.

Durch Etablierung eines schwach immunogenen retroviralen Vektorsystems zur Transfektion von Nierenkarzinomzelllinien mit B7-1 bzw. B7-2 kann ein Therapiekonzept zum Einsatz von autologen B7 transfizierten Nierenkarzinomzelllinien in klinischen Studien entwickelt werden. Ein retrovirales Vektorsystem kann dabei auf den Einsatz eines Antibiotikaresistenzgens verzichten, was die Immunogenität des Vektorsystems erheblich reduzieren wird.

Darüber hinaus sollen auch Therapiekonzepte entwickelt werden, die eine Modifikation der T-Zell Aktivierung auf der T-Zell Seite beinhalten. Dadurch könnte es möglich sein, auch gegen andere *tumor escape* Mechanismen neben der fehlenden Costimulation therapeutisch vorzugehen. Hier ist die Entwicklung eines Vektorsystems mit einem Ribozym gegen die mRNA für CTLA-4 ein möglicher Ansatz (Cepero et al., 1998).

Da bereits mehrere B7 homologe Proteine identifiziert wurden, werden die Analysen der T-Zell Aktivierung auf diese Moleküle ausgeweitet (Ling et al., 2000; Chapoval et al., 2001; Freeman et al., 2002). Nach Isolierung der B7-H2 cDNA wird diese in Nierenkarzinomzelllinien transfiziert und etablierte B7-H2 Transfektanden in MLTC-Analysen eingesetzt.

Die Identifizierung von Biomarkern für die Detektion einer klinisch signifikanten Immunantwort ist für die Analyse der Effizienz immuntherapeutischer Studien sehr wertvoll (Mosca et al., 2003). T-Zellen nach Aktivierung durch B7 transfizierte Nierenkarzinomzelllinien sollen mittels etablierter Proteomanalyse (Lichtenfels et al., 2001) untersucht werden. Differenziell exprimierte Proteine werden massenspektrometrisch identifiziert und ihre Bedeutung als Biomarker evaluiert. Diese Analysen werden weiterhin auch auf die Untersuchung phosphorylierter Proteine ausgeweitet. Die grundlegende Bedeutung der identifizierten Proteine für die B7 Costimulation von T-Zellen soll abschließend durch Erstellung eines Netzwerkes von Proteininteraktionen ermittelt und bewertet werden.

III. Material

1. Geräte und Software

1.1 Geräte

Absaugpumpe	KNF Neuberger (Freiburg)
Autoklaven	Technorama Deutschland (Fernwald) H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Bakterienschüttler	SM, Edmund Bühler (Bodelshausen)
Bakteriensterilbank	Twin 30, Gelaire Flow Laboratories (Sarstedt)
Bestrahlungseinheit	IBL 437C, Isotypendiagnostik CIS GmbH (Dreieich)
CO ₂ -Begasungsschränke	Heraeus B5060EK/CO ₂ , Kendro (Hanau)
DALT Elektrophorese Tank	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
DALT Gel Kassette	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
DALT Gel Gießstand	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Durchflußzytometer	Epics XL-MCL, Beckman Coulter (Krefeld)
Einfrierboxen	Cryo Freezing Container, Nalgene (Hereford, UK)
Fokussierungseinheit	IPGphor, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Folienschweißgerät	Polystar 401M, Rische + Herfurth (Hamburg)
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus Herafreeze, Kendro (Hanau)
Gelapparaturen, horizontal	Horizon 11.14 und Horizon 58, Invitrogen (Karlsruhe) Sub-Cell GT, Mini Sub-Cell GT, Biorad (München)
Gelapparaturen, vertikal	Minigel-Twin, Biometra (Göttingen)
Glasschalen aus Pyritt	Newell (Mühlthal)
Kühlwasserbad	F10, Julabo (Seelbach)
Mikroskop	Wilovert S, H. Hund GmbH (Wetzlar)
Milli-Q-Wasseranlage	Milli Q Plus Ultra Pure, Water System (Eschborn)
MTP Plattenreader	MRXII, Dynex (Denkendorf)
PCR-Geräte	Perkin Elmer (Weiterstadt) Biometra (Göttingen)
Photometer	Ultraspec1000, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg) PowerPac 300, Biorad (München)
Scanner	Powerlook III, Umax (Willich)
Sofortbildkamerasystem	Polaroid MP4 Land Camera, Polaroid (Offenbach)
Spannungsgeräte	Power Supply ST504 Invitrogen (Karlsruhe) Hofer EPS 2A200, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Spektralphotometer (UV/Vis)	Uvicon 930, Kontron Instruments (Neufarn)
Sterilbänke	Nuaire, Zapf (Sarstedt) Heraeus HeraSafe 12, Kendro (Hanau) Heraeus T6080, Kendro (Hanau)
Sterilschrank	tec-lab (Königstein)
Stickstofftank	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Streifenhalter 18cm	Trans Blot Cell, Bio Rad (München)
Tank-Blot-Apparatur	Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer	Heraeus UT6420, Kendro (Hanau)
Trockenschrank	Sonoplus, Bandelin (Berlin)
Ultraschallstab	UV Kontaktlampe Chroma 41, 254 nm und Handlampe, 266 nm, Vetter GmbH (Wiesloch)
UV-Leuchtschirm	analytic, universal und BP 310S, Sartorius (Einbeck)
Waagen	Heraeus Omnifuge 2. ORS, Megafuge 3.OR, Biofuge 15, Suprafuge 22, Kendro (Hanau)
Zentrifugen	

1.2 Software

Acrobat Reader 5.0.5	Adobe Systems Incorporated (Unterschleißheim)
Adobe Photoshop Version 5.0.2	Adobe Systems Incorporated (Unterschleißheim)
Align plus, Version 4.0	Scientific & Educational Software (Durham, USA)
Clone Manager, Version 5.2	Scientific & Educational Software (Durham, USA)
Durchflußzytometer Software	Expo32, Beckman Coulter (Krefeld)
Enhance Version 3.1	Scientific & Educational Software (Durham, USA)
Magic Scan32 V4.3.	Umax (Willich)
Microsoft Excel 2000	Microsoft Corporation (Unterschleißheim)
Microsoft Power Point 2000	Microsoft Corporation (Unterschleißheim)
Microsoft Word 2000	Microsoft Corporation (Unterschleißheim)
MTP Reader Software	Revelation 4.06, Dynex (Denckendorf)
Primer designer, Version 4.1	Scientific & Educational Software (Durham, USA)
Proteomweaver 1.3.2.	Definiens (Martinsried)

2. Verbrauchsmaterialien

Einmalsterilfilter	0,2 und 0,45µm, Millipore GmbH (Eschborn)
Einmalpipetten	Greiner (Frickenhausen)
Glaspasteurpipetten	Brand (Wertheim/Main)
Immobiline DryStrip	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Kryogefäße	Nunc, Nalgene (Hereford, UK)
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll (Dassel)
LeucoSeprörhchen	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen)
Polaroidfilme	Polaroid Typ 667, Schwarzweiß-Sofort-Packfilm, Format 8,6 x 10,8 cm, Polaroid (Offenbach)
Protein A Säulen	Hi Trap, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Proteingrößenausschlußsäulen	Nanosep, Pall (Dreieich), Centricon, Millipore GmbH (Eschborn)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Teflonfolie	Biofolie 25, In Vitro System & Services (Göttingen)
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Zellkulturgefäße	Greiner (Frickenhausen), Nunc (Wiesbaden)
Overhead-Projektionsfolie	Esselte Leitz (Stuttgart)

2.1. Sterilisation der verwendeten Materialien

Kunststoffmaterialien wie Eppendorfreaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert und dann im Trockenschrank bei 90°C getrocknet.

Glaspasteurpipetten wurden bei 180°C trockener Hitze für 4 Stunden im Sterilschrank sterilisiert.

3. Chemikalien

Acrylamid/Bis-Acrylamid (39:1)	AppliChem (Darmstadt)
Acrylamid/PDA Mix (39:1)	AppliChem (Darmstadt)
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Diagnostics (Mannheim)
AG 501-X8(D)	Biorad (München)
Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	AppliChem (Darmstadt)
Ammoniumsulfat	AppliChem (Darmstadt)

Ampicillin (Amp)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Bacto-Trypton	Difco (Augsburg)
Bacto-Yeast-Extract	Difco (Augsburg)
Bromphenolblau	AppliChem (Darmstadt)
n-Butanol	Merck KGaA (Darmstadt)
CHAPS	AppliChem (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics (Mannheim)
dNTP	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Dry Strip Cover Fluid	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Eisessig	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KGaA (Darmstadt)
Ficoll	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Formaldehyd 37%	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Glycerin, wasserfrei	AppliChem (Darmstadt)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Harnstoff	AppliChem (Darmstadt)
HCl (Salzsäure)	Merck KGaA (Darmstadt)
HEPES (N-2-Hydroxyethyl- piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Immobiline DryStrip Cover Fluid	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt)
Isopropyl- β -D-thiogalacto- pyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Jodacetamid	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumhydrogencarbonat	Merck KGaA (Darmstadt)
Lipofectamin	Invitrogen (Karlsruhe)
LMP-Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck KGaA (Darmstadt)
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumacetat	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Natriumcarbonat	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumcitrat	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumthiosulfat	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
NDSB-256	ICN Biomedicals (Eschwege)
Nonident P-40	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Orange G	AppliChem (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Serva Feinbiochemica GmbH (Heidelberg)
Percoll	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Pharmalytes pH 3-10	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Phenylmethansulfonsäurefluorid	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Phosphorsäure	Merck KGaA (Darmstadt)

RNase Inhibitor	Roche Diagnostics (Mannheim)
Silbernitrat	Merck KGaA (Darmstadt)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva Feinbiochemica GmbH (Heidelberg)
Thioharnstoff	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
TMB	Biosource (Solingen)
Tris/Acetat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tris/HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Triton-X-100	Merck KGaA (Darmstadt)
Trypanblau	Merck KGaA (Darmstadt)
Tween-20	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA (Darmstadt)
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)
Xylencyanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

4. Material für die Zellkultur

4.1. Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung der Zelllinien	Quelle
MZ1257RC, MZ1774RC, MZ1790RC, MZ1795RC, MZ1846RC, MZ1851RC, MZ1879RC, MZ1940RC	Nierenzellkarzinom (RCC)	A. Knuth, Mainz H.Gabbert, Mainz
MZ2733RC, MZ2858RC, MZ2861RC, MZ2862RC, MZ2877RC, MZ2885RC, MZ2902RC, MZ2905RC		J. Bukur, AG Seliger, Mainz
LAN2, LAN5, KHAI1, SK-N-Be, SK-N-F1	Neuroblastom	E. Levitskaya, Stockholm, Schweden
Siha, HT3, CaSki, Me180	Zervixkarzinom	American Type Culture Col- lection, Manassas, USA
SCC-68 , PCI-4A	Kopf-Halstumore (HNSCC)	T. Whiteside, Pittsburg, USA
buf526, buf1101, buf1102, buf1182, buf1195, buf1268, buf 1287, buf 1290, buf1317, buf1330	Melanom	S. Ferrone, Buffalo, USA
T2	Fusion aus B-Zelllinie 721.714 und der T- Lymphomzelllinie CEM	Salter und Cresswell, 1986
293	humane primäre embryonale Nieren	Graham et al., 1977
COS7	Zellen der grünen Meerkatze	Gluzman, 1981

4.3. Lösungen für die Zellkultur

Dulbecco's Phosphat

gepufferte Saline (DPBS)

Trypsin-EDTA

Cambrex Bioscience (Apen)

Invitrogen (Karlsruhe)

DMEM 1% Paraformaldehyd:

1% (w/v) Paraformaldehyd wurde in DMEM eingebracht, die Lösung im Wasserbad erwärmt bis knapp unter 60°C und vorsichtig geschüttelt, bis die Lösung klar wurde.

Nach Abkühlen wurde die Lösung sterilfiltriert (0,22µm).

Trypanblau-Lösung für die Zellzählung in einer Zählkammer:

NaCl 0,85% (w/v)

Trypanblau 0,16% (w/v)

Percollgradient 30ml:

Percoll 13,5ml

10x Earle's MEM 1,5ml

Spinners Medium 14,55ml

Penicillin / Streptomycin 150µl

Glutamin 150µl

NEA 150µl

zentrifugieren bei 11950g, 12min, 20°C, ohne Bremse

Einfriermedium:

FCS 90%

DMSO 10%

ACK-Lösung

Ammoniumsulfat 0,15 M

Kaliumhydrogencarbonat 1 M

EDTA 0,1 M

pH 7,3

Lösung wurde sterilfiltriert (0,22µm)

4.4. Komplettsysteme

BrdU ELISA

Roche Diagnostics (Mannheim)

Cytotox96

Promega (Mannheim)

Cell Titer 96 One Solution (MTS)

Promega (Mannheim)

Opt EIA ELISA Sets

Pharmingen (Wiesbaden)

Quantum Microbead Kit

Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen)

IntraPrep Kit

Beckman Coulter (Krefeld)

4.5. Antikörper Isotyp-Kontrollen

Antikörper	Verwendung	eingesetzte Menge	Quelle
IgG1 FITC	Durchflußzytometrie	5 µl	Beckman Coulter (Krefeld)
IgG2a FITC		5 µl	
IgG1 PE		5 µl	
IgG2a PE		5 µl	
IgG1 PE-CY5		2,5 µl	

verwendete spezifische Antikörper

Antikörper	Verwendung	eingesetzte Menge	Quelle
β-Aktin	Western Blot	1:10000	Abcam (Cambridge, UK)
B7-H2	Durchflußzytometrie Western Blot	10µl 1:10000	R&D (Wiesbaden)
CD14 FITC	Durchflußzytometrie	5µl	Beckman Coulter (Krefeld)
CD14 PE-CY5	Durchflußzytometrie	2,5µl	
CD19 PE	Durchflußzytometrie	5µl	
CD3 FITC	Durchflußzytometrie	5µl	
CD3 PE	Durchflußzytometrie	5µl	
CD3 PE-CY5	Durchflußzytometrie	2,5µl	
CD40 PE	Durchflußzytometrie	5µl	
CD45RA	Durchflußzytometrie	5µl	
CD45RO	Durchflußzytometrie	5µl	
CD80 FITC	Durchflußzytometrie Blockade	5µl 80µl	
CD86 PE	Durchflußzytometrie Blockade	5µl 80µl	
HLA-ABC FITC	Durchflußzytometrie	5µl	
ICAM-1 FITC	Durchflußzytometrie	5µl	
ICOS	Durchflußzytometrie Western Blot	10µl 1:1000	
LFA-3 FITC	Durchflußzytometrie	5µl	Beckman Coulter (Krefeld)
OKT3 (Orthoclon)	T-Zell Stimulation	1µg/ml	Janssen-Cilag (Neuss)
PCNA	Western Blot	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Stathmin	Western Blot	1:1250	Calbiochem Merck Biosciences (Schwalbach)
w6/32	Durchflußzytometrie Blockade	100 µl 2ml	Barnstable et al., 1978

Zweitantikörper

anti-Maus IgG FITC	Durchflußzytometrie	10µl	Beckman Coulter (Krefeld)
anti-Ziege IgG FITC	Durchflußzytometrie	10µl	DAKO (Hamburg)

FITC: Fluorescein Isothiocyanate, PE: Phycoerythrin, PE-CY5: Phycoerythrin Konjugat mit Indodicarbocyanin, Blockade: Diese Antikörper wurden zur Blockade der T-Zell Aktivierung in den angegebenen Mengen pro 10ml Kulturmedium eingesetzt.

4.6. Enzyme

Test-Neuraminidase

Chiron Behring (Marburg)

4.7. retrovirale Kulturüberstände

Vom Europäischen Institut für Forschung und Entwicklung von Transplantationsstrategien (EUFETS AG, Idar-Oberstein) wurden verschiedene retrovirale Kulturüberstände zur Verfügung gestellt bzw. im Rahmen einer Zusammenarbeit hergestellt:

LTR-leader	cDNA	Retroviren x10 ⁶ /ml	
SFFV-1 γ	eGFP	1,6	
MPSV-1 γ	eGFP	2,1	
MoMuLV-1 γ	eGFP	3,5	
SFFV-91	B7-1	3,3	
		5,3	
		3,4	
		3,3	
		2,7	
		2,8	
		2,3	
SFFV-91	B7-2	2,0	
		2,8	
		1,5	
		1,8	
		1,4	
		1,4	
		1,7	
SFFV-91	B7-1/B7-2	Klon 1	Klon 2
		1,5	2,5
		2,8	3,4
		1,9	2,5
		2,2	2,9
		1,8	2,1
		3,0	2,7
		2,0	2,4

eGFP: *enhanced green fluorescent protein*

5. Material für die Molekularbiologie

5.1. Komplettsysteme

2D Quant	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
2D Clean Up	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
ECL Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Phospho Protein Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid-Isolierungs-Kits	Qiagen (Hilden)
Protein Assay ESL	Roche Diagnostis (Mannheim)
Qia Quick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
RNA-Isolierungs-Kit	Qiagen (Hilden)
Taq DNA Polymerase PCR Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
Titan One Tube RT-PCR System	Roche Diagnostics (Mannheim)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

5.2. Enzyme

DNase	Invitrogen (Karlsruhe)
Glycosidase F	Roche Diagnostics (Mannheim)
Klenow Enzym	Roche Diagnostics (Mannheim)
Phosphatase, alkalische	Roche Diagnostics (Mannheim)
Proteinase K	Roche Diagnostics (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics (Mannheim), NEB (Frankfurt/Main)
T4 DNA Ligase (7U/ μ l)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

5.3. Molekulargewichts- und Längenstandards

5.3.1. DNA-Längenstandards

100 Basenpaar-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe), NEB (Frankfurt/Main)
1000 Basenpaar-Leiter	NEB (Frankfurt/Main)

5.3.2. Proteinmolekulargewichtsstandards

RPN 800	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
---------	---------------------------------------

5.4. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Software Programms Primer Designer (III.1.2.) abgeleitet und von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

5.4.1. Oligonukleotide für verschiedene Klonierungsansätze

Target	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	abgeleitet nach
B7-H2	29 1089C	GTTGCTCCTCTCCGAGGTCT CTCTCACGGTGGCGTCTCAT	Genbank AF289028
CTLA-4	1163 1923C	ATGAC-GAATTC- TGAAGACCTGAACACCGCTC GCATC-CTCGAG- TTAGAATTGCCTCAGCTCTT	Genbank X15072 L15006 M74363
IgG2a	764 1473C	AAACTCGAGCCCAGAGGGCCCAC GCTCTAGAAGCTCATTTACCCG- GAGTCC	Genbank MMIGHC2AA
ICOS	2346 2767C	CGGGATCCATGAAGTCAGGCCTCTGG- TATAACTCGAGCTGGCAACAAAG	Plasmid pICOS (III.5.10.)
anti CTLA-4 Ribozym	Ribo1 for	GATCAATTGCGGCCGCTTCA CATAAGAACCTGACCAGAGAA	Cepero et al., 1998
	Ribo1 rev	TTCTCTGGTCAGGTTCTTAT GTGAAGCGGCCGCAATTGATC	
	Ribo2 for	ACACACGTTGTGGTATATTA CCTGGTAGGATCCGAATCCGG	
	Ribo2 rev	CCGGATTCGGATCCTACCAG GTAATATAACCACAACGTGTGT	
tRNA _{Val} Promotor	tprom1-for	CCCAAGCTTTGTAACCGTTG- GTTTCCGTAGTGTAGTGGTT ATCACGTTTCGCTCACACGC GAACGGTCCGAATTCC	Wong-Staal et al., 1998b
	tprom1-rev	GGAATTCGGACCGTTCGCGT GTGAGGCGAACGTGATAACC ACTACACTACGGAAACCAAC GGTTACAAAGCTTGGG	
	tprom2-for	GGAATTCGGTCCCCGGTTCG AAACCGGGCGGAAACAGCG GCCGCTAAACTAT	
	tprom2-rev	ATAGTTTAGCGGCCGCTGTT TCCGCCCGGTTTCGAACCGG GGACCGAATTCC	
tRNA _{Val} Terminator	term for	CGGGATCCTTTTGCATTTTC TGCAGGCATGCAAGCTTGGG	
	term rev	CCCAAGCTTGCATGCCTGCAG AAAAATGCAAAAGGATCCCG	

5.4.2. Oligonukleotide für RT-PCR Analysen

Target	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	abgeleitet nach Genbank	Annealing- temperatur/ Zyklenzahl
B7-H2	145 659C	ACTGCTCTTCCTGCTCTTCA GGCTGTTGTCCGTCTTATTG	AF289028	56°C/22
β-Aktin	885 1199C	TCCTGTGGCATCCACGAAACT GAAGCATTGTGCGGTGGACGAT	BC014861	57°C/25
mdm2	579 1065C	TGATGAAAGCCTGGCTCTGT CTCTTCAGCTTGTGTTGAGT	BT007258	56°C/25
Her2/neu	1815 2739C	ACCTGACCTCTCCTACATGC CCACACAGTCACACCATAAC	M11730	63°C/25
p53	485 803C	GTCTGTGACTTGCACGTACT CAGTCAGAGCCAACCTCAGG	X02469	55°C/25
B7-H1	410 758C	GGTGCCGACTACAAGCGAAT TTGGAGGATGTGCCAGAGGT	AF177937	52°C/25
B7-H3	355 792	AGCTTCACCTGCTTCGTGAG CACCAGCAGTGCAATGAGAC	NM_025240	57°C/25

5.4.3. Oligonukleotide für RT-PCR Analysen zur Evaluierung von Biomarkern

Target	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	abgeleitet nach Genbank	Annealing- temperatur/ Zykluszahl
ApoAI	200 443C	GGCCACTGTGTACGTGGATG GGCCTTCACCTCCTCCAGAT	X02162	55°C/30
eIF5a	135 544C	TGGCAGATGACTTGGACTTC CACCGTGATCAGGATCTCTT	NM_001970	53°C/30
FLJ20580	117 452C	CCGGTGGTACCTGAAGATGA CAGTCCTTCTCCTGCAGATT	NM_017887	53°C/30
Glia maturation factor	17 403C	CTGGTGGTGTGCGAGGTAGA CCAGGCCTCAGTGAGGTCAT	AF38956	54°C/30
GrpE	199 584C	AGATCCTCCTGCTACAGAGA GGAACAAGGCCTCATGTTCA	BC024242	51°C/30
GST-Pi	226 495C	CCAATACCATCCTGCGTCAC GGTTGTAGTCAGCGAAGGAG	X06547	54°C/30
MGC15429	361 735C	AGGCTCGCTTCTCTGTACTG GAGCTGGAGTCTTCACACTG	NM_032750	55°C/30
neuro h3, raf kip	123 412C	CCTTGAGCCTGCAAGAAGTG CACATAATCGGAGAGGACTG	D16111	53°C/30
nudix	283 705C	AAGAGCAGACTGCGGATGGT TGGCGTCCACTGTGAGATGT	AF218818	54°C/30
PCNA	159 424C	AGGTGTTGGAGGCACTCAAG TACTAGCGCCAAGGTATCCG	AF527838	54°C/30
PDGF	106 467C	TACAAGCCCTGAGGAGATCG CCTTGGCTTGCTCTGTCTTC	BC000684	54°C/30
pnpp	209 687C	GGATTAGGAGGTCTGACTGA ACATAGGTGCCTTCCTGTAG	NM_000270	52°C/30
Prefoldin5	45 315C	TGAATCTGCCGCAGCTAGAA TTGGCATCCTCAGCTGTCTT	XM_028598	53°C/30
ran	314 754C	CCGGCCAGGAGAAATTCGGT CATCCTCATCCGGGAGAGCA	NM_006325	54°C/30
rho GDI	115 437C	ATGAGCACTCGGTCAACTAC GTACTTCATGCCGGACACTA	X63863	54°C/30
RNA binding subunit	177 562C	TGTCCTGATGCCAGCCTTGA ACTTGAGCCGCCACCTCCTT	NM_007262	54°C/30
Stathmin	158 436C	ATTCTCAGCCCTCGGTCAA TTGTGCCTCTCGGTTCTCTT	NM_005563	51°C/30
Splicefaktor p32	269 701C	CTGCACACCGACGGAGACAA CAGACTCGCCAGTGGACTGA	AF338439	53°C/30
Taldo1	96 569C	GACCAGCTCAAGCAGTTCAC GGCGAAGGAGAAGAGTAACG	NM_006755	54°C/30
TCP1 γ	824 1173C	AGCAGCTCTGTGAGGACATT CTGGAGGTTGCGTTCTACTT	NM_005998	52°C/30
UbE2N	136 454C	GCCGAACCAGATGAGAGCAA TCTTCCACTGCTCCGCTACA	NM_003348	52°C/30

5.5. Bakterienstamm

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* (*E.coli*)-Stamm DH5 α eingesetzt.

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , F ⁺ , hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), deoR, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, D(argF-lacZYA)169, F80d(lacZDM15)	(Hanahan, 1983)

5.6. Bakterienkulturmedien

Luria Bertani-Medium (LB-Medium)

Bacto Trypton	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Millipore H ₂ O	ad 1000ml
pH 7,5	

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Bei Bedarf wurde nach Abkühlen Ampicillin als Selektionsantibiotikum (100 mg/ml in Aqua bidest., steril filtriert) in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml Medium zugegeben.

YT++-Medium

Bacto Trypton	10g
Bacto Yeast Extract	5g
NaCl	5g
Millipore H ₂ O	ad 980ml
pH 7,5	

Nach Autoklavieren und Abkühlen wurden folgende steril filtrierte Lösungen zugeben:

2 M MgSO ₄	10ml
1 M KCl	10ml

5.7. Lösungen für die Bakterientransformation

Puffer TFB I

Kaliumacetat	30mM
MnCl ₂	50mM
RbCl	100mM
CaCl ₂	10mM
Glycerin	15%

Der Puffer wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Puffer TFB II

Na-MOPS, pH 7,0	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl	10 mM
Glycerin	15%

Der Puffer wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

SOC-Medium

Bacto Trypton	2,0% (w/v)
Yeast Extract	0,5%
NaCl	10mM
KCl	2,5mM

Die Lösung wurde autoklaviert und nach Abkühlung wurden folgende steril filtrierte Lösungen steril zugeben:

MgCl ₂	10mM
MgSO ₄	10mM
Glukose	20mM

5.8. Lösungen für die Plasmidpräparation**Puffer P1**

Tris/HCl pH8,0	50mM
EDTA	10mM

Puffer P2

Natriumhydroxid	200mM
SDS	1% (v/v)

Puffer P3

Kaliumacetat pH 5,5	3M
---------------------	----

TE-Puffer

Tris HCL, pH 8,0	10mM
EDTA, pH 8,0	1mM

5.9. Lösungen für Gelelektrophorese von DNA**50 x TAE-Puffer**

Tris	2M
Eisessig	1M
EDTA	50mM

5 x DNA-Beladungspuffer

Ficoll	5g
Bromphenolblau	50mg
Xylene Cyanol	50mg
Orange G	50mg
Millipore H ₂ O	ad 20ml

5.10. Basisvektoren und verwendete Expressionsvektoren

pCMV Ires Neo

Der Basisvektor pCMV Ires Neo wurde aus den Vektoren pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe) und dem Vektor pIRES Neo (Veelken et al., 1996) zusammengesetzt (Abb. 18). Durch die Verwendung der *internal ribosome entry site* (IRES) des Enzephalomyocarditisvirus (ECMCV) ist die Kopplung der Genexpression eines Zielgens an die Expression des Antibiotikaresistenzgens möglich.

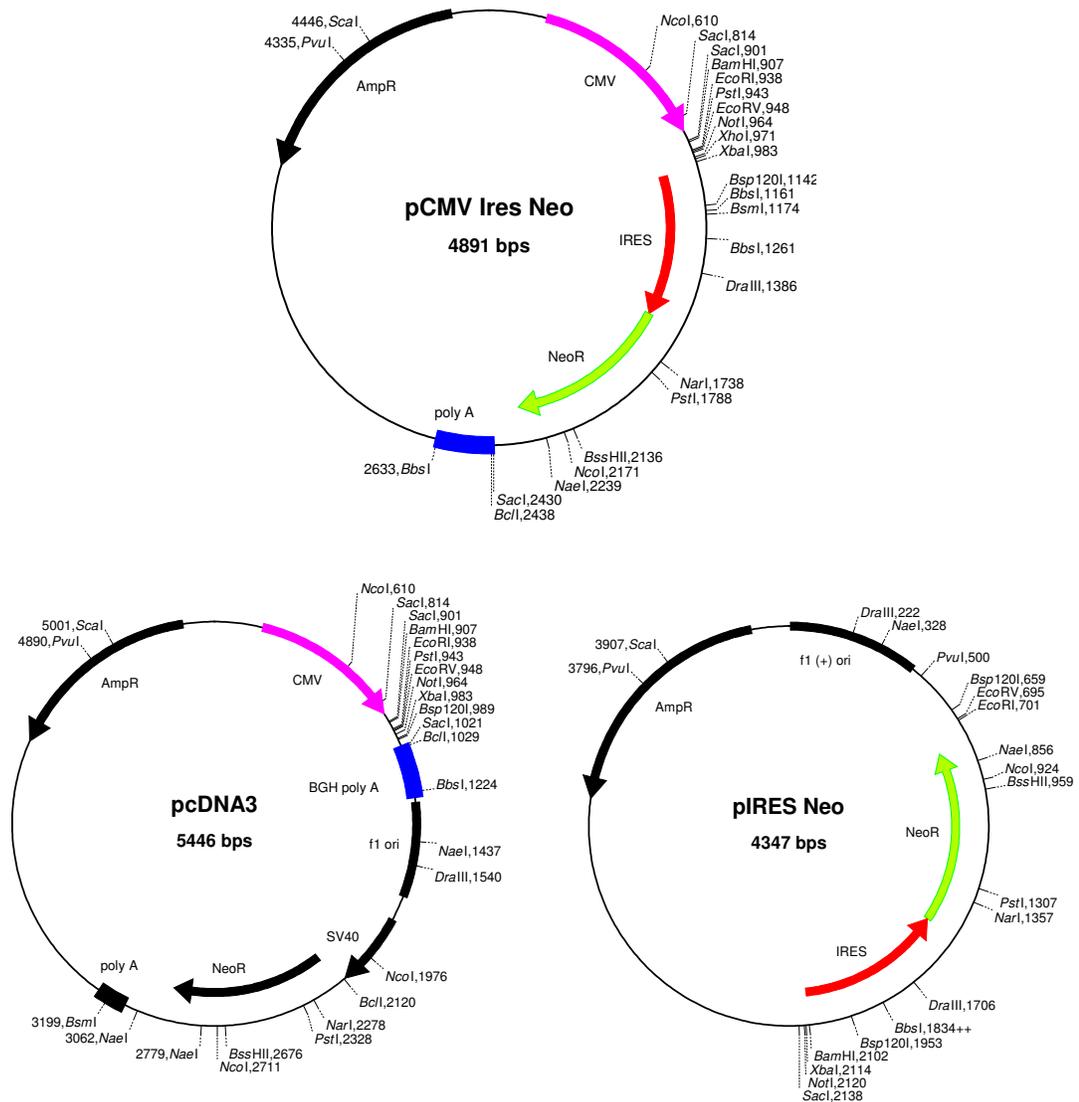


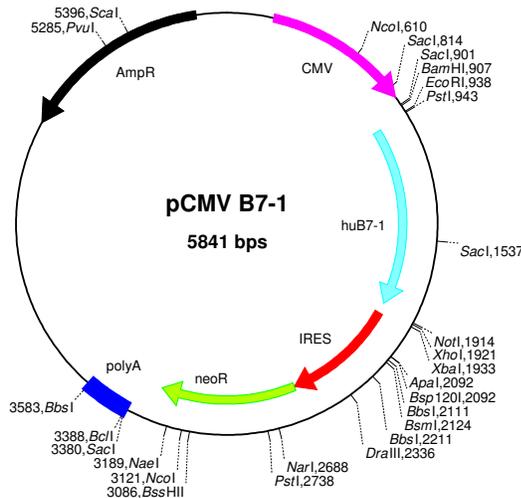
Abb. 18 Basisvektor pCMV Ires Neo zusammengesetzt aus pcDNA3 und pIRES Neo

Der Basisvektor pCMV Ires Neo wurde aus den Vektoren pcDNA3 und pIRES Neo zusammengesetzt.

AmpR=Ampicillinresistenzgen, polyA=Polyadenylierungssignal, CMV=Zytomegalievirus-promotor, IRES=*internal ribosome entry site*, NeoR=Neomycinresistenzgen, SV40=SV40 Promotor

pCMV B7-1

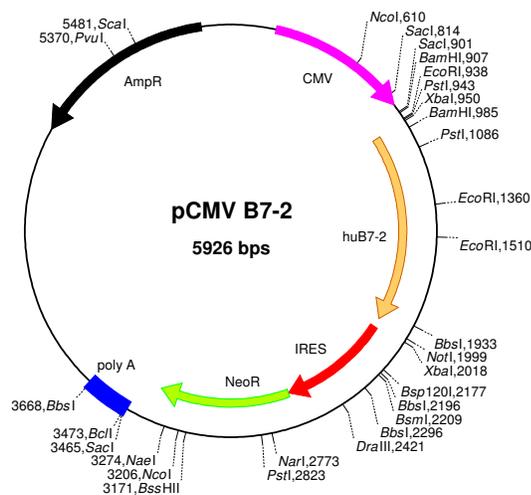
Die humane B7-1 cDNA (948bp, Genbank NM_005191 nt375-1320) wurde mittels RT-PCR aus der RNA von T2-Zellen amplifiziert und über die Restriktionsschnittstelle EcoRV in den Basisvektor pCMV IRES Neo eingesetzt. Das Genkonstrukt (GK) trägt die Bezeichnung pCMV B7-1 (Abb. 19). Die Identität des GK wurde über Sequenzierung sichergestellt (siehe Anhang X. 2). Das Nukleotid 1086 weicht mit einem A statt G von der Datenbanksequenz (Genbank NM_005191 nt510) ab. Diese Abweichung hat keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz (Jung et al., 1999).

**Abb. 19 B7-1 Expressionsvektor**

Die cDNA für humanes B7-1 wurde in die MCS des Vektors pCMV IRES Neo kloniert (Jung et al., 1999).
AmpR=Ampicillinresistenzgen, CMV=Zytomegalieviruspromotor, IRES=internal ribosome entry site, NeoR=Neomycinresistenzgen, polyA=Polyadenylierungssignal

pCMV B7-2

Die humane B7-2 cDNA (1036bp, Genbank HUMB72A nt75-1110) wurde mittels RT-PCR aus der RNA von T2-Zellen amplifiziert und über die Restriktionsschnittstelle EcoRV in den Basisvektor pCMV IRES Neo eingesetzt (Jung et al., 1999). Das GK trägt die Bezeichnung pCMV B7-2 (Abb. 20). Die Identität des GK wurde über Sequenzierung sichergestellt, die B7-2 Sequenz entspricht komplett der Datenbanksequenz (Anhang X. 2).

**Abb. 20 B7-2 Expressionsvektor**

Die cDNA für humanes B7-2 wurde in die MCS des Vektors pCMV IRES Neo kloniert (Jung et al., 1999).
AmpR=Ampicillinresistenzgen, CMV=Zytomegalieviruspromotor, IRES=internal ribosome entry site, NeoR=Neomycinresistenzgen, polyA=Polyadenylierungssignal

pCMV B7-1/B7-2

Aus den Expressionsvektoren pCMV B7-1 und pCMV B7-2 wurde der Doppelexpressionsvektor pCMV B7-1/B7-2 unter Verwendung zweier identischer IRES Sequenzen (ECMCV) generiert (Abb. 21).

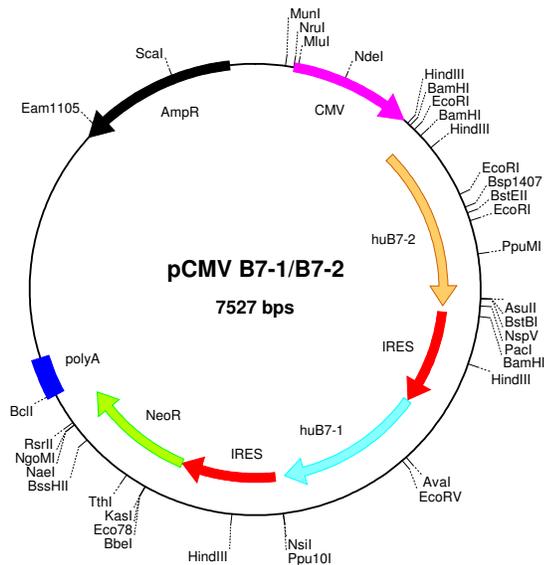


Abb. 21 B7-1/B7-2 Expressionsvektor

Aus den Vektoren pCMV B7-1 und pCMV B7-2 wurde der Vektor pCMV B7-1/B7-2 kloniert (Jung et al., 1999). AmpR=Ampicillinresistenzgen, CMV=Zytomegalieviruspromotor, IRES=*internal ribosome entry site*, NeoR=Neomycinresistenzgen, polyA=Polyadenylierungssignal

pCMV IRES Hyg

Der Vektor pCMV IRES Hyg wurde von Clontech, Heidelberg bezogen (Abb. 22). Mit Hilfe dieses Vektors steht Hygromycin als weiterer Selektionsmarker zur Genexpression in eukaryotischen Zellen zur Verfügung.

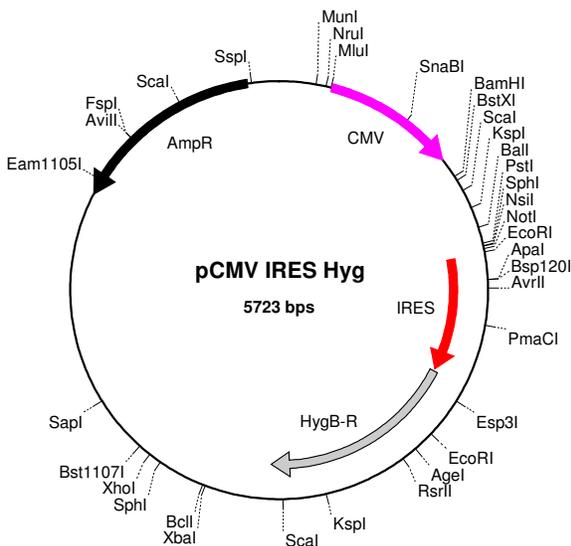


Abb. 22 pCMV IRES Hyg

Der Vektor pCMV Ires Hyg wurde von Clontech (Heidelberg) bezogen. AmpR=Ampicillinresistenzgen, CMV=Zytomegalieviruspromotor, IRES=*internal ribosome entry site*, HygR=Hygromycinresistenzgen

5.11. Lösungen für Western Blot Analyse**Protease-Inhibitoren-Mix (in PBS):**

Die Protease-Inhibitoren wurden - wenn nicht anders angegeben - in Millipore H₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

Protease-Inhibitor	Stocklösung	eingesetztes Vol.	Endkonzentration
Aprotinin (4°C)	1mg/ml	10µl	10µg/ml
Trypsininhibitor	1mg/ml	10µl	10µg/ml
PMSF (in Isoprop.)	2,5mg/ml	20µl	50µg/ml
Jodacetamid	185mg/ml	20µl	370µg/ml
Pepstatin	68mg/ml	25µl	17µg/ml
Leupeptin	38mg/ml	25µl	9,5µg/ml

2x SDS-Puffer:

Saccharose	1g
25%iges SDS (w/v)	4ml
1 M Tris/HCl pH 6,8	1,2ml
Millipore H ₂ O	4,8ml
Pyronin	1 Krümel

SDS-PAGE Gele

Trenngel 10%		Sammelgel 5%	
Acrylamid / Bisacrylamid Mix 39:1	2,3ml	Acrylamid / Bisacrylamid Mix 39:1	0,38ml
1,88M Tris/HCl pH 8,8	1,2ml	0,625 M Tris/HCl pH 6,8	0,4ml
0,5% SDS	1,2ml	0,5% SDS	0,4ml
Aqua bidest.	1,3ml	Aqua bidest.	0,82ml
TEMED	5µl	TEMED	2µl
10% APS	30µl	10% APS	10µl

SDS-PAGE 5x Laufpuffer

Tris-Base	150g
Glycin	720g
Millipore H ₂ O	ad 5000ml

SDS-PAGE Elektrophorese-Puffer

Tris-Base	50mM
Glycin	192mM
SDS	0,1% (w/v)

Western Blot Transferpuffer

SDS-PAGE 5x Laufpuffer	300ml
Ethanol	600ml
Millipore H ₂ O	ad 3000ml

TBS-T

Tris-Base	20mM
Tween20	0,1%
NaCl	137mM
pH 7,6	

TBS-AP-Lösung

Tris-Base	20mM
NaCl	137mM
MgCl ₂	1,01g
NaCl	0,58g
Millipore H ₂ O	ad 100ml
pH 9,5	

5.12. Lösungen für die Proteinaufreinigung**gesättigte Ammoniumsulfatlösung**

Ammoniumsulfat	541,77g (bei 25°C)
Millipore H ₂ O	ad 1000ml

Zitratphosphatpuffer pH 3.0

Zitronensäure 0,1M	
Zitronensäure	19,21g
Millipore H ₂ O	ad 1000ml

Natriumdihydrogenphosphat 0,2M	
Natriumdihydrogenphosphat x 2 H ₂ O	35,6g
Millipore H ₂ O	ad 1000ml

Zitratphosphatpuffer pH 3.0	
Zitronensäure 0,1M	39,8ml
Natriumdihydrogenphosphat 0,2M	10,2ml

5.13. Lösungen für Proteomanalysen

Lösungen für den Zellaufschluß

7M Harnstoff / 2M Thioharnstoff

Harnstoff	21,02g
Thioharnstoff	7,61g
Millipore H ₂ O	ad 40ml

Nach vollständigem Lösen wurde die Lösung entionisiert.

Hierzu wurden der Lösung 0,5g Austauscher-Resin (AG 501-X8(D)) zugesetzt und die Lösung mindestens 10min in Gegenwart des Austauscherharzes gerührt. Bei störenden Ionen entfärbte sich das Resin, wobei bei vollständiger Entfärbung nochmals 0,5g Austauscherharz zugesetzt wurde. Anschließend wurde das Harz durch Filtration entfernt.

Rabilloud-Lysepuffer:

7M Harnstoff / 2M Thioharnstoff	40ml
NDSB	2,57g
DTT	0,5g
CHAPS	2g
0,5%ige Pharmalytes pH 3-10	625µl
1%ige Bromphenolblau-Lösung	30µl
Millipore H ₂ O	ad 50ml

Der Lysepuffer wurde in 5 ml Aliquots bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Lösungen für die SDS-PAGE Auftrennung (2. Dimension)

2D PAGE Gele

Ansatz für 12 Gele (1600ml Gel-Mix)

Acrylamid/PDA (39:1 Mix)	520ml
1M Tris/HCl, pH 8.8	600ml
Glycerin	64ml
1M NaS ₂ O ₃	8ml
Millipore H ₂ O	ad 50ml
10% APS	16ml
TEMED	800µl

gesättigtes Butanol

n-Butanol wurde mit 0,375M Tris/HCl, pH 8.8 ausgeschüttelt. Es wurde solange 0.375M Tris/HCl, pH 8.8 zugeben bis sich zwei Phasen bildeten. Anschließend wurde die obere Butanol-Phase abgenommen und eingesetzt.

10x SDS-PAGE-Puffer

Tris	300g
Glycin	1440g
SDS	100g
Millipore-H ₂ O	ad 10000ml

9,5M Harnstoff

Harnstoff	285,3g
Millipore-H ₂ O	ad 500ml

Der Harnstoff wurde gelöst, über Nacht bei RT gerührt und anschließend mit Ionenaustauscher entionisieren. Hierzu wurden der Lösung 2,5g Austauscher-Resin (BioRad AG 501-X8(D)) zugesetzt und die Lösung mindestens 10min in Gegenwart des Austauscherharzes ge-

rührt. Bei Entfärbung des Resin wurde erneut 1g Austauscherharz zugesetzt und die Lösung nochmals 10min gerührt, bevor das Harz durch Filtration (Whatman-Filter) abgetrennt wurde.

IPG-Äquibrierungspuffer

Ansatz für 10 IPG-Strips

9,5M Harnstoff	189ml
SDS	6g
1M Tris/HCl	15ml
Glycerin	90ml
Millipore-H ₂ O	ad 300ml

Äquibrierungspuffer 1

Ansatz für 10IPG Strips

IPG-Äquibrierungspuffer	150ml
DTT	2,25g

Äquibrierungspuffer 2

Ansatz für 10IPG Strips

IPG-Äquibrierungspuffer	150ml
Jodacetamid	7,2g

Ladepuffer mit *low melting point* (LMP) Agarose

LMP Agarose	1g
10x SDS-PAGE Puffer	10ml
1% Bromphenolblau	50µl
Millipore-H ₂ O	ad 100ml

Lösungen für die Silberfärbung

Fixierer

Ethaonol	400ml
Eisessig	100ml
Millipore-H ₂ O	500ml

Ethanolösung

Ethaonol	300ml
Millipore-H ₂ O	700ml

Sensitivierungslösung

Natriumthiosulfat	0,2g
Millipore-H ₂ O	ad 1000ml

Silbernitratlösung

Silbernitrat	2g
Millipore-H ₂ O	ad 1000ml

Entwicklerlösung

Natriumcarbonat	30g
Millipore-H ₂ O	ad 1000 ml

Stopplösung

Eisessig	50ml
Millipore-H ₂ O	ad 1000ml

IV. Methoden

1. Zellkulturmethoden

1.1. Allgemeine Methoden der Zellkultur

Die Zellkulturmethoden und die Behandlung sämtlicher Geräte, Chemikalien und Labormaterialien für zellbiologische Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden nach Mishell und Shiigi (1980) sowie Lindl und Bauer (1993) durchgeführt und gegebenenfalls, wie in der Arbeit angegeben, abgeändert.

Sterile Arbeiten erfolgten in verschiedenen Sterilbänken und die Zellen wurden in einem elektronisch geregelten CO₂-Begasungsbrutschrank bei konstanten 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen kultiviert. In Abhängigkeit ihrer Dichte wurden die Zellen alle drei bis fünf Tagen umgesetzt oder expandiert. Adhärente Zellen wurden durch Zugabe von Trypsin/EDTA und mechanisches Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Die vom Boden gelösten Zellen bzw. nicht-adhärente Zellen wurden in 15ml oder 50ml Röhrchen bei 450g sedimentiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen in neue Flaschen mit frischem Kulturmedium überführt.

1.2. Kryokonservierung

Zellen können über längere Zeit bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Die Zellen wurden hierfür in Einfriermedium aufgenommen, in Kryogefäße abgefüllt und in Einfrierboxen mit Isopropanol mindestens 24 Stunden bei -80°C gelagert, um ein gleichmäßiges Abkühlen von 1°C/min zu gewährleisten, bevor sie in den Stickstofftank überführt wurden.

Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie bei 37°C aufgetaut und zum Waschen möglichst schnell in warmes Medium überführt, bevor sie sedimentiert und in neuem Medium ausgesät wurden.

1.3. Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung in einer Zählkammer

Die Zellzahlbestimmungen erfolgten mit Trypanblau-Exklusion. Die Zellsuspension wurde in 0,16% Trypanblau-Lösung geeignet verdünnt und lebende, ungefärbte Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt.

Lebende Zellen werden durch den Farbstoff nicht angefärbt, da er deren intakte Plasmamembran nicht durchdringen kann. Tote Zellen hingegen erscheinen unter dem Mikroskop blau.

1.4. Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA

Durch Einführung von Plasmid-DNA in Säugerzellen können diese stabil transfiziert werden. Dabei wird die Plasmid-DNA nach dem Gentransfer in das Genom der Zelle integriert und damit dauerhaft exprimiert.

Vorbereitung der Plasmid-DNA für die stabile Transfektion

Für eine stabile Integration der Plasmid-DNA in das Genom der Zelle muß die Plasmid-DNA (IV.2.1.) linearisiert werden. Die Plasmid-DNA wurde daher im Bereich des Ampicillin-Gens, das für die Vermehrung des Plasmids in Bakterien notwendig ist, mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Nach Aufreinigung der DNA mit dem PCR Purification Kit erfolgte eine Ethanol-fällung. Nach Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das Pellet unter der Sterilbank in sterilem TE-Puffer aufgenommen.

Gentransfer durch Lipofektion

Eine Möglichkeit des Gentransfers in eukaryotische Zellen ist die Lipofektion. Bei Verwendung von kationischen Lipiden beruht sie auf dem Prinzip, dass die Lipidreste mit der Zellmembran in Wechselwirkung treten, während die kationische Kopfgruppe des Lipids mit den

negativ geladenen Phosphatresten der DNA assoziiert. Durch Internalisierung dieses Komplexes gelangt die DNA in die Zelle (Felgner et al., 1987).

Einen Tag vor der Transfektion wurden 1×10^5 Zellen je Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Je Ansatz wurden $3 \mu\text{l}$ Lipofectamin in $100 \mu\text{l}$ Medium (ohne Zusätze) für eine Stunde inkubiert. Gleichzeitig wurden $2 \mu\text{g}$ der Plasmid-DNA in $100 \mu\text{l}$ Medium (ohne Zusätze) inkubiert. Die Ansätze wurden vereinigt (Transfektionslösung) und 30min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Medium ohne Zusätze gewaschen, bevor die Transfektionslösung und $800 \mu\text{l}$ Medium ohne Zusätze zugegeben wurden. Die Zellen wurden vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, danach zweimal mit Medium gewaschen und anschließend in frischem Medium mit Zusätzen aufgenommen. Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen auf Selektionsmedium umgesetzt.

Selektion stabil transfizierter antibiotikaresistenter Zellen

Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde die minimale Konzentration des entsprechenden Antibiotikums gewählt, die zur Tötung nicht transfizierter Zellen ausreichte.

Diese Konzentrationen wurden vor der Transfektion ermittelt:

MZ1257RC, MZ2733RC und 293 Zellen: $300 \mu\text{g/ml}$ G418

COS7 Zellen: $600 \mu\text{g/ml}$ Hygromycin
 $500 \mu\text{g/ml}$ G418

Nach zwei bis drei Wochen Kultur in antibiotikahaltigem Medium wurden antibiotikaresistente Zellklone isoliert und expandiert. Dazu wurde auf den ausgewählten Zellklon ein Klonierungsring aus Metall gesetzt und der Zellklon mit Hilfe einer Pipette und $50 \mu\text{l}$ Trypsin/EDTA gepickt, in ein neues Loch einer 6-Loch-Platte überführt und weiter kultiviert.

Nach Selektion wurden die transfizierten Zellen dauerhaft in den entsprechenden antibiotikahaltigem Medium gehalten.

1.5. stabiler Gentransfer eukaryotischer Zellen mittels Retroviren

Eine hohe Effizienz beim Gentransfer in eukaryontische Zellen bietet die Transfektion mit Retroviren. Retrovirale Vektoren, die die gewünschte DNA, wie z.B. B7 oder GFP, exprimieren können, werden dabei in Verpackungszelllinien transfiziert. Diese Zelllinien produzieren dann funktionelle Retroviren und geben sie in den Kulturüberstand ab. Dieser retrovirushaltige Kulturüberstand kann dann zum Gentransfer eingesetzt werden.

Herstellung retrovirushaltiger Kulturüberstände

Die Transfektion der Verpackungszelllinien, Selektion von Zelllinien, die einen hochtitrigen Kulturüberstand produzieren, Produktion mehrerer Chargen und Konservierung bei -80°C wurde von der EUFETS AG (Idar-Oberstein) übernommen (III.4.7).

Retroviraler Gentransfer

Einen Tag vor dem Gentransfer wurden die adhärenenten RCC-Zellen auf 6-Loch-Platten (2×10^5 Zellen/ml, 4ml pro Loch) ausgesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Kulturüberstand abgesaugt und pro Loch 4ml retrovirushaltiger Kulturüberstand und $16 \mu\text{g}$ Protaminsulfat zugegeben.

Die Platten wurden 1h bei 1000g zentrifugiert und anschließend normal inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Transfektion mit den gleichen retrovirushaltigen Kulturüberständen wiederholt. Wiederum einen Tag später wurde das Medium abgesaugt und normales Kulturmedium zugegeben. Nach weiteren fünf Tage wurden die transfizierten unklonierten Kulturen erstmals in Analysen (z.B. FACS Analysen) auf ihre Genexpression hin untersucht.

Selektion stabil transfizierter Zellen ohne Antibiotikaresistenz

Ausgewählte Zellklone wurden mit Hilfe von Klonierungsringen isoliert und expandiert. Die Zellen wurden dauerhaft in antibiotikafreiem Medium gehalten und auf ihre Genexpression als Zeichen der erfolgreichen Transfektion untersucht.

Da in den eingesetzten retroviralen Vektoren kein eukaryotischer Selektionsmarker enthalten war, wurden positive Zelllinien auch durch *limiting dilution* Ansätze isoliert. Dabei wurden nach ersten positiven Analysen die unklonierten Kulturen so gesplittet, dass 0,5 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte ausgesät wurden.

Mindestens 24 Klone wurden so insgesamt pro Transfizierung isoliert und auf ihre Genexpression hin analysiert.

1.6. Aufarbeitung von *buffy coat* Präparationen

Buffy coat Präparationen von gesunden Blutspendern wurden von der Blutbank der Uniklinik Mainz zur Verfügung gestellt.

Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC)

Die *buffy coat* Präparation wurde gleichmäßig auf 4 LeucoSepröhrchen verteilt und 25min bei 450g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation enthält die Interphase zwischen Plasma und Ficollschicht die PBMC, Erythrozyten und Granulozyten befinden sich im Sediment und die Thrombozyten befinden sich im oberen Plasmaanteil. Die Interphasen wurden zusammen mit dem Plasma abgenommen und vereinigt. Nach Zentrifugation (10min, 750g) wurde das Plasma abgenommen und das Pellet dreimal mit DPBS gewaschen.

Aufarbeitung von autologem Plasma

Das bei der Isolierung der PBMC abgenommene Plasma wurde zentrifugiert, bis der Überstand klar erschien (>30min, 3300g). Der Überstand wurde abgenommen und für 30min bei 56°C im Wasserbad denaturiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert, bis der Überstand klar erschien (>30min, 3300g). Der Überstand wurde abgenommen und steril filtriert. Das Plasma wurde anschließend direkt eingesetzt oder bei -20°C gelagert (Thurner et al., 1999).

Isolierung nicht-adhärenter PBMC durch Adhärenzreinigung

Durch Anheften an Zellkulturschalen können Monozyten von T- und B-Zellen abgetrennt werden.

Die PBMC eines Spenders wurden in 200ml RPMI Kulturmedium aufgenommen und auf zehn 660cm² Zellkulturschalen verteilt. Die Platten wurden im Brutschrank 90min inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Platten zweimal mit 10ml Medium abgespült. Die nicht-adhärenen Zellen wurden anschließend vereinigt.

Isolierung naiver T-Zellen

Zur Isolierung naiver T-Zellen mussten zunächst Schafserythrozyten vorbereitet werden. Über ihren CD2-Rezeptor können mit ihnen T-Zellen aus den nicht adhärenen PBMC isoliert werden.

Nach vorsichtigem, gutem Resuspendieren wurden zweimal 5ml Schafserythrozyten in ein 15ml Röhrchen überführt, mit DPBS aufgefüllt und für 5min bei 750g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet solange mit DPBS gewaschen, bis der Überstand nicht mehr gelb war. Jedes Pellet wurde in 1,5ml Flüssigkeit mit 1U Neuraminidase aufgenommen und gut gemischt. Es schloß sich eine Inkubation von 60min bei 37°C und 5%CO₂ an. Danach wurden die Zellen pelletiert und dreimal mit DPBS gewaschen. Jedes Erythrozytenpellet wurde anschließend in 25ml RPMI Kulturmedium aufgenommen.

Die nicht-adhärenen PBMC wurden mit RPMI Kulturmedium auf 1x10⁷ Zellen/ml eingestellt. Je 10ml dieser Zellsuspension wurden mit 5ml Schafserythrozytensuspension und 5ml

FCS in einem 50ml Röhrchen gemischt. Bei Raumtemperatur wurden diese Röhrchen für 15min auf den Rollinkubator inkubiert. Nach einer Zentrifugation 10min, 150g wurden die Röhrchen für 60min auf Eis inkubiert. Nach kurzem Anwärmen im Brutschrank wurde das Zellpellet vorsichtig resuspendiert und anschließend langsam mit 10ml Ficoll unterschichtet. Danach wurden die Röhrchen für 20min bei 450g, RT ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich die B-Zellen in der Interphase und die T-Zellen zusammen mit den Schafserythrozyten im Sediment. Die B-Zellen wurden zusammen mit dem Überstand abgesaugt und das Pellet in 5ml ACK-Lösung aufgenommen. Die Suspension wurde auf- und abpipettiert, bis die Farbe dunkler aber durchsichtiger wurde (Erythrozytenlyse). Anschließend wurde mit DPBS aufgefüllt und für 5min, 450g, RT zentrifugiert. Die Parallelansätze wurden vereinigt und zweimal mit DPBS gewaschen. Die T-Zellen im Sediment wurden gezählt und in flüssigem Stickstoff gelagert oder die Zellzahl wurde für die nachfolgenden Versuche in RPMI mit 10% autologem Plasma eingestellt.

1.7. Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen

In gemischten Lymphozyten-Tumorzell-Kulturen (MLTC) werden Tumorzellen und T-Zellen gemeinsam inkubiert und anschließend die T-Zellfunktion analysiert. In dieser Arbeit wurden unstimulierte naive T-Zellen und vorstimulierte T-Zellen in MLTC-Ansätzen zusammen mit fixierten Tumorzellen eingesetzt. Diese Ansätze wurden immer nach den vorgegebenen Schemata (Abb. 31 und 32) durchgeführt.

Vorstimulation von PBMC

Isolierte PBMC (aus IV.1.6.) eines Spenders wurden in 100ml RPMI-Kulturmedium aufgenommen und in 5 Kulturflaschen (182cm²) mit 1µg/ml OKT3 und 250 U/ml IL-2 kultiviert. Nach 2 Tagen wurden je Kulturflasche 20ml RPMI-Kulturmedium mit 500 U/ml IL-2 zugegeben. Nach 5 Tagen Stimulation wurden die Zellen (jetzt >95% T-Zellen) geerntet und die Zellzahl für die nachfolgenden Versuche eingestellt.

Tumorzellvorbereitung

2 Tage vor Beginn der MLTC wurden die Tumorzellen geerntet, gezählt, auf 4×10^5 Zellen/ml in DMEM Kulturmedium eingestellt und auf 96-Loch-Platten, 24-Loch-Platten, 6-Loch-Platten oder 25cm² Kulturflaschen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 15min mit DMEM 1% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und in RPMI ohne Zusätze über Nacht inkubiert.

MLTC-Ansatz

Das Medium wurde von den fixierten Tumorzellen abgesaugt und die T-Zellen (4×10^6 Zellen/ml) ausgesät.

Nach 2 Tagen (vorstimulierte T-Lymphozyten) bzw. 5 Tagen (naive T-Zellen) wurde der MTS-Test bzw. der BrdU-ELISA zur Analyse der T-Zellproliferation durchgeführt. Nach 2 Tagen wurden die Kulturüberstände für ELISA-Analysen der Zytokinsekretion und die Zellpellets für RNA und Proteinanalysen gewonnen.

Zellbestrahlung

Für Untersuchungen die zur Etablierung der SOP „Behandlung und Verabreichung des zellulären B7-Vakzins“ dienten, wurden die Zellen abweichend vom Standard MLTC Ansatz nicht mit Paraformaldehyd fixiert, sondern mit 180Gy im Bestrahlungsgerät der Blutbank Mainz bestrahlt.

1.8. Generierung von professionellen antigenpräsentierenden Zellen

Für verschiedene Expressionsanalysen wurden Makrophagen und dendritische Zellen *in vitro* aus isolierten Monozyten hergestellt.

Generierung von Makrophagen

Die kompletten PBMC einer *buffy coat*-Aufarbeitung wurden nach der Ficollierung dreimal mit DPBS gewaschen. Die Zellen wurden in 3ml DPBS aufgenommen, auf einen 30ml Percollgradienten gegeben und bei 650g, 40min, 20°C, ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befinden sich in der oberen Zellschicht 80-90% Monozyten und in der unteren Zellschicht die verbleibenden PBMC.

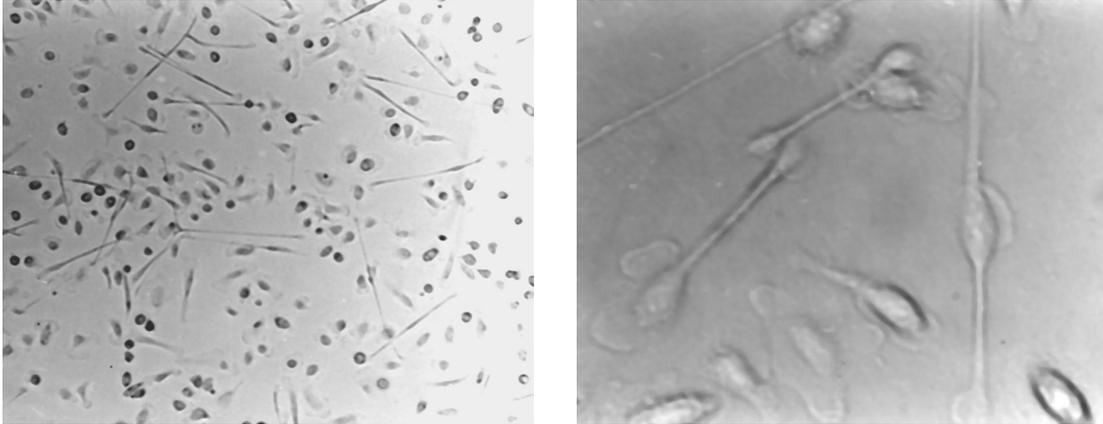
Die Monozyten wurden abgenommen, zweimal mit DPBS gewaschen und in RPMI Kulturmedium mit 10% autologem Plasma und 1000U/ml GM-CSF auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 5 Tage in sterilen Teflonbeuteln mit hydrophober Innenseite (Weber et al., 1992; Kodelja et al., 1998).

Der Vorteil der Zellkultivierung in Teflonbeuteln mit hydrophober Innenseite liegt in einer Verringerung des Kontaminationsrisikos und einer geringen Adhärenz der Zellen (van der Meer et al., 1978). Die Makrophagen ließen sich durch kräftiges Ziehen der Beutel über eine stumpfe Kante von der Teflon-Oberfläche ablösen und ausgießen. Somit konnte die Irritation der Zellen durch mechanische Reizung minimal gehalten werden. Unter dem Mikroskop zeigten die Zellen ihre typischen langen Fortsätze (Abb. 25). Zur Aktivierung wurden ausgereifte Makrophagen für 24h mit 1µg/ml LPS stimuliert.

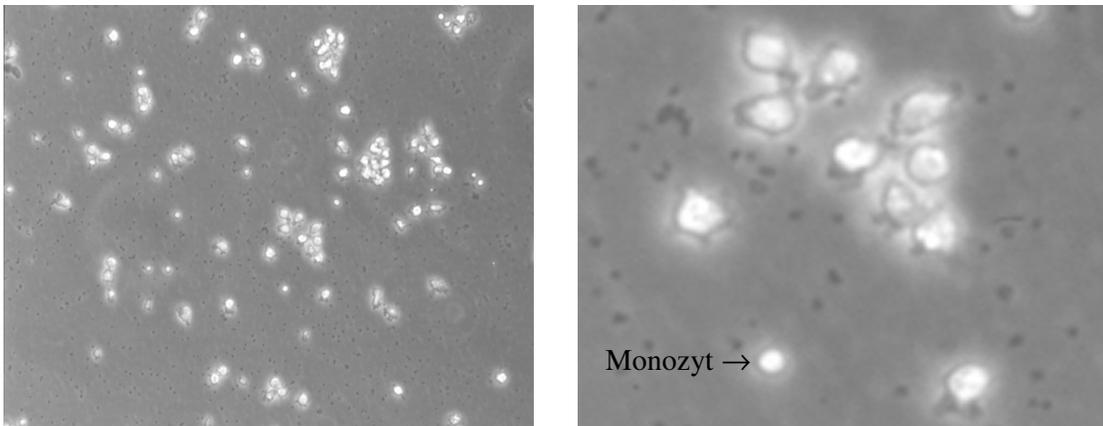
Generierung unreifer und reifer dendritischer Zellen

Adhärente PBMC, vorwiegend Monozyten wurden in einer Konzentration von 8×10^5 Zellen/ml in RPMI mit 10% autologem Plasma mit GM-CSF 1000U/ml und IL-4 1000U/ml in Zellkulturflaschen für 2 Tage inkubiert. Nach 2 und 4 Tagen wurde ein Viertel des Mediums durch frisches Medium mit 4000U/ml GM-CSF und 4000U/ml IL-4 ersetzt. Nach einem Tag bildeten die Zellen erste Cluster oder formten lose Aggregate, die nach 4-6 Tagen in Suspension übergingen. Nach 6 Tagen waren die unreifen dendritischen Zellen ausdifferenziert. Für eine weitere Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen wurden die nicht adhären Zellen in neue Platten überführt und mit 1000U/ml GM-CSF, 1000U/ml IL-4, 1000U/ml IL-6, 1µg/ml PGE₂, 10ng/ml IL-1β und 1000U/ml TNFα für 2 Tage inkubiert (Romani et al., 1996; Jonuleit et al., 1997; Thurner et al., 1999). Die Differenzierungsschritte wurden mikroskopisch (Abb. 25) und durch durchflußzytometrische Analysen von Oberflächenmarkern überwacht.

Makrophagen



unreife dendritische Zellen



reife dendritische Zellen

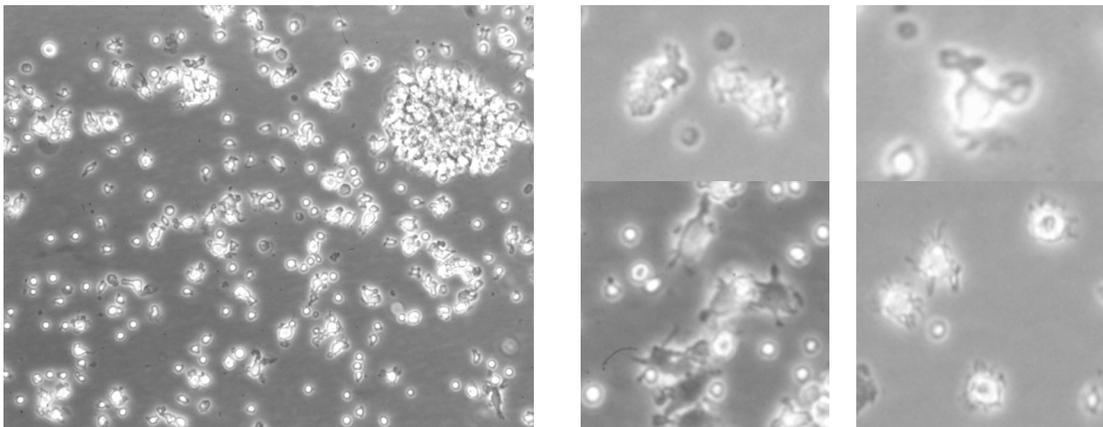


Abb. 25 Mikroskopische Aufnahmen von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen

Makrophagen und dendritischen Zellen wurden durch den Einsatz von Zytokinen aus den Monozyten gesunder Blutspender hergestellt. Nach 5 Tagen in Teflonbeuteln mit GM-CSF (Makrophagen), 5 Tagen mit GM-CSF und IL-4 (unreife dendritische Zellen) bzw. 2 zusätzlichen Tagen mit IL-1 β , IL-6 TNF α und PGE $_2$ (reife dendritische Zellen) in Kulturschalen wurden die Zellen unter dem Mikroskop fotografiert.

In der obersten Zeile sind reife Makrophagen, in der mittleren Zeile unreife dendritische Zellen und in der untersten Zeile reife dendritische Zellen dargestellt. In der linken Spalte sind Übersichtsaufnahmen mit einer Vergrößerung von 100x dargestellt, während die Vergrößerung der Nahaufnahmen der rechten Spalte 400x beträgt. Ein Monozyt ist in seiner typischen Form in der Nahaufnahme der unreifen dendritischen Zellen markiert.

1.9. Proliferationstest mittels BrdU-ELISA

Der BrdU-ELISA ist ein nichtradioaktiver Test, bei dem die Proliferation der Zellen über den Einbau von 5-bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU) in die zelluläre DNA bestimmt wird. Der Test ist vom Prinzip her vergleichbar mit dem radioaktiven Thymidintest, allerdings sensitiver und unproblematischer in der Handhabung (Gratzner, 1982; James, 1994; Tough und Sprent, 1996; Tamarit et al., 2002; Hawker, 2003; Nguyen et al., 2003).

Die Zellen werden nach der Inkubation mit BrdU lysiert und fixiert. Über Antikörperbindung an BrdU und anschließendem TMB Substratumsatz wird die Menge an eingebautem BrdU im ELISA Reader bei 450nm ermittelt.

Nierenkarzinomzelllinien wurden in 96-Loch-Platten in Konzentrationen von 2.000-500.000 Zellen pro Loch kultiviert und für vier Stunden mit der BrdU Färbelösung inkubiert. Die Zellfixierung erfolgte bei 60°C für 60min im Trockenschrank und die Antikörperinkubation erfolgte für 90min bei RT. Alle anderen Schritte des Proliferationstests wurde analog des Herstellerprotokolls durchgeführt.

1.10. Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels MTS-Test

Der MTS-Test ist ein nichtradioaktiver Test, bei dem die metabolische Aktivität von Zellen über die Umsetzung des Tetrazoliumsalses MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] in ein farbiges Formazan colorimetrisch gemessen wird (Berney et al., 2001; Decker et al., 2002). Dies ist eine Weiterentwicklung des MTT-Tests (Mosmann, 1983). Als Elektronenkopplungsreagenz dient hier Phenazine Ethosulfat (PES). Das gebildete Formazan hat ein Absorptionsmaximum bei 490nm, das man im ELISA Reader messen kann. Durch den Vergleich der metabolischen Aktivität von Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten lässt sich die Proliferation der Zellen bestimmen.

Nierenkarzinomzelllinien wurden in 96-Loch-Platten in Konzentrationen von 2.000-500.000 Zellen pro Loch und T-Zellen in der Konzentration von 400.000 Zellen pro Loch eingesetzt. Unter Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ wurden pro well 20µl Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagenz zugegeben und nach 1h bei Nierenkarzinomzelllinien und nach 4h bei T-Zellen die Rotfärbung bei 490nm im Mikrotiterplattenreader bestimmt. Alle anderen Schritte des Proliferationstests wurde analog des Herstellerprotokolls durchgeführt.

1.11. Bestimmung der Zytokinsekretion

Die Zytokinsekretion von GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-10 und TNF α in die Kulturüberstände der MLTC-Ansätze wurde mittels ELISA bestimmt.

ELISA-Platten wurden über Nacht mit einem ersten spezifischen Antikörper inkubiert. Nach Blockade mit DPBS 10% FCS wurden die Platten mit den Kulturüberständen und Standardreihen für 2h inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit einem zweiten spezifischen biotinylierten Antikörper und einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat für 1h. Abschließend wurde der Umsatz von TMB im ELISA Reader bei 450nm bestimmt. Alle Schritte des ELISA wurden analog des Herstellerprotokolls durchgeführt.

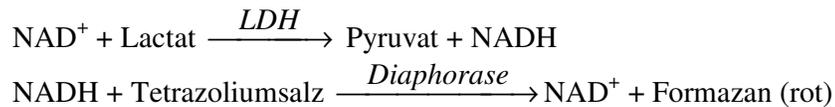
1.12. Zytotoxizitätstest

Um die zytotoxische Aktivität mehrmals restimulierter T-Zellen zu ermitteln, wurden diese T-Zellen auf lebende Nierenkarzinomzellen, analog zu den Standard MLTC-Ansätzen, eingesetzt und die Menge an freigesetztem Lactatdehydrogenase (LDH) mit dem Cytotox96 Assay bestimmt.

Das aktive LDH ist im Zytoplasma von Säugerzellen lokalisiert und tritt nur in geringer Menge in die Zwischenzellflüssigkeit oder das Blut aus. Sterben Zellen ab, tritt das Enzym aus der Zelle aus. Das Verhältnis von Enzymaktivität in der Zelle (Zelllysate) gegenüber der Enzymaktivität außerhalb der Zelle (Kulturüberstände, Blut, Zwischenzellflüssigkeit) offenbart, in welchem Zustand sich die untersuchten Zellen befinden (typischer Herzinfarkttest in der klinischen Diagnostik). Eine hohe LDH-Aktivität im Kulturüberstand im Vergleich zum Zelly-

sat zeigt, dass Zellen abgestorben sind. Je höher dieser Wert ist, umso höher ist der Anteil abgestorbener Zellen in der untersuchten Probe (Schnyder und Baggiolini, 1978; Taff und Sitkovsky, 1994; Singer et al., 1999; Hawryluk und Hirshfield, 2002).

Reaktionen:



50µl der Kulturüberstände und verschiedener Kontrollen wurden in 96-Loch-Platten überführt und für 30min mit dem Cytotox96 Substratmix inkubiert. Anschließend wurde die Menge an gebildetem Formazan bei 490nm im Mikrotiterplattenreader bestimmt. Alle anderen Schritte des Zytotoxizitätstests wurden analog des Herstellerprotokolls durchgeführt.

1.13. Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine immunologische Methode zur Analyse von membranständigen und intrazellulären Proteinen. Das Prinzip beruht auf der Identifizierung und Quantifizierung von Zellen oder Zellstrukturen durch Bindung markierter Antikörper an definierte Zielantigene.

Die markierten Zellen werden mit Hilfe eines Vakuums angesaugt und durch eine Trägerflüssigkeit so stark beschleunigt, dass vorhandene Aggregate aufgetrennt und die Zellen perlen-schnurartig aneinander gereiht werden. Die Fluoreszenz wird durch einen Argon-Ionen-Laser angeregt und in zwei Richtungen gemessen. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (FSC) das Maß für die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (SSC) das Maß für die Granulierung der Zelle. Mit Hilfe der spezifischen Fluoreszenz des gewählten Farbstoffes kann die Expressionsstärke des markierten Proteins bestimmt werden.

Nachweis membranständiger Proteine

5×10^5 Zellen wurden zweimal mit DPBS gewaschen und zu ca. 100µl Restvolumen nach dem zweiten Waschschritt wurden direkt markierte oder unmarkierte Erst-Antikörper bzw. Isotyp-Kontrollen zugefügt. Die Inkubation erfolgte auf Eis für 30min. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurde, falls notwendig, der zweite markierte Antikörper zupipettiert und wieder 30min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurden die Zellen in 1ml DPBS aufgenommen und im Durchflußzytometer analysiert.

Nachweis intrazellulärer Proteine

Zum Nachweis intrazellulärer Proteine wurden die Zellen vor der Behandlung mit Antikörpern fixiert und permeabilisiert. Hierzu wurde der IntraPrep Kit analog des Herstellerprotokolls benutzt. Alle weiteren Schritte wurden analog des Nachweises membranständiger Proteine durchgeführt.

Ermittlung der B7 Zelloberflächenmoleküle

Zur quantitativen Bestimmung der Zelloberflächenexpression, ermittelt man zunächst die Antikörperbindekapazität der eingesetzten Antikörper mit IgG bindenden Mikrobeads. Setzt man diese beladenen Beads parallel zu Versuchen mit Zellen, deren Expression man quantifizieren möchte, in durchflußzytometrischen Untersuchungen ein, so kann man die Zahl an Zelloberflächenmolekülen bestimmen (Labus und Petersen 1992).

In dieser Arbeit wurde die Zahl der B7-Oberflächenmoleküle auf den MZ1257RC Transfektanden bestimmt. Hierzu wurden die CD80FITC und CD86PE Antikörper zur Analyse der Zellen und zur Beladung der Mikrobeads eingesetzt. Der Quantum Microbead Kit wurde dabei analog des Herstellerprotokolls eingesetzt.

2. Molekularbiologie

2.1. Vermehrung und Isolierung rekombinanter DNA

Zur Vermehrung wird cDNA in Plasmid-Klonierungs-Vektoren eingebunden. Diese Plasmide besitzen i.d.R. ein Replikon eines selektionierbaren Markergens. Dabei handelt es sich meist um eine Antibiotika-Resistenz. Ein sehr häufig verwendetes Antibiotika-Resistenzgen kodiert für Ampicillin-Resistenz (Amp^R).

2.1.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen (Hanahan, 1983)

Durch eine Calciumchlorid-Behandlung wird die Zellwand von *E.coli* durchlässiger und das Bakterium ist in der Lage, Plasmid-DNA aufzunehmen (Transformation).

Mit Hilfe dieser Methode wird eine hohe Transformationseffizienz erzielt. Im Falle des Bakterienstammes DH5 α wird eine Transfektionseffizienz von $5-8 \times 10^7$ colony forming units/ μ g Plasmid-DNA erreicht.

Eine Einzelkolonie des *E.coli*-Stammes DH5 α wurde in 2ml YT++-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225U/min geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 50 μ l dieser Bakterienkultur in 5ml YT++-Medium überführt und weitere 3,5h bei 37°C und 225 U/min inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz komplett in 100ml vorgewärmtes YT++-Medium überführt und inkubiert bis eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,45-0,55 erreicht wurde. Die Kultur wurde auf zwei sterile 50ml Röhren verteilt und nach kurzer Abkühlung auf Eis 8min bei 4°C und 3300g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die sedimentierten Bakterien in 10ml TFBI-Puffer resuspendiert und 10min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (8min, 4°C, 3300g) wurden die sedimentierten Bakterien in 2ml TFBII-Puffer resuspendiert und in einem Ethanol/Trockeneisbad in vorgekühlten Reaktionsgefäßen in 200 μ l Aliquots eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

2.1.2. Transformation

Ein Aliquot der Transformationskompetenten Zellen wurde mit 10-100ng Ligations-DNA bzw. cDNA 30min auf Eis inkubiert, anschließend 1min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und wieder auf Eis gestellt. Die Zellen regenerierten in SOC-Medium 1h bei 37°C. Der Hitzeschock bewirkte eine Veränderung der Zellmembran. Die rekonstituierten Zellen wurden unterschiedlich hoch konzentriert auf mehreren LB_{Amp}-Agar-Platten ausplattiert und bei 37°C inkubiert bis Einzelkolonien entstanden. Nichttransformierte Zellen von *E. coli* DH5 α besitzen keine Ampicillin-Resistenz, weshalb sie unter diesen selektiven Bedingungen nicht anwachsen können.

2.1.3. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Das Prinzip der Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli* beruht darauf, dass die DNA durch NaOH denaturiert wird. Die Einzelstränge der linearen chromosomalen DNA lösen sich voneinander, während die Plasmid-DNA zusammenbleibt. Beim Renaturieren durch Zugabe einer sauren Salzlösung bildet die chromosomale DNA ein unlösliches Netzwerk und kann einschließlich der präzipitierten Proteine abzentrifugiert werden, während die Plasmid-DNA bei der Zentrifugation in Lösung bleibt.

Mini-Plasmid-DNA-Präparation nach (Seed, 1983)

Eine Einzelkolonie von LB_{Amp}-Agar-Platten wurde in 5ml LB_{Amp}-Medium überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 2 \times 1,5ml in einem Eppendorfreaktionsgefäß abzentrifugiert (13000U/min, RT, 1min, Tischzentrifuge) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 200 μ l Puffer P1 resuspendiert, 200 μ l Puffer P2 wurden zugegeben, dreimal invertiert und maximal 5min bei RT inkubiert.

Als nächstes wurden 200µl Puffer P3 hinzugefügt und nach dreimaligem Invertieren wurde 10min zentrifugiert (13000U/min, RT, Tischzentrifuge) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 0,7Vol Isopropanol (-20°C) ausgefällt und direkt pelletiert (13000U/min, RT, 30min, Tischzentrifuge). Danach wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, bei 65°C für 5min getrocknet und abschließend in 50µl TE-Puffer resuspendiert.

Mini-Plasmid-DNA-Präparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit

Alternativ wurde die Plasmid-DNA mit der Mini-Plasmid-DNA-Präparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA unter hoher Salzkonzentration an eine Silica-Membran gebunden. Durch mehrere Waschschriffe wird die DNA gereinigt und anschließend mit geringer Salzkonzentration (z.B. Millipore H₂O) von der Säule eluiert. Mit Hilfe dieser Aufreinigung wird sehr saubere DNA, die unter anderem zum Sequenzieren eingesetzt werden kann, in kurzer Zeit gewonnen.

Midi- und Maxi Plasmid-DNA-Präparation (Qiagen)

Mit diesen Methoden können größere Mengen Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad isoliert werden.

Durch alkalische Lyse werden die Bakterien aufgeschlossen. Bei niedrigen Salzkonzentrationen bindet die DNA an eine Anionenaustauschsäule und nach mehreren Waschschriffen mit mittlerer Salzkonzentration wurde die DNA mit hohen Salzkonzentrationen von der Säule eluiert. Die Fällung der DNA aus dem salzreichen Eluat erfolgte mit 0,7Vol Isopropanol (-20°C). Die Präparation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2. Spektralphotometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Eine schnelle und einfache Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde über Absorptionsspektroskopie im UV-Bereich durchgeführt. Dabei wird die Absorption der Probe im monochromatischen Licht der geeigneten Wellenlänge abzüglich der Absorption des Lösungsmittels erfaßt. Die erhaltenen Absorptionswerte können einer bestimmten Nukleinsäurekonzentration zugeordnet werden (Bertram und Gassen, 1998; Sambrook und Russell, 2001). Man bestimmt die Absorption der Nukleinsäurelösung bei den Wellenlängen $\lambda=260\text{nm}$ (Nukleinsäuren) und $\lambda=280\text{nm}$ (Proteine) zum Erfassen von Proteinverunreinigungen. Der Quotient der Absorptionen 260nm/280nm wird als Reinheitskriterium verwendet. Der errechnete Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um eine ausreichend reine Probenqualität zu gewährleisten.

Nach der folgenden Formel wurde die Konzentration von Nukleinsäuren in der Lösung ermittelt (Sambrook und Russell, 2001):

$$A_{260\text{ nm}} \times V \times \text{OD} = \mu\text{g/ml Nukleinsäure}$$

$A_{260\text{ nm}}$: Absorption der Lösung bei $\lambda = 260\text{nm}$

V: Verdünnungsfaktor der spektralphotometrisch gemessenen Nukleinsäurelösung

OD: Optische Dichte

Die OD für Nukleinsäuren bei 260nm ist bekannt. Sie beträgt:

1OD = 50µg/ml doppelsträngige DNA

1OD = 40µg/ml einzelsträngige DNA bzw. RNA

1OD = 20µg/ml Oligonukleotid

2.3. Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Eine enzymatische Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen ermöglicht die Charakterisierung von Plasmiden und die Darstellung von DNA-Fragmenten. Diese Enzyme erkennen kurze palindrome Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren und spalten die DNA entweder in diesem Bereich oder kurz daneben hydrolytisch. Es entstehen dabei je nach verwendeter Restriktionsendonuklease stumpfe Enden sogenannte *blunt ends* oder überhängende "klebrige" Enden *sticky ends*. Die für jedes Enzym spezifischen optimalen Hydrolysebedingungen (Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke) wurden nach Angaben des Herstellers eingestellt. Es gilt als Faustregel: Ein Unit Enzym spaltet in einer Stunde ein μg DNA. Eine Überdosierung des Enzyms ist zu vermeiden, da dies zu unspezifischen Reaktionen führen kann.

2.4. Native Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die native Agarose Gelelektrophorese ist eine einfache und dennoch höchst effiziente Methode zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von 0,5 bis 25kb DNA-Molekülen. Die DNA wird je nach zu trennender Größe in 0,2–2%igen (w/v) Agarose-Gelen in TAE-Puffer aufgetrennt (Sambrook und Russell, 2001). Unter den Bedingungen der Elektrophorese sind die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren ionisiert, so dass diese Polyanionen im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt sowohl von der Molekülgröße bzw. der Kettenlänge als auch von der Konformation (linear, nicked-circular, superhelical) des Moleküls ab. Eine Bestimmung der Größe der Fragmente ist bei Mitführen eines geeigneten Größenstandards möglich. Die DNA-Proben wurden in Nukleinsäure-Farbmarker aufgenommen. Die zugesetzten Farbstoffe ermöglichten ein Verfolgen des Verlaufs der Elektrophorese (Bertram und Gassen, 1998; Sambrook und Russell, 2001). Die Dokumentation erfolgte durch in die Doppelhelix der DNA interkalierendes Ethidiumbromid. Dieses wurde mit einer UV-Kontaktlampe (254nm) angeregt und mit einer Polaroidkamera dokumentiert.

Die Agarose gewünschter Konzentration wurde in die Gelkammer gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Beladungspuffer versetzt, 5min bei 65°C denaturiert und in die Taschen überführt. Die Elektrophorese wurde in Flachbettgelkammern bei einer Spannung von 60-120V und einer Stromstärke von maximal 400mA durchgeführt.

2.5. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach einer hydrolytischen Spaltung und anschließender Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarose-Gel, wodurch auch eine Trennung von noch vorhandenen Proteinen erfolgt, kann ein bestimmtes Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und aus dem Agarose-Gel eluiert werden.

Das gewünschte Fragment wurde zur Schonung der DNA unter UV-Licht einer längeren Wellenlänge (302nm) ausgeschnitten. Die Elution aus dem Agarose-Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit-Protokoll. Diesem Protokoll liegt folgendes Prinzip zugrunde: Die Gelmatrix wird durch eine Natriumiodat/Natriumchlorat-Lösung aufgelöst. Die DNA in der Lösung bindet unter hohen Salzkonzentrationen an Silica-Gel-Partikel. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNA unter niedriger Salzkonzentrationen entweder mit Millipore H₂O Aqua bidest. oder mit einem im Kit enthaltenen Puffer eluiert.

Bei Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit erfolgt die Aufreinigung über eine Säule, in der sich Silica-Gel-Partikel befinden, wodurch eine höhere Reinheit der DNA erzielt werden kann. Die Protokolle wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6. Ligation

Bei einer Ligation wird ein gewünschtes DNA-Fragment mit Hilfe einer Ligase in einen linearisierten Vektor inseriert, der dann zur Transformation verwendet wird. Der Vektor besitzt ein Antibiotikaresistenzgen, damit Klone isoliert werden können, die den Vektor aufgenommen haben.

Für die Ligationen wurden linearisierter Vektor und Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:16 an freien Enden zusammengegeben (Sambrook und Russell, 2001). Die ligierbaren Enden wurden durch geeignete Restriktionsspaltungen erzeugt. Die Reaktion erfolgte über Nacht mit der T4 DNA-Ligase bei 14°C in einem Reaktionsansatz von 20 µl.

2.7. Sequenzierung von DNA Molekülen

Um die erfolgreiche Herstellung der gewünschten DNA Moleküle zu überprüfen wurden die DNA Moleküle vor ihrem Einsatz sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GENterprise (Mainz) mit dem ThermoSequenase Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Die Elektrophorese und Fragmentdetektion erfolgte mit dem automatischen Sequenziergerät ABI 373A (Applied Biosystems, Weiterstadt). Nach der Sequenzierung wurden die Nukleotidsequenzen mittels der Programme SeqED (Applied Biosystems, Weiterstadt) und Sequencer (Gene Codes, Michigan, USA) analysiert.

2.8. RNA-Präparation aus eukaryotischen Zellen

Die Durchführung der RNA-Präparation mit dem RNeasy Mini Protocol (Qiagen) diente der Gewinnung von Gesamt-RNA aus Zellen und erfolgte nach Herstellerangaben.

Maximal 1×10^7 Zellen wurden in einem Guanidiniumisothiocyanat (GITC)-haltigen Puffer lysoziert und homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol, um geeignete Bindungskonditionen zu erhalten wurde die Lösung auf eine „RNeasy Silica“ Membran gegeben, wo die RNA unter hohen Salzbedingungen bindet. Nach mehreren Waschschrritten wurde die RNA mit Millipore H₂O eluiert.

2.9. Reverse Transkription und PCR

2.9.1. PCR von cDNA

Zur Vermehrung verschiedener DNA Moleküle wurden ca. 50ng cDNA in *Taq*-Polymerase-Puffer unter Zusatz von 0,2mM dNTP's, 40pmol der jeweiligen Primer und 1,5IU der *Taq*-Polymerase eingesetzt. Nach einer zweiminütigen Denaturierung der cDNA bei 95°C wurde in Abhängigkeit des nachzuweisenden Gens folgender Zyklus unterschiedlich oft (siehe III.5.4.) durchlaufen:

95°C 1min (Denaturierung der DNA)

xx°C 1min (Annealingtemperatur der Primer siehe III.5.4.)

72 °C 1min (DNA-Synthese)

Die Produkte wurden auf Agarose-Gelen aufgetrennt und analysiert.

2.9.2. Titan™ One Tube RT-PCR-System

RNA kann durch retrovirale Reverse Transkriptasen in cDNA umgeschrieben werden. Als Zufallsprimer dient ein Gemisch aus Hexanukleotiden, die an die RNA binden und als Startermoleküle für die Transkriptasen fungieren (Sarngadharan et al., 1972).

Bei dieser Methode werden die cDNA-Synthese und die PCR mit einem optimierten Puffer und entsprechenden Enzymen zwar nacheinander durchgeführt, jedoch ohne erneute Zugabe von Reagenzien. Das Ein-Schritt-Protokoll verwendet AMV (Aviärer Myoblasto Virus) Reverse Transkriptase für die cDNA Erststrang Synthese und einen Enzym-Mix aus *Taq* DNA-Polymerase und *Pwo*-DNA-Polymerase für die anschließende PCR. Das Titan RT-PCR-System hat folgende Vorteile:

Es reduziert die Fehlerrate in der PCR aufgrund der Korrekturlese-Eigenschaft der *Pwo*-DNA-Polymerase und die hohe Effizienz der Enzyme verbessert die Sensitivität des RNA-Nachweises.

Die Titan RT-PCR wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt, wobei für jeden Ansatz 200ng Gesamt-RNA eingesetzt wurden. Die Annealingtemperaturen für verschiedene Ansätze sind in III.5.4. aufgelistet.

2.10. Protein-Präparation aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen wurden diese in einem Mix aus Protease-Inhibitoren kurz inkubiert und anschließend in einem denaturierenden und lysierenden Puffer aufgenommen.

Etwa 2×10^7 Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen, kurz mit 1 ml Protease-Inhibitoren-Mix inkubiert, adhärente Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber von der Zellkulturflasche gelöst und in einer Tischkühlzentrifuge bei 4°C und 13.000U/min für 2min sedimentiert. Die sedimentierten Proteine wurden in 200µl 1x SDS-Puffer resuspendiert und 5min bei 95°C denaturiert. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -20°C.

2.11. Protein-Konzentrationsbestimmung

Mit Hilfe des Protein Assay ESL Kits kann die Proteinkonzentration in Lösungen spektrophotometrisch bestimmt werden. Diese Methode ist eine optimierte Weiterentwicklung der Vorschrift von Matsushita et al., (1993) und basiert auf einer Biuret-ähnlichen Reaktion, wobei Cu^{2+} zunächst mit Protein im alkalischen Medium komplexiert wird. Jedoch wird der Proteingehalt durch Messung der Extinktion eines Cu^+ -Bathocuproin-Komplex gemessen, der sich aus überschüssigem Cu^{2+} bildet, welches nicht durch das Protein komplexiert wurde. Das überschüssige Cu^{2+} wird mit Hilfe von Ascorbinsäure zu einwertigem Cu^+ reduziert und kann dann den farbigen Komplex mit Bathocuproin bilden. Die Meßgröße ist im Gegensatz zu anderen gebräuchlichen Protein-Tests negativ proportional zur Anzahl der Peptidbindungen. Daher ist die Protein-zu-Protein-Abweichung dieses Kits sehr gering.

Zunächst wurden die Proteinproben zusammen mit einer Standardreihe in einer alkalischen Kupfertatrat-Lösung für mindestens 5min inkubiert. Anschließend wurde eine zweite Lösung die u.a. Bathocuproindinsulfonsäure enthielt zugegeben und nach exakt 30sec die Extinktion bei 485nm bestimmt. Durch das Mitführen einer Standardreihe konnte die Proteinkonzentration in der Probe mit Hilfe einer Kalibrierkurve bestimmt und für nachfolgende Versuche eingestellt werden.

2.12. Proteinaufreinigung mittels Protein A

Zur Aufreinigung von murinen Antikörpern oder Fusionsproteinen mit murinen Immunglobulinomänen wurden Zellkulturüberstände und gesättigte Ammoniumsulfatlösung bei Raumtemperatur zu gleichen Teilen gemischt und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert. Die ausgefallenen Proteine wurden für 30min bei 3300g zentrifugiert und das Zellpellet in DPBS aufgenommen. Diese Lösung wurde auf Protein A Säulen (HiTrap, Amersham Pharmacia Biosciene, Freiburg) gegeben. Die Säulen wurden dreimal mit PBS gewaschen und gebundene Proteine mit Zitratphosphatpuffer pH 3.0 eluiert. Nach der Elution wurde sofort mit DPBS verdünnt, um die Lösung möglichst schnell zu neutralisieren. Nach erneuter Fällung mit Ammoniumsulfat standen die Proteine anschließend zum Einsatz in der Zellkultur zur Verfügung.

2.13. Glycosidase F Behandlung

Zur Deglycosylierung von Proteinen wurden diese mit Glycosidase F behandelt. Die in 1xSDS Puffer gelösten Proteine wurden mit 2U Glycosidase F pro 10µg Protein für 30min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in Western Blot Analysen untersucht.

2.14. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE (Laemmli, 1970) werden die denaturierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Konzentration des Polyacrylamid-Gels ist variierbar und wird abhängig vom Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins gewählt. Das Molekulargewicht der einzelnen aufgetrennten Proteine kann mit Hilfe eines Proteingrößenmarkers, der definierte Proteine enthält, bestimmt werden. Das SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine (ca. ein gebundenes SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren), wodurch eine stark negative Ladung in die denaturierten Proteine eingeführt wird, was ihre eigene Ladung überdeckt. Dadurch wandern die Proteine im elektrischen Feld zur Anode.

Es wurden Minigele der Größe 10cm x 10cm verwendet und pro Gelspur 20-50µg Protein in 15µl 1xSDS-Puffer denaturiert und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mit 10mA pro Gel im Sammelgel und mit 20mA im Trenngel bei V_{max} . Als Marker diente ein vorgefärbter Rainbowmarker.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden durch Transfer auf eine Nitrozellulosemembran immobilisiert und für Antikörper gut zugänglich gemacht. Die Proteine werden durch spezifische Antikörper immunologisch nachgewiesen.

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde über Nacht in einer Tank-Blot-Kammer mit Western Blot Transferpuffer bei 100mA (V_{max}) bei RT durchgeführt.

Die Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran nach Proteintransfer erfolgte durch Inkubation für zwei Stunden mit 10% Pferdeserum und 2% Trockenmilchpulver in TBS-T unter leichtem Schwenken. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (s. AK-Liste in III.4.5.) für mindestens zwei Stunden unter leichtem Schwenken. Vor Zugabe des Zweitantikörpers (s. III.4.5.) wurde dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation und das anschließende Waschen entsprachen der Behandlung bei der Erstantikörper-Inkubation. Der Zweitantikörper war konjugiert an Meerrettich-Peroxidase. Die Membran wurde im Anschluß an die Inkubation mit dem Zweitantikörper in einer Lösung, bestehend aus einer 1:1-Mischung aus Detergenz 1 und Detergenz 2 (ECL-Detection Reagents) für 1min inkubiert. Bei der dann ablaufenden Reaktion wurde Licht emittiert, dass mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert wurde.

2.15. Proteomanalyse

Probenvorbereitung

Die T-Zellen wurden nach Ende der MLTC Ansätze dreimal mit DPBS gewaschen und als Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Jedes Zellpellet wurde direkt nach Entnahme aus dem -80°C Gefrierschrank in 300µl Rabiloud-Lysepuffer aufgenommen und durch mehrfaches Pipettieren bzw. Vortexen gut resuspendiert. Anschließend wurde das Lysat mit dem Ultraschallstab beschallt (dreimal 15sec) und 90min bei 13000U/min, 15°C , Tischzentrifuge zentrifugiert. Das klare Lysat wurde anschließend in ein frisches, steriles Eppendorf-GefäßCup überführt. Ein Aliquot des klaren Überstandes wurde zur Proteinbestimmung eingesetzt.

Aufreinigung phosphorylierter Proteine

Mit dem PhosphoProtein Purification Kit mit Probenkonzentrierung können phosphorylierte Proteine von nichtphosphorylierten getrennt werden. Die Phosphoproteine binden an die Aufreinigungssäulen, während die restlichen Proteine durch die Säulen durchlaufen.

Durch die anschließende Probenkonzentrierung und Entsalzung beider Proteinfraktionen, sollen die getrennten Proteine für den Einsatz in der 2D-Analyse vorbereitet werden.

Der Kit wurde nach Herstellerangaben zur Auftrennung von Proteinproben in phosphorylierte und nichtphosphorylierte Proteine eingesetzt. Nach der Aufreinigung wurden die Proteinfrak-

tionen mit Nanosep Ultrafiltration Columns (phosphorylierte Proteine) und Centricon Plus-20 Centrifugal Filter Devices nach Herstellerprotokollen in Rabilloud-Puffer aufkonzentriert.

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit dem 2D Quant Kit der bestimmt. Mit diesem Kit ist eine Proteinbestimmung in Rabilloud-Puffer möglich, da störende Chemikalien (vor allem DTT) entfernt werden.

Die Proteinproben wurden so eingestellt, dass die gewünschte Proteinmenge in einem Volumen von 340µl vorlag. Nach dieser Aliquotierung konnten die Proben bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

Auftrennung isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Zunächst wurden die Streifenhalter mit je 340µl Probe beladen und anschließend die Fokussierungstreifen (Immobiline Dry Strips pH 3-10) eingebracht. Waren alle Halter derart beladen, wurden sie auf die Elektrodenplatte der IPGphor-Einheit gestellt und die Plastikdeckel der Streifenhalter aufgebracht.

Danach wurde die Schutzhaube der IPGphor-Einheit geschlossen und das Rehydrierungs- und IEF-Protokoll gestartet:

Rehydrierungs- und IEF-Programm

Parameter

Rehydration	2h	0V step and hold	Pause
STEP1	10h	30V step and hold	
STEP2	1h	500V step and hold	
STEP3	1h	1000V step and hold	
STEP4	1h	5000V step and hold	
STEP5	4h	8000V step and hold	

Gesamtlaufzeit: 19 Stunden, Gesamtvoltstundenzahl (Vhrs) ca. 34-36.000Vhrs.

In der Programmpause nach 2h wurden die inzwischen aufgequollenen Fokussierungstreifen mit 350µl DryStrip Cover Fluid überschichtet und die eigentliche Fokussierung gestartet.

Nach Ablauf der Fokussierung wurden die Streifen entweder sofort für die weitere Auftrennung in der 2. Dimension eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Auftrennung SDS-PAGE (2. Dimension)

Herstellung der Polyacrylamidgele

Das Gießen der Polyacrylamidgele erfolgte mit Hilfe des DALT Gel Gießstandes. Beim Gießen war darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstehen und dass der Füllstand nicht zu hoch gewählt wurde, da zumindest noch 100ml 50%ige Glycerinlösung zum Verdrängen der Acrylamidlösung aus dem Füllschlauch nachgefüllt werden mussten. Die Verdrängungslösung wurde dazu genutzt, den Füllstand des Gelgießstandes auf noch ca. 1-1,5cm freie Füllhöhe bis zur Gelkassettenoberkante zu bringen. Schließlich wurde durch vorsichtiges Aufbringen des Tris-gesättigten Butanols (2-3ml Gelkassette) die Ausbildung einer planen Geloberfläche sowie der Abschluß zur Luftschicht erzielt. Um eine vollständige Polymerisierung der Gele zu gewährleisten, erfolgte die Polymerisation über Nacht.

Gellauf

Zunächst wurde die 2D-Elektrophoresekammer mit 20000ml frisch angesetztem 1xSDS-PAGE-Laufpuffer beschickt. Zudem wurde das Kühlwasserbad eingeschaltet.

Vor Auftrennung der Proben in der 2. Dimension wurden die Fokussierungstreifen umgepuffert, um die Proteine mit SDS zu beladen.

Die Äquilibration der Streifen erfolgte dabei in 2 Schritten. Zunächst wurden die fokussierten IPG-Streifen in separaten Glasröhrchen unter ständigem Schütteln für 15min in 12ml Äquilibrationpuffer 1 inkubiert. Dabei wurden in Gegenwart von DTT die fokussierten Proteine vollständig reduziert. Parallel dazu wurden die Proteine bereits mit SDS beladen, denaturiert und erhielten dabei eine negative Oberflächenladung. Zudem wurde dadurch der im Lysepuffer enthaltene Thioharnstoff, der das Auswandern der Proteine aus dem Fokussierungsstreifen stark behindern würde, ausgewaschen. Im zweiten sich direkt anschließenden Schritt wurden die Streifen erneut unter ständigem Schütteln für 15min in 12ml Äquilibrationpuffer 2 inkubiert. Dabei erfolgte durch die Umsetzung mit Jodacetamid eine Blockierung der reduzierten, freien SH-Gruppen, was die Ausbildung von unerwünschten Thiolbrücken endgültig verhinderte. Auch diese Inkubation erfolgte in Gegenwart von SDS, das damit zur weiteren Beladung der Proteine genutzt werden konnte. Der Äquilibrationpuffer 2 wurde anschließend zur Entfernung von freiem Jodacetamid in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer ausgewaschen. Die Streifen konnten dann bis zum Auftrag auf das SDS-PAGE-Gel für kurze Zeit in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer zwischengelagert werden.

Zur Beladung von Gelen mit äquilibrierten Fokussierungsstreifen wurden die Gele seriell zunächst mit Ladepuffer mit Low-Melting-Agarose überschichtet und die Streifen nacheinander vorsichtig auf die Geloberkante aufgebracht. Ein direkter Kontakt zwischen Fokussierungsstreifen und Geloberkante verhinderte das spätere Auftreten von falschen Doppelspots bzw. störender Luftblasen.

Vor dem Erstarren der Agarose wurde pro Gel ein Streifen Whatmanpapier mit 15 μ l mit Proteinmolekulargewichtsstandard mitaufgetragen. Die mit Marker getränkten Papierstreifen wurden dann auf der sauren Seite des Fokussierungsstreifens in die Agarose eingebettet.

Um den Austritt der Proteine aus den Streifen zu erleichtern, wurde die Trennung initial mit geringer Voltzahl durchgeführt (1h mit 50V), danach wurde die Spannung derart eingestellt, dass die Gele über Nacht aufgetrennt wurden (80-100V). Die Trennung wurde abgebrochen, sobald die Lauffront das Ende der Gelkassette erreicht hatte.

Gelfärbung

Die Silberfärbung von Proteinen (Heukeshoven und Dernick, 1988) ist eine sensitive Methode und eignet sich zur Färbung von größeren Gel-Serien analytischer Gele. Die Färbung der Gele erfolgte in Glasschalen, wobei das Absaugen der Reagenzien mit Hilfe einer Vakuumpumpe unter Verwendung einer Saugflasche erfolgte. Die Fixierung erfolgte für mindestens 60min mit Fixierer, bei größeren Versuchsansätzen erfolgte dieser Inkubationsschritt auch über Nacht. Bei diesem Vorgang schrumpften die Gele stark ein, während der nachfolgenden Schritte nahmen sie aber ihre Ausgangsgröße wieder ein. Nach der Fixierung wurde zunächst zweimal für 20min mit der Ethanollösung und anschließend dreimal für 20sec mit Millipore-H₂O gewaschen.

Daran schloß sich das Sensitivieren für mindestens 1min in der Sensitivierungslösung an. Durch diesen Schritt wurde die unspezifische Hintergrundfärbung stark reduziert. Auch nach diesem Schritt wurde dreimal für 20sec mit Millipore-H₂O gewaschen.

Die Gele wurden mit der Silbernitratlösung für 20min bei 4°C im Kühlraum unter regelmäßigem, vorsichtigem Schwenken der Färbewannen gefärbt. Durch Vorkühlen der Färbelösung auf 4°C und waschen vor und nach der Färbung mit gekühltem Millipore-H₂O konnte eine weitere Reduzierung der Hintergrundfärbung erreicht werden. Auch nach diesem Schritt wurde dreimal für 20sec mit Millipore-H₂O gewaschen.

Die Entwicklung der gefärbten Gele erfolgte für 1-15min in der Entwicklerlösung. Je nach Färbegrad, der stark von der Proteinbeladung abhing, wurde die Entwicklung durch kurzes Waschen mit Millipore-H₂O und abstoppen mit der Stopplösung für mindestens 15min beendet. Ein frühzeitiges Abstoppen brachte hier die besten Ergebnisse, weil die Entwicklungsreaktion auch in der Stopplösung noch einige Zeit anhält. Ein abschließendes ausführliches

Waschen mit Millipore-H₂O für mindestens dreimal 10min beendete den Färbeporgang. Anschließend wurden die Gele in Overhead-Präsentationsfolien eingeschweißt und bis zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert.

Gelanalyse

Zur Auswertung der aufgetrennten Proteinspots wurden die eingeschweißten Gele mit einer Auflösung von 300dpi in Originalgröße farbig (Millionen von Farben) eingescannt und unter ihrem Namen mit Gelnummer als TIFF-file abgelegt. Zur weiteren Spotanalyse mit dem Programm Proteomweaver wurde die Farbinformation auf Graustufen reduziert und die Gele gleicher Versuchsserien gemeinsam in die Software eingeladen. Die Software detektierte zunächst alle erkennbaren Proteinspots und verglich als erstes die Spotmuster der Gele einer Versuchsreihe und anschließend verschiedene Versuchsreihen (z.B. mit und ohne B7) miteinander. Dadurch ließen sich interessante und zwischen den verschiedenen Versuchsreihen unterschiedliche Spots im Regelfall auf eine Zahl von 1.000-5.000 Spots pro Versuch reduzieren. Um entgeltige Aussagen treffen zu können, war es notwendig, jeden einzelnen Proteinspot zu betrachten und vor allem die richtige Zuordnung zu überprüfen. Das Programm war nicht in der Lage, Proteine, die durch verschiedene Modifikationen wie z.B. Glykosilierungen oder Phosphorylierungen, in ihrer Lage auf den Proteingelen verschoben waren, richtig zuzordnen. Verschiedene interessante Spots wurden herausgenommen und in Powerpointpräsentationen so markiert, dass sie einer nachfolgenden Proteinidentifikation zugeführt werden konnten.

Proteinidentifikation mit MALDI TOF

Zur Identifikation von Proteinen wurden silbergefärbte Gele, gemeinsam mit der Spotdokumentation in Powerpointpräsentationen und dem Proteomweaverdatensatz, an das MPI für Biochemie in Martinsried übersandt. Die Arbeitsgruppe um Prof. Lottspeich übernahm die Identifikation der Proteinspots.

Die Spots wurden mit einem automatischen Spotpicker aus den Gelen ausgeschnitten und anschließend mit der Endoproteinase Lys-C verdaut. Die dadurch entstandenen Peptide wurden in einer MALDI-MS-Analyse aufgetrennt (*peptide mass fingerprint*). Die Größen der gefundenen Peptide wurden in die MASCOT-Datenbank (Hirosawa et al., 1993; Perkins et al., 1999) eingegeben und eine Standardsuche durchgeführt. Zur entgeltigen Identifikation des Proteins aus der von der Datenbank zur Verfügung gestellten Trefferliste wurden jeweils zwei Peptide aus der ersten MALDI-MS-Analyse über Tandem-MS-Analysen weiter fragmentiert und so deren Aminosäuresequenz bestimmt. Alle Ergebnisse zusammen sind statistisch signifikant ($p < 0.05$).

2.16. Erstellung von Proteinnetzwerken

Zur Generierung von Proteinnetzwerken wurden zunächst Proteininteraktionen aus *Medline Abstracts* extrahiert. Zunächst wurde ein Verzeichnis aller humanen Gen- und Proteinnamen aus LOCUSLINK, SWISSPROT und TREMBL erstellt. Dem schloss sich eine Erweiterung dieses Verzeichnisses bezüglich morpho-syntaktischer und semantischer Parameter mittels des TEMIS Insight Discoverer Extractor (TEMIS GmbH, Heidelberg) an. Danach wurden verschiedene mögliche Interaktionen wie Aktivierung, Inhibition oder Bindung zwischen diesen Proteinen festgelegt und geordnet mit Hilfe des TEMIS Skill Cartridge Studio (TEMIS GmbH, Heidelberg). In einer Extraktion aus allen *Medline Abstracts* (bis 7/03) konnten ca. 21000 Interaktionen gefunden werden. Auf Basis dieser Daten konnten dann Netzwerke von Proteininteraktionen identifiziert werden.

V. Ergebnisse

1. Steigerung der Immunogenität von Nierenkarzinomzelllinien durch B7-Gentransfer

Ausführliche Untersuchungen verschiedener Nierenkarzinomzelllinien und Nierenkarzinomgewebeprobe zeigten, dass viele dieser Tumorzellen die costimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 nicht exprimieren (Jung et al., 1999; Pantuck et al., 2001; Antonia et al., 2002). Somit fehlt für eine effektive T-Zell Aktivierung das zweite costimulatorische Signal, auch wenn das erste Signal vermittelt werden kann (Abb. 8).

Um die Immunogenität von Nierenkarzinomzellen zu erhöhen, wurde daher ein auf B7 Modifikation basierender Therapieansatz zur Herstellung eines zellulären Vakzins entwickelt.

Durch Transfektion einer Tumorzelllinie mit der cDNA für die costimulatorischen B7 Moleküle sollen diese Zellen in die Lage versetzt werden, die Costimulatoren auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Durch diese gentechnisch veränderten Zellen könnten dann antigenspezifische T-Zellen aktiviert werden, da nun ein zweites Signal vorhanden ist (Abb. 13).

Basis für diesen Ansatz ist die etablierte Nierenkarzinomzelllinie MZ1257RC (Tab. 7). Sie zeichnet sich durch gutes Wachstum und eine stabile Expression von HLA-Oberflächenmolekülen, sowie verschiedener Tumorantigene aus (Neumann et al., 1998; Jung et al., 1999). Sie trägt die HLA-Klasse I Moleküle A2, A3, B7, B44, Cw5 und Cw7. Somit können alle Nierenkarzinompatienten die ebenfalls das weit verbreitete HLA-A2 besitzen mit Hilfe dieser Zelllinie therapiert werden und eine Immunantwort gegen die Tumorantigene der Zelllinie MZ1257RC aufbauen.

Tab. 7 Eigenschaften von MZ1257RC (Neumann et al., 1998; Jung et al., 1999)

HLA-Phänotyp	A2, A3, B7, B44, Cw5 und Cw7
EBV-Zelllinie	vorhanden
Expression von	
Tumorantigenen	mdm2, HER2/neu, p53, RAGE-1
Costimulatoren	ICAM-1, LFA-3, CD40
keine Expression von	B7-1, B7-2

Die Zelllinie MZ1257RC wurde subkloniert und ein Klon mit den B7-Expressionsvektoren pCMV B7-1 (Abb. 19), pCMV B7-2 (Abb. 20) und dem Kontrollvektor pCMV IRES Neo (Abb. 18) stabil transfiziert.

Die unklonierten batch-Kulturen der B7-1 und B7-2 Transfektanden zeigten in durchflusszytometrischen Analysen (FACS-Analysen) eine stabile Expression von B7-1 bzw. B7-2 und auch in MLTC-Versuchen mit T-Zellen die erhofften immunstimulierenden Eigenschaften wie die Induktion der T-Zell Proliferation und Zytokinsekretion (Jung et al., 1999). Die durch diese Experimente entstandenen unklonierten batch-Kulturen wurden sowohl direkt zur Umsetzung des Therapieansatzes mit der Entwicklung eines klinischen Protokolls eingesetzt (V.1.2.), als auch kloniert und für weiterführende Untersuchungen zur Optimierung des zellulären Vakzins und weiteren Grundlagenuntersuchungen zur APZ T-Zell Wechselwirkung benutzt (V.1.1.).

1.1. Untersuchung und Charakterisierung der B7-Klone

Parallel zur Entwicklung und Umsetzung der klinischen Studie wurde die Forschung an verschiedenen B7 exprimierenden Klonen intensiv fortgesetzt, um grundlegende Erkenntnisse über die Wechselwirkung der B7-Moleküle mit den T-Zellen zu erhalten, die Qualität des zellulären Vakzins *in vitro* zu ermitteln und diese vor allem zu optimieren.

Diese Erkenntnisse sollten in die Umsetzung der klinischen Studie einfließen, um den optimalen Therapieerfolg zu ermöglichen. Bei diesen Veränderungen, sollte vor allem auf eine effektive und ungefährliche Handhabung Wert gelegt werden, damit diese Umsetzungen problemlos in den klinischen Anlauf integriert werden können.

1.1.1 Auswahl der B7 Klone und Analyse ihrer Oberflächenexpression

Aus den für die klinische Pilotstudie eingesetzten batch-Kulturen wurden verschiedene B7 exprimierende Klone durch *limiting dilution* gewonnen, von denen je 4 Klone mit unterschiedlicher B7-1 bzw. B7-2 Oberflächenexpression (Abb. 27-28) und guter stabiler HLA-Oberflächenexpression ausgewählt (Abb. 26-28) wurden. Als Kontrolle wurden in diesen Versuchen die Wildtyp Zelllinie MZ1257RC (wt) und die Vektorkontrolltransfektante (Vektor) mitgeführt.

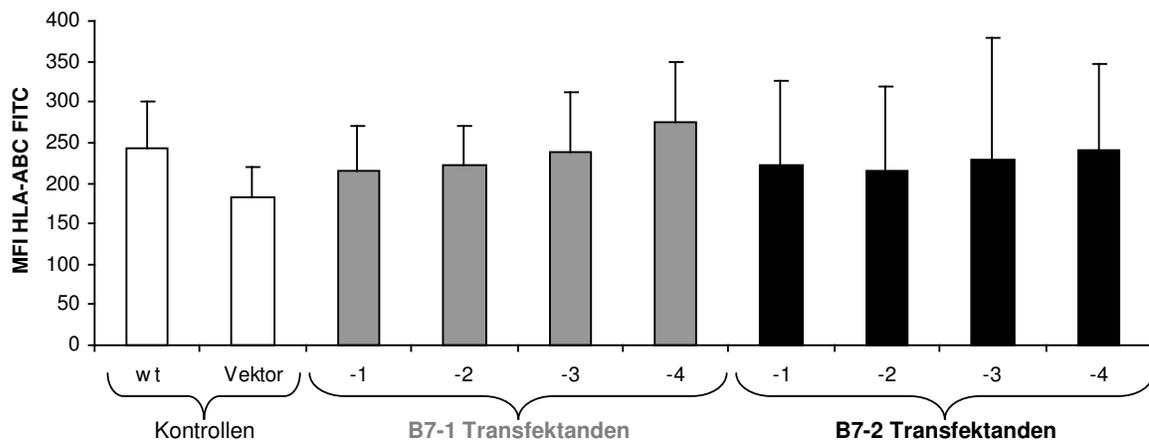


Abb. 26 HLA Expressionsdaten der B7-Transfektanden

Die Zelllinie MZ1257RC (wt), Vektorkontrolltransfektante (Vektor), B7-1 und B7-2 Transfektanden (-1, -2, -3, -4) wurden mit einem anti HLA-ABC FITC Antikörper und einem IgG Kontrollantikörper inkubiert. Die Oberflächenexpressionen wurden in einer FACS-Analyse bestimmt. Anschließend wurden die MFI Werte des anti HLA-Antikörper durch die MFI des Kontrollantikörpers dividiert und als Balkendiagramm dargestellt. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität

Um die Oberflächenexpression der B7-1 und B7-2 Klone vergleichen zu können, wurde die Zahl an Oberflächenmolekülen über die Bestimmung der „*antibody binding capacity*“ (ABC) des anti B7-1 FITC und des anti B7-2 PE Antikörpers ermittelt (Abb. 29). Dies ermöglicht den direkten Vergleich von B7-1 und B7-2 Oberflächenexpression durch Ermittlung der Zahl an B7-Molekülen auf der Zelloberfläche. Dadurch ist es möglich, Ergebnisse aus Versuchen mit B7-1 und B7-2 Transfektanden in einem Diagramm darzustellen und erlaubt später Aussagen über die Unterschiede der Wirkungsspektren der B7-Moleküle (Abb. 30).

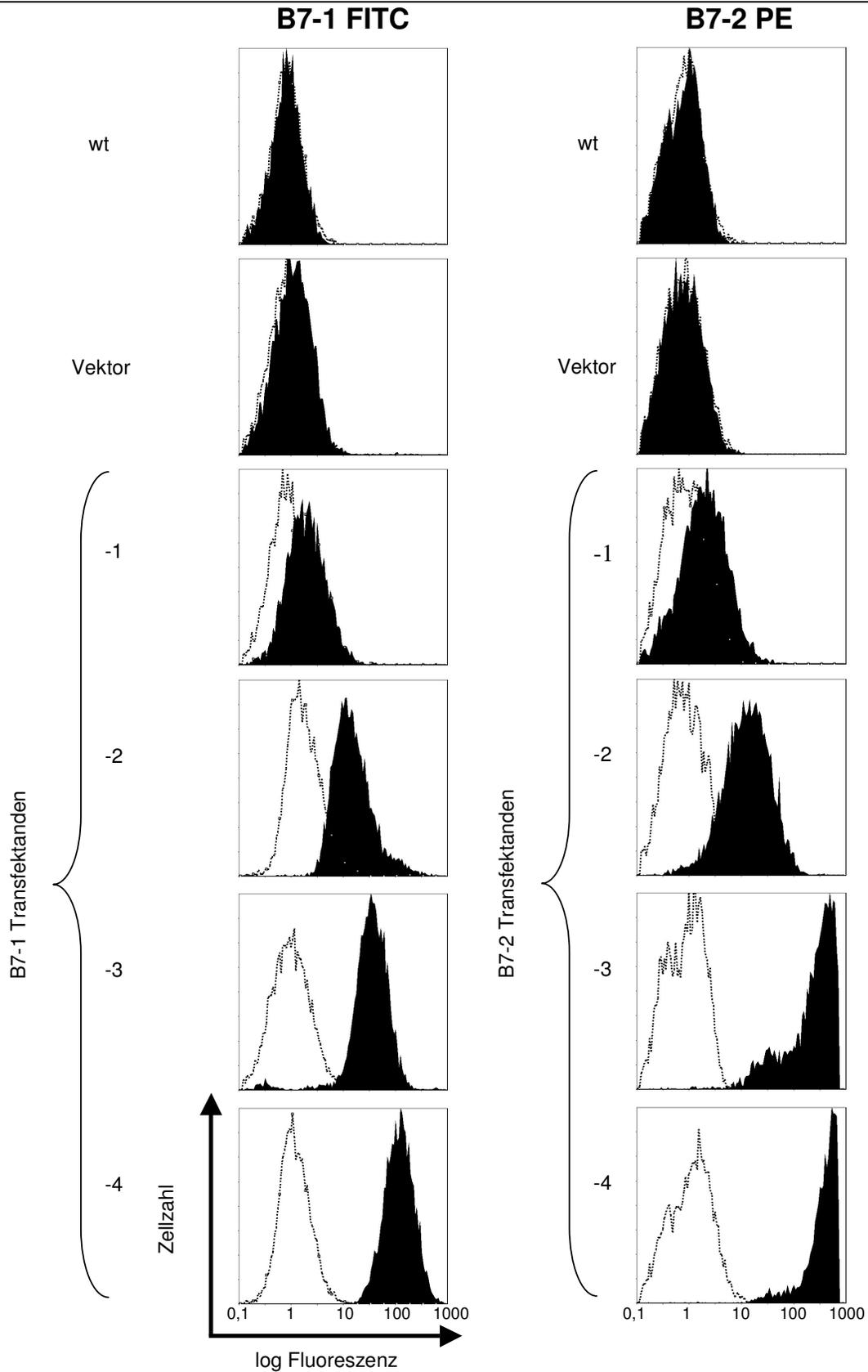


Abb. 27 FACS Analyse der B7 Oberflächenexpression der MZ1257RC B7 Transfektanden

Die Zelllinien MZ1257RC (wt), Vektorkontrolltransfektante (Vektor), B7-1 und B7-2 Transfektanden (-1, -2, -3, -4) wurden mit den Antikörpern IgG- und B7-1 FITC- bzw. B7-2 PE- inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächenexpressionen in einer FACS-Analyse bestimmt. Die Histogramme der B7-1 Expressionsanalysen von wt, Vektor und B7-1 Transfektanden sind in der linken und die Histogramme der B7-2 Expressionsanalysen von wt, Vektor und B7-2 Transfektanden in der rechten Spalte dargestellt.

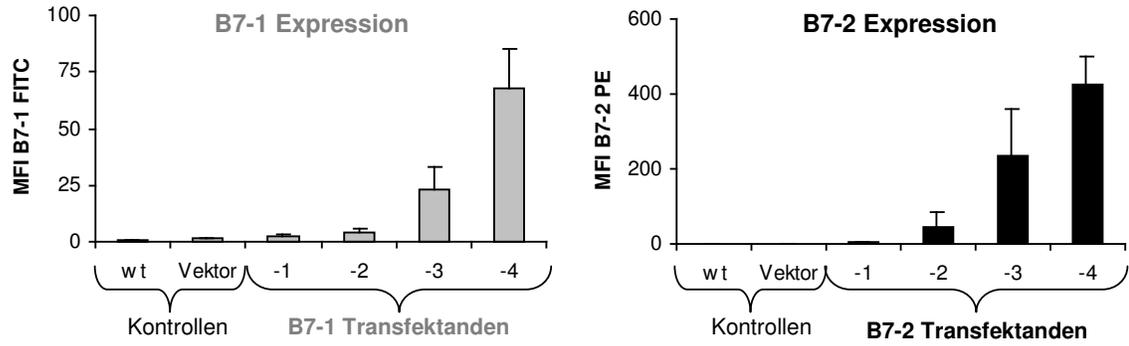


Abb. 28 Zusammenfassung der B7 Expressionsdaten aus den FACS Analysen

Die Zelllinien MZ1257RC (wt), Vektorkontrolltransfektante (Vektor), B7-1 und B7-2 Transfektanten (-1, -2, -3, -4) wurden mit den Antikörpern anti B7-1 FITC- bzw. anti B7-2 PE und Kontrollantikörpern inkubiert. Die Oberflächenexpressionen wurden in einer FACS-Analyse bestimmt. Anschließend wurden die MFI Werte der B7 Antikörper durch die MFI der Kontrollantikörper dividiert und die Daten in Balkendiagrammen dargestellt. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität

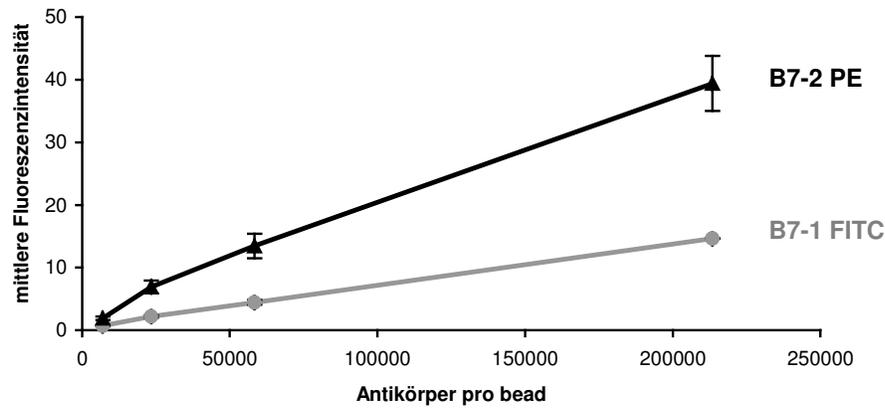


Abb. 29 ABC Bestimmung B7-1 FITC/B7-2 PE Antikörper

Mit dem Quantum Simply Cellular Microbead Kit wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der gebundenen Antikörpermenge mittels der Ermittlung der Antikörperbindekapazität (ABC) für die Antikörper anti B7-1 FITC und anti B7-2 PE, wie unter IV.1.13. beschrieben, bestimmt.

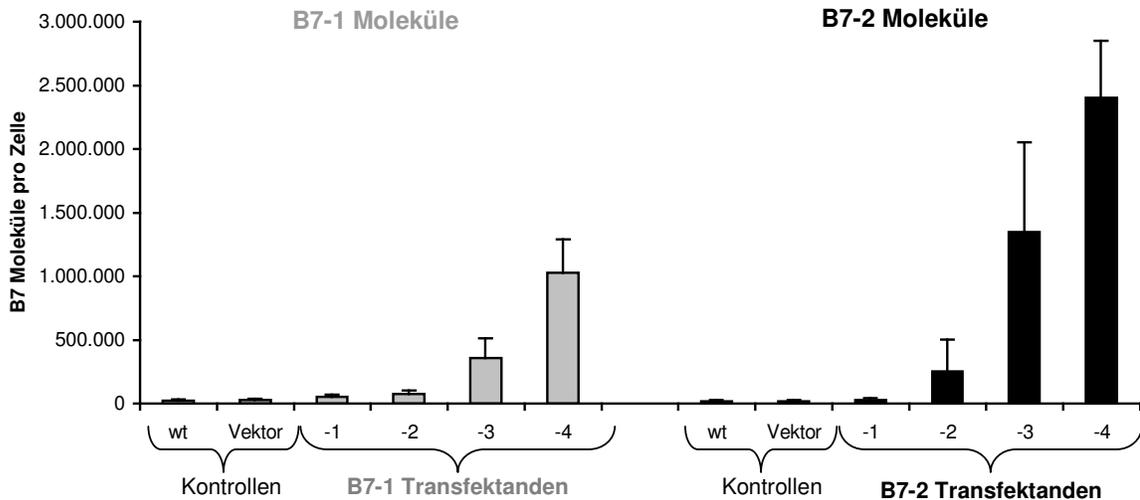


Abb. 30 B7 Oberflächenmoleküle pro Zelle

Durch Umrechnung der MFI-Werte aus Abb. 28 mit den Resultaten der ABC Bestimmung der beiden Antikörper B7-1 FITC und B7-2 PE aus Abb. 29 wurde die Anzahl von B7-Molekülen auf der Oberfläche der einzelnen Klone, wie unter IV.1.13 beschrieben, berechnet.

1.1.2. Ansatz gemischte Lymphozyten – Tumorzellen Kultur (MLTC)

Zur Untersuchung der T-Zell Stimulierung durch gentechnisch modifizierte Tumorzellen wurden Tumorzellen und T-Zellen gemeinsam kultiviert. Vor dieser gemeinsamen Kultur wurden die T-Zellen aus *buffy coat* Präparationen gesunder Blutspender isoliert und entweder direkt oder nach Vorstimulation mit OKT3/IL-2 eingesetzt. Die Tumorzellen wurden durch Fixierung mit Paraformaldehyd inaktiviert, damit sie nicht in der Lage waren durch ihr Wachstum, RNA- oder Proteinexpression die Analyse der T-Zell Reaktion zu beeinflussen.

Die Analysen wurden nach den Schemata für nicht vorstimulierte T-Zellen (Abb. 31) und für OKT3, IL-2 vorstimulierte T-Zellen (Abb. 32) durchgeführt.

MLTC unstimulierte T-Zellen

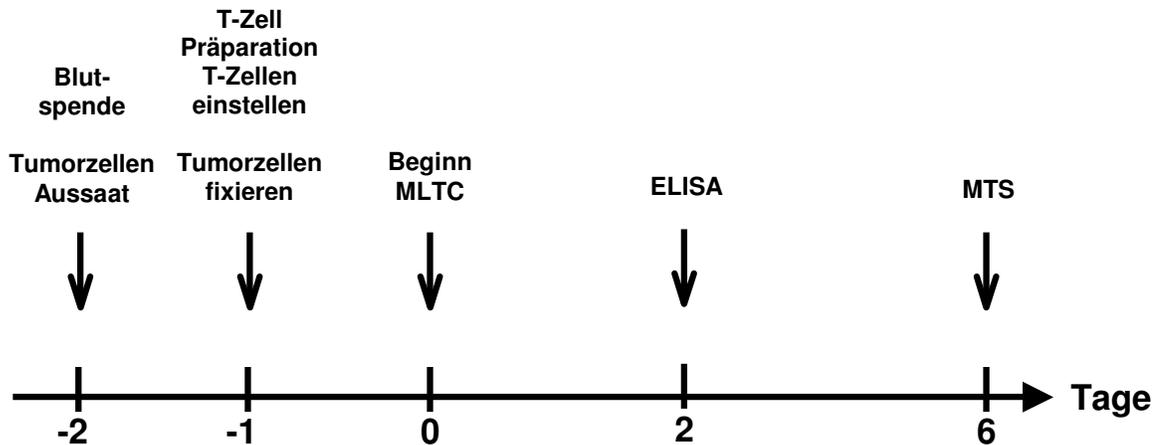


Abb. 31 MLTC Schema unstimulierte T-Zellen

MLTC vorstimulierte T-Zellen

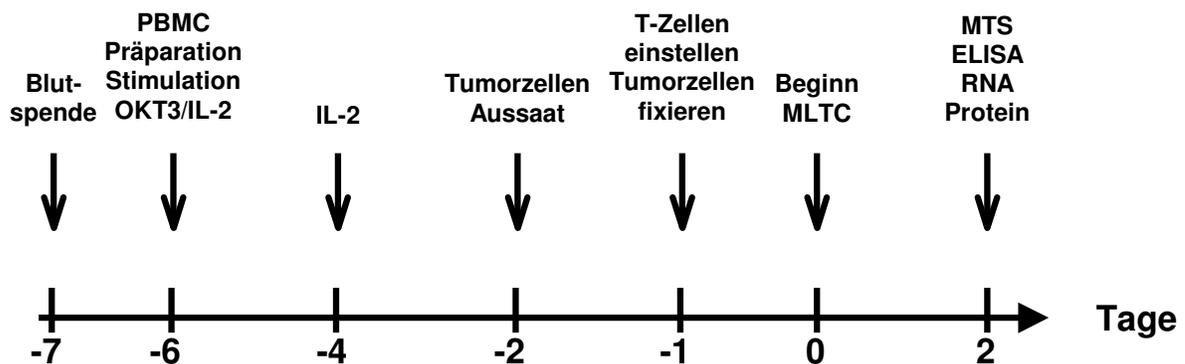


Abb. 32 MLTC Schema vorstimulierte T-Zellen

Bei allen Versuchen wurde die Steigerung der metabolischen Aktivität als Maß für die T-Zellproliferation (MTS-Test) und die Zytokinproduktion (ELISA) bestimmt. Den Versuchen mit vorstimulierten T-Zellen schlossen sich den MTS- und ELISA-Untersuchungen Protein- und RNA-Analysen an.

Für die Generierung zytotoxischer T-Zellen (V.1.1.5.) wurden die Zellen nach Schema Abb. 32 dreimal stimuliert und abschließend ihre zytotoxischen Eigenschaften auf nicht fixierte Zellen in einem LDH-Freisetzungstest bestimmt.

1.1.2.1. Tumorzellaussaat und Fixierung

Für alle Versuche wurde eine strenge Zeitabfolge entsprechend der Schemata eingehalten. 48 Stunden vor Beginn der MLTC wurden die Tumorzellen geerntet, in Kulturgefäße ausgebracht und 24 Stunden vor MLTC Beginn mit Paraformaldehyd fixiert.

Die erste Zeitspanne von 24 Stunden zwischen Aussaat und Fixierung reicht aus, um den Zellen eine Erholung von der Ernte sowie ein Anheften an die Kulturgefäße zu ermöglichen, dies wurde durch mikroskopische Kontrolle festgestellt.

Die zweite Zeitspanne von 24 Stunden zwischen Fixierung und Beginn der MLTC führt dazu, dass bei Kontrolluntersuchungen keine RNA und so gut wie kein Protein in den fixierten Zellen mehr nachweisbar ist. Dies ermöglicht aussagekräftige Untersuchungen der RNA- und Proteinexpression der T-Zellen. Weiterhin ist zu Beginn der MLTC keine metabolische und proliferative Aktivität der Tumorzellen mehr vorhanden, so dass hier die nichtradioaktiven T-Zell Analysen nicht verfälscht werden.

Im Gegensatz dazu bleibt die für die T-Zell Stimulierung wichtige Oberflächenexpression von HLA- und B7-Molekülen unbeeinflusst (Abb. 33). Bei FACS-Analysen zeigten sich bei identischen Geräteeinstellungen fast identische Kurven vor und nach der Fixierung. Nur die Werte der IgG-Kontrolle stiegen an, was sich aber durch die intrazelluläre Bindung der IgG Moleküle erklären lässt, da die Fixierung mit Paraformaldehyd neben einer Zellfixierung auch zu einer Zellpermeabilisierung führt.

Bei einer Inaktivierung der Tumorzellen durch die weit verbreitete Methode der radioaktiven Bestrahlung, wie sie auch für die klinische Studie zum Einsatz kommt (siehe V.1.2.3.), wären verschiedene nichtradioaktive Analysen nicht möglich gewesen. Auch die RNA- und Proteinanalysen wären durch die RNA- und Proteinexpression der Tumorzellen stark verfälscht werden. Somit war für die in dieser Arbeit angewandten Methoden die Fixierung mit Paraformaldehyd das Mittel der Wahl.

Durch den Einsatz von Paraformaldehyd zur Zellfixierung war es möglich, auf die sonst üblichen radioaktiven Methoden wie ^3H -Proliferationsassay oder ^{51}Cr -Zytotoxizitätstests zu verzichten.

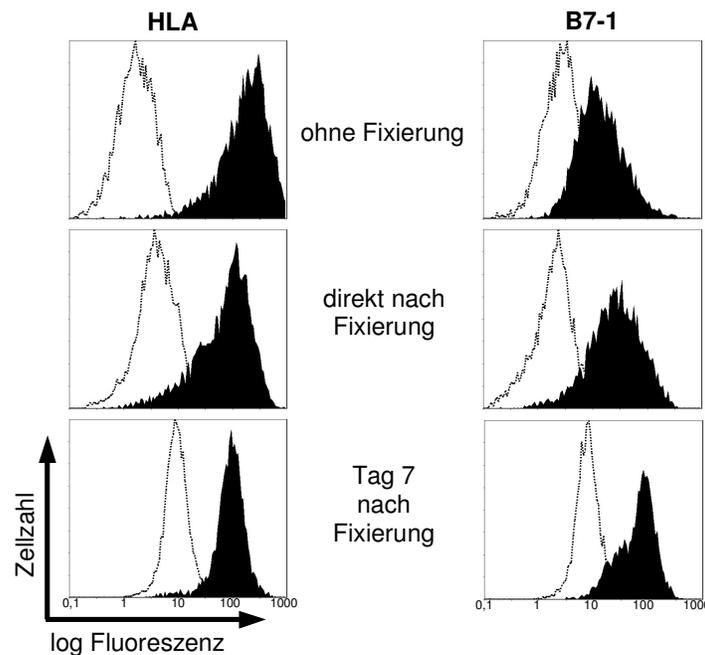


Abb. 33 HLA und B7 Oberflächenexpression vor und nach Zellfixierung mit Paraformaldehyd

Die B7 Transfektante MZ1257RC B7-1 Klon 2 wurde ohne Fixierung, direkt nach Fixierung und 7 Tage nach Fixierung mit Paraformaldehyd mit den Antikörpern IgG- \square und HLA-ABC FITC- \square bzw. B7-1 FITC- \blacksquare inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächenexpressionen in einer FACS-Analyse bestimmt. Die Histogramme der HLA Expressionsanalysen von B7-1 Klon 2 sind in der linken und die Histogramme der B7-1 Expressionsanalysen in der rechten Spalte dargestellt.

1.1.2.2 T-Zell Vorbereitung

1.1.2.2.1. Isolation naiver T-Zellen

Nicht vorstimulierte, naive T-Zellen wurden aus buffy coat Präparationen gesunder HLA-A2 positiver Spender gewonnen. Nach PBMC Isolierung mittels Ficollgradient und Adhärenzreinigung wurden sie 24 Stunden vor Beginn der MLTC mit der klassischen Erythrozytenrosettierung gewonnen. Diese Methode führt zu guten Ergebnissen (Reinheit >90%) und hat den Vorteil gegenüber antikörperbasierten Methoden, dass die Zellen nur minimal stimuliert werden. 24 Stunden Ruhe zwischen Isolierung und Einsatz gewährleisten, dass diese minimale Vorstimulierung keinen Einfluss auf nachfolgende Ergebnisse hat.

Im Vergleich zum Einsatz von vorstimulierten T-Zellen (siehe 1.1.2.2.2.) haben unstimulierte T-Zellen zwei entscheidende Nachteile:

Durch die geringe Gesamtzahl an gewonnenen Zellen war es bei den MLTC-Versuchen nur möglich, die Proliferation (MTS-Test) zwischen den B7-1 Klonen und den B7-2 Klonen zu vergleichen, nie aber konnten Zytokinproduktion (ELISA), RNA-Expression (RT-PCR) oder gar Proteinexpression (Western Blot, Proteomanalyse) verglichen werden. Weiterhin ergaben sich oft nur wenig aussagekräftige Ergebnisse, weil die Aktivierung der nicht vorstimulierten T-Zellen meist nur sehr gering war.

Trotzdem sind diese Untersuchungen von großer Wichtigkeit, spiegeln sie doch im Vergleich zu vorstimulierten T-Zellen am besten die Situation der T-Zellen *in vivo* wieder.

1.1.2.2.2. PBMC Isolation und T-Zell Vorstimulierung

Im Vergleich zur Gewinnung unstimulierter T-Zellen wurden hier die gesamten PBMC gesunder HLA-A2⁺ bzw. HLA-gematchter Spender mit OKT3 (anti-CD3 Antikörper) und IL-2 unspezifisch vorstimuliert. Dieses Stimulationsschema führt zu einer starken Zellproliferation, die sich sehr gut unter dem Mikroskop kontrollieren lässt.

Diese Stimulationen resultieren in CD3⁺T-Zellpopulationen mit einer Reinheit von über 90%. Durch 24 Stunden Pause zwischen Vorstimulation und MLTC-Beginn wurde es möglich, die T-Zellen durch Tumorzellen spezifisch zu aktivieren.

1.1.3. T-Zell Proliferation nach Stimulation mit B7 exprimierenden Tumorzellen

Die Bestimmung der T-Zell Proliferation ist neben der Zytokinproduktion ein Standardversuch, der sehr schnell den Grad der T-Zell Aktivierung zeigt. Im Bestreben dieser Arbeit, nur leicht handhabbare und vor allem nichtradioaktive Testsysteme einzusetzen, wurde die Proliferation der T-Zellen über die Steigerung der metabolischen Aktivität im Verlauf der MLTC-Reaktion mit dem MTS-Test bestimmt. Die metabolische Aktivität der unstimulierten T-Zellen wurde dabei gleich 100 gesetzt und die Aktivitäten der mit den fixierten Tumorzellen stimulierten T-Zellen relativ dazu dargestellt, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Versuchen zu gewährleisten. Durch die Fixierung der Tumorzellen mit Paraformaldehyd ist in diesen Zellen nach 24 Stunden keine metabolische Aktivität mehr nachweisbar. Durch den Einsatz des nichtradioaktiven MTS-Tests war es möglich, bei den MLTC-Versuchen die metabolische Aktivität an mehreren Tagen zu messen und so Verlaufskurven zu erhalten (Abb. 34, 35).

Abb. 34 zeigt einen typischen Verlauf der relativen Proliferation beim Einsatz von nicht vorstimulierten, naiven T-Zellen. Aus verschiedenen Versuchen stellten sich die Ergebnisse von Tag 6 als repräsentativ dar, die einen Vergleich zwischen verschiedenen Versuchsansätzen zuließen. Beim Einsatz vorstimulierter T-Zellen wurden die Werte von Tag 2 als repräsentativ festgestellt, ein typischer Verlauf ist hierzu in Abb. 35 dargestellt.

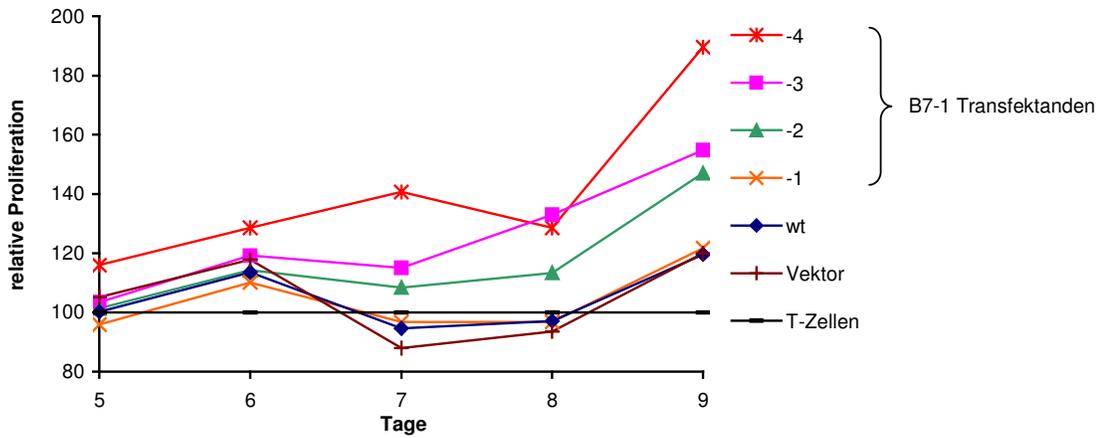


Abb. 34 Verlauf der Proliferation naiver T-Zellen bei Stimulation mit B7-1 transfizierten Tumorzellen
 Naive T-Zellen wurden für 5, 6, 7, 8 und 9 Tage mit fixierten MZ1257RC (wt), Vektor-kontrolltransfektanden (Vektor) und B7-1 transfizierten Tumorzellen inkubiert. An jedem Tag wurde für 4 Stunden die metabolische Aktivität mit dem MTS-Test ermittelt. Die metabolische Aktivität der unstimulierten T-Zellen wurde gleich 100 gesetzt und die Aktivitäten der mit den fixierten Tumorzellen stimulierten T-Zellen als relative Proliferation dazu berechnet.

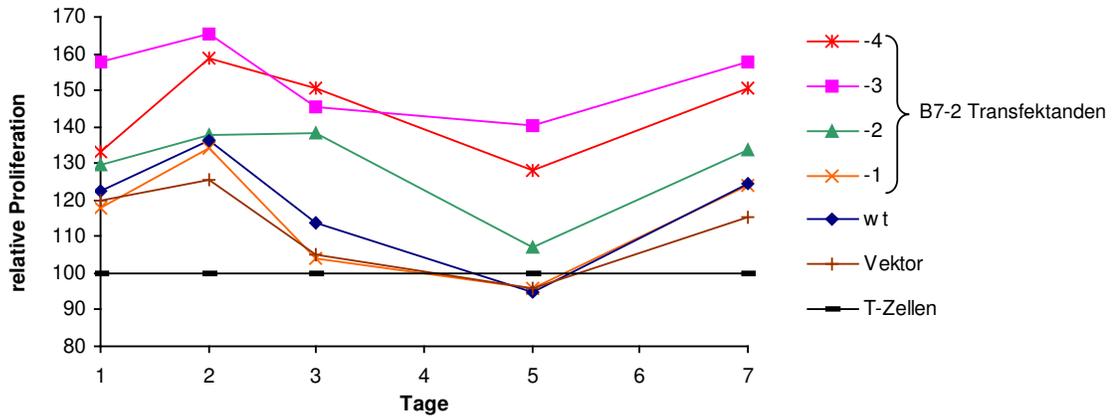


Abb. 35 Verlauf der Proliferation vorstimulierte T-Zellen bei Stimulation mit B7-2 transfizierten Tumorzellen
 OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen wurden für 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 9 Tage mit fixierten MZ1257RC (wt), Vektor-kontrolltransfektanden (Vektor) und B7-2 transfizierten Tumorzellen inkubiert. An jedem Tag wurde für 4 Stunden die metabolische Aktivität der unstimulierten T-Zellen wurde gleich 100 gesetzt und die Aktivitäten der mit den fixierten Tumorzellen stimulierten T-Zellen als relative Proliferation dazu berechnet.

Bei Darstellung der aus den MLTC-Reaktionen gewonnen repräsentativen MTS-Daten gegenüber der B7-Oberflächenexpression der eingesetzten Tumorzellen, zeigte sich eine kontinuierlich zunehmende T-Zell Proliferation mit steigender B7-1 Expression auf den Tumorzellen. Bei der T-Zell Aktivierung mit B7-2 transfizierten Tumorzellen zeigte sich ebenfalls eine zunehmende Aktivierung mit steigender B7-2 Oberflächenexpression bis zu einer MFI von ca. 250. Die Stimulierung der T-Zellen mit einer B7-2 Transfektante mit einer MFI von über 400 zeigte aber eine deutlich reduzierte Aktivierung.

Diese Zusammenhänge wurden sowohl bei den Versuchen mit naiven, als auch bei den Versuchen mit vorstimulierten T-Zellen deutlich. In Abb. 36 wurden die beispielhaften Kurvenverläufe eines Versuchs mit naiven T-Zellen und zweier Versuche mit vorstimulierten T-Zellen dargestellt.

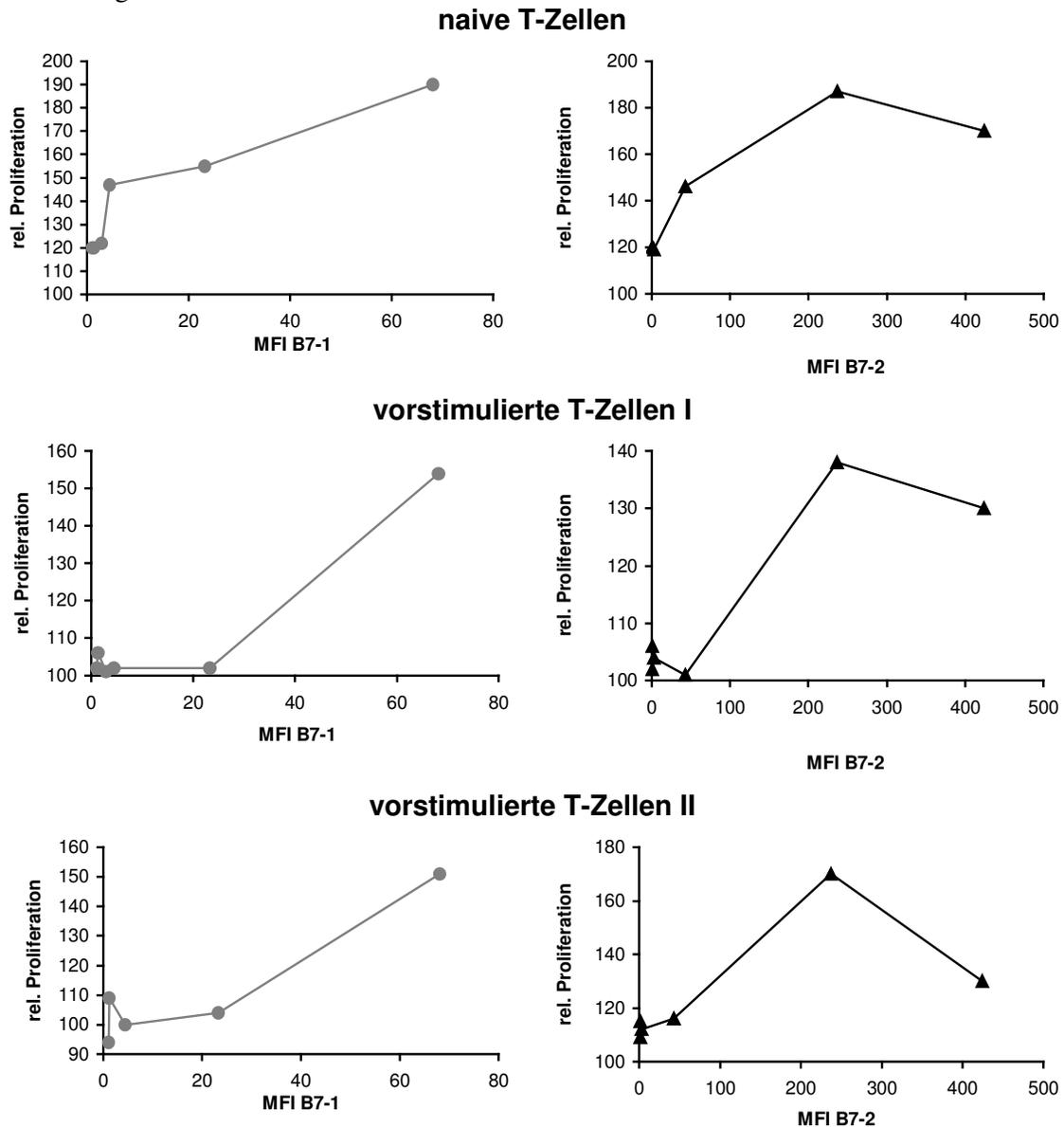


Abb. 36 Naive und vorstimulierte T-Zellen proliferieren in Abhängigkeit von der B7 Expression der Tumorzellen

Naive und vorstimulierte T-Zellen wurden in MLTC-Versuchen zusammen mit MZ1257RC, Vektorkontrolltransfektanden und B7-transfizierten Tumorzellen inkubiert. Zu repräsentativen Zeitpunkten wurde die metabolische Aktivität der stimulierten T-Zellen mit einem MTS-Test bestimmt. Die metabolische Aktivität der unstimulierten T-Zellen wurde gleich 100 gesetzt und die Aktivitäten der stimulierten T-Zellen als relative Proliferation dazu berechnet. Die erhaltenen Werte wurden gegen die B7 Oberflächenexpression der eingesetzten Tumorzellen, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit den Antikörpern B7-1 FITC bzw. B7-2 PE, aufgetragen. Entsprechung der B7-Oberflächenexpression der Tumorzellen sind dies daher von links nach rechts gesehen die Werte der T-Zell Stimulationen mit MZ1257RC (wt), Vektorkontrolle und B7-1 bzw. B7-2 Klon 1, Klon 2, Klon 3 und Klon 4.

Durch die Ermittlung der Antikörperbindekapazität (V.1.1.1, Abb. 29 und 30) wurde eine gemeinsame Darstellung der Daten und damit ein objektiver Vergleich der T-Zell Aktivierung zwischen der Stimulierung mit B7-1 und B7-2 transfizierten Tumorzellen möglich (Abb. 37). Es zeigten sich keine gravierenden Unterschiede in den Kurvenverläufen zwischen T-Zell Stimulierungen mit B7-1 oder B7-2.

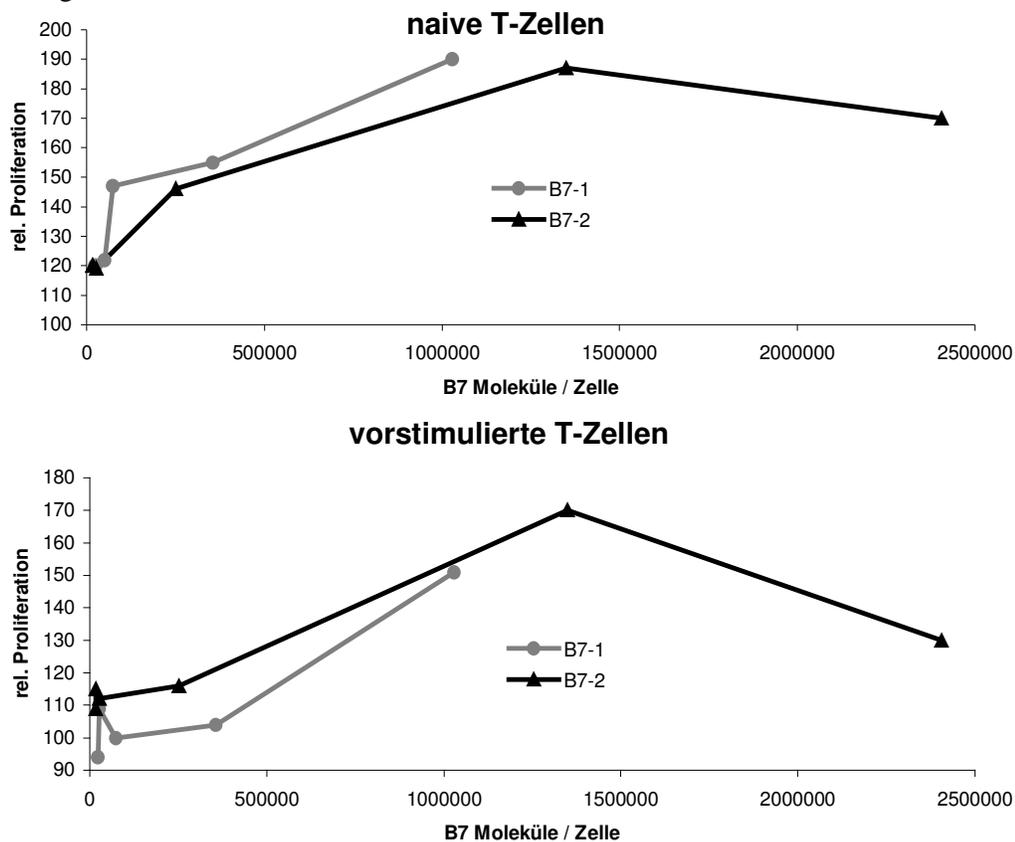


Abb. 37 Kein Unterschied in der Proliferation der T-Zellen zwischen Stimulation mit B7-1 oder B7-2

Naive und vorstimulierte T-Zellen wurden in MLTC-Versuchen zusammen mit MZ1257RC, Vektorkontrolltransfektanden und B7-transfizierten Tumorzellen inkubiert. Zu repräsentativen Zeitpunkten wurde die metabolische Aktivität der stimulierten T-Zellen mit einem MTS-Test bestimmt. Die metabolische Aktivität der unstimulierten T-Zellen wurde gleich 100 gesetzt und die Aktivitäten der stimulierten T-Zellen als relative Proliferation dazu berechnet. Die erhaltenen Werte wurden gegen die Zahl an B7 Oberflächenmolekülen der eingesetzten Tumorzellen aufgetragen. Entsprechung der B7-Oberflächenexpression der Tumorzellen sind dies daher von links nach rechts gesehen die Werte der T-Zell Stimulationen mit MZ1257RC (wt), Vektorkontrolle und B7-1 bzw. B7-2 Klon 1, Klon 2, Klon 3 und Klon 4.

Da sich die Transfektanden B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3 als beste Stimulatoren der T-Zell Aktivierung und darüber hinaus aufgrund ihrer sehr ähnlichen B7 Oberflächenexpression von ca. 1.25 Mio Molekülen als gut vergleichbar gezeigt haben, wurden die Blockadeanalysen auf diese B7-Transfektanden beschränkt. Als Kontrollen wurden die Wildtyp Zelllinie MZ1257RC und die Vektorkontrolltransfektande eingesetzt.

Durch den Einsatz von blockierenden Antikörpern gegen HLA (W6/32), B7-1 und B7-2 lies sich die T-Zell Aktivierung in MLTC Versuchen Dosis-abhängig deutlich reduzieren. Die Blockade der T-Zell Aktivierung steigerte sich dabei mit der Menge an eingesetztem Antikörper. Dies offenbart, dass die T-Zell Aktivierung von der HLA- und B7-Oberflächenexpression abhängig war (Abb. 38 und 39). Durch den Einsatz von Mischungen aus B7-1 Klon 4, B7-2 Klon 3 und Vektorkontrollzellen zur T-Zell Stimulierung konnte ebenfalls die Abhängigkeit der T-Zell Aktivierung von der B7 Oberflächenexpression gezeigt werden. Bei Mischung der B7 exprimierenden Tumorzellen mit Vektorkontrollzellen ohne B7 zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der T-Zell Proliferation mit abnehmender Menge an B7 exprimierenden Tumorzellen. Kein Veränderungen der T-Zell Aktivierung wurde bei der Mischung der B7-1 und B7-2 exprimierenden Tumorzellen beobachtet (Abb. 40).

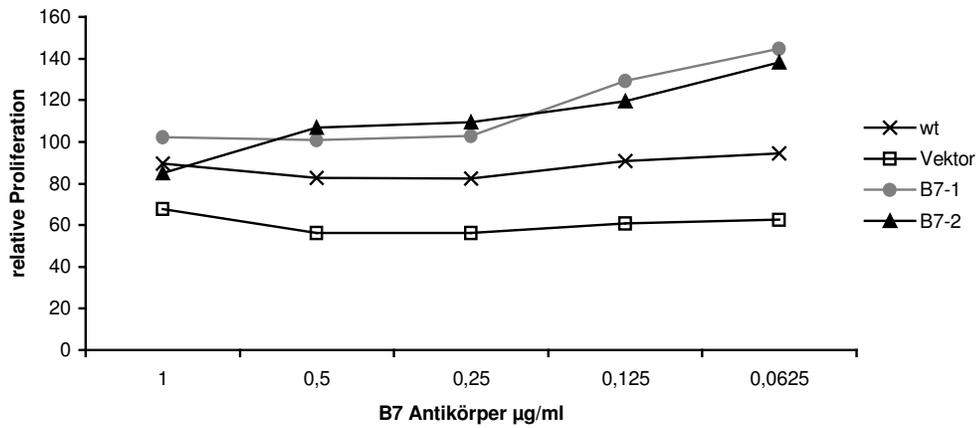


Abb. 38 Blockade der T-Zell Aktivierung durch B7 Antikörper

Fixierte MZ1257RC, Vektorkontroll-, B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3 Tumorzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der blockierenden B7 Antikörper für 3h inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen in einem MLTC-Versuch mit vorstimulierten T-Zellen eingesetzt. Nach 48 Stunden wurde die metabolische Aktivität der stimulierten T-Zellen mit einem MTS-Test als OD490 bestimmt und die Proliferation relativ zur T-Zell Kontrolle dargestellt.

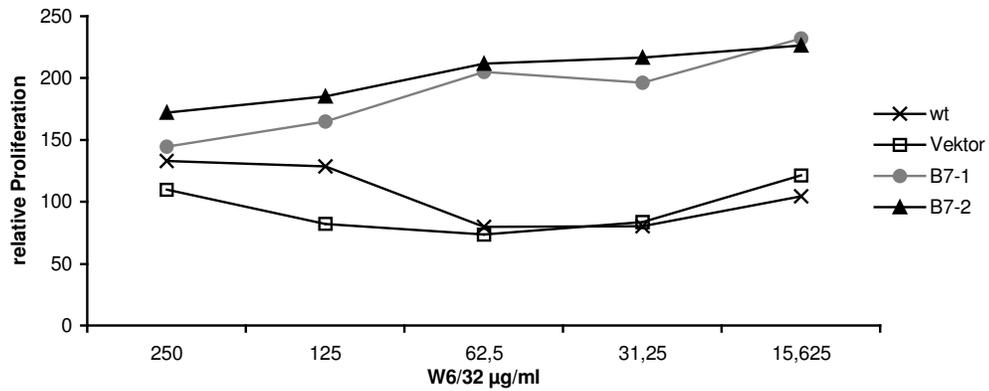


Abb. 39 Blockade der T-Zell Aktivierung durch HLA Antikörper

Fixierte MZ1257RC wt, mock, B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3 Tumorzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des blockierenden HLA Antikörpers W6/32 für 3h inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen in einem MLTC-Versuch mit vorstimulierten T-Zellen eingesetzt. Nach 48 Stunden wurde die metabolische Aktivität der stimulierten T-Zellen mit einem MTS-Test als OD490 bestimmt und die Proliferation relativ zur T-Zell Kontrolle dargestellt.

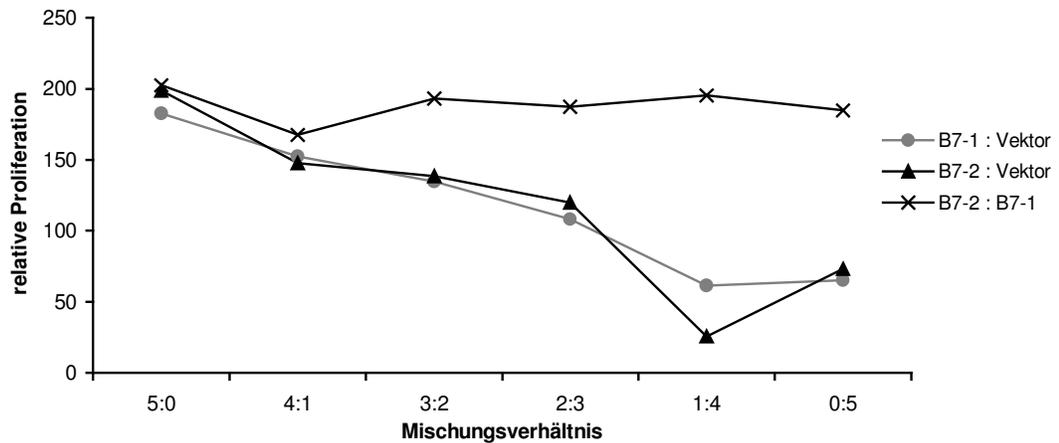


Abb. 40 Die T-Zell Aktivierung ist anhängig von der Zahl B7 exprimierender Tumorzellen

MZ1257RC B7-1 Klon 4 und Vektorkontroll-, B7-2 Klon 3 und Vektorkontroll- sowie B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3 Tumorzellen wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt und in Zellkulturplatten ausgebracht. Nach Fixierung wurden diese Zellen in einem MLTC-Versuch mit vorstimulierten T-Zellen eingesetzt. Nach 48 Stunden wurde die metabolische Aktivität der stimulierten T-Zellen mit einem MTS-Test als OD490 bestimmt und die Proliferation relativ zur T-Zell Kontrolle dargestellt.

1.1.4. T-Zell Zytokinsekretion nach Stimulation mit B7 exprimierenden Tumorzellen

Die Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA ist nach der Bestimmung der Proliferation die nächste Analysemethode, die einen guten Aufschluss über die Aktivität von T-Zellen gibt.

Die Kulturüberstände aller MLTC-Versuche wurden 48h nach Beginn der MLTC gewonnen und im ELISA auf die Produktion der Zytokine $\text{IFN}\gamma$, GM-CSF, $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-2, IL-4 und IL-10 getestet.

Die Analyse der Zytokinproduktion der naiven T-Zellen zeigten bei IL-2 und $\text{IFN}\gamma$ Sekretion Ergebnisse, die denen der Proliferationsanalysen vergleichbar waren (Abb. 41). Einem stetigen Anstieg der Zytokinsekretion bei steigender B7-1 Oberflächenexpression stand eine Sättigung oder ein beginnender Abfall der Zytokinproduktion bei hoher B7-2 Expression der Transfektanden gegenüber.

Leider ließen sich diese Resultate nicht direkt miteinander vergleichen, da aufgrund der geringen Zellausbeuten beim Einsatz von naiven Zellen verschiedene T-Zellpräparationen für Stimulationsversuche mit B7-1 und B7-2 Transfektanden eingesetzt werden mussten.

Die Ergebnisse der $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF und IL-10 Sekretionsanalysen waren auf Grund geringer Werte nicht aussagekräftig. IL-4 und IL-1 β konnte in den Versuchsansätzen nicht nachgewiesen werden.

An dieser Stelle sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass in den Versuchen mit naiven T-Zellen aussagekräftige IL-2 Produktionen bei Stimulation mit fixierten Tumorzellen gefunden wurden. Bei den nachfolgenden Untersuchungen mit anti-CD3, IL-2 vorstimulierten Zellen konnte in keinem Versuch eine signifikante IL-2 Produktion nachgewiesen werden.

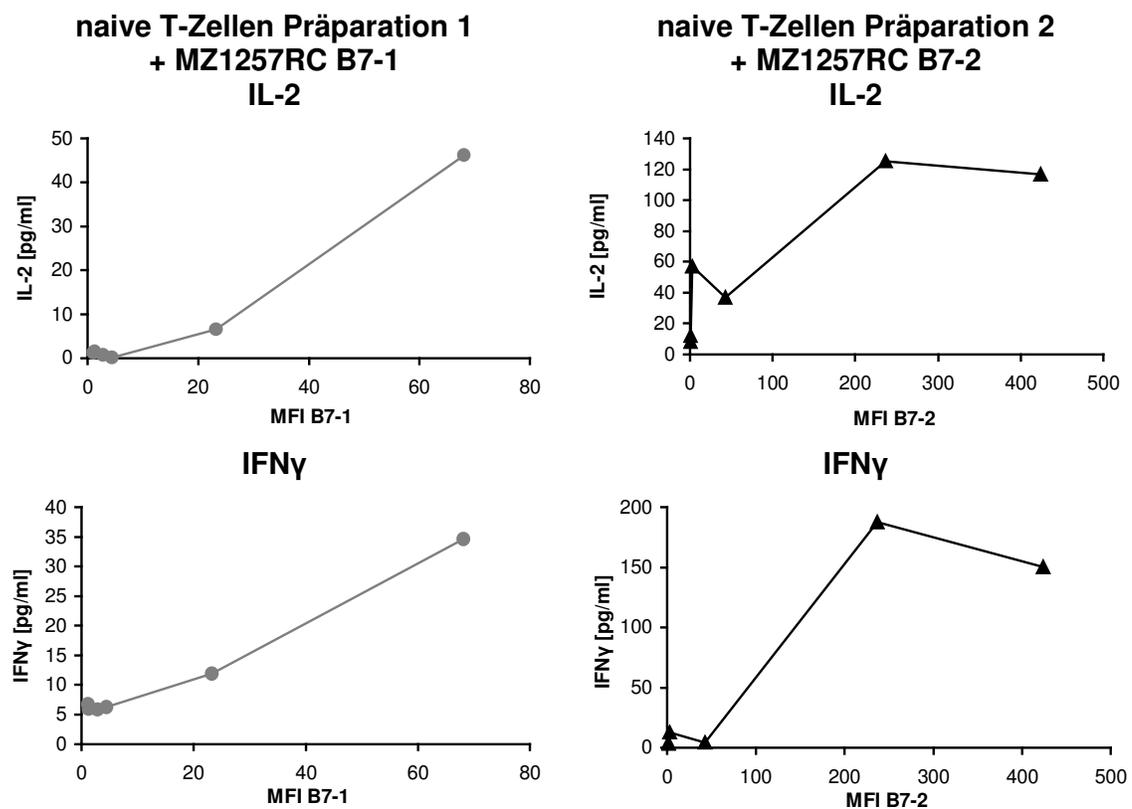


Abb. 41 Die Zytokinproduktion naiver T-Zellen ist abhängig von der B7 Oberflächenexpression der Tumorzellen

Naive T-Zellen wurden mit fixierten MZ1257RC, Vektorkontroll- und B7 transfizierten Tumorzellen für 48h inkubiert. Anschließend wurden ELISA Analysen auf die Produktion von IL-2 und $\text{IFN}\gamma$ durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden gegen die B7 Oberflächenexpression der eingesetzten Tumorzellen, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit den Antikörpern B7-1 FITC bzw. B7-2 PE, aufgetragen. Entsprechung der B7-Oberflächenexpression der Tumorzellen sind dies daher von links nach rechts gesehen die Werte der T-Zell Stimulationen mit MZ1257RC (wt), Vektorkontrolle und B7-1 bzw. B7-2 Klon 1, Klon 2, Klon 3 und Klon 4. Für die MLTC-Versuche mit B7-1 bzw. B7-2 Transfektanden wurden verschiedene *buffy coat* Präparationen eingesetzt.

Auch bei den Ergebnissen der Zytokinsekretion der Versuche mit OKT3/IL-2 vorstimulierten Zellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei den Proliferationsanalysen bzw. den Stimulationsanalysen mit naiven T-Zellen (Abb. 42). Die Zytokinsekretion der aktivierten T-Zellen stieg bei den MLTC-Versuchen mit den B7-1 Transfektanden linear mit der Menge an B7-Molekülen pro Tumorzelle an (Abb. 42, linke Spalte). Dem gegenüber kam es beim Einsatz der B7-2 Transfektanden zu einer Sättigung der IFN γ und GM-CSF Zytokinsekretion bei hoher Zahl an B7-2 Molekülen pro Tumorzelle. Beim Einsatz der Transfektande mit den meisten B7-2 Molekülen auf der Zelloberfläche fiel die Sekretion von TNF α und IL-10 sogar wieder deutlich ab (Abb. 42, rechte Spalte).

Da es beim Einsatz vorstimulierter T-Zellen problemlos möglich war, die Versuche mit den B7-1 und B7-2 Transfektanden mit den T-Zellen aus der selben Präparation durchzuführen, wurden in Abb. 43 die ELISA-Resultate in gemeinsamen Abbildungen dargestellt. In der linken Spalte sind die repräsentativen Ergebnisse für die den Einsatz HLA-ungematchter HLA-A2⁺ T-Zellen dargestellt.

Wie schon bei den Ergebnissen der Proliferationsanalysen (Abb. 37) zeigten sich bei den Analysen von IFN γ und GM-CSF Sekretion nur geringfügige Unterschiede zwischen der T-Zell Stimulation mit B7-1 oder B7-2.

Im Unterschied dazu konnten bei den Analysen der TNF α und IL-10 Sekretion signifikante Unterschiede zwischen der Stimulation ungematchter T-Zellen mit B7-1 und B7-2 exprimierenden Tumorzellen beobachtet werden. Die Zytokinproduktion beim Einsatz der B7-2 Transfektanden war deutlich höher als beim Einsatz der B7-1 Transfektanden. Gleiches galt auch für die Sekretion von IFN γ , GM-CSF, TNF α und IL-10 wenn HLA-gematchte T-Zellen stimuliert wurden (Abb. 43, rechte Spalte).

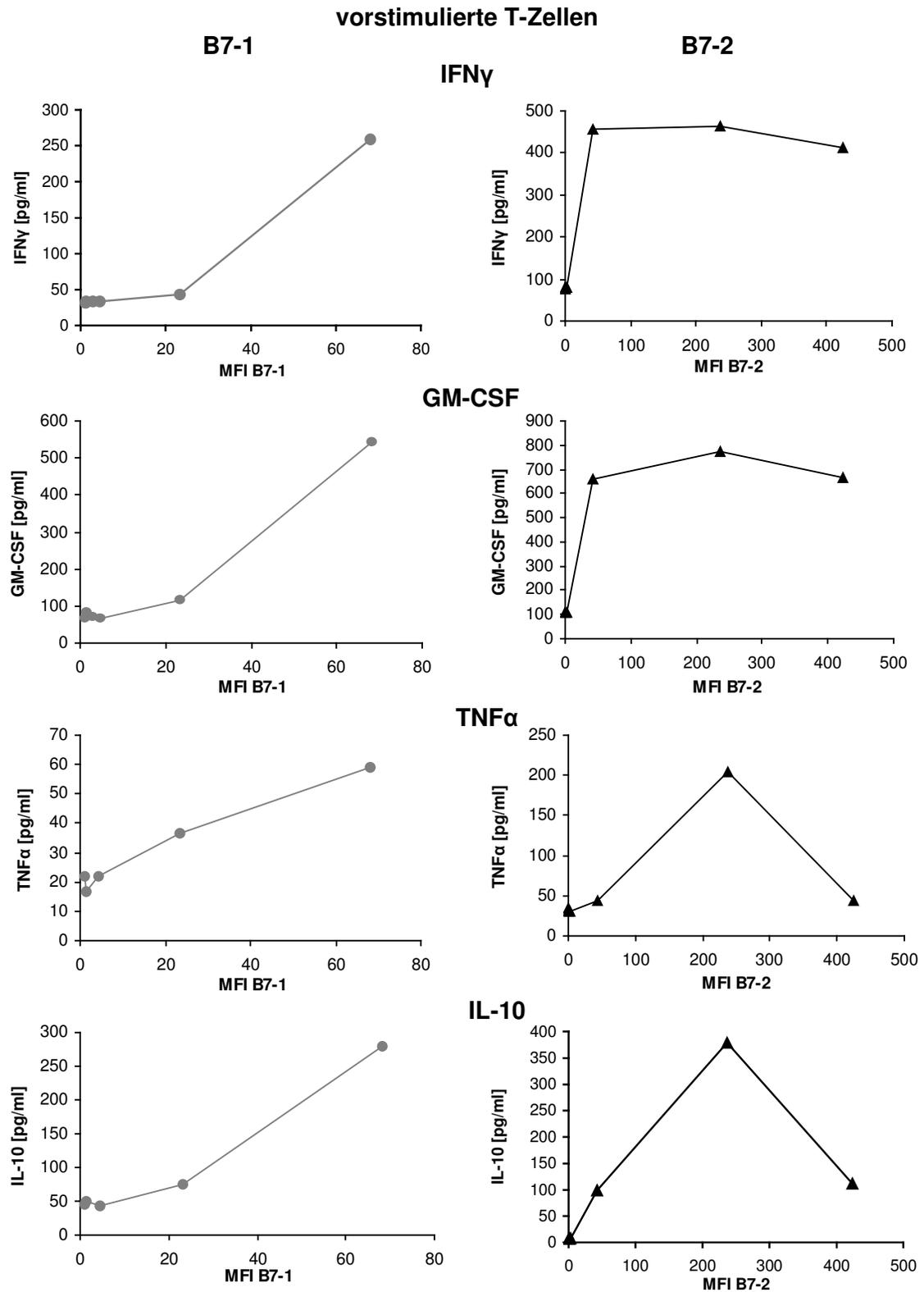


Abb. 42 Die Zytokinproduktion vorstimulierter T-Zellen ist abhängig von der B7 Expression der Tumorzellen
 OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen wurden mit fixierten MZ1257RC, Vektorkontroll- und B7 transfizierten Tumorzellen für 48h inkubiert. Anschließend wurden ELISA Analysen auf die Produktion von IFN γ , GM-CSF, TNF α und IL-10 durchgeführt. Die Ergebnisse beim Einsatz von B7-1 Transfektanten sind in der linken und die Ergebnisse beim Einsatz von B7-2 Transfektanten in der rechten Spalte dargestellt. Die erhaltenen Werte wurden gegen die B7 Oberflächenexpression der eingesetzten Tumorzellen, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit den Antikörpern B7-1 FITC bzw. B7-2 PE, aufgetragen. Entsprechung der B7-Oberflächenexpression der Tumorzellen sind dies daher von links nach rechts gesehen die Werte der T-Zell Stimulationen mit MZ1257RC (wt), Vektorkontrolle und B7-1 bzw. B7-2 Klon 1, Klon 2, Klon 3 und Klon 4.

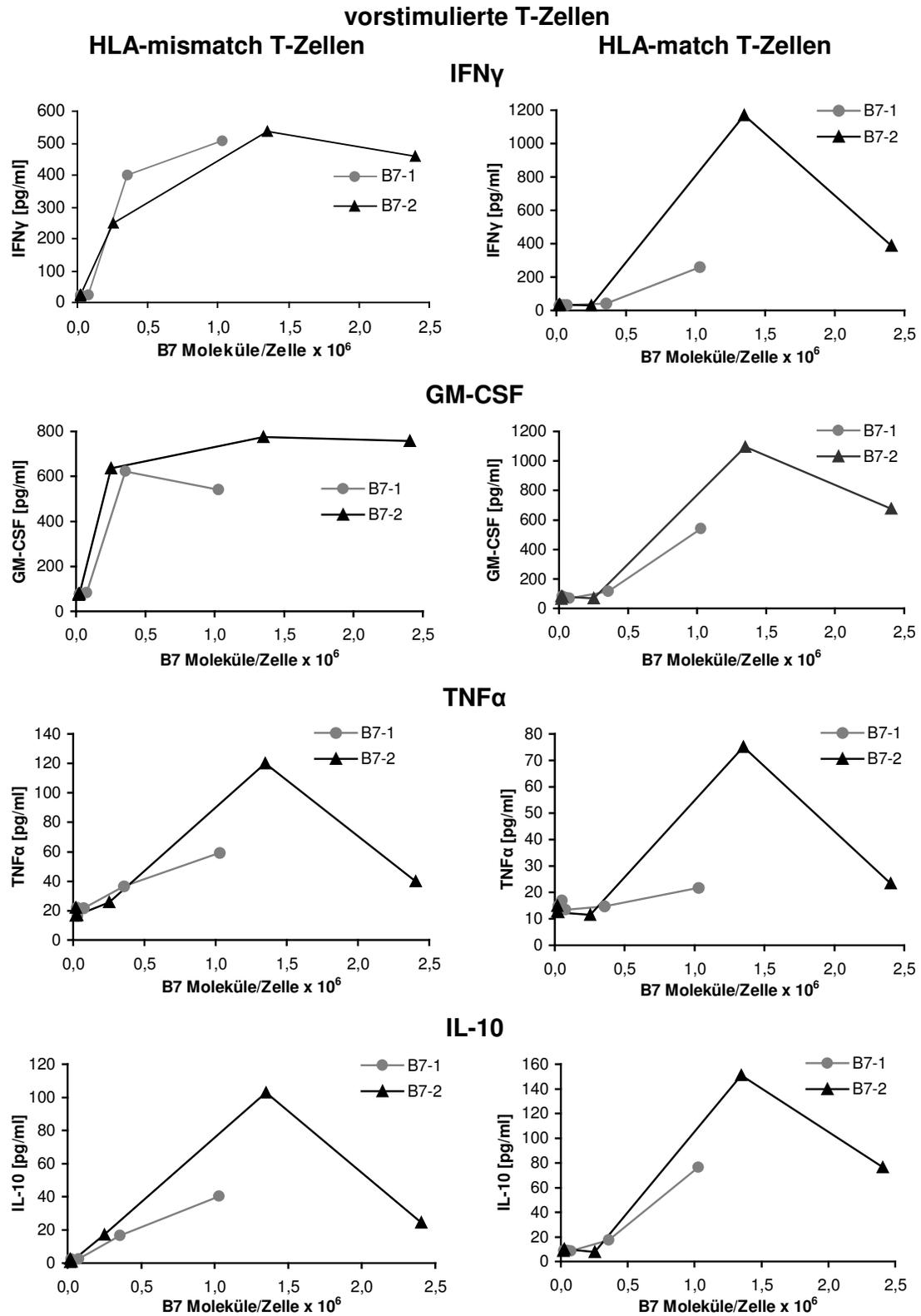


Abb. 43 Zytokinproduktion stimulierter T-Zellen ist abhängig von B7-1 bzw. B7-2 und dem HLA-Phänotyp

OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen wurden mit fixierten B7 transfizierten Tumorzellen für 48h inkubiert. Anschließend wurden ELISA Analysen für IFN γ , GM-CSF, TNF α und IL-10 durchgeführt. Die Versuche wurden mit HLA-A2* ungematchten T-Zellen (linke Spalte) und HLA-gematchten T-Zellen (rechte Spalte) durchgeführt. Die Ergebnisse beim Einsatz von B7-1 und B7-2 Transfektanten sind gemeinsam dargestellt, aufgetragen gegen die B7 Molekülzahl pro Zelle. Entsprechung der B7-Oberflächenexpression der Tumorzellen sind dies daher von links nach rechts gesehen die Werte der T-Zell Stimulationen mit MZ1257RC (wt), Vektorkontrolle und B7-1 bzw. B7-2 Klon 1, Klon 2, Klon 3 und Klon 4.

Durch den Einsatz von Antikörpern gegen HLA-ABC, B7-1 und B7-2 konnte die Zytokinsekretion von T-Zellen, die durch B7-Transfektanden stimuliert wurden, deutlich reduziert werden (Abb. 44). Da sich in den Versuchen zur T-Zell Proliferation (V.1.1.3.) sowie den ELISA-Analysen die Transfektanden B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3 als beste Stimulatoren der T-Zell Aktivierung und darüber hinaus als gut vergleichbar gezeigt haben, wurden die Blockadeversuche auf diese B7-Transfektanden beschränkt. Als Kontrollen wurden die Wildtyp Zelllinie MZ1257RC und die Vektorkontrolltransfektande eingesetzt. Durchschnittlich war es mit jedem Antikörper möglich, 50% der Zytokinsekretion spezifisch zu blockieren.

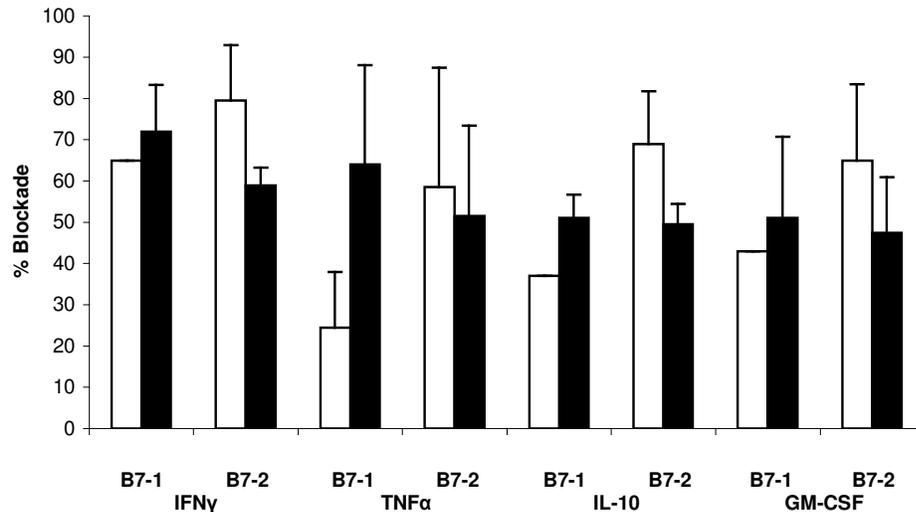


Abb. 44 Blockade der Zytokinsekretion durch HLA und B7 Antikörper

Vorstimulierte T-Zellen wurden in MLTC-Versuchen mit fixierten Tumorzellen B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3 eingesetzt. Vor Beginn der Stimulation wurden die fixierten Tumorzellen für 3h mit einem anti HLA- (W6/32, weiß) oder mit anti B7-Antikörpern (schwarz) inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die IFN γ , TNF α , IL-10 und GM-CSF Zytokinsekretion mittels ELISA bestimmt und die prozentuale Blockade der Produktion berechnet.

Durch den Einsatz eines CTLA-4 Ig Fusionsproteins konnte die IFN γ Sekretion aktivierter T-Zellen in Abhängigkeit von der Menge an eingesetzten CTLA-4 Ig blockiert werden. Es zeigte sich hier eine erheblich bessere Blockade der Stimulierung mit B7-1 Transfektanden gegenüber der Stimulierung mit B7-2 Transfektanden (Abb. 45). Dieser Unterschied um den Faktor 3 entsprach hierbei ungefähr dem Unterschied der Bindungsaffinitäten von CTLA-4 für B7-1 bzw. B7-2.

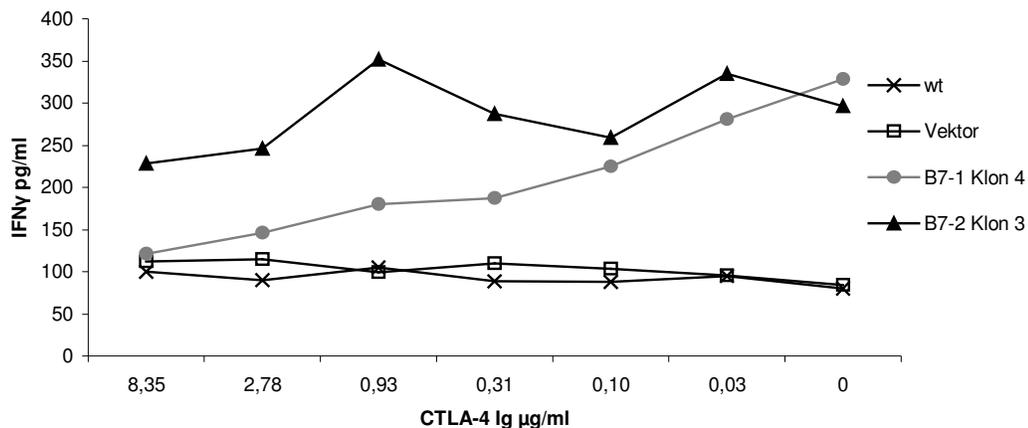


Abb. 45 Blockade der IFN γ Sekretion durch CTLA-4 Ig

Vorstimulierte T-Zellen wurden in MLTC-Versuchen mit fixierten MZ1257RC, Vektorkontroll-, B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3 Tumorzellen eingesetzt. Vor Beginn der Stimulation wurden die fixierten Tumorzellen für 3h mit CTLA-4 Ig in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die Zytokinsekretion mittels ELISA bestimmt und gegen die Menge an eingesetztem CTLA-4 Ig aufgetragen.

1.1.5. Zytotoxische Aktivität B7 aktivierter T-Zellen

Zur Analyse der zytotoxischen Aktivität wurden T-Zellen, wie schematisch in Abb. 32 dargestellt, dreimal stimuliert. Die Analysen der zytotoxischen Aktivität wurden analog zu den Blockierungsversuchen von Proliferation und Zytokinsekretion auf die Transfektanden B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3 beschränkt. Als Kontrollen wurden die Wildtyp Zelllinie MZ1257RC und die Vektorkontrolltransfektande eingesetzt. Zielzelle für die T-Zell vermittelte Lyse war die Wildtyp Zelllinie MZ1257RC.

Im Verlaufe der Restimulationen zeigte sich deutlich, dass die T-Zell Kulturen, die mit den B7-1 Transfektanden inkubiert wurden, am stärksten und am längsten proliferierten. In diesen Kulturen zeigte sich unter dem Mikroskop auch die schnellste und stärkste Zerstörung der zur wöchentlichen Restimulation eingebrachten Tumorzellen. Nach 4h war die Lyserate meist noch sehr gering und steigerte sich nach 24h. Die T-Zellen, die mit den B7 exprimierenden Zellen stimuliert wurden, zeigten eine deutlich stärkere Lyse der Wildtypzelllinie, als die T-Zellen, die ohne B7 stimuliert wurden (Abb. 46).

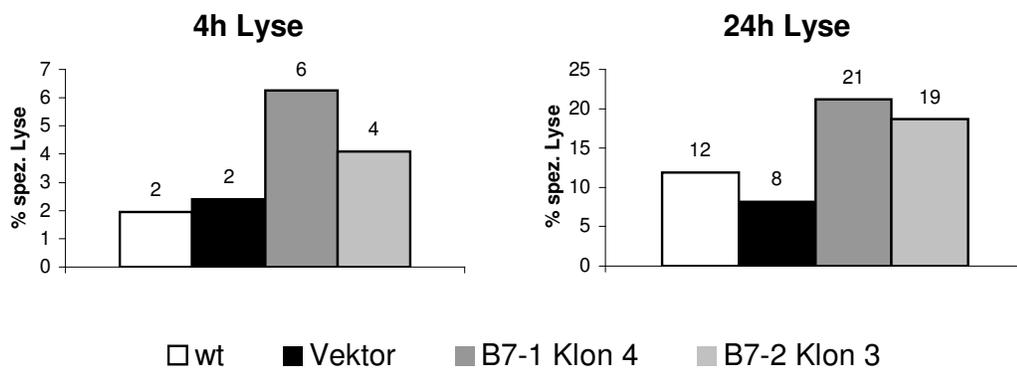


Abb. 46 Zytotoxizitätsanalysen aktivierter T-Zellen nach Stimulierung mit B7-Transfektanden

HLA-ungematchte T-Zellen wurden dreimal stimuliert mit den fixierten MZ1257RC (wt), Vektorkontroll-, B7-1 Klon 4 und B7-2 Klon 3 Tumorzellen. Danach wurde bei allen Kulturen die Zellzahl eingestellt und ihre zytotoxische Aktivität gegen die Wildtyp Zelllinie MZ1257RC über LDH-Freisetzung bestimmt. Die spezifische Lyse wurde durch Einbeziehung der Spontanlysen von T-Zellen und Tumorzellen bestimmt.

1.2. Klinische Studie mit B7 modifizierten Tumorzellen

1.2.1. Klinische Studie – Konzept und Protokoll

Zur Therapie von Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom wurde ein Protokoll für eine klinische Pilotstudie entwickelt.

Unter dem Titel *“Therapeutic vaccination with B7-modified allogenic tumor cells and GM-CSF (Leucomax®) as adjuvant in patients with metastatic renal cell cancer”* (Seliger und Kronfeld, 2003) soll diese Studie im Tumorzellvaccinationszentrum der Uniklinik Mainz durchgeführt werden.

In dieser klinischen Pilotstudie sollen HLA-A2⁺ Patienten mit fortgeschrittenem metastasierendem Nierenzellkarzinom durch subkutane Injektion von B7-modifizierten allogenen MZ1257RC Zellen und GM-CSF behandelt werden. Die GLP (*good laboratory practice*) -Prüfung und die GMP (*good manufacturing practice*) -Produktion des zellulären Vakzins wurden von der Fa. Q-One Biotech Ltd. in Glasgow, UK übernommen (siehe V.1.2.2.).

Primäres Ziel ist dabei zunächst die Sicherheit, Toxizität und Durchführbarkeit dieses Therapieansatzes zu bestimmen. Weitere Ziele sind festzustellen, (i) ob es durch die B7 Vakzinierung zu einer Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen kommt, (ii) ob Unterschiede zwischen der Stimulation mit B7-1 und B7-2 feststellbar sind und (iii) ob es zu einer Verbesserung der klinischen Situation des Patienten kommt.

16 Patienten sollen neun mal eine Injektion eines zellulären B7-Vakzins (Produktion, Bestrahlung und weitere Vorbehandlung siehe V.1.2.2 und V.1.2.3) erhalten. Diese Verabreichung ist in einen festen Zyklus von Untersuchungen und weiteren Maßnahmen eingebettet und wird in zweiwöchigen Intervallen durchlaufen werden (siehe Abb. 47).

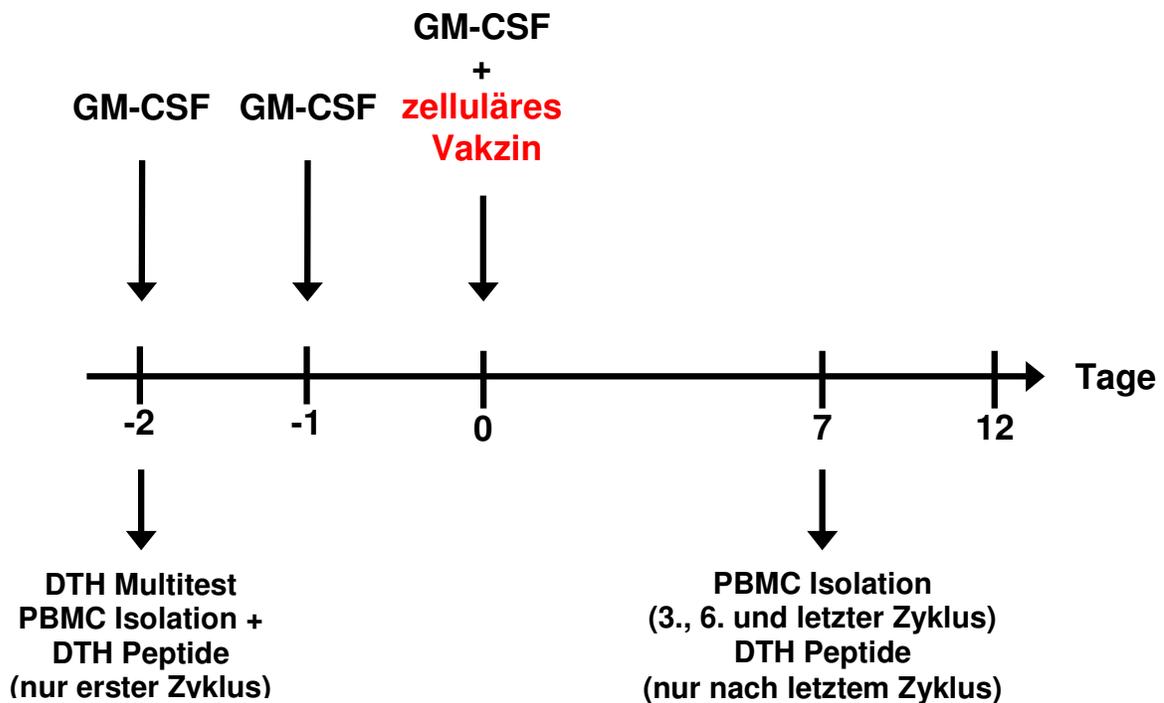


Abb. 47 Vakzinierungszyklus für den klinischen Einsatz des zellulären B7 Vakzins

Ein Vakzinierungszyklus dieser Studie dauert 14 Tage und soll insgesamt neun mal von jedem Patienten durchlaufen werden, wobei die Patienten am Tag 0 das zelluläre Vakzin zusammen mit GM-CSF erhalten. GM-CSF erhalten die Patienten auch schon am Tag -2 bzw. -1 vor Verabreichung des Vakzins. An Tag -2 wird ein DTH Multitest durchgeführt und die DTH-Reaktion am Tag 0 abgelesen. An Tag -2 des ersten Zyklus und an Tag 7 des letzten Zyklus werden Peptide von p53, mdm2 und HER2/neu unter die Haut injiziert und die DTH Reaktion zwei Tage später abgelesen. Am Tag -2 des ersten Zyklus und an Tag 7 nach dem dritten, sechsten und letzten Zyklus werden außerdem PBMC isoliert und asserviert.

Neben dem zellulären Vakzin werden die Patienten zusätzlich GM-CSF (Leucomax®) als Adjuvanz erhalten. Dadurch soll die Zahl der professionellen antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen und Makrophagen) am Ort der Vakzinverabreichung erhöht werden. In anderen klinischen Studien hat dies das Auftreten zytotoxischer T-Zellen gefördert (Jaeger et al., 1996).

Die allgemeine Fähigkeit des Immunsystems des Patienten, Immunantworten aufzubauen, wird regelmäßig durch eine Standard DTH (*delayed-type-hypersensitivity*) Überempfindlichkeitshautreaktion getestet werden. Bei diesem kommerziellen Test (Multitest) werden 8 Standardantigene eingesetzt und die Immunreaktion 48h nach Antigenverabreichung bestimmt.

Zu Beginn der Studie und 7 Tage nach der letzten Immunisierung sollen antigene Peptide der Tumorantigene p53, mdm2 und HER2/neu verabreicht werden. Der Vergleich der DTH-Reaktion der Patienten auf diese Peptide vor und nach Vakzinierung soll dann erste Hinweise auf den Erfolg der Vakzinierung geben.

Regelmäßig während der Vakzinierungszyklen werden Blutproben genommen aus denen die PBMC isoliert werden. Mit einem IFN γ ELISPOT wird dann der Aktivierungsstatus der T-Zellen nach Vakzinierung bestimmt.

Sicherheit und Toxizität der Therapie werden streng nach den Empfehlungen der WHO analysiert, kontrolliert und dokumentiert.

Die klinische Situation wird ausführlich vor Therapiebeginn, nach 9 Wochen, nach Abschluss der Therapie und nachfolgenden Intervallen ermittelt und die Veränderung bestimmt und bewertet.

Nach Abschluss der kompletten Studie und Analyse aller Ergebnisse soll dann über eine Fortführung, Ausweitung bzw. Veränderung, auch basierend auf Ergebnissen aus V.1.1., entschieden werden. Zur Zeit wird über Protokoll von verschiedenen Ethikkommissionen überprüft.

1.2.2. Zellproduktion und -kontrolle

Die GLP (*good laboratory practice*) - Prüfung und die GMP (*good manufacturing practice*) - Produktion des zellulären Vazins wurden von der Fa. Q-One Biotech Ltd. in Glasgow, UK übernommen. Dafür wurden die unklonierten Kulturen der B7-1 und B7-2 Transfektanden von MZ1257RC in je 35 Kryogefäßen kryokonserviert. Von diesen Konserven wurden dann je 10 Gefäße versandt. Die anderen Kryokonserven wurden für weitere Untersuchungen aserviert.

Nach ausführlichem Testen u.a. auf Sterilität, Retroviren, HIV, CMV, EBV, HBV, HCV, Herpesviren, Schweineviren, Rinderviren, Mycoplasmen, Viabilität und Ausbeute nach Auftauen wurden von Q-One Biotech zwei Master Zellbanken (MCB) etabliert, jeweils 100 Kryogefäße mit 5×10^6 Zellen abgefüllt und in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zur Kontrolle der Zellproduktion wurden jeweils drei Kryokonserven der MCB direkt angefordert. Nach Kontrolle und Protokollierung der ordnungsgemäßen Beschriftung wurden die Zellen gezählt und in Kultur genommen.

Die in Kultur genommenen Zellen zeigten ein gutes Wachstum und die FACS-Analysen der Überexpressionen von HLA- und B7 Molekülen entsprachen der Erwartung (Abb. 48). Die unklonierten Zelllinien zeigten ihr heterogenes B7 Expressionsmuster. Auch die RT-PCR Analysen auf die RNA-Expression von Tumorantigenen ergaben die erwarteten guten Ergebnisse für p53, mdm2 und HER2/neu (Abb. 49), ebenso wie die FACS-Analysen auf die Expressionen der costimulatorischen Moleküle ICAM-1, LFA-3 und CD40 (Abb. 50). Auch die erwartete IFN γ abhängige Hochregulation der ICAM-1 und CD40 Expression konnte beobachtet werden.

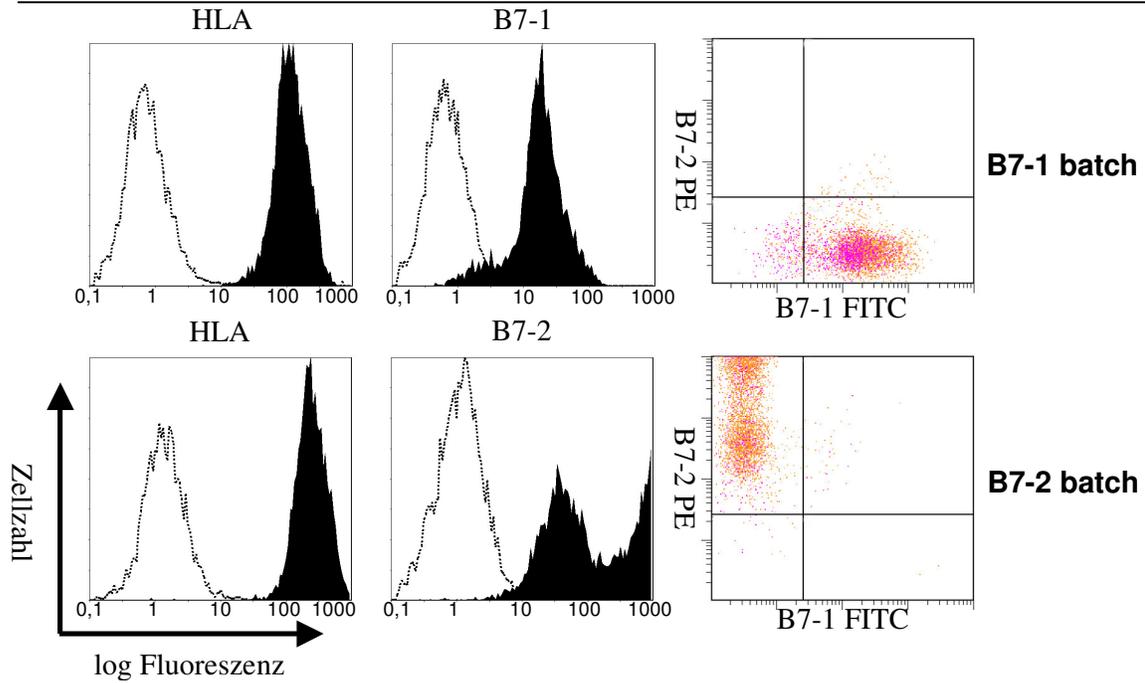


Abb. 48 HLA- und B7-Oberflächenexpression der MZ1257RCB7-1 und B7-2 batch Kulturen
 Die B7-1 und B7-2 Zelllinien der MCB wurden mit den Antikörpern IgG- μ , anti HLA-ABC, anti B7-1 FITC und anti B7-2 PE inkubiert. Die Daten für FACS Analysen der B7-1 Kultur sind oben und die Daten der B7-2 Kultur unten dargestellt. In den Spalten links und mitte sind FACS Analysen mit je einem Antikörper und in der rechten Spalte eine B7-1/B7-2 Doppelfärbung dargestellt.

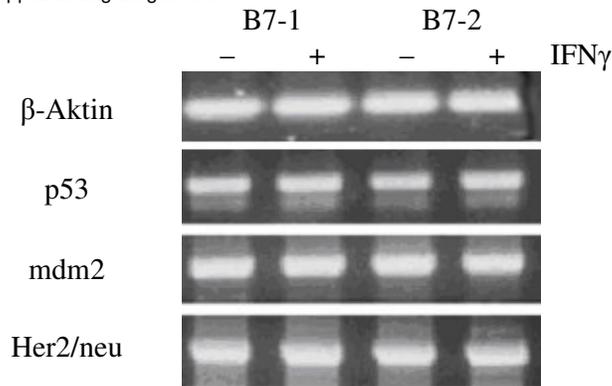


Abb. 49 Tumorantigenexpression von MZ1257RCB7-1 und B7-2 batch Kulturen
 Die Tumorzelllinien MZ1257RC B7-1 MCB und B7-2 MCB wurden nach GMP-Produktion in Kultur genommen und mit und ohne IFN γ mittels RT-PCR auf ihre Tumorantigenexpression hin untersucht. Als Kontroll-PCR wurde eine β -Aktin PCR durchgeführt.

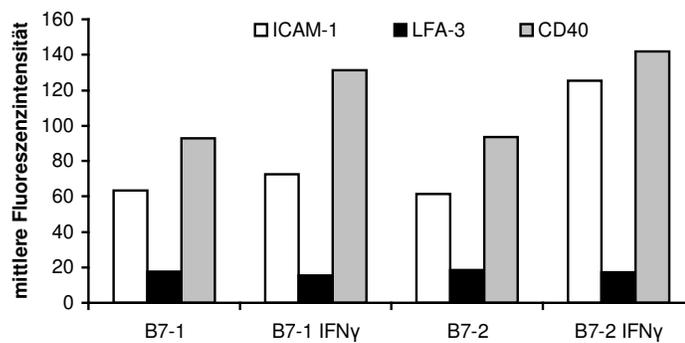


Abb. 50 Oberflächenexpression von ICAM-1, LFA-3 und CD40 auf MZ1257RCB7-1 und B7-2 batch Kulturen
 Die Tumorzelllinien MZ1257RC B7-1 MCB und B7-2 MCB wurden nach GMP-Produktion in Kultur genommen und mit den Antikörper ICAM-1 FITC, LFA-3 FITC und CD40PE inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächenexpressionen in einer FACS-Analyse bestimmt und als Balkendiagramm dargestellt.

1.2.3. Entwicklung und Verifizierung der SOP

Damit die produzierten Zellen als zelluläres Vakzin eingesetzt werden können, war es unter anderem notwendig, eine SOP (*standard operating procedure*) für den Ablauf Auftauen - Bestrahlen - Verabreichung zu etablieren.

Das von Q-One Biotech eingesetzte Auftauprotokoll wurde den örtlichen Gegebenheiten angepasst und bezüglich der eingesetzten Materialien modifiziert (siehe Anhang X. 3. SOP Behandlung und Verabreichung des zellulären B7-Vakzins).

Mit diesem Protokoll für die klinische Anwendung wurden dann auch die weiteren Versuche zur Ermittlung der optimalen Strahlendosis durchgeführt.

In diesen Versuchen sollte ein Strahlendosis für die Bestrahlung des zellulären Vakzins festgelegt werden, die garantiert, dass den Patienten keine teilungsfähigen Zellen verabreicht werden. Dabei sollten die immunstimulierenden Eigenschaften der Zellen möglichst gut erhalten bleiben.

Für diese Versuche standen neben den Kryokonserven der ursprünglichen, unklonierten Kulturen jeweils drei Kryokonserven der beiden Master-Zellbanken zur Verfügung. Zur Bestrahlung konnte die, auch für die klinische Studie vorgesehene, GMP-Bestrahlungseinheit der Blutbank Mainz benutzt werden.

Nach den Bestrahlungen wurden die Zellen in Kultur genommen, ihre metabolische Aktivität (MTS-Test), ihre Proliferation (BrdU-ELISA) und ihre Oberflächenexpression von HLA- und B7-Molekülen bestimmt (Abb. 51-56).

Da diese Studie eine der ersten Studien mit zellulären Vakzinen in Deutschland ist, lagen hier noch keine genauen Erkenntnisse über eine effektive Strahlendosis vor. Auch in der internationalen Literatur fanden sich keine klaren Hinweise (Galligioni et al., 1996; Simons et al., 1997; Plautz et al., 1999; Seigne et al., 1999; Li et al., 2000; Nelson et al., 2000; Kusumoto et al., 2001).

Daher wurden zunächst breit gefächert Bestrahlungsdosen von 0Gy, 60Gy, 120Gy, 180Gy, 240Gy und 300Gy getestet (Abb. 51-53).

Für diesen ersten Versuch wurden Kryokonserven der ursprünglichen, unklonierten B7-1 Kultur eingesetzt.

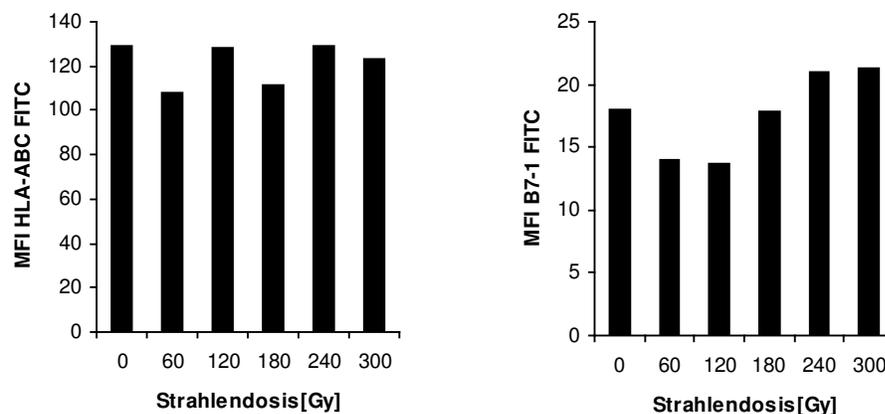


Abb. 51 Unveränderte Oberflächenexpression von HLA und B7-1 nach Bestrahlung

MZ1257RC B7-1 Zellen wurden mit verschiedenen Dosen von 0-300Gy bestrahlt, gewaschen, mit den Antikörpern anti HLA-ABC FITC und anti B7-1 FITC inkubiert und im FACS analysiert. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten wurden in einem Balkendiagramm gegen die eingesetzte Strahlendosis aufgetragen. Auf der linken Seite sind die Fluoreszenzdaten des HLA-ABC FITC Antikörpers und auf der rechten Seite die Daten des B7-1 FITC Antikörpers dargestellt.

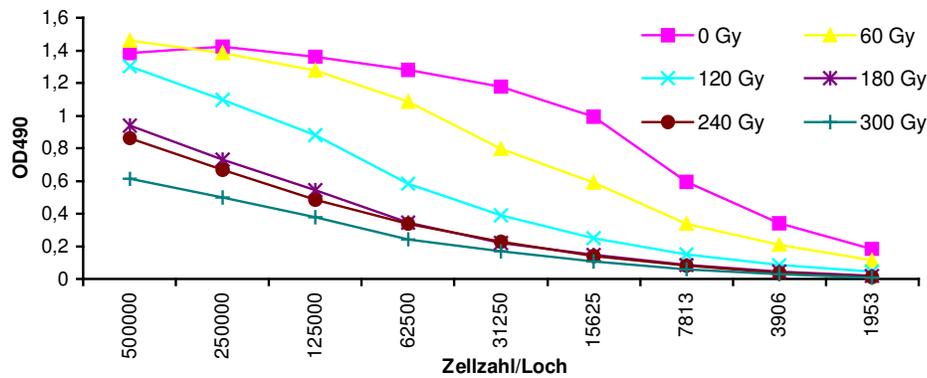


Abb. 52 Reduktion der metabolische Aktivität von MZ1257RC B7-1 batch Zellen nach Bestrahlung

MZ1257RC B7-1 Zellen wurden mit verschiedenen Dosen von 0-300Gy bestrahlt, gewaschen, die Zellzahl eingestellt und in 96-Loch Mikrotiterplatten (MTP) in Verdünnungsreihen ausgesät. Nach 24h wurden mit dem MTS-Test die metabolischen Aktivitäten bestimmt und als OD490 gegen die Zellzahl pro Loch aufgetragen.

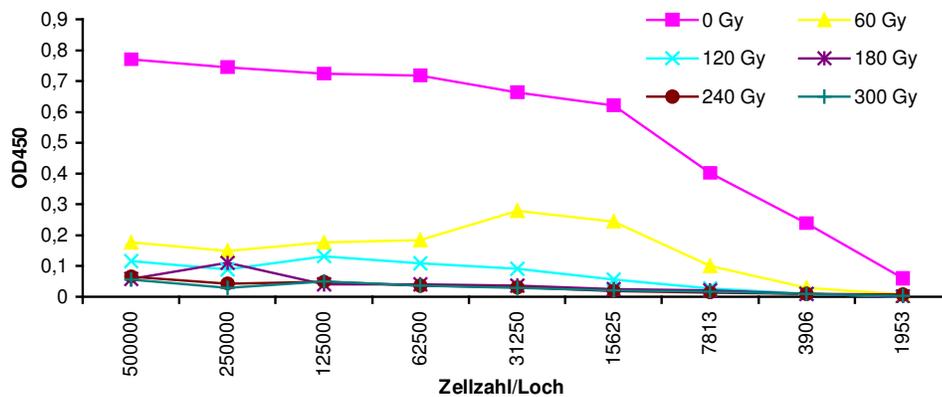


Abb. 53 Fehlende Proliferation von MZ1257RC B7-1 batch nach Bestrahlung

MZ1257RC B7-1 Zellen wurden mit verschiedenen Dosen von 0-300Gy bestrahlt, gewaschen, die Zellzahl eingestellt und in 96-Loch Mikrotiterplatten (MTP) in Verdünnungsreihen ausgesät. Nach 24h wurde mit dem BrdU-ELISA die Proliferation der Zellen bestimmt und als OD450 gegen die Zellzahl pro Loch aufgetragen.

Die FACS-Kontrollanalysen zeigten nach der Bestrahlung kaum veränderte Oberflächenexpressionen von HLA- und B7-1 Molekülen bei Strahlendosen von 0-300Gy (Abb. 51). Der MTS-Test offenbarte in allen Zellen dosis-abhängig metabolische Aktivität (Abb. 52), während die Zellproliferation schon ab 60Gy erheblich reduziert und bei 180Gy fast nicht mehr nachweisbar war (Abb. 53). In den Zellkulturen zeigten sich nach 5 Tagen Kulturdauer in den Kulturen, die eine Strahlendosis über 120Gy erhalten hatten, fast keine adhärenenten vitalen Zellen mehr. In Analogie wurde dieser Versuch mit einem eingeschränkten Spektrum an Strahlendosen (120-210Gy) und Kryokonserven der ursprünglichen, unklonierten B7-2 Kultur wiederholt. Auch hier zeigte sich, dass 180Gy eine günstige Dosis waren.

Daher wurde nun der komplette Durchlauf der SOP mit Kryokonserven der MCB von Q-One von B7-1 und B7-2 und einer Bestrahlungsdosis von 180Gy getestet (Abb. 54-56) zweimal getestet.

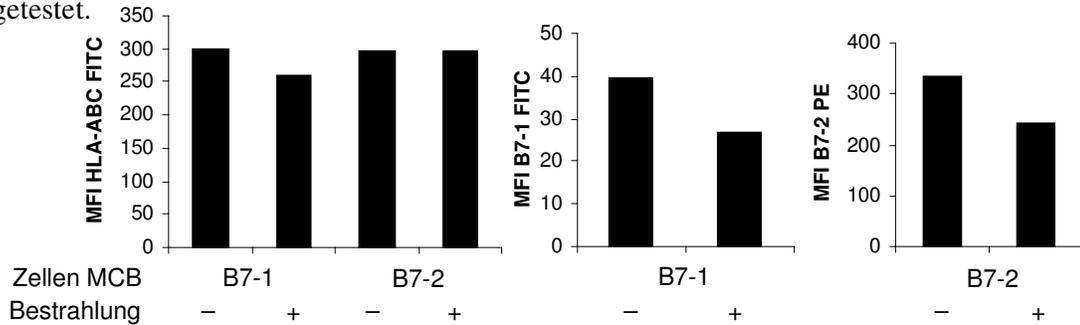


Abb. 54 FACS-Analyse von MZ1257RC MCB B7-1 und B7-2 nach Bestrahlung mit 180Gy

B7 Transfektanten der MCB wurde ohne und mit Bestrahlung von 180Gy mit den Antikörpern anti HLA-ABC FITC, anti B7-1 FITC und anti B7-2 PE inkubiert und im FACS analysiert. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) wurden bestimmt und als Balkendiagramm dargestellt.

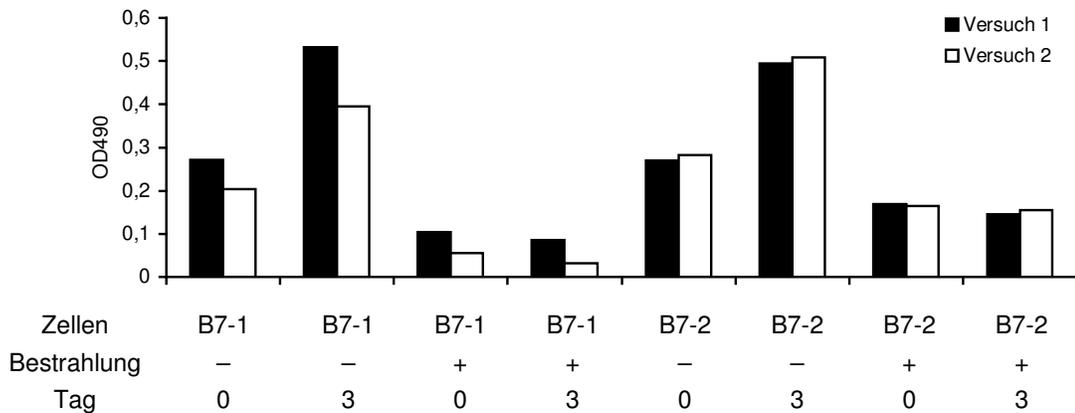


Abb. 55 Reduzierte metabolische Aktivität von MZ1257RC MCB B7-1 und B7-2 nach Bestrahlung mit 180Gy

B7 Transfektanten der MCB wurde ohne und mit Bestrahlung von 180Gy in 96-Loch Platten ausgesät. An Tag 0 und Tag 3 wurde mit dem MTS-Test die metabolische Aktivität als OD490 bestimmt und als Balkendiagramm aufgetragen. Die Daten von zwei unabhängigen Versuchen (Versuch 1 weiß, Versuch 2 schwarz) sind hier dargestellt.

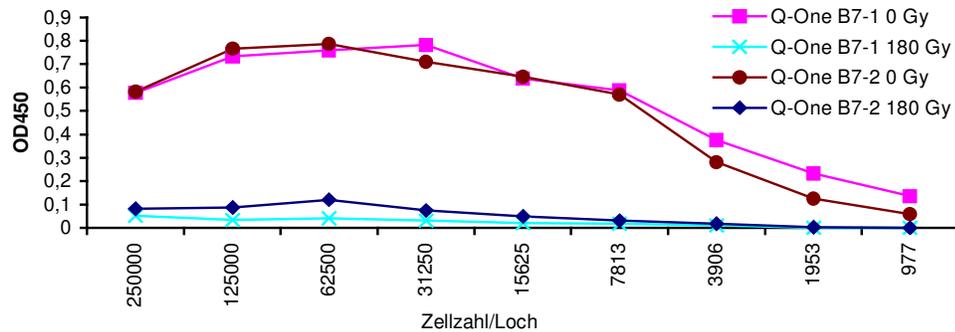


Abb. 56 Fehlende Proliferation von MZ1257RC MCB B7-1 und B7-2 nach Bestrahlung mit 180Gy

B7 Transfektanten der MCB wurde ohne und mit Bestrahlung von 180Gy in 96-Loch Platten in Verdünnungsreihen ausgesät. Nach 24h wurde mit dem BrdU-ELISA die Proliferation als OD450 bestimmt und gegen die Zellzahl pro Loch aufgetragen.

Die Ergebnisse dieser beiden Versuche zeigten ein leichte Reduktion der B7-Oberflächenexpression in beiden Durchläufen (Abb. 54). Ob dies einen Einfluss auf die T-Zell stimulierenden Eigenschaften der B7 Transfektanten haben könnte, sollte eine nachfolgender T-Zell Stimulierungsversuch zeigen. In den MTS-Tests zeigte sich eine geringe, aber gut nachweisbare metabolische Aktivität der bestrahlten Zellen, die von Tag 1 zu Tag 3 nicht zunahm (Abb. 55). Zusammen mit den Proliferationsdaten aus dem BrdU-ELISA (Abb. 56) konnte deutlich gezeigt werden, dass nach Bestrahlung mit 180Gy keine teilungsfähigen Zellen mehr vorhanden sind. Mikroskopische Kontrollen der Kulturen konnten dies ebenfalls bestätigen.

Da die Zellzahl in den Kryokonserven für T-Zell Stimulierungsversuche nicht ausreichend waren, mussten die unbestrahlten Zellen von Q-One Biotech für zwei Passagen in Kultur genommen werden, um die Funktion bestrahlter Zellen testen zu können.

Aus *buffy coat* Präparationen gesunder HLA-A2⁺ Blutspender wurden PBMC präpariert und je zwei Präparationen mit anti-CD3 (OKT3) und IL-2 vorstimuliert bzw. ohne Vorstimulation eingesetzt.

Die Vakzinzellen wurden nach der SOP mit 180Gy bestrahlt und im Verhältnis 1:10 mit den T-Zellen kultiviert (MLTC, *mixed lymphocyte tumor culture*). Nach 24 Stunden wurde ein MTS-Test und ein BrdU-ELISA durchgeführt. Dabei überlagerte der Hintergrund der bestrahlten Zellen die T-Zellaktivität. Somit lieferte nur der IFN γ ELISA der Kulturüberstände 48h nach Stimulationsbeginn aussagekräftige Daten (Abb. 57).

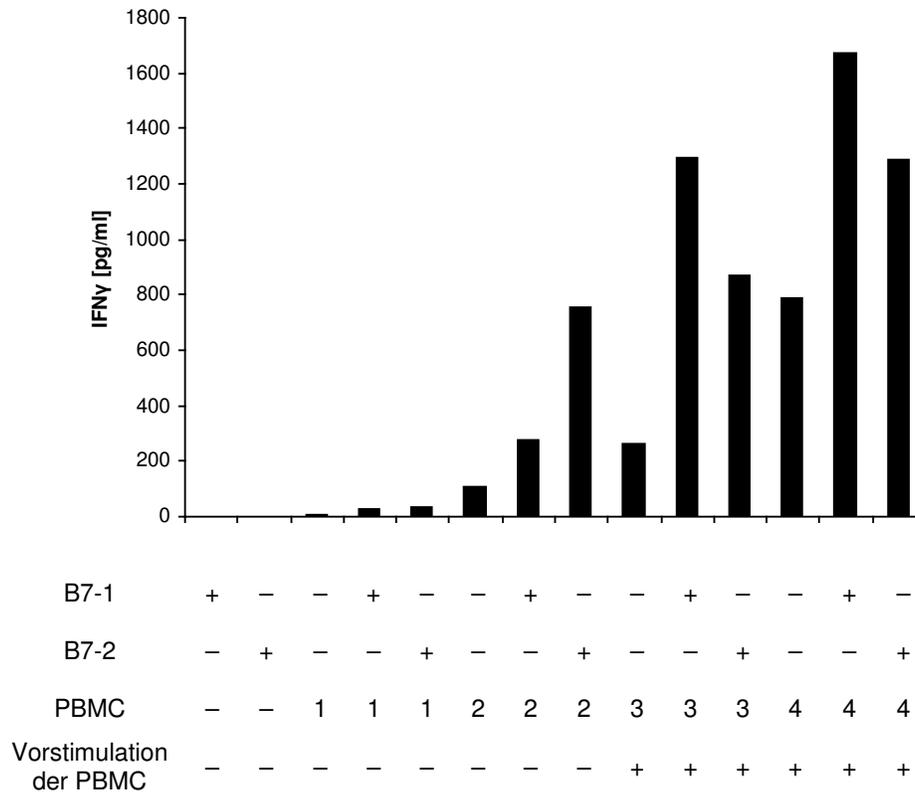


Abb. 57 PBMC produzieren IFN γ nach Stimulation mit bestrahlten B7 exprimierenden Tumorzellen

48h nach Beginn der MLTC zwischen bestrahlten B7-transfizierten MZ1257RC MCB von Q-One Biotech und PBMC von gesunden Spendern wurden die Kulturüberstände gewonnen und auf den Gehalt an IFN γ im ELISA analysiert. Die PBMC Präparationen 1 und 2 wurden nicht vorstimuliert, während die PBMC 3 und 4 für 5 Tage mit OKT3 und IL-2 vorstimuliert wurden. Als Kontrollen wurden bestrahlte Zellen alleine und unstimulierte PBMC mitgeführt.

Es zeigte sich in allen MLTC-Kulturen eine gesteigerte Produktion von IFN γ bei Kultur mit den 180Gy bestrahlten Vakzinzellen. Diese Werte entsprechen den Ergebnissen der parallelen Untersuchungen mit den B7-Zellklonen (V.1.1.). Somit konnte die Dosis von 180 Gy für die SOP festgelegt werden. Die komplette SOP, so wie sie im Sommer 2003 der Bundesärztekammer vorgelegt wurde, findet sich im Anhang X. 3.

2. Neue Wege der Immuntherapie mit Retroviren und Ribozymen ?

Die Entwicklung neuer Methoden zeigt auch für die Immuntherapie mögliche neue Wege auf. Der Einsatz retroviraler Vektorsysteme ermöglicht z.B. eine Transfektion von primären T-Zellen z.B. von Tumorpatienten und ist ebenfalls ein schneller effizientes System zur Transfektion von Tumorzellen.

Dadurch ist es möglich, neue Therapiekonzepte auf Seiten der Vakzinherstellung und auch einen Gentransfer in antigenspezifische T-Zellen zur Steigerung der Immunogenität umzusetzen.

Der Einsatz dieser Systeme hat auch den großen Vorteil, dass man hohe Transfektionsraten erreicht und damit auf Selektion der Zellen über Antibiotikaresistenzen verzichten kann. Dadurch hat man einerseits einen deutlichen Zeitgewinn gegenüber anderen Transfektionssystemen und andererseits wird die unspezifische Immunogenität deutlich verringert (Jung et al., 1998; Kühlcke et al., 2002).

2.1. Etablierung eines B7 retroviralen Transfektionssystems

Da sich der B7-Gentransfer in Nierenkarzinomzelllinien mit Hilfe eines plasmidbasierten Transfektionssystems zwar äußerst erfolgreich darstellt, aber langwierig ist und den Einsatz eines potentiell immunogenen Antibiotikaresistenzgens bedarf, wurde die Etablierung eines retroviralen Vektorsystems begonnen. Die Herstellung von retroviralen Kulturüberständen wurde in Zusammenarbeit mit der EUFETS AG Idar-Oberstein durchgeführt. Dies hat den Vorteil, dass die retroviralen Kulturüberstände auch für einen klinischen Einsatz zur Verfügung stehen können. Somit wäre eine klinische Umsetzung dieses Therapiekonzeptes sehr schnell möglich, was auch einen erheblichen Vorteil gegenüber dem Einsatz des plasmidbasierten Systems darstellt (siehe V.1.).

2.1.1. Retrovirale Transfektion mit B7 - der Weg zur individuellen Therapie ?

Ein Transfektionssystem, das eine schnelle, effektive Expression von B7-Molekülen auf der Zelloberfläche von Tumorzelllinien ermöglicht, würde die Chance bieten, das Therapiekonzept aus V.1. zu individualisieren, was zu einer wesentlich besseren Immunantwort mit weniger Nebenwirkungen führen sollte. Durch die Verbesserung der Etablierung von Nierenkarzinomzelllinien könnte man für jeden Patienten, bei dem die Kultur der operativ entfernten Tumorzellen gelingt, ein eigenes, spezifisches zelluläres Vakzin herstellen (Abb. 58). Werden die Tumorproben nach einem etablierten Protokoll verarbeitet, so gelingt es, ca. 50% der Ansätze dauerhaft in Kultur zu halten (Bukur, persönliche Mitteilung). Ein individuelles zelluläres Vakzin hätte gegenüber dem MZ1257RC Vakzin einige Vorteile. Durch den kompletten HLA-Match würde die Abstoßungsreaktion erheblich länger dauern und somit hätte das Vakzin eine deutlich längere Wirkzeit, was die Chancen auf eine effektive Immunantwort erhöht. Ein individuelles Vakzin stellt weiterhin das optimale Target für antigenspezifische T-Zellen dar, da Vakzin und Tumorzellen bis auf die gentechnische Modifikation mit B7 identisch sind und damit alle vorhandenen Tumorantigene präsentiert werden. Beim Einsatz des MZ1257RC Vakzins dagegen stehen für die T-Zell Aktivierung nur die Tumorantigene zur Verfügung, die von MZ1257RC über HLA-A2 präsentiert werden.

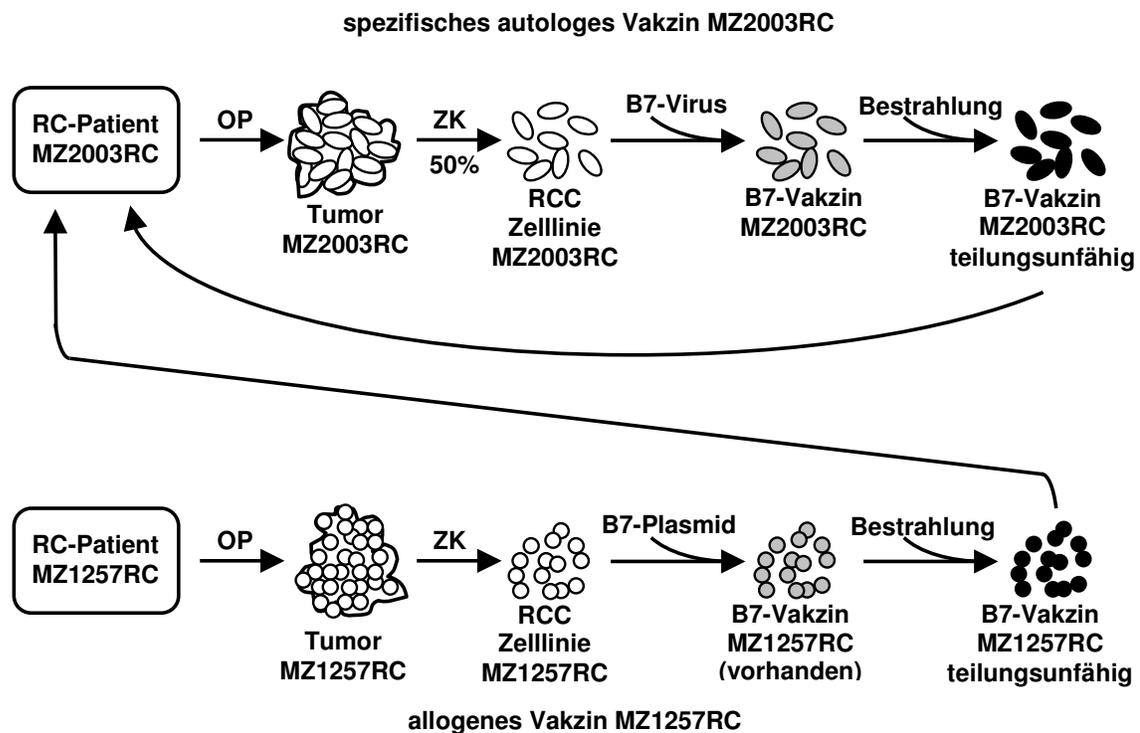


Abb. 58 Vakzin Herstellung: Vergleich autologes gegen allogenes Vakzin

Nach Etablierung des retroviralen B7-Transfektionssystems würden für 50% der Nierenkarzinompatienten (hier z.B. MZ2003RC) zwei Vakzine zur Verfügung stehen. Das individuelle, autologe, neu hergestellte B7 Vakzin (hier z.B. MZ2003RC) und das allogene, vorhandene B7 Vakzin MZ1257RC.

RC-Patient = Nierenkarzinompatient; OP = operative Entfernung des Nierenzellkarzinoms; ZK = Etablierung einer Zelllinie aus dem Nierenzellkarzinom in der Zellkultur; B7-Virus = retrovirale Transfektion mit B7; B7-Plasmid = B7 Transfektion mit B7-Plasmid

2.1.2. Transfektion mit GFP-exprimierenden Retroviren

Um für den retroviralen Gentransfer in Nierenkarzinomzellen das effizienteste System zu finden wurden Retroviren mit LTR (*long terminal repeat*) Bereichen verschiedener Viren auf ihre Transfektionseffizienz bei Nierenkarzinomzelllinien hin untersucht. Da für epitheliale Zellen noch keine Erkenntnisse über den Einsatz dieser LTR Bereiche (Hildinger et al., 1999) vorlagen, wurden Retroviren gewählt, die unterschiedliche Spezifitäten bei der Transfektion von hämatopoetischen Zellen gezeigt haben (Hu und Pathak, 2000; Engels et al., 2003).

Die Tumorzellen MZ1257RC und M2733RC wurden einmal mit retroviralen Kulturüberständen transfiziert, deren Retroviren unter der Kontrolle verschiedener LTR Bereiche GFP (*green fluorescent protein*) exprimieren können (Hildinger et al., 1999; Kühlcke et al., 2002; Baum et al., 2003). Mit diesem Protein, das im gleichen Wellenlängenbereich wie Fluorescein fluoresziert, kann man in FACS-Untersuchungen leicht die Transfektionseffizienz bestimmen.

Es zeigte sich, dass retrovirale Kulturüberstände, die Retroviren mit den LTR Bereichen des SFFV (*spleen focus forming virus*) enthalten, eine gute Transfektionseffizienz für Nierenkarzinomzelllinien hatten, während bei Transfektionen mit Retroviren die die LTR Bereiche von MPSV (*myeloproliferative sarcoma virus*) oder MoMuLV (*moloney murine leukemia virus*) enthielten, fast keine Transfektanden gefunden werden konnten (Tab. 8).

Tab. 8 Abhängigkeit der effektiven retroviralen Transfektion von Nierenkarzinomzellen von den LTR Bereichen

Zelllinie	Transfektionseffizienz von Retroviren mit den LTR Bereichen von		
	SFFV	MPSV	MoMuLV
MZ1257RC	17,5%	<1%	<1%
MZ2733RC	28%	<1%	<1%

2.1.3. Herstellung und Test retroviraler B7-Vektorsysteme

Basierend auf den plasmidbasierten Vektorsystemen und den Ergebnissen des GFP-Vorversuchs wurden von der Fa. EUFETS retrovirale Vektorsysteme zur Expression von B7-1 und B7-2 hergestellt. Beim Entfernen des Neomycingens wurde auch die IRES-site des Encephalomyocarditis Virus aus den pCMV Vektoren (Abb. 19-21) entfernt, und im B7-1/B7-2 Doppelexpressionsvektor fand nun die von der EUFETS AG eingebrachte IRES-site des NF- κ B repressing factor (NRF) Verwendung. Die hergestellten Vektoren tragen die Bezeichnungen pSFFV B7-1 für das B7-1 Expressionssystem, pSFFV B7-2 für das B7-2 Expressionssystem und pSFFV B7-1/B7-2 für das B7-1/B7-2 Doppelexpressionssystem (Abb. 59).

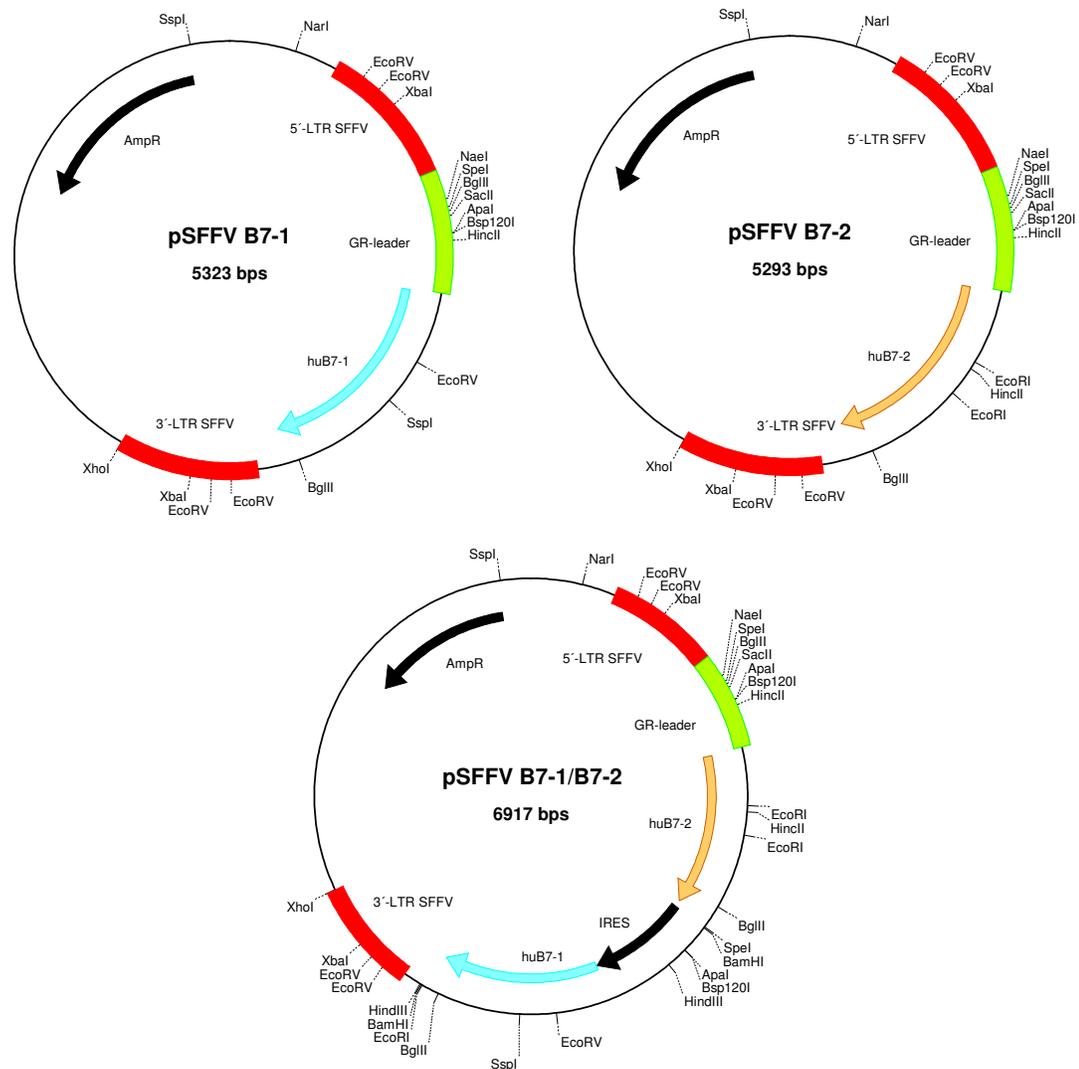


Abb. 59 retrovirale B7-Expressionssysteme

Aus den vorhandenen plasmidbasierten Vektorsystemen wurden die cDNA Moleküle von B7-1 und B7-2 in retroviralen Expressionssysteme kloniert. Dargestellt sind hier die Vektorkarten mit den wichtigsten Elementen und Restriktionsschnittstellen. Links oben der B7-1 Expressionsvektor, rechts oben der B7-2 Expressionsvektor und unten das B7-1/B7-2 Doppelexpressionssystem. LTR = long terminal repeat ; IRES = internal ribosome entry site

Um die Funktion der hergestellten Expressionssysteme zu testen, wurden die retroviralen Konstrukte über Lipofektion in COS7-Zellen transfiziert. Die Einzelexpressionssysteme pSFFV B7-1 und pSFFV B7-2 zeigten dabei eine gute Oberflächenexpression von B7-1 und B7-2 (Abb. 60). Der Doppelexpressionsvektor pSFFV B7-1/B7-2 zeigte in FACS-Analysen nur eine sehr geringe Expression von B7-1 und B7-2 auf der Oberfläche der COS7-Zellen.

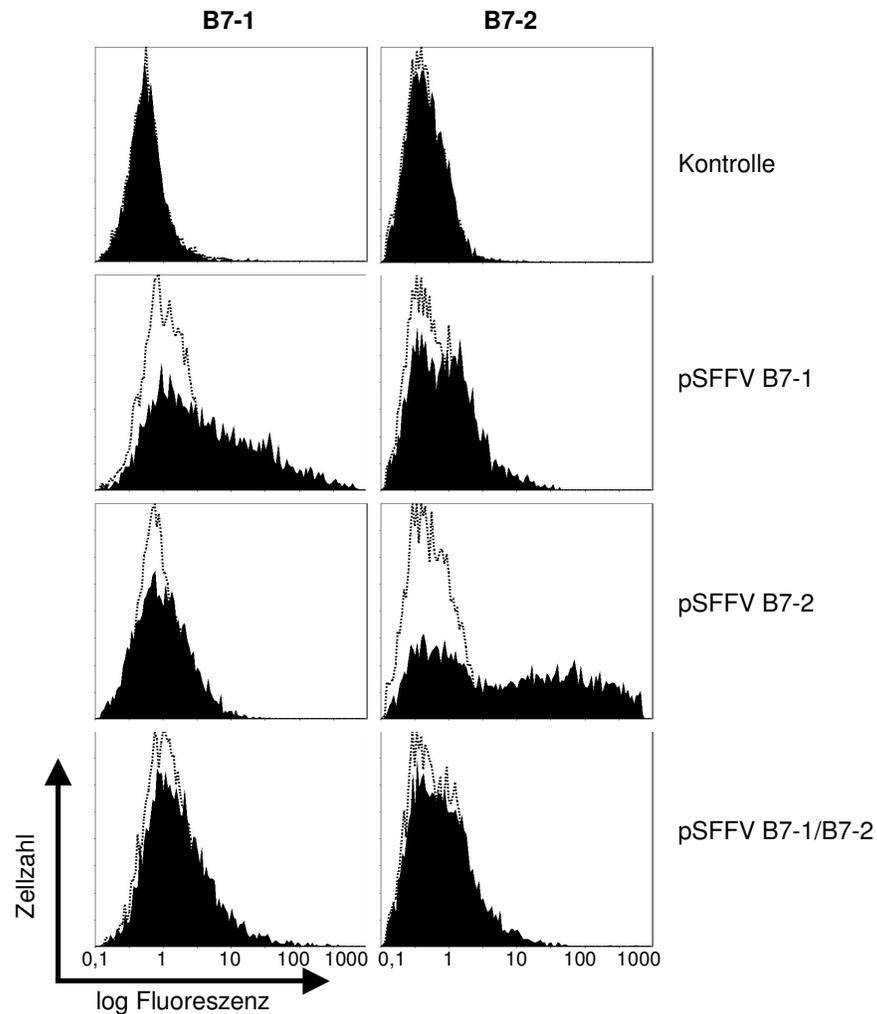


Abb. 60 Signifikante B7 Oberflächenexpression nach Lipofektion mit pSFFV B7-1 und pSFFV B7-2.

COS7-Zellen wurden durch Lipofektion mit den Plasmiden pSFFV B7-1, pSFFV B7-2 und pSFFV B7-1/B7-2 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit den Antikörpern IgG- μ , anti B7-1 FITC und anti B7-2 PE inkubiert und in FACS-Analysen untersucht. Als Kontrolle wurden parentale COS7-Zellen mitgeführt. In der linken Spalte sind die Histogramme der B7-1 Expressionsanalysen und in der rechten Spalte die Histogramme der B7-2 Expressionsanalysen dargestellt.

Die Plasmide pSFFV B7-1, pSFFV B7-2 und pSFFV B7-1/B7-2 wurden von der EUFETS AG in PG13-Verpackungszelllinien transfiziert (Ayuk et al., 1999; Kühlcke et al., 2002). Anschließend wurden verschiedene Klone isoliert, kultiviert und auf ihre Sezernierung von funktionellen Retroviren in den Kulturüberstand hin getestet. Es wurden jeweils ein Klon von pSFFV B7-1 und pSFFV B7-2 transfizierten Verpackungszelllinien und zwei Klone von pSFFV B7-1/B7-2 Verpackungszelllinien mit einer starken Retrovirussezernierung etabliert und retroviraler Kulturüberstand gewonnen (Abb. 15, III.4.7.).

2.2. Einsatz eines retroviralen B7-Transfektionssystems

2.2.1. Retrovirale B7 Transfektion von MZ1257RC und MZ2733RC

Die etablierten Nierenkarzinomzelllinien MZ1257RC und MZ2733RC konnten erfolgreich mit den verschiedenen retroviralen Kulturüberständen infiziert werden, wie in FACS Analysen der B7-Oberflächenexpression gezeigt werden konnte (Abb. 61). Es bestätigten sich allerdings auch die Ergebnisse der Vorversuche (V.2.1.3.) und es konnten in den mit pSFFV B7-1/B7-2-Retroviren transfizierten Zellen keine Klone gefunden werden, die sowohl B7-1 als auch B7-2 Moleküle exprimierten. In allen FACS-Analysen zeigte sich nur eine Expression von B7-1.

Aus den Primärkulturen wurden durch Einzelzellklonierung verschiedene Kulturen mit unterschiedlicher B7-Oberflächenexpression für weiterführende Versuche ausgewählt (Tab. 9).

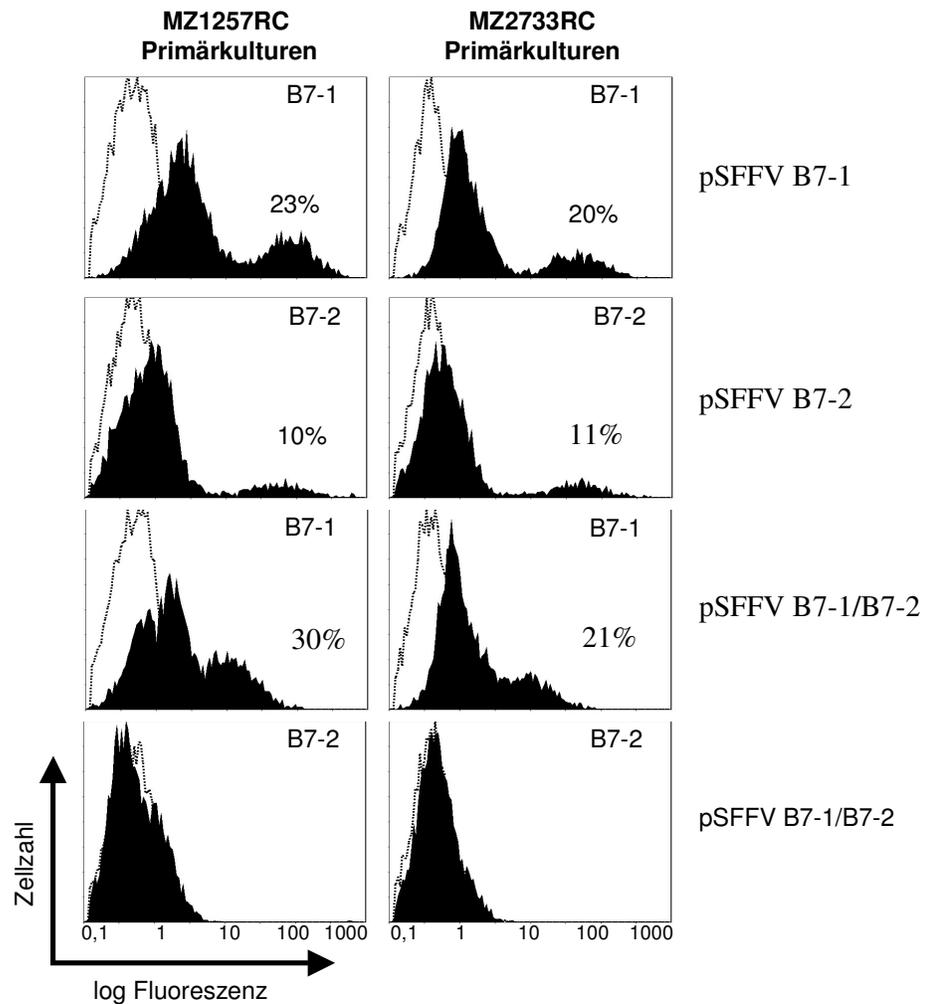


Abb. 61 Primärkulturen von retroviral transfizierten Nierenkarzinomzelllinien exprimieren B7

Die Nierenkarzinomzelllinien MZ1257RC und MZ2733RC wurden mit den Retroviren pSFFV B7-1, pSFFV B7-2 und pSFFV B7-1/B7-2 transfiziert. Anschließend wurde die B7-Oberflächenexpression in FACS-Analysen mit Hilfe der Antikörper CD80-FITC und CD86-PE Zur Kontrolle wurden IgG-Kontrollantikörper eingesetzt . In der linken Spalte sind die Histogramme der Expressionsanalysen der MZ1257RC Primärkulturen und in der rechten Spalte die Histogramme der Expressionsanalysen der MZ2733RC Primärkulturen dargestellt.

Tab. 9 B7 Oberflächenexpression der klonierten MZ1257RC und MZ2733RC Transfektanden

	mittlere Fluoreszenzintensität	
	B7-1	B7-2
MZ1257RC pSFFV B7-1 Klon 1	43	1
MZ1257RC pSFFV B7-1 Klon 2	78	1
MZ1257RC pSFFV B7-2 Klon 1	1	265
MZ1257RC pSFFV B7-2 Klon 2	1	4
MZ1257RC pSFFV B7-1/B7-2 Klon 1	16	1
MZ1257RC pSFFV B7-1/B7-2 Klon 2	29	1
MZ2733RC pSFFV B7-1 Klon 1	31	1
MZ2733RC pSFFV B7-1 Klon 2	76	1
MZ2733RC pSFFV B7-2 Klon 1	1	7
MZ2733RC pSFFV B7-2 Klon 2	1	71
MZ2733RC pSFFV B7-1/B7-2 Klon 1	30	1
MZ2733RC pSFFV B7-1/B7-2 Klon 2	40	1

Die Nierenkarzinomzelllinien MZ1257RC und MZ2733RC wurden mit den Retroviren pSFFV B7-1, pSFFV B7-2 und pSFFV B7-1/B7-2 transfiziert. Anschließend wurde die B7-Oberflächenexpression in FACS-Analysen mit Hilfe der Antikörper anti B7-1 FITC, anti B7-2 PE und IgG Kontrollen bestimmt und die mittlere Fluoreszenzintensität berechnet.

2.2.2. T-Zell Stimulation mit B7 retroviral transfizierten Nierenkarzinomzelllinien

Nach der erfolgreichen Etablierung verschiedener B7 exprimierender Zellen nach retroviraler Transfektion wurden diese analog zu den Versuchen mit den B7-Transfektanden, die über plasmidbasierte Vektoren und Elektroporation etabliert wurden, in MLTC-Versuchen mit vorstimulierten T-Zellen eingesetzt (Schema Abb. 32). Anschließend wurde die T-Zell Proliferation und Zytokinsekretion analysiert (Abb. 62). Vor allem die mit pSFFV B7-1 Retroviren infizierten B7-1 exprimierenden Tumorzellen zeigten dabei gute T-Zell aktivierende Eigenschaften mit klonalen Unterschieden.

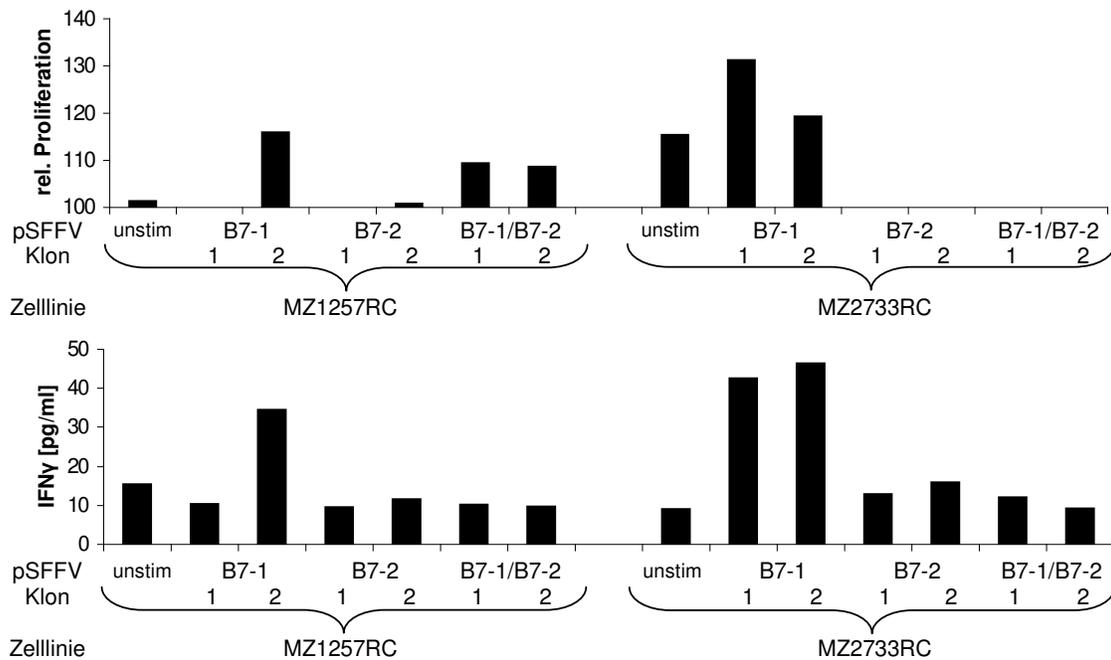


Abb. 62 Retroviral B7 transfizierte Nierenkarzinomzellen aktivieren T-Zellen

OKT3/IL-2 vorstimulierte T-Zellen wurden mit fixierten B7 retroviral transfizierten Tumorzellen stimuliert. Nach zwei Tagen wurde die metabolische Aktivität (oben) und die IFN γ Zytokinsekretion (unten) der T-Zellen bestimmt. Die metabolische Aktivität der unstimulierten T-Zellen wurde gleich 100 gesetzt und die Aktivitäten der mit den fixierten Tumorzellen stimulierten T-Zellen relativ dazu dargestellt.

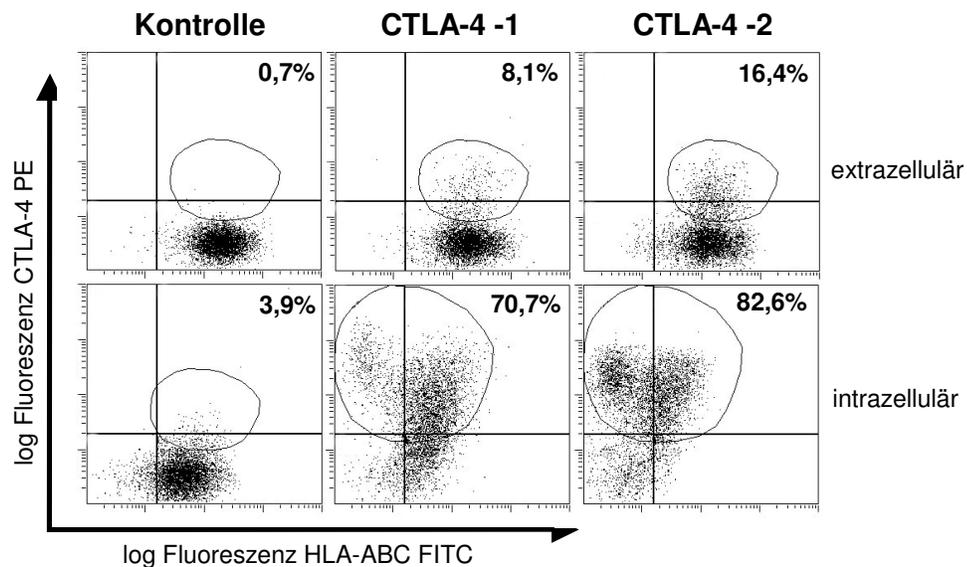


Abb. 64 COS7 Zellen exprimieren CTLA-4 nach Transfektion mit pCMV CTLA-4

COS7-Zellen wurden stabil mit dem CTLA-4 Expressionsvektor pCMV CTLA-4 (CTLA-4 -1, CTLA-4 -2) und dem Kontrollvektor pCMV Ires Hyg (Kontrolle) transfiziert. Die Kulturen verschiedener Klone wurde unter Selektionsdruck mit Hygromycin etabliert. Diese Klone wurden extrazellulär und intrazellulär mit den Antikörpern HLA-ABC FITC und CTLA-4 PE inkubiert. Anschließend wurden ihre Fluoreszenzen in einer Zweifarb-FACS Analyse bestimmt. Die Zellen die eine deutliche PE-Fluoreszenz distinkt von der reinen HLA-ABC positiven Population zeigten wurden prozentual erfasst. Die Prozentangaben sind in jeder Abbildung angegeben.

Die Klone CTLA-4 -1 und -2 zeigten eine gute extrazelluläre Expression von CTLA-4 in 8% bzw. 16% der Zellen. Diese Zellpopulationen sind im FACS deutlich von den rein HLA-ABC positiven getrennt (Abb. 64 oben).

Bei der intrazellulären FACS-Analyse war die HLA-ABC-FITC Fluoreszenz trotz identischer Geräteinstellungen etwas niedriger (Abb. 64 unten). Diese Veränderung und das Auftreten einer HLA-ABC negativen Population kann nur durch den Einfluss von Zellfixierung und Zellpermeabilisierung erklärt werden, die für eine intrazelluläre FACS-Analyse notwendig sind. Bei diesen Untersuchungen zeigten die Kulturen einen hohen Anteil an CTLA-4 positiven Zellen (Abb. 64 unten). Mit diesen Klone wurden die weiteren Untersuchungen zur Funktion des anti-CTLA-4 Ribozyms fortgesetzt.

2.3.2. Expression eines anti-CTLA-4 Ribozymes

Zur erfolgreichen Expression eines kurzen RNA-Moleküls, wie das eines Ribozyms, ist es notwendig, ein Expressionssystem für die RNA-Polymerase III einzusetzen. Daher wurde das anti-CTLA-4 Ribozym in die Expressionskassette der tRNA von Valin eingesetzt (Wong-Staal et al., 1998b). Die fertige Expressionskassette wurde mit und gegen die Transkriptionsrichtung des CMV-Promotors in den etablierten Expressionsvektor pCMV IRES mit Neomycin-Resistenzgen eingesetzt (Abb. 65). Durch den Einsatz der beiden Varianten sollte herausgefunden werden, welche Transkriptionsrichtung für eine anti-CTLA-4 Ribozym Expression am effektivsten ist.

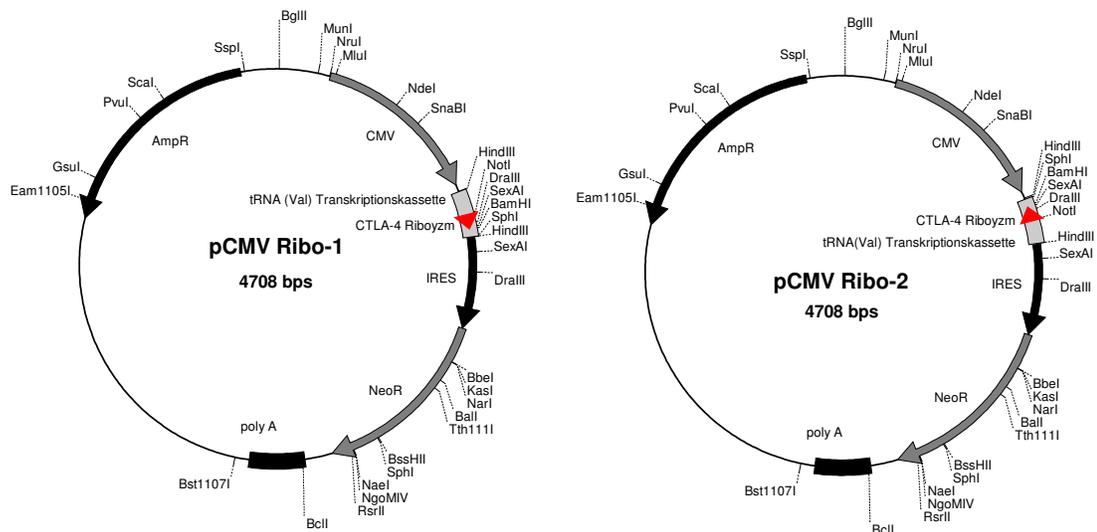


Abb. 65 CTLA-4 Ribozym-Vektorsysteme für plasmidbasierte Transfektionen

Die DNA Sequenz für ein anti-CTLA-4 spezifisches Ribozym wurde in der tRNA (Val) Transkriptionskassette in den pCMV-IRES Expressionsvektor eingesetzt. In Vektor pCMV Ribo-1 ist die Transkriptionsrichtung von CMV Promotor und tRNA Transkriptionskassette identisch. In Vektor pCMV Ribo-2 ist die Transkriptionsrichtung der tRNA Transkriptionskassette der Transkriptionsrichtung des CMV-Promotors entgegengesetzt.

AmpR=Ampicillin-Resistenzgen, polyA=Polyadenylierungssignal, CMV=Zytomegalieviruspromotor, IRES= *internal ribosome entry site*, NeoR=Neomycin-Resistenzgen, Val=Valin

Die beiden CTLA-4 exprimierenden Klone (CTLA-4 -1, und -2) sowie ein Klon der Vektorkontrolle und parentale COS7 Zellen wurden anschließend jeweils mit pCMV Ires Neo, pCMV Ribo-1 und pCMV Ribo-2 transfiziert. Unter Selektion mit Neomycin und Hygromycin konnten verschiedene Zellklone etabliert werden. In FACS-Analysen zeigte sich zunächst, dass die CTLA-4 Expression der Klone CTLA-4 -1 und CTLA-4 -2 durch die Transfektion mit dem Kontrollvektor nicht verändert wurde (Abb. 66, Reihen 1 und 2).

Eine Reduktion der CTLA-4 Expression war dagegen in den CTLA-4 Klonen nach Transfektion mit pCMV Ribo-1 und pCMV Ribo-2 zu sehen (Abb. 66). In allen Analysen war eine Reduktion der CTLA-4 Expression zu erkennen, die beim Einsatz von pCMV Ribo-1 etwas stärker erschien, als beim Einsatz von pCMV Ribo-2.

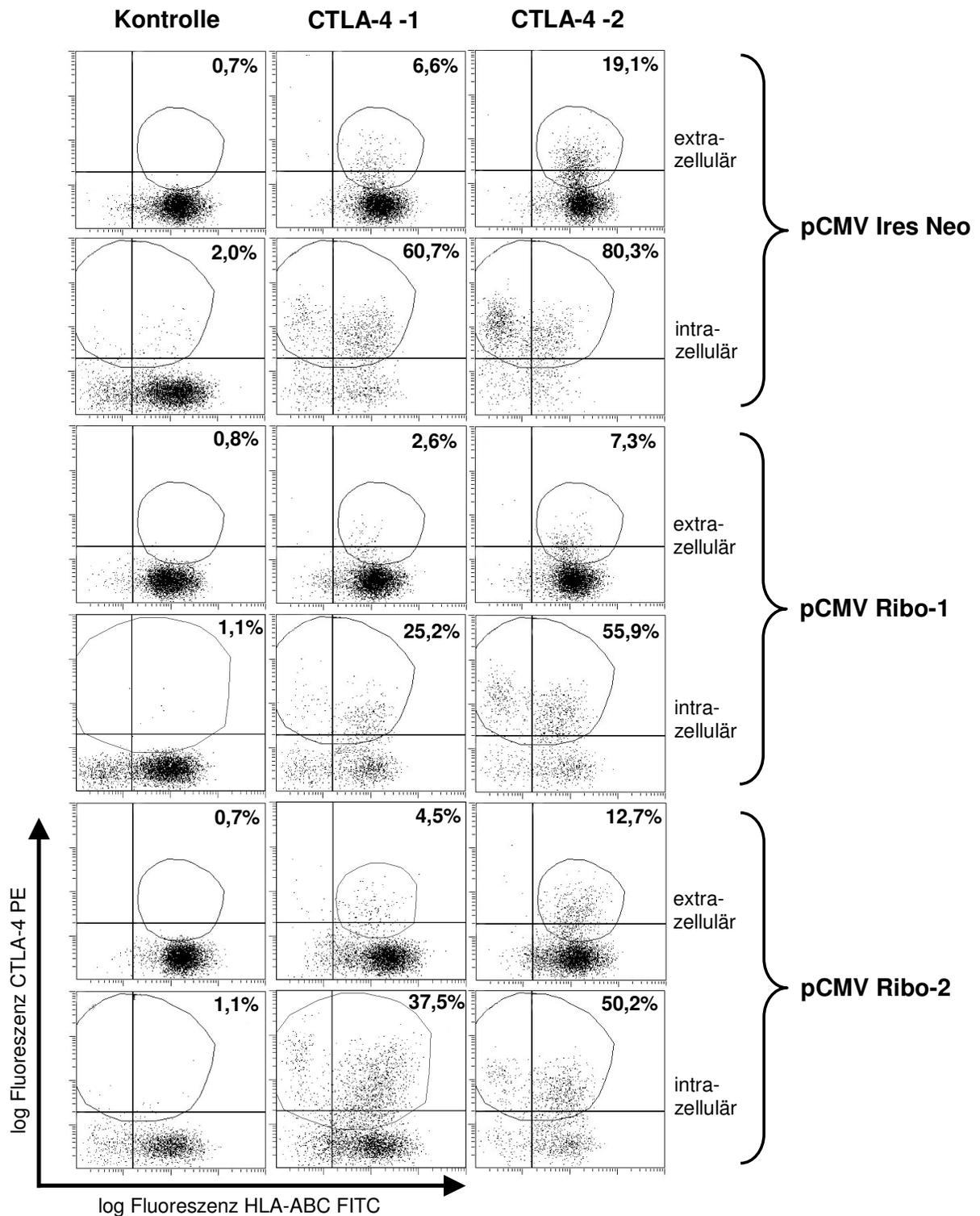


Abb. 66 Reduktion der CTLA-4 Expression durch Transfektion mit einem anti-CTLA-4 Ribozym

Die COS7 Transfektanten pCMV Ires Hyg, CTLA-4 -1 und CTLA-4 -2 wurden zusammen mit der parentalen Zelllinie mit den Vektoren pCMV Ires Neo, pCMV Ribo-1 und pCMV Ribo-2 transfiziert und unter Selektion mit Neomycin und Hygromycin die Kultur verschiedener Klone etabliert. Diese Klone wurden extrazellulär und intrazellulär mit den Antikörpern HLA-ABC FITC und CTLA-4 PE inkubiert. Anschließend wurden ihre Fluoreszenzen in einer Zweifarb-FACS Analyse bestimmt. Die Zellen, die eine deutliche PE-Fluoreszenz distinkt von der reinen HLA-ABC positiven Population zeigten, wurden prozentual erfasst. Die Prozentangaben sind in jeder Abbildung angegeben. Es wurde jeweils ein repräsentativer Klon dargestellt. Bei den Abbildungen der Kontrollen ist je ein Klon pCMV Ires Hyg pCMV Ires Neo, ein Klon COS7 pCMV Ribo-1 und ein Klon pCMV Ires Hyg pCMV Ribo-2 dargestellt, da sich Kulturen von pCMV Ires Hyg pCMV Ribo-1 bzw. COS pCMV Ribo-2 in Kultur nur sehr instabil zeigten.

Nachdem die Funktion des Ribozyms gezeigt werden konnte, wurden beide Expressionskassetten in den retroviralen Vektor pMPSV (Abb. 24) eingesetzt und stehen somit für weitere Versuche und einen möglichen klinischen Einsatz zur Verfügung (Abb. 67).

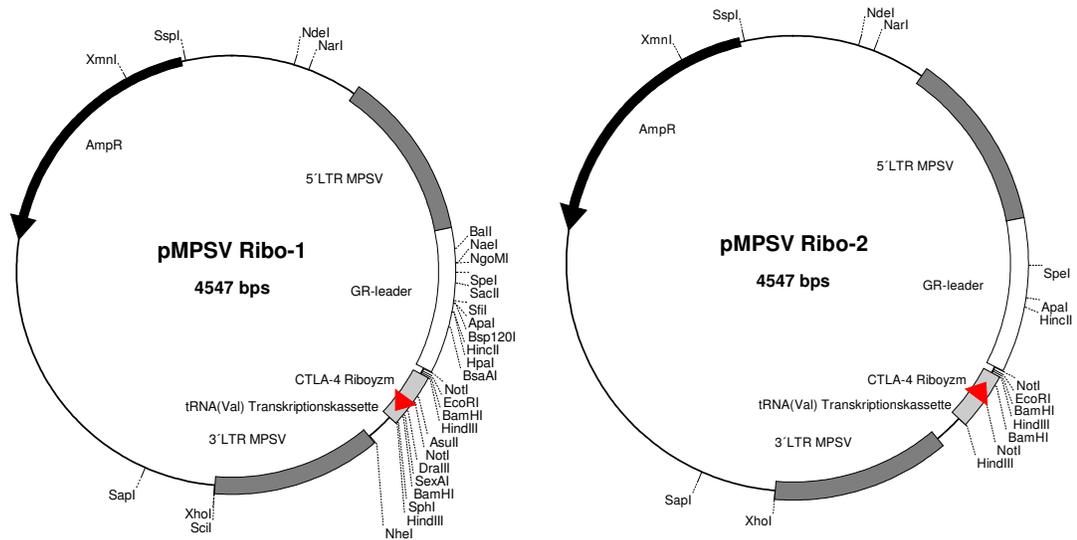


Abb. 67 retrovirale Ribozym - Vektorsysteme

Die tRNA (Val) Expressionskassette mit dem CTLA-4 Ribozym wurde aus den Plasmiden pCMV Ribo-1 und pCMV Ribo-2 in den retroviralen Expressionsvektor pMPSV umgesetzt.

AmpR=Ampicillin-Resistenzgen, LTR=long terminal repeat