

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen**

Abteilung Innere Medizin II

**(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie)**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Generierung antigenspezifischer T-Zellantworten
mittels RGS1-IVT (In-vitro-Transkript)
transfizierter Dendritischer Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Stefanie Erndt
aus
Stuttgart
2010**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Brossart
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Bitzer

Für
meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Die unspezifische (angeborene) Immunität	1
1.1.2	Das spezifische (adaptive) Immunsystem	3
1.2	Zellen des Immunsystems	4
1.2.1	Effektorzellen	4
1.2.2	Dendritische Zellen	5
1.2.3	“Cross-presentation” - eine weitere Besonderheit dendritischer Zellen	6
1.2.4	T-Zell-Aktivierung	7
1.3	Tumorimmunologie	8
1.3.1	Tumor-escape-Mechanismen	9
1.3.2	Tumorantigene	10
1.4	Immuntherapie im Rahmen der Behandlung maligner Erkrankungen	11
1.4.1	Das Tumorantigen RGS1	13
1.4.2	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3	Reagenzien	18
2.1.4	Kits und Primer	20
2.1.5	Medien und Puffer	21
2.1.6	RNA	22
2.1.7	Antikörper	22
2.1.8	Tumorzelllinien	23
2.2	Methoden	25
2.2.1	Kultivierung von Zellen	25
2.2.2	Kryokonservierung von Zellen	25
2.2.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	25

2.3	Molekularbiologische Methoden, Vorarbeiten	26
2.3.1	Gen-Expressionsanalyse mit Hilfe von High-density Oligonucleotid Microarray (Arbeitsgruppe S.Stevanović, Abteilung Immunologie, Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen, Deutschland)	26
2.4	Molekularbiologische Methoden dieser Arbeit	27
2.4.1	RNA-Isolation für Reverse Transkriptase-PCR	27
2.4.2	Reverse Transkriptase-(RT)-PCR	27
2.4.3	Generierung des RGS1- und des EGFP-In-vitro-Transkriptes	29
2.5	Generierung dendritischer Zellen aus adhärennten Monozyten des peripheren Blutes (PBMNC's)	29
2.5.1	<i>In-Vitro</i> Generierung Dendritischer Zellen	30
2.5.2	Ernten reifer Dendritischer Zellen	30
2.5.3	Dendritische Zellen am Scheideweg	30
2.6	Fluorescence activated cell sorting (FACS)	31
2.6.1	FACS-Färbung (DC-Panel)	31
2.7	RNA Elektroporation Dendritischer Zellen	32
2.7.1	Prinzip	32
2.7.2	Vorgehen	32
2.8	Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten (CTLs) und Restimulation	33
2.8.1	Vorgehen	33
2.9	Standard Chrom- ^[51Cr] Release-Assay	34
2.10	Antikörperblockierung im Chrom ^[51Cr] -Release-Assay	35
2.11	Cold Target Inhibition	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Vorarbeiten durch die AG Stevanović	37
3.1.1	Genexpressionsanalysen in Nierenzellkarzinomen (RCC)	37
3.2	Ergebnisse dieser Arbeit	37
3.2.1	Expressionsanalyse von RGS1 mittels RT-PCR	37
3.2.2	RGS1-spezifische CTLs lysieren Tumorzellen sowohl epithelialen, als auch hämatologischen Ursprungs	38
3.2.3	RGS1-spezifische CTLs können autologe CLL-Blasten lysieren	44

4 Diskussion	47
4.1 Grenzen der Arbeit	50
5 Zusammenfassung	52
6 Danksagungen	65
7 Lebenslauf	68

Verzeichnis der Abkürzungen

Ω	Ohm
ADCC	antibody-dependent-cell-mediated cytotoxicity (Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
AG	Antigen
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen presenting cell (Antigen präsentierende Zelle)
AR	aktivierender Rezeptor
BCR	B-cell receptor
CD	Cluster of Differentiation
CLL	Chronisch myeloische Leukämie
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte (Zytotoxischer T-Lymphozyt)
CTLA	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen (zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen)
DC	Dendritic Cell (dendritische Zelle)
EGFP	enhanced green fluorescent protein (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FAS	Fibroblast-associated antigen (Fibroblasten-assoziertes Antigen)
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor)
HLA	Human Leukocyte Antigen (humanes Leukozyten Antigen)
HPV	Humanes Papilloma Virus
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
IVT	In-vitro-Transkript
kD	kilodalton
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor (Killerzell-inhibierende Rezeptoren)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NK	Natürliche Killerzelle
PBMNC	peripheral blood mononuclear cell (mononukleäre Zelle des peripheren Blutes)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
RCC	renal cell carcinoma (Nierenzell-Karzinom)
RGS1	regulator of G-protein-signalling (Regulatorprotein 1 der GTPase Signaltransduktion)
RGS1-IVT	RGS1 In-vitro-Transkript (s.o.)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion)
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	transporter associated with antigen processing (Antigenpeptid Transporter)
TCR	T-cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TGF	transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
TNF	tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
TRP	Tyrosin-related Peptid (Tyrosin-assoziiertes Peptid)
TSA	Tumor spezifisches Antigen

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1:** Dendritische Zelle aus Monozyt des Menschen
- Abb. 2:** RT-PCR humaner Tumorzelllinien
- Abb. 3:** *Chrom*- ^{51}Cr – *Release-Assay* zur Analyse der lytischen CTL-Aktivität (HLA-A2-positiver Targetzellen)
- Abb. 4:** Bestätigung der Antigen-spezifität mittels Antikörperblockierung (HLA-A2-restringiert)
- Abb. 5:** *Chrom*- ^{51}Cr – *Release-Assay* zur Analyse der lytischen CTL-Aktivität (HLA-A3-positiver Targetzellen)
- Abb. 6:** Bestätigung der Antigen-spezifität mittels *Cold Target Inhibition* (HLA-A3-restringiert)
- Abb. 7:** *Chrom*- ^{51}Cr – *Release-Assay* zur Analyse der lytischen CTL-Aktivität (HLA-A2/-A3-positiver Targetzellen)
- Abb. 8:** Bestätigung der Antigen-spezifität mittels *Cold Target Inhibition* (HLA-A2 und HLA-A3 restringiert)
- Abb. 9:** Lyse autologer RGS1-positiver CLL Blasten und T-Zellen im *Chrom*- ^{51}Cr – *Release-Assay* (Patient 1). Bestätigung der HLA-Restriktivität mittels Antikörperblockierung.
- Abb. 10:** Lyse autologer CLL-Blasten (Patient 1, Patient 2), Negativkontrolle mit autologen, RGS1-negativer AML-Blasten (Patient 3).

Tabellenverzeichnis

1	Geräte und Hersteller	16
2	Geräte und Hersteller (Fortsetzung)	17
3	Verbrauchsmaterialien	17
4	Reagenzien	18
5	Reagenzien (Fortsetzung)	19
6	Kits und Primer	20
7	Medien und Puffer	21
8	RNA	22
9	Antikörper	22
10	Tumorzelllinien	23
11	Tumorzelllinien (Fortsetzung)	24

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem (immunis aus dem lateinischen = frei, verschont, unberührt) des Menschen ist ein aus Zellen, Molekülen und Organen bestehendes, multifunktionales Netzwerk. Es hat zum Ziel, den Körper vor externen (toxischen, mechanischen, infektiösen) Störfaktoren sowie internen Fehlsteuerungsprozessen zu schützen, welche die Integrität des Organismus gefährden könnten. Der Körper befindet sich in ständiger Auseinandersetzung mit unzähligen Mikroorganismen, die es abzuwehren gilt. Außerdem kontrolliert das Immunsystem eigene Zellregulationsmechanismen, d.h., es eliminiert Zellen, die in irgend einer Form fehlgeleitet, beziehungsweise von ihrem determinierten Differenzierungspfad abgekommen sind. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen der unspezifischen, angeborenen und der spezifischen, adaptiven Immunität. Beide Systeme sind jedoch funktionell eng miteinander verknüpft .

1.1.1 Die unspezifische (angeborene) Immunität

Die unspezifische Immunität ist ein phylogenetisch sehr alter Teil des Immunsystems und weist große Ähnlichkeit zu anderen Spezies auf. Sie ist von Geburt an funktionstüchtig, kann - im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem - kein immunologisches Gedächtnis entwickeln, sprich - sie kann nicht "hinzulernen". Sie kann jedoch durch Interaktion mit dem spezifischen Immunsystem in ihrer Wirksamkeit enorm verstärkt werden. Bestandteile des unspezifischen Immunsystems sind beispielsweise

- der physiologische Säureschutzmantel der Haut
- die Schleimhäute, welche sowohl mechanische als auch immunologische Schutzfunktionen besitzen (aktive, gerichtete Resorptions- und Sekretionsvorgänge sowie die Sezernierung von Immunglobulinen, allen voran IgA)
- Speichel und Tränenflüssigkeit, die mithilfe von Muraminidasen (Lysozym) die Zellwand von Bakterien andauen
- das Flimmerepithel der Bronchialschleimhaut, welches aktiv, durch gerichteten Kinozilenschlag, Schmutzpartikel oralwärts transportiert

- der saure pH-Wert im Magen,
- die physiologische Bakterienflora des gesamten Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes, die mikrobiellen Eindringlingen das Überleben erheblich erschwert [45, S.38-45][52, 75]

Die zellulären Vertreter der angeborenen Immunität sind Phagozyten (allen voran neutrophile Granulozyten und Makrophagen, aber auch eosinophile Granulozyten und dendritische Zellen). Schafft es ein mikrobieller Eindringling nun doch, die Oberflächenepithelien des Körpers zu überwinden, wird er sofort von Phagozyten und Molekülen attackiert. Nach Erkennung des Pathogens anhand allgemein vorkommender Oberflächenstrukturen phagozytieren Makrophagen den Erreger und induzieren die Sekretion von biologisch aktiven Molekülen. (Zytokine, welche das Verhalten anderer Zellen beeinflussen und Chemokine, welche andere Effektorzellen - unter anderem neutrophile Granulozyten aus dem Blut - anlocken). Diese biogenen Moleküle initiieren einen Entzündungsprozess [55, 85].

Auch über eine Aktivierung des alternativen Wegs des Komplementsystems kann eine Entzündungsreaktion beziehungsweise Phagozytose mikrobieller Pathogene generiert werden. Das Komplementsystem ist ein System von Plasmaproteinen, dessen Hauptaufgaben unter anderem in der Opsonierung von Pathogenen, in der Chemotaxis weiterer Effektorzellen, in der Initiierung einer Entzündung, sowie in der direkten Lyse der Zielzelle bestehen [99].

Auch die etwa 30 Proteine der Akuten Phase, die bei Gewebsschädigung mediatorvermittelt in der Leber synthetisiert werden, sind wichtiger Bestandteil des unspezifischen Immunsystems. Sie tragen dazu bei, einer Ausbreitung der Entzündung entgegen zu wirken, beziehungsweise den Entzündungsherd zu sanieren.

Eine weitere Wirkung der Zytokine ist die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Sie entwickeln sich im Knochenmark aus der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle und patrouillieren im peripheren Blut. Sie können entartete oder virusinfizierte Zellen erkennen und abtöten, müssen folgerichtig auch in der Lage sein, zwischen infizierten und nicht-infizierten beziehungsweise körpereigenen und körperfremden Zellen zu differenzieren. Dies gelingt ihnen durch verschiedene Regulationsmechanismen wie z.B. die Expression von zwei verschiedenen Oberflächenrezeptortypen (hemmend: KIR, bzw. aktivierend: AR) sowie die Expression von MHC-Klasse-1-Molekülen. Darüberhinaus besitzen sie niedrig affine $Fc\gamma$ -Rezeptoren (klassifiziert als CD16 Oberflächenantigene), welche

aggregiertes IgG erkennen und binden. Dieser Mechanismus verleiht den NK Zellen neben ihrer natürlichen Zytotoxizität die Fähigkeit zur Antikörper-abhängigen Zytotoxizität (ADCC=*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)[76]. Somit können unspezifisch Zellen erkannt bzw. lysiert werden, welche mit humoralen Antikörpern markiert sind. NK Zellen können jedoch auch ohne Antikörpervermittlung agieren: Eine verminderte bzw. fehlende Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen (wie z.B auf Tumor- bzw. Virusinfizierten Zellen) führt zur sofortigen Elimination [54, 30].

1.1.2 Das spezifische (adaptive) Immunsystem

Phylogenetisch entwickelt sich bei Menschen und Wirbeltieren die adaptive (spezifische/erworbene) Immunität aus dem unspezifischen Immunsystem und muß postnatal erst erlernt werden. Sie ist charakterisiert durch höchste Pathogenspezifität, Diversität, die Fähigkeit zur Konservierung der erlernten Fähigkeiten (immunologisches Gedächtnis) sowie die Möglichkeit zur Sekundärantwort. Die spezifische Immunabwehr ist stets antikörpervermittelt. Hauptakteure sind Antigenpräsentierende Zellen (APCs), die sich aus der myeloiden Vorläuferzelle ableiten, sowie B- und T-Lymphozyten, die aus der lymphatischen Vorläuferzelle hervorgehen.

Der humorale Teil des spezifischen Immunsystems wird von den B-Lymphozyten getragen, welche im Knochenmark entstehen. Durch klonale Selektion wird hierbei höchste Pathogenspezifität erreicht. Nach Bindung des passenden Antigens an die N-terminale Region des B-Zell-Rezeptors (BCR = gebundene Form des von der B-Zelle synthetisierten Antikörpers) auf der Oberfläche der B-Zellen werden diese aktiviert und differenzieren meist zu Immunglobulin-produzierenden Effektorzellen, den Plasmazellen, oder einige wenige zu sogenannten Gedächtniszellen (durch welche das Immunsystem im Falle eines Zweitkontaktes mit dem Pathogen schneller in der Lage ist, zu reagieren) [106]. Immunglobuline (Igs) entfalten ihre Wirkung durch Neutralisation von Antigenen, Opsonierung, Aktivierung des Komplementsystems, ADCC via NK-Zellen sowie durch Agglutination. Das Antikörperrepertoire des Menschen umfasst ca. 10^{11} verschiedene Moleküle. Diese enorme Diversität wird durch Mechanismen wie z.B. somatische Rekombination, variable Kombinationsmöglichkeiten der schweren und leichten Kette im vollständigen Ig-Molekül sowie durch verschiedene Mutationsprozesse erreicht [103, 43, 100, 11, 26, 105]. Im Gegensatz zu T-Lymphozyten sind B-Lymphozyten in der Lage, natives Antigen zu erkennen - auch ohne die Hilfe von APCs [113].

T-Zellen entstehen - ebenso wie B-Zellen - im Knochenmark, wandern jedoch schon früh als naive T-Zellen zur vollständigen Ausdifferenzierung in den Thymus aus. Dort angekommen, müssen sie sich positiven Selektionsmechanismen (Prüfung der Existenz autologer MHC-Moleküle) und negativen Selektionmechanismen (Elimination autoreaktiver T-Zellen) unterziehen. Der T-Zell Rezeptor erkennt Antigen nur in Assoziation mit Selbst-MHC-Molekülen (*Major-Histocompatibility Complex*), wobei Antigen auf APCs gebunden präsentiert wird. [5, 66, 89] Zur Erkennung werden jedoch auch Ko-Rezeptoren benötigt: CD4 interagiert hierbei nur mit MHC-Klasse-II-Molekülen, CD8 nur mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Nach Aktivierung erfolgt die Differenzierung in folgende Effektorzellen:

- Zytotoxische T-Lymphozyten (im folgenden als CTL bezeichnet): Sie sind CD8⁺ Effektorzellen, welche fertige Zytotoxine in Form von lytischen Granzym-/Perforin gefüllten Granula bereithalten. Ihre Aufgabe ist die zielgenaue Elimination von zytosolischen Krankheitserregern (meist Viren) und von Tumorzellen. Darüber hinaus synthetisieren sie IFN γ (hemmt die Virusreplikation, reguliert die Expression von MHC-Klasse-1-Molekülen, aktiviert Makrophagen)
- T-Helferzellen: Sie tragen CD4 Moleküle auf ihrer Oberfläche und aktivieren T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen
- Inflammatorische T-Zellen: sie tragen ebenfalls CD4 Moleküle auf ihrer Oberfläche

1.2 Zellen des Immunsystems

1.2.1 Effektorzellen

B- und T-Lymphozyten, welche bisher noch keinen Antigenkontakt hatten, sind sogenannte naive, also ungeprägte Lymphozyten. Kommen sie jedoch - beispielsweise im Rahmen einer Infektion - mit Pathogenen in Berührung, proliferieren sie und differenzieren zu Effektorzellen.

Bei den T-Effektorzellen gibt es drei funktionelle Gruppen, wobei sich die CD4⁺ T-Helferzellen in T_H1 und T_H2-Zellen unterteilen. Die T_H1 -Zellsynthese wird angeregt durch vesikuläres Pathogen in Makrophagen und dendritische Zellen (DCs). Sie richten sich somit vor allem gegen intrazelluläre Erreger. Sie stimulieren über GM-CSF und TNF α die "Tötungsmechanismen" der Makrophagen und CTLs und

sind somit wesentlicher Bestandteil der zellvermittelten Immunität. An der humoralen Immunität beteiligen sie sich, in dem sie B-Zellen zur Ak-Synthese (vor allem IgG) anregen. T_H2 Zellen stimulieren hingegen über Interleukine (z.B IL 4, IL5,IL10) die humorale Immunität.

Die dritte Gruppe sind die $CD8^+$ CTLs - auch T-Killerzellen genannt. Sie erkennen Antigen, das ihnen über MHC-Klasse-I-Komplexe von allen kernhaltigen Zellen dargeboten wird, d.h., sie sind spezialisiert auf die Erkennung endogen synthetisierter Peptide - somit unterscheiden sie zwischen "eigen und fremd". Ihre Aufgabe besteht in der Eliminierung virusinfizierter oder maligne entarteter Zellen durch Induktion von Apoptose. Dies bewältigen CTLs vor allem über kalziumabhängige Freisetzung spezieller, intrazellulär präformierter, lytischer Granula wie Granzym B [60] (gehört zur Familie der Serinproteasen) und Perforinen (zu den Proteasen gehörend) [104]. Letztere induzieren die Apoptose indirekt über Aktivierung von Enzymkaskaden, die letztendlich zum Abbau der DNA führen. Ein weiterer Tötungsmechanismus der CTL ist die rezeptorvermittelte Aktivierung von Caspasen (Bindung des Fas-Liganden an den Fas Rezeptor auf der Zielzelle). Darüber hinaus stehen ihr zur Wirtsverteidigung zytokinvermittelte Verteidigungsstrategien zur Verfügung, zum Beispiel die Sekretion von $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ und $TNF-\beta$. Bewaffnete zytotoxische $CD8^+$ Effektorzellen schränken so auf vielfältige Weise die Verbreitung zytosolischer Krankheitserreger bzw. maligne entarteter Zellen ein.

1.2.2 Dendritische Zellen



Abbildung 1: DC aus Monozyten des Menschen, www.immuntherapie.org

Zu den sogenannten "professionellen" antigenpräsentierenden Zellen gehören dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen, wobei erstere hierbei in sehr "altruistischer" Weise agieren: Ihre wohl einzige Aufgabe besteht darin, T-Zellen Antigen zu präsentieren. Dendritische Zellen (im folgenden als DCs bezeichnet) gelten als potenteste, höchstspezialisierte APCs und spielen daher eine Schlüsselrolle in der zellvermittelten Immunabwehr und präsentieren sowohl MHC-Klasse-I- als auch MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche [47]. DCs existieren funktionell und phänotypisch in zwei unterschiedlichen Reifestadien. Unreife DCs (Prototyp sind die Langerhanszellen der Epidermis) sind darauf spezialisiert, Pathogen zu lokalisieren und gegebenenfalls zu phagozytieren, sind jedoch nicht zur hochpotenten T-Zell-Stimulation fähig. Sie exprimieren relativ geringe MHC-Molekülkonzentrationen an ihrer Oberfläche und besitzen keine ko-stimulatorischen Fähigkeiten (z.B. CD86, B7). Nach Pathogenaufnahme kommt es zur Hochregulation dieser Ko-Stimulatoren, zur Zytokinsekretion sowie zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Chemokinen (MIP-3 β , 6CKine) [84, 92] wodurch die DCs über afferente Lymphbahnen zu den regionären Lymphknoten und in die Milz gelangen. Nun haben die DCs ein (Reife-)Stadium erreicht, in dem sie eine primäre Immunantwort initiieren können. In dem sie naiven Lymphozyten AG präsentieren und ihre Entwicklung in definierte Effektorzellsubpopulationen dirigieren (z.B. in T_H1- Lymphozyten, T_H2-Lymphozyten oder regulatorische T-Lymphozyten (T_{reg})), regulieren und kontrollieren sie die Art der Immunantwort [13, 29].

Eine nicht unbedeutende Rolle spielen DCs auch in der Induktion der Immuntoleranz [8], welche als selektive Immuntoleranz des adaptiven Immunsystems zu verstehen ist. Immuntoleranz gegenüber "Selbst-Epitopen" verhindert Autoaggression - ist jedoch von der medikamentös induzierten Immunsuppression abzugrenzen.

1.2.3 "Cross-presentation" - eine weitere Besonderheit dendritischer Zellen

Generell existieren zwei verschiedene Mechanismen, mit denen APCs in der Lage sind Antigen - je nach dessen Herkunft - zu prozessieren um es danach zu präsentieren.

MHC-Klasse-I-Moleküle:

Alle Proteine, zytosolische Proteine und solche intrazellulärer Erreger, werden vom Proteasom fragmentiert, anschließend via TAP (transporter associated with antigen processing) ins Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) befördert, um sich dort in die Antigenbindungstasche der MHC-Klasse-I-Moleküle einzulagern, mit denen sie dann an die Zelloberfläche gelangen. Sobald zellfremdes Peptid über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert [91] und von CD8⁺-T-Lymphozyten erkannt wird, ist die Vernichtung dieser Zelle nur noch eine Frage der Zeit.

MHC-Klasse-II-Moleküle:

Diese Moleküle haben die Aufgabe, extrazelluläres AG zu präsentieren, das nach Aufnahme in den Lysosomen prozessiert wurde. Hierbei werden die entstehenden Peptidfragmente nicht ins rER transportiert, sondern die MHC-Klasse-II-Moleküle werden zu den Lysosomen gebracht. Damit letztere nicht schon im rER beladen werden, besitzen sie eine sogenannte MHC-II-assoziierte invariante Kette, welche die Peptidbindungstasche verdeckt. Erst im sauren Milieu der Lysosomen wird diese durch Proteasen abgespalten und so die Bindungstasche freigegeben. Dann wandert der Komplex auf die Zelloberfläche [27, 56, 20, 97].

Dendritische Zellen haben nun die Fähigkeit, extrazelluläres Antigen über MHC-Klasse-I-Moleküle zu präsentieren. Ebenso können sie virusinfizierte oder maligne entartete Zellen aufnehmen, um deren Antigen CD8⁺ CTLs zu präsentieren. Diesen Prozess bezeichnet man als "cross-presentation" [96]. Weitere wichtige Mechanismen wie z.B. nicht ausreichendes "cross-dressing" [23] könnten eine Erklärung für insuffiziente T-Zell-Immunantworten sein.

1.2.4 T-Zell-Aktivierung

Die T-Zell-Aktivierung findet in den sekundär-lymphatischen Organen statt und besteht aus vier Teilschritten: Adhäsion, Ko-Stimulation, Aktivierung und Zytokinausschüttung. Zunächst interagieren T-Lymphozyt und Zielzelle via unspezifischer Adhäsionsmoleküle (LAF-1 und CD2 auf der T-Zelle und ICAM's und LFA-3 auf der APC). Dies erlaubt der T-Zelle, die Zielzelloberfläche nach spezifischem (MHC-Komplex) Peptid abzusuchen. Registriert sie ein spezifisches AG, erhöht sich die interzelluläre Avidität - der Zell-Zell-Kontakt prolongiert. Weitere ko-stimulatorische Signale wie die Interaktion zwischen dem CD80 und CD86 Re-

zeptor der APC und dem CD28 Rezeptor der T-Zelle [18] führen zu ihrer Aktivierung. Es erfolgt die Rezeptorstimulation, Synthese und Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) [84], was die T-Zelle autokrin zur Proliferation sowie zur weiteren Differenzierung in eine Effektorzelle stimuliert. Ein den Vorgang limitierendes kostimulatorisches Protein ist CTLA-4 (CD152), welches an den B7-Rezeptor von APCs bindet. CTLA-4 sendet naiven T-Zellen inhibitorische Signale, vermindert die IL-2 Synthese und vermindert die Expansion aktivierter T-Zellen. Klinisch versucht man sich dies bereits zur Reduktion der bei Knochenmarkstransplantationen vorkommenden Graft-versus-Host-Reaktionen (GvHD) zu Nutze zu machen [35]. Fehlen ko-stimulatorische Faktoren, führt dies zur Anergie [112].

1.3 Tumorimmunologie

Die Tumorimmunologie ist ein Teilgebiet der Immunologie und beschäftigt sich mit den immunologischen Vorgängen, die an der Ätiologie, Progression und Bekämpfung von Tumoren beteiligt sind. Historische Wurzeln findet sie in den von Ehrlich bzw. später Burnett postulierten Theorien der Immunüberwachung ("immune surveillance") [25, 17].

Die Entstehungsmechanismen von Tumoren können vielfältiger Natur sein. Begünstigende Faktoren sind steigendes Lebensalter, ionisierende Strahlung, karzinogene Substanzen bzw. Chemikalien und Viren. Meist kann man eine einzelne, kausale Determinante für die Entstehung eines Tumors nicht ausfindig machen sondern es müssen mehrere Umstände zusammentreffen, damit ein Tumor entsteht. Ausgangspunkt der Tumorentstehung bildet eine einzelne Zelle, die irgendwann von ihrem für sie vorgesehenen "Differenzierungspfad" abgekommen ist (Differenzierungsblock auf einer bestimmten Entwicklungsstufe), sich nicht mehr differenziert, sondern schnell proliferiert. Der Tumor wächst, wobei die DNA einzelner Tochterzellen mutiert (Tumorprogression) [3]. Wenn es trotz Präsentation über MHC-Moleküle einzelnen Tumorzellen gelingt, sich von ihrem Primarius zu lösen, so können sich diese via Blut oder Lymphstrom im ganzen Körper verteilen und Tochtergeschwulste (Metastasen/Filiae) bilden.

Demzufolge hätte dann die Genese selbst Bezug zum Immunsystem und die Immunüberwachung hätte aus irgend einem Grund versagt. Folgende Kriterien müssten für eine gute Immunüberwachung gegeben sein: Die Tumorzelle müsste für das Immunsystem gut von nicht transformierten Zellen differenzierbar sein, der Unterschied müsste von den potentiellen Effektorzellen erkannt werden und die Effektorzelle müsste darüber hinaus aktiviert und stimuliert werden, woraufhin

sie eigentlich in der Lage sein müsste, eine initiale Immunantwort zu generieren. Kurz gesagt müssten maligne entartete Zellen ausreichend immunogen sein um über Effektorzellen ihre eigene Apoptose induzieren zu können. In der Tat werden bei Tumorpatienten spezifisch gegen autologe Tumorzellen gerichtete CD8⁺ Effektorzellen detektiert, welche *in-vitro* Tumorzellen lysieren können. *In-vivo* vermögen sie dies nur unzureichend [31]. Im Rahmen der Tumorummunologie wird nun versucht, das Immunsystem, respektive CTLs *in-vitro* dahingehend zu stimulieren, dass sie Tumorzellen erkennen und diese dann *in-vivo* eliminieren.

1.3.1 Tumor-escape-Mechanismen

In-vitro lassen sich also selbst bei Tumorpatienten spezifische, gegen autologe Tumorzellen gerichtete CD8⁺ Effektorzellen detektieren. Diese sind jedoch nicht im Stande, *in-vivo* den Tumor in ausreichendem Maße zu attackieren - geschweige denn zu eliminieren [31]. Tumoren müssen also Mechanismen entwickelt haben, mit denen sie dem Immunsystem entgehen. Dabei kommen verschiedene Strategien zum Einsatz:

- Eine verminderte Konzentration von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche führt zu einer schlechteren Erkennung durch CTLs [93].
- Tumorzellen verfügen auf ihrer Oberfläche über keine ko-stimulatorischen Elemente, welche für eine effektive T-Zell-Antwort jedoch unabdingbar sind [2, 7, 88].
- Tumorzellen sind im Stande, T-Zell-inhibitorisch wirksame Zytokine (wie z.B. IL-10, TGF- β) zu sezernieren, T-Zellen also funktionell zu inaktivieren bzw. bei ihnen Apoptose zu induzieren [22].
- Die Inhibition der IL-2 assoziierten Tyrosinkinase JAK3 wirkt antiproliferativ [78, 50].
- Viele Tumoren sind in der Lage, "ihre" Tumorantigene z.B. über eine verstärkte Expression von Glykokalixmolekülen zu verdecken (Antigenmaskierung).
- Tumorzellen proliferieren sehr stark, der natürliche Zellteilungszyklus ist gestört, hinzu kommt ein verminderter Apoptoseindex.
- Das Tumormikromileu zeigt eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren.

All diese Strategien der Tumorzelle führt dazu, dass das Immunsystem den Tumor erst erkennt, wenn er unter Umständen schon weit fortgeschritten ist [77].

1.3.2 Tumorantigene

Obwohl Tumoren aus körpereigenen Zellen hervorgehen, ist es gelungen, morphologische Unterschiede zwischen malignen und gesunden Zellen zu identifizieren. Maligne Zellen exprimieren an der Oberfläche andere Proteine bzw. andere Proteinkonzentrationen, welche potentiell immunogen sind.

Tumorspezifische Antigene (TSAs) werden ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert, tumorassoziierte Antigene (TAAs) können auch auf nicht transformierten Zellen exprimiert werden. Sowohl TSAs als auch TAAs können humorale und/oder zelluläre Immunantworten bei Tumorpatienten initiieren.

Nach dem Ursprung unterteilt man die Tumorantigene für die Anwendung in der Immuntherapie in folgende Gruppen [71].

- Tumorspezifische Antigene
- Antigene embryonalen Ursprungs (*Cancer-testis antigen*)
- gewebespezifische Antigene (Differenzierungsantigene)
- onkovirale Proteine und
- in Tumoren überexprimierte Antigene.

TSAs entstehen durch Punktmutationen oder Genumlagerungsprozesse, die häufig Teil der Onkogenese sind. Beispiele hierfür sind das Tumorsuppressorprotein p53, das als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Zellzykluskontroll-, DNA-Reparatur- oder Apoptoseinduktionsgenen kontrolliert oder das Protoonkogen Ras, welches als zentrales Glied verschiedener Signaltransduktionswege Wachstums- und Differenzierungsprozesse kontrolliert.

Antigene embryonalen Ursprungs werden von Tumorzellen, nicht aber - abgesehen von Plazenta und Testis- von normalen Zellen exprimiert. Zahlreiche Epitope aus der MAGE-, BAGE-, GAGE-, LAGE- und NY-ESO-1-Familie wurden identifiziert [28]. Da die Trophoblasten in Plazenta und die Keimbahnzellen im Testisgewebe keine MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren, werden die Antigene auch nicht auf der Zelloberfläche präsentiert und somit von den CD8⁺ Effektorzellen nicht erkannt. Deshalb sind die Antigene embryonalen Ursprungs relativ tumorspezifisch. Gefunden werden diese Antigene z.B. auf Melanomen, Brust- oder

Pankreastumoren.

Gewebespezifische Antigene leiten sich von Proteinen ab, welche dem Differenzierungsgrad und dem Zelltyp entsprechen, von dem sie exprimiert werden. Sie werden also von Genen codiert, die nur in bestimmten Gewebetypen exprimiert werden. Beispiele sind gewebespezifische Antigene, die von Melanozyten und Melanomzellen exprimiert werden (Melanom-assoziierte Antigene wie MART-1/Melan A). Andere Beispiele sind Tyrosinase und Tyrosin-related Protein (TRP) [90, 101, 48].

Einige Viren haben onkogene Potenz. Onkovirale Proteine sind somit Proteine, die von Viren synthetisiert werden und zur malignen Entartung von Zellen führen. Aufgrund ihrer Eigenschaft als Alloproteine sind sie potentiell dazu in der Lage, eine T-Zell-Reaktion hervorzurufen. Ein sehr prominentes Beispiel ist die Infektion mit dem Humanen Papillomavirus 16 beim Zervixkarzinom, bei der eine CTL-Antwort generiert werden kann [72]. Klinische Anwendung findet dies bereits in Impfungen gegen die Hochrisikotypen der HP-Viren [59], die mittlerweile sogar teilweise schon von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen werden. Ein weiteres Beispiel ist das Epstein-Barr-Virus, welches mit der Entstehung des Burkitt-Lymphoms, von Non-Hodgkin-Lymphomen sowie mit dem Nasopharynxkarzinom in Zusammenhang gebracht wird.

In Tumoren überexprimierte Antigene sind Antigene, die im Vergleich zu normalen Zellen auf Tumorzellen stark überexprimiert werden. Beispiele hierfür sind das Tumorantigen HER-2/neu (c-Erb-2), welches eine für den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors homologe Rezeptortyrosinkinase ist und unter anderem auf Brust- und Ovarialtumoren exprimiert wird oder MUC-1, ein unterglykosyliertes Mucin, das beispielsweise auf Brust- und Pankreastumoren gefunden wird. Diese Tumorantigene kommen jedoch auch auf normalen, nicht transformierten Zellen vor, wenn auch in wesentlich geringeren Konzentrationen [14, 12].

1.4 Immuntherapie im Rahmen der Behandlung maligner Erkrankungen

Die drei Säulen in der Therapie maligner Erkrankungen sind grundsätzlich - soweit möglich - die Operation, die Chemotherapie sowie die Strahlentherapie, gegebenenfalls auch in Kombination. Diese Therapieformen sind jedoch oft sehr nebenwirkungsreich und belastend für den Patienten, zudem ist der langfristige Erfolg nicht immer befriedigend. Als Beispiel seien hier die Chemotherapeutika genannt. Diese sind potentielle Zelltoxine, deren nahezu einzige "Tumorselektivität"

darin besteht, Zellen zu töten, die sich gerade in einer bestimmten Teilungsphase des Zellzyklus befinden. Beispielsweise wirken Antimetaboliten auf die S-Phase, Spindelgifte auf die M-Phase, alkylierende Substanzen auf alle vier Phasen des Zellzyklus. Daneben gibt es auch völlig phasenunspezifische Substanzen wie z.B. Daunorubicin. Da Tumorzellen hochproliferativ sind, sind diese initial davon betroffen. Jedoch bleiben auch die Wechselgewebe des Körpers, d.h. Gewebe, das permanentem Zellersatz unterliegt wie z.B. Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes, Zellen des Knochenmarks, der Spermiogenese, des lymphatischen Gewebes etc. von den Chemotherapeutika nicht verschont - es kommt zu oft schwerwiegenden Nebenwirkungen.

Die Immuntherapie versucht nun, die Therapie spezifischer zu gestalten, indem sie die Immunogenität des Tumors erhöht bzw. seine Toleranz gegenüber dem Immunsystem herabsetzt, um eine anhaltende Immunantwort zu induzieren, z.B. über die *ex-vivo* Aktivierung CD8⁺ Effektorzellen via DCs.

Eine Ursache, warum der Tumor trotz Tumorantigenpräsentation nicht immunogen genug ist, um eine Immunantwort zu initiieren, sind fehlende kostimulatorische Elemente auf der Oberfläche der Tumorzelle. Die Immuntherapie löst dieses Problem, indem sie die Hilfe von APCs, allen voran von DCs in Anspruch nimmt. Diese sind absolute Spezialisten auf ihrem Gebiet, sie besitzen höchste Potenz zur Antigenpräsentation, zur Ko-Stimulation sowie zur Induktion hochpotenter, primärer Immunantworten auch gegen Tumorzellen [6, 4, 15, 16, 82, 107]. Darüberhinaus unterstützen DCs die Immunantwort, indem sie T_H2-Helferzellen aktivieren und zur Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle anregen [58].

Es gibt verschiedene Methoden, DCs zum Zwecke der Vakzinierung dazu zu bringen, Tumorantigen zu präsentieren.

Eine Möglichkeit besteht in der Beladung der MHC-Moleküle von außen mit tumorspezifischen Peptiden [46, 98, 86]. Hierzu ist es nötig, das tumorassoziierte, besser noch das tumorspezifische Epitop sowie den MHC-Haplotypen des Patienten zu kennen.

Weitere Möglichkeiten sind die Verwendung von Tumorzelllysaten [110], rekombinanten Proteinen oder rekombinanten Vektorsystemen [111, 108] oder durch Fusion aus Tumorzellen und DCs [74].

In diesem Ansatz wurden autologe DCs *ex-vivo* generiert und mit Tumor-mRNA mittels Elektroporation transfiziert. Diese Methode hat den Vorteil, hochpotente antigen- und tumorspezifische T-Zell Immunantworten gegen multiple Epitope induzieren zu können, wobei jedoch die exakte Definition des TAAs oder der

Haplotyp des Patienten nicht benötigt wird. Somit bietet dieses Verfahren das Potential zur breiten klinischen Anwendung [34, 9, 69, 31].

Ziel ist es spezifische, CD8⁺ Effektorzellen zu generieren, welche dem Patienten - dann als aktivierte, hochspezifische CTLs - verabreicht werden können [15, 74, 24, 81, 44, 94, 109]. Es besteht auch die Möglichkeit, dem Patienten die mit dem Tumorantigen versehenen DCs zu verabreichen. Dann kommt es *in-vivo* zur Aktivierung und Proliferation spezifischer CTLs [67, 57].

Durch Zugabe von Zytokinen (beispielsweise IL-2, IL-12, GM-CSF, Flt3-L bzw Adjuvanzen wie Anti-CTLA-4) wird versucht, die Immunantwort weiter zu verstärken [107, 19, 21, 80]. In neueren Ansätzen versucht man dies zu optimieren, indem man die Zytokine den Ansätzen nicht bloß zusetzt, sondern DCs mittels adenoviraler Transduktionsmethoden mit IL-12-Genen und/ oder GM-CSF-Genen transduziert, was insgesamt einen positiven Effekt aufweisen soll [73] .

1.4.1 Das Tumorantigen RGS1

RGS1 (*regulator of G protein signalling-1* bzw. *G-Protein-Regulator-1*) ist ein sich auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran befindlicher Regulator des G-Protein Signaltransduktionsweges. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gehören zur Superfamilie der heptahelikalen Transmembranproteine (7-TM-Rezeptoren) und werden auf den Zelloberflächen aller eukaryotischen Zellen gefunden. Sie bestehen aus sieben transmembranen Helixstrukturen, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Sie besitzen sowohl eine intrazelluläre als auch eine transmembrane Lingandenbindungsstelle. Beinahe alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind zur Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins (mit je einer α -, β -, γ - Untereinheit) befähigt, welches sich an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran befindet, wo es als Regulatormolekül fungiert. G-Proteine sind also funktionelles Bindeglied zwischen Rezeptor und Enzymen oder Ionenkanälen in der Membran [36, 40].

Die Funktion der G-Protein-Regulatoren (*RGS*) ist die Inhibition der biologischen Aktivität von G-Proteinen. Durch die Bindung an die α -Untereinheit des G-Proteins wird dessen intrinsische GTPase-Aktivität stimuliert. Hieraus folgt die beschleunigte Hydrolyse von GTP zu GDP, woraufhin der inaktive, heterotrimere Ausgangszustand schneller wieder hergestellt werden kann und somit die Signalschleife terminiert [41, 83].

RGS1 wurde ursprünglich als B-Zell-aktivierender Faktor kloniert (BL34). Er wird rasch nach *in-vitro* B-Zell Aktivierung induziert, besonders ausgeprägt im Keim-

zentrum lymphatischen Gewebes. Er kann jedoch nicht in primären T-Zellen detektiert werden [42]. Studien an Mäusen konnten zeigen, dass überexprimiertes RGS1 in aktivierten B-Zellen die Chemotaxis in Richtung einiger Chemokine (wie zum Beispiel stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) oder platelet-activating factor (PAF) und B lymphocyte chemoattractant (BLC)) beeinträchtigt [79]. Infolgedessen weisen RGS1^{-/-}-Mäuse Zellen auf, welche auf Chemokine abweichend reagieren. Eine Immunisierung dieser Mäuse führt zu einer exzessiven Keimzentrumsformation, zu partieller Zerspaltung der physiologischen Milzstruktur und der Peyer'schen-Plaques sowie zu einer aberranten Funktion immunglobulinproduzierender Zellen [65]. Darüber hinaus konnten Han et al. zeigen, dass bei solchen Mäusen Zellen besser an den endothelialen Venolen innerhalb der Lymphknoten haften, ein besseres "homing" aufweisen und sich auch innerhalb des Lymphfollikels schneller bewegen als entsprechende Zellen in Wildtypmäusen [37]. In Anlehnung an diese Beobachtungen schlugen Agenes et. al vor, dass eine Überexpression von RGS1 in regulatorischen T-Zellen eine Hyposensitivität gegenüber den Chemokinen CCL19 und CCL 21 bedingen könnte [1].

1.4.2 Zielsetzung

Um selektiv in Tumorzellen exprimierte oder überexprimierte Gene zu identifizieren, wurden vergleichende Expressionsprofile von Tumorgewebe und normalem Gewebe mittels Microarray Technologien durchgeführt [51, 53, 86, 87, 102] Mit diesem Vorgehen wurde eine Überexpression von RGS1 in Nierenzellkarzinomen (RCC) in 9 von 11 getesteten Tumoren detektiert. RGS1 war hierbei mehr als achtzehnfach überexprimiert. Darüberhinaus konnten Koga et al. eine RGS1-mRNA Überexpression in 4 von 6 adulten T-Zell-Leukämien (ATL) nachweisen, verglichen mit PHA Blasten von gesunden Kontrollprobanden. All diese Erkenntnisse machen dieses Tumorantigen zu einem interessanten Kandidaten immuntherapeutischer Forschungsansätze [49].

In dieser Arbeit wurde ein RNA-basiertes Vorgehen gewählt, um die mögliche Funktion dieses Moleküls als neues TAA zu untersuchen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass DCs, welche mit für ein TAA kodierender RNA oder mit Gesamt-Tumor-mRNA transfiziert wurden, die Potenz zur Induktion antigen- und tumorspezifischer T-Zell- Antworten gegen multiple Epitope besitzen [34, 63, 64, 69]. Hierzu wurde die RGS1 cDNA in einen Transkriptionsvektor kloniert. In einem zweiten Schritt wurde die gesamte RGS1-mRNA ("*full-length RGS1-mRNA*", das ist die Sequenz, die das vollständige Gen umfasst und somit für das ganze RGS1

Protein kodiert) *in-vitro* transkribiert, um damit DCs, die aus Monozyten des peripheren Blutes hergestellt wurden, zu transfizieren. Die so behandelten Zellen wurden als APCs zur *in-vitro* Induktion antigenspezifischer CTLs verwendet.

In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob RGS1 spezifische CTLs mehrerer gesunder Spender primär maligne Zellen in antigenspezifischer und HLA-restringierter Weise erkennen können. An Hand von Chrom- ^{51}Cr –Release-Assays wurde die lytische Aktivität der CTLs gegen Tumorzelllinien überprüft, welche endogen RGS1 exprimieren - wie z.B. Nierenzellkarzinome (RCCs), Melanome und Ovarialkarzinome. Zusätzlich wurde überprüft, ob dieser Ansatz auch auf ein autologes, initial pathologisch verändertes System übertragbar ist: Hierzu wurden DCs aus dem peripheren Blut eines sich in Remission befindenden CLL Patienten generiert und mit Gesamt-RGS1-mRNA transfiziert. Anschließend wurden auch die so generierten CTLs in einem Chrom- ^{51}Cr –Release-Assay überprüft.

RGS1 ist an vielen intrazellulären Regulationsprozessen, an diversen Signaltransduktionswegen und an der Regulation verschiedenster Migrationsprozesse beteiligt. Hinzu kommt die Tatsache, dass RGS1 auf vielen menschlichen Tumoren stark überexprimiert wird. Dies alles macht es, im Kontext der Tumor Vakzination, zu einem interessanten neuen TAA. Somit kann es als Zielscheibe für Tumorzellen verwendet werden, welche dieses Protein exprimieren, und bietet vielversprechende Ansatzpunkte für den Einsatz im Rahmen immuntherapeutischer Behandlungsmethoden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Affymetrix Genechip Scanner 3000	Affymetrix, Buckinghamshire, UK
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Bestrahlungsgerät Gammacell 1000	MDS Nordion, Bucks, UK
Betaplatte liquid scintillation counter 1205	Percin Elmar, Freiburg, Deutschland
Elektroporationsgerät Easyjet Plus TM	EquiBio/Peqlab, Erlangen, Deutschland
Fotometer RNA/DNA Calculator Gene Quant TM II	Amersham Biosciences Europe Bmbh, Freiburg, Deutschland
Mini-Protean3 Electrophoresis-System	BioRad Laboratories GmbH München, Erlangen
Multi-Detektions-Reader-SLT Rainbow	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
PCR-Gerät Gene Amp PCR System 9600	Pekin Elmer Life Science, Wellesley, USA
RNeasy® Mini Anionenaustauscher-spin-Säulen	Qiagen, GmbH, Hilden, Deutschland
Scanner Agilent 2500A GeneArray Scanner	Agilent, Waldbronn, Deutschland

Tabelle 1: Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
UV-Reader Biometra Bio Doc Analyze	Whatman Biometra GmbH, Wellesley, USA
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf Hamburg Deutschland, Wellesley, USA
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Kendro Hanau Deutschland

Tabelle 2: Geräte und Hersteller (Fortsetzung)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-Well Zellkulturplatte FALCON® Multiwell TM	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
24-well Zellkulturplatte Falcon®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Zellkulturplatte U-Shape Cellstar®, with lid, TC-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon® Blue Max TM 50ml Blue cups	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
Falcon® Blue Max TM 10 ml Blue cups	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
Luma Plate TM -96	Packard Bioscience BV, Groningen, Niederlande
Zellkulturflaschen Falcon® Tissue Culture Flask 0,2 µl Vented Blue Plug Seal Cup 70 ml, 275 ml	BD-Falcon, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Reagenzien

Einige Chemikalien und Biochemikalien, welche hier nicht explizit erwähnt sind, wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck Eurolab (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth & Co. (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, Deutschland).

Produkt	Hersteller
Bio Separating Solution	BioChromAG, Berlin, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Biotinylated SDS Page Standards Low Range	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
[⁵¹ Cr]- Natrium-Chromat	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland
DMSO	Serva, Heidelberg, Deutschland
ECTL TM plus detection refent	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland
Fetal Bovine Serume 10082	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler TM 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
GM-CSF	Leukine Liquid Sargramostim, Bayer HealthCare Pharmaceuticals, USA
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

Tabelle 4: Reagenzien

Produkt	Hersteller
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
IL4	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Penicillin Streptomycin 100ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin horseradish peroxidase conjugate	Amersham Life Science, Freiburg, Deutschland
TLR3-Ligand (Poly I:C)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TLR7/8-Ligand (R848)	InvivoGen, San Diego, USA
TNF- α	R&D Systems Wiesbaden, Deutschland
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	R&D Systems Wiesbaden, Deutschland

Tabelle 5: Reagenzien (Fortsetzung)

2.1.4 Kits und Primer

Produkt	Hersteller
BioArray High Yield Gene Chip IVT Labeling kit	Enzo Diagnostics, Inc., Framingdale, USA
cDNA-Set: First-Strand Synthesis Systems for RT-PCR	Roche, Mannheim, Deutschland
Gene Chip IVT Labeling kit	Affymetrix, Buckinghamshire, UK
HG-U133 Plus 2.0 oligonucleotide microarray	Affymetrix, Buckinghamshire, UK
Human Genom U133A oligonucleotide microarray	Affymetrix, Buckinghamshire, UK
Oligo-dT-Primer	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
PCR-Set: Amplitaq	Perkin Elmer, Boston, USA
RNeasy® Mini kits	Ambion, Huntingdon, UK
RNA 6000 Pico LabChip kit	Agilent, Waldbronn, Deutschland
SP6/T7 m MESSAGE mMACHINE® kit	Ambion, Huntingdon, UK

Tabelle 6: Kits und Primer

2.1.5 Medien und Puffer

Produkt	Hersteller
DNA-Ladepuffer	5 % Glycerin 166,7 μ M EDTA 0,025 % Bromphenolblau
FACS-Puffer	PBS+BSA 0,5 %
Einfriermedium	RP 10 unter Zusatz von 10 % DMSO
RP10	RPMI unter Zusatz von Glutamax plus 10 % hitzeinaktiviertem FCS, Penicillin 100 IU/ml, außerdem Streptomycin 100 mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 mit Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MACS-Puffer	DPBS 5 % BSA 2 mM EDTA
PBS: Dulbeccos Phosphate Buffered Saline 0,0095 M (PO ₄)	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
TAE	40 nM Tris 13 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8.0
X-VIVO	Lonza Verviers, Verviers, Belgien
X-Vivo 20	Bio Whittaker, Whakersville, USA

Tabelle 7: Medien und Puffer

2.1.6 RNA

Produkt	Hersteller
RGS1-RNA	PD Dr. rer. nat. Frank Grünebach, Medizinische Universitätsklinik II, Otfried-Müller-Straße 10, 72076 Tübingen, Deutschland (Forschungsschwerpunkt: Molekulare und funktionelle Untersuchungen zur Differenzierung und Funktion humaner dendritischer Zellen)
EGFP-RNA (enhanced green fluorescent protein)	PD Dr. rer. nat. Frank Grünebach, Medizinische Universitätsklinik II, Otfried-Müller-Straße 10, 72076 Tübingen, Deutschland (Forschungsschwerpunkt: Molekulare und funktionelle Untersuchungen zur Differenzierung und Funktion humaner dendritischer Zellen)

Tabelle 8: RNA

2.1.7 Antikörper

Produkt	Hersteller
Biotin-Antistreptavidin Antikörper	Molecular Probes, Invitrogen
Streptavidin-Phycoerythrin	Molecular Probes, Invitrogen
Monoklonaler Antikörper W6/32 gegen HLA-Klasse-I Moleküle	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD DR. rer. nat. Stefan Stevanović des interfakultären Institutes für Zellbiologie der Universität Tübingen, Deutschland

Tabelle 9: Antikörper

2.1.8 Tumorzelllinien

Tumorzelllinien	Herkunft und Wachstumsverhalten	HLA-A Status	endogene RGS1 Expression	Bezogen von
A498	Humanes Nierenzellkarzinom, adhären	HLA-A2	RGS1-pos.	Prof. A. Knuth Frankfurt, Deutschland
Caki-1	Humanes klarzelliges Nierenzellkarzinom		RGS1-pos.	ATCC
CROFT	Humane EBV immortalisierte B-Zell-Linie, Zellsuspension	HLA-A2	RGS1-pos.	O. J. Finn Pittsburgh, USA
HL-60	Humane AML, Zellsuspension	HLA-DR neg.	RGS1-pos.	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
K562	CML, Zellsuspension	HLA-A2	RGS1-neg.	ATCC
KASUMI-1	Humane AML, Zellsuspension	HLA-DR pos.	RGS1-pos.	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
MCF-7	Humanes Mammakarzinom, adhären	HLA-A2	RGS1-neg.	ATCC
Mel 1479	Humanes malignes Melanom, adhären	HLA-A3	RGS1-pos.	Prof. G. Pawelec Tübingen

Tabelle 10: Tumorzelllinien

Tumorzelllinien	Herkunft und Wachstumsverhalten	HLA-A Status	endogene RGS1 Expression	Bezogen von
MZ1774	Humanes Nierenzellkarzinom, adhären	HLA-A2	RGS1-pos.	Prof. A. Knuth, Frankfurt, Deutschland
NT-2 (NTERA-2)	Pluripotente embryonale Karzinomzellen, adären		RGS1-pos.	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
SD-1	Humane lymphoblastoide B-Zell-Blasten, Zellsuspension	HLA-DR pos.	RGS1-pos.	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
THP-1	Humane Akute monozytoide Leukämiezellen, Zellsuspension	HLA-DR pos.	RGS1 neg.	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
U 266	Humanes multiples Myelom, Zellsuspension	HLA-A2	RGS1-pos.	ATCC
Skov-3	Humanes Ovarialkarzinom, adhären	HLA-A3	RGS1-pos.	O. J. Finn Pittsburgh, USA
WERI-RB-1	Humanes Retinoblastom		RGS1-neg.	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 11: Tumorzelllinien (Fortsetzung)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Tumorzelllinien erfolgte in RP10-Medium in 75cm² Kulturflaschen. In den Inkubatoren herrschte eine Temperatur von 37 °C, 5% CO₂ bei feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre. PH-Wert-Änderungen des Mediums, bedingt durch Nährstoffverwertungen, führten zu einem Farbumschlag des Indikators. Adhärent wachsende Tumorzelllinien wurden etwa beim Erreichen einer Konfluenz von 75% mit PBS gewaschen, die Flüssigkeit dekantiert und die Zellen mit Trypsin/EDTA von den Wänden der Kulturflasche abgelöst. Diese Zellen wurden nun, analog den nicht adhären wachsenden Tumorzelllinien, in je ein 50ml Falcontube überführt und bei 1800 rpm, 5 min Raumtemperatur zentrifugiert. Der Waschzyklus wurde zwei mal wiederholt. Ein Teil der Zellen wurden verworfen, die restlichen Zellen resuspendiert und in Zellkulturflaschen in RP10 Medium angesetzt.

2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Ca. $1 - 2 \times 10^7$ Zellen wurden in 1,8 ml nunc tubes in 1ml RP10 unter Zusatz von 10% DMSO aufgenommen und sofort bei -80 °C eingefroren. Beim Auftauen wurde das Pellet in 37 °C RP10 resuspendiert, mit sterilem PBS gewaschen, um zügig das zytotoxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Medium kultiviert.

2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Neubauer-Zählkammern verwendet. Als Farbstoff wurde Trypanblau verwendet, für den vitale Zellmembranen nicht permeabel sind. Dadurch können vitale Zellen leicht von avitalen visuell differenziert werden. 20 μ l Zellsuspension wurden mit 20 μ l Farbstoff gemischt. In den sechzehn Quadranten der der Zählkammer wurden alle farblosen Zellen ausgezählt. Die Zellzahl ergab sich wie folgt:

$$(Zellzahl \text{ aus } 16 \text{ Quadranten}) \times 10^4 \times 2 \text{ Zellen} / ml$$

Anm: Faktor 2 ist dimensionslos und entspricht der Verdünnung.

2.3 Molekularbiologische Methoden, Voarbeiten

2.3.1 Gen-Expressionsanalyse mit Hilfe von High-density Oligonucleotid Microarray (Arbeitsgruppe S.Stevanović, Abteilung Immunologie, Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen, Deutschland)

Microarrays dienen der molekularbiologischen Analyse des Transkriptoms einer Zelle. Mit ihrer Hilfe kann man die Expression mehrerer hunderttausend Gene analysieren. Hersteller wie Affymetrix stellen Genchips für verschiedene Organismen her. Durch das Prinzip der komplementären Basenpaarung werden die in der Zelle transkribierten Gene detektiert und mittels Fluoreszenzmarkierung visualisiert.

Gefrorene Tumorfragmente RCC0044, RCC0068, RCC0070, RCC0073, RCC0075, RCC0098 und RCC0103 wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Aus diesen Proben wurde die Gesamt-RNA mittels TRIzol (Invitrogen) entsprechend des Herstellerprotokolls vorbereitet. Danach folgte eine Reinigung mit RNeasy (Quiagen, Hilden, Germany). Die Qualität und Quantität wurden mittels Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Germany) unter Benutzung des RNA 6000 Pico LabChip kit (Agilent) ermittelt. Die Genexpressionsanalyse der RNA-Proben RCC0044, RCC0068, RCC0070, RCC0073, RCC0075, RCC0098, RCC0103 wurden mit dem Human Genom U133A oligonucleotide Microarray von Affymetrix durchgeführt (Affymetrix, Buckinghamshire, UK). Für alle anderen Proben wurde HG-U133 Plus 2.0 verwendet. Um Vergleichbarkeit zu erzielen, wurde auf beide Array-Typen die gleiche normale Nierenprobe hybridisiert. Alle Schritte wurden entsprechend des Affymetrix Handbuches 3 durchgeführt.

Kurz zusammengefasst wurden 5-8 μg Gesamt-RNA zur Synthese doppelsträngiger cDNA verwendet (Superscript RTII, Invitrogen und Oligo-dT-T7 primer MWG Biotech). Die *in-vitro* Transkription für die Arrays U133A wurde mit BioArray High Yield RNA Transcript Labeling kit (ENZO Diagnostics), die für die Arrays U133 Plus 2.0 mit Gene Chip IVT Labeling kit (Affymetrix) durchgeführt. Anschließend erfolgte die cRNA-Fragmentierung, Hybridisierung, und die Markierung mit Streptavidin-Phycoerythrin und mit Biotin-Antistreptavidin Antikörpern (Molecular Probes, Invitrogen). Zum Scannen wurden die beiden Scanner Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) oder der Affymetrix Genechip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0) verwendet. Die Analyse der Daten erfolgte mit MAS5.0 (U133A) oder GCOS (U133 Plus 2.0), beides Software von Affymetrix. Hierbei wurden für alle

Variablen die "default" Einstellung verwendet. Es wurden paarweise Vergleiche berechnet, wobei die jeweiligen normalen Nieren-Arrays als Basis herangezogen wurden. Für die Normalisierung wurden 100 von Affymetrix bereitgestellte housekeeping-Gene verwendet. Die relativen Expressionswerte wurden aus den von der Software gelieferten Signal-log-ratios errechnet und die normale Nierenprobe wurde als Referenz auf 1 gesetzt.

2.4 Molekularbiologische Methoden dieser Arbeit

2.4.1 RNA-Isolation für Reverse Transkriptase-PCR

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der RNeasy Mini Anionenaustauscher-spin-Säule (Qiagen) aus Tumorzelllysaten tierischer Zellen nach mitgeliefertem Protokoll isoliert. Quantität und Reinheit der RNA wurde mit Hilfe von UV-Spektrophotometrie bestimmt. Die RNA Proben wurden auf ihre Integrität hin routinemäßig mittels Formaldehyd/Agarosegel-Elektrophorese getestet und bei -80 °C konserviert.

2.4.2 Reverse Transkriptase-(RT)-PCR

Die cDNA Synthese erfolgte nach dem Protokoll von SuperscriptTM® First-Strand Synthesis Systems for RT-PCR (Roche). Die cDNA Synthese erfolgte mit Hilfe eines sogenannten Oligo-d(T)-Primers. Dieser besteht aus mehreren Thymin-Basen, welche komplementär zum Poly-(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA sind, da auch die reverse Transkriptase ein kurzes Stück DNA zur Initiierung der DNA Synthese benötigt. Das Ergebnis ist cDNA einer Länge von 1-2 kb.

Die PCR ist eine molekularbiologische Methode, mit deren Hilfe sich gezielt kleinste DNA Mengen exponentiell amplifizieren und sequenzieren lassen. Im ersten Schritt erfolgt durch Temperaturerhöhung auf 94 °C die Denaturierung der Doppelstrang-DNA in Einzelstrang-DNA. In einem 2. Schritt (Annealing) erfolgt durch Abkühlung auf ca. 50 °C die Bindung der aus ca. 20 Basen bestehenden Oligonukleotide komplementär am 5'Ende der beiden Einzelstränge (sogenannte Forward- und Reverse Primer). Die Synthese erfolgt schließlich durch Zugabe der DNA-Polymerase (meist thermostabile Taq-Polymerase). Durch erneutes Erhitzen auf über 90 °C zerlegt sich die DNA wieder in Einzelstränge, der Zyklus beginnt von vorne. So können spezifische Genabschnitte beliebig oft amplifiziert werden.

Der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) liegt dasselbe Prinzip zugrunde, nur

ist das Ziel der Nachweis einer bestimmten RNA-Sequenz. Hierfür muß zunächst die gesamte RNA einer Zelle mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben werden. Als Primer für die Umschreibung dienen Oligo-dT-Nukleotide, die sich an den Poly-A-Schwanz der RNA anlagern können. Der gesuchte Abschnitt kann dann im Anschluß von der cDNA (*copy*DNA) mit der PCR amplifiziert werden.

PCR-Ansatz:

1 μ l cDNA wurde zu einer 50 μ l PCR Amplifizierungsreaktion verwendet. Um die Qualität der RNA und die Effizienz der cDNA Synthese zu kontrollieren, wurden 1,0 μ l cDNA mittels eines Intron-übergreifenden Primerpaars für β_2 -Mikroglobulin Gene amplifiziert.

Für die RGS1 und die β_2 -Mikroglobulin cDNA wurden folgende PCR Temperaturen verwendet:

- Vorbehandlung: 5 min 94 °C, 32 oder 25 Zyklen bzw. 30 s
- Annealing: 30 s bei 72 °C
- DNA Synthese: 60 s bei 72 °C
- Extensionsschritt: 7 min 72 °C

(Die Annealing Temperatur für β_2 -Mikroglobulin betrug 55 °C, die für RGS1 60 °C.) Primerfrequenzen:

- β_2 -Mikroglobulin (Zugangsnummer NM_004048),
5' -GGGTTTCATCCATCCGACAT- 3' und
5' -GATGCTGCTTACATGTCTCGA- 3'
- RGS1 (Zugangsnummer NM_002922),
5' -TCCCAGGTTCCCTCAAATCAG- 3' und
5' -TCTGCGCCTGGATAACTTTC- 3'

Um die PCR-Produkte zu analysieren, wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese (Agarosegel 3.0%) durchgeführt. Die Agarosegele enthalten Ethidiumbromid, welches mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht unter dem Transilluminator wird das Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt, die verschiedenen DNA-Banden werden sichtbar und können dokumentiert werden. Für die Analyse und Dokumentation der DNA-Banden wurde das Biometra Bio Doc Analyse Gerät verwendet.

2.4.3 Generierung des RGS1- und des EGFP-In-vitro-Transkriptes

Für die Herstellung des RGS1-IVT wurde ein synthetischer Poly-(A)₃₀-Schwanz mit samt einer neuen *Nde*I Restriktionsstelle an die *Not*I Stelle von pRc/CMV-RGS1-poly(A)₃₀ eingefügt. Dies ergab das Konstrukt pRc/CMV-RGS1-poly(A)₃₀. Vor der *in-vitro* Transkription wurde das Plasmid hinter dem Poly-A-Schwanz durch Verdau mit *Nde*I Restriktionsenzyme linearisiert. Zur *in-vitro* Transkription unter der Kontrolle des T7 Promotors wurde das T7 mMACHINE mMACHINE kit gemäß des Herstellerprotokolls genutzt.

Das EGFP-IVT wurde mit Hilfe des SP6 mMACHINE kit (Ambion, Huntingdon, UK) hergestellt [34].

Die Reinigung der IVTs wurde mittels RNeasy Mini anion-exchange spin columns (Qiagen) gemäß des RNA Reinigungsprotokolls des Herstellers durchgeführt. Quantität und Reinheitsgrad wurden mit Hilfe von UV-Spektrometrie ermittelt. Routinemäßig wurden die IVTs auf Größe und Integrität mittels Formaldehyd/Agarose-Gel-Elektrophorese getestet und in kleinen Aliquots gelagert [31].

2.5 Generierung dendritischer Zellen aus adhärennten Monozyten des peripheren Blutes (PBMNC's)

Verwendet wurden Buffycoats der Blutspendezentrale der Universität Tübingen. Die Monozyten des peripheren Blutes (PBMNC's) der freiwilligen gesunden Spender wurden mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll/Biochrom) isoliert. Dieses Verfahren basiert darauf, dass das Ficoll eine höhere Dichte besitzt als die PBMNC's, jedoch eine geringere als andere zelluläre Blutbestandteile (Granulozyten, Thrombozyten, Erythrozyten). Dadurch werden beim Zentrifugieren die zellulären Bestandteile voneinander getrennt – es entsteht eine weiße Schicht (PBMNCs) zwischen Ficoll und Serum, welche sich gut abnehmen lässt. 50 ml Blut wurden auf vier Falcontubes verteilt (bei 100 ml auf 6 Falcontubes), mit PBS verdünnt und bis maximal 35 ml aufgefüllt. (Das Verdünnungsverhältnis sollte mindestens bei 1:1 liegen, angestrebt wurde jedoch ein größerer Anteil an PBS von etwa 1:5). 12 ml Ficoll (Dichte 1,007 g/l) wurden vorsichtig und ganz langsam untergeschichtet. Es folgte eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 2000 rpm ohne Bremse. Ein Teil des Überstandes wurde verworfen, die weiße Zellschicht (hauptsächlich Lymphozyten und Monozyten) vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und auf 4 bis 6 Falcontubes verteilt, mit PBS aufgefüllt (ca. 40

ml), zentrifugiert (entspricht Waschvorgang, Zyklus wurde 2 mal wiederholt) und in X-Vivo Medium aufgenommen. Nun wurde die Lebendzellzahl bestimmt und es folgte eine Separierung der PBMNCs in „DCs in spe“ (ca 8×10^8 Zellen, welche in 8 Anzuchtflaschen angesetzt wurden) und in Zellen, die kryokonserviert werden mußten (der Rest), da sie erst zu einem späteren Zeitpunkt Verwendung fanden.

2.5.1 *In-Vitro* Generierung Dendritischer Zellen

Die so isolierten PBMNCs wurden nun in 75 cm^2 Anzuchtflaschen bei einer Dichte von 1×10^8 /Flasche 1,5 h in X-Vivo Medium inkubiert (37°C , 5% CO_2 , feuchtigkeitsgesättigt). Da CD14^+ Monozyten die Fähigkeit besitzen, unter gegebenen Bedingungen am Boden der Zellkulturflaschen in Adhärenz zu gehen, verblieben diese beim Spülen mit PBS am Boden der Flasche. Alle nicht-adhärenenten Zellen - inklusive der später noch für die Restimulation benötigten PBMNCs - wurden aus den Überständen abgenommen, in Nunc-tubes überführt (1×10^7 /ml Medium) und unter Zugabe von 10% DMSO bei -80°C eingefroren. Zur Generierung unreifer DCs wurde an Tag 0, 2, 4 und 6 GM-CSF (100ng/ml) und Interleukin-4 (20 ng/ml) zugegeben. Zur Induktion reifer DCs wurde den Zellen für 24h zusätzlich Poly I:C (TLR3-Ligand, $5 \mu\text{g/ml}$) und R848 (TLR7-Ligand, $2 \mu\text{g/ml}$) beigefügt.

2.5.2 Ernten reifer Dendritischer Zellen

An Tag 7 konnten die nun reifen DCs mittels zweimaligen Waschens mit PBS und EDTA 5% aus den Kulturflaschen geerntet werden. Durch das EDTA lösten sich die adhärenenten DCs vom Boden der Kulturflasche. Die Überstände wurden abgenommen und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nun wurden in jede Flasche 10 ml der PBS/EDTA Lösung gegeben. Nach ca. 10 min Einwirkzeit wurde mehrmals mit PBS gepült, die Suspension auf mehrere Falcontubes verteilt und zentrifugiert (1500 U/min , $t = 5 \text{ min}$). Die Überstände wurden abgesaugt, die Pellets in RP10 resuspendiert, gepoolt und die Zellzahl ermittelt.

2.5.3 Dendritische Zellen am Scheideweg

Hier trennt sich der bisher gemeinsame Weg der DCs:

Ein Teil der DCs wurde sofort mit RGS1-RNA transfiziert. Dies geschieht mittels Elektroporation (s.u.). Zur CTL Induktion wurden standardmässig 2×10^6 DCs elektroporiert, um später 4 wells à 5×10^5 DCs (auf 24-well-Platten) ansetzen zu können.

Ein kleiner Teil der DCs wurde abgenommen, um zu überprüfen, ob die Zellen durch das zugegebene Poly I:C/R848 wie gewünschte maturiert wurden. Dies wurde mittels durchflußzytometrischer Verfahren (FACS = fluorescence activated cell sorting, zum Prinzip s.u.) getestet.

Der Rest der DCs wurde kryokonserviert, um für spätere Restimulationsverfahren bzw. für den *Chrom-[Cr⁵¹]-Release-Assay* zur Verfügung zu stehen.

2.6 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Dieses Prinzip beruht auf der Streuung optischer Signale seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Das Maß für die Beugung bzw. Brechung des Lichts bildet das Vorwärts- (FSC = Forward-Scatter, Funktion: ungefähre Zellgröße) bzw. das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards-Scatter, Funktion: Zellgranularität und Zellkomplexität). Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Fotomultiplier nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit ihrer Größe und ihrer Oberflächenkomplexität. Da sich reife DCs von unreifen durch ihre Rezeptorexpression unterscheiden, lässt sich ihre Maturität über Markierung mit verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern emitteln.

Fluoreszenzmessung: Bei der direkten Markierung verwendet man spezifische, gegen Antigene der Zelloberfläche gerichtete Antikörper, an die ein Farbstoff gekoppelt ist. Die indirekte Markierung erfolgt mit fluoreszenzmarkierten Anti-Immunglobulinen. Die Zellen werden durch eine Kapillare gepresst und von einem Laserstrahl erfasst. Fotomultiplier (Fotodetektoren) messen die Lichtstreuung (Maß für Granularität der Zelle und die Emission der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe, s.o.). Ein Computer analysiert die Informationen. Werden viele Zellen auf diese Weise untersucht, lässt sich sowohl die Anzahl der Zellen mit bestimmten Eigenschaften, als auch die Expressionsrate der Molekülexpressionsprofile der Zelloberfläche analysieren.

2.6.1 FACS-Färbung (DC-Panel)

Die zur FACS Färbung bestimmten DCs (in einer Konzentration von ca. 1×10^6) wurden zentrifugiert (1500rpm, t=5 min), der Überstand abgekippt und in dem zurücklaufenden Medium unter Zugabe von 20 μ l Mouse IgG resuspendiert und 5-10 min inkubiert. Es erfolgen 4 verschiedene AK-Markierungen, die in vier tubes vorgelegt werden.

1. 6 μ l Anti-Mouse IgG FITC/ 6 μ l Anti-Mouse IgG PE

2. 6 μl CD1a FITC / 12 μl CD 83 PE
3. 6 μl CD14 FITC / 6 μl HLA DR PE
4. 6 μl CD 86 FITC / 6 μl CD 80 PE

(Der erste AK wird auf den Boden des Zentrifugenröhrchens pipettiert, der zweite an die Wand des tubes).

Nach der Inkubation wurden 2 ml FACS Puffer zugegeben, zentrifugiert (1500 rpm, t=5 min), und in 450 μl FACS Puffer aufgenommen. In jedes der 4 vorgelegten tubes wurden 100 μl pipettiert und 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde je 1 ml FACS Puffer zugegeben, zentrifugiert und in je 200 μl FACS Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben analysiert.

2.7 RNA Elektroporation Dendritischer Zellen

2.7.1 Prinzip

Es gibt verschiedene Verfahren, DCs *in-vitro* dazu zu verhelfen, Tumorantigen zu präsentieren. Eine Möglichkeit hierfür bietet die Elektroporation mit RNA - ein Verfahren, mit dem man eine transiente Permeabilität der Zellmembran herstellt. Durch kurzzeitige Pulse eines sich entladenden Kondensators entsteht ein elektrisches Feld, welches eine Poreninduktion mit konsekutivem Verlust der Semipermeabilität der Zellmembran zur Folge hat. Mit diesem Verfahren können sehr hohe Transformationsraten erreicht werden. Grünebach et al. [34, 33] analysierten die Effektivität verschiedener Strategien. Es konnte gezeigt werden, dass DCs, welche mit für Tumorantigen kodierender RNA oder Gesamt-Tumor-mRNA transfiziert wurden, in der Lage sind, sehr potente antigen- und tumor-spezifische T-Zell-Immunantworten gegen multiple Epitope zu generieren. Diese Technik verlangt dabei weder die Kenntnis der Haplotypen der Patienten, noch benötigt man die Definition des Tumorantigens. Somit bietet diese Technik enormes Potential zur breiten klinischen Anwendung.

In dieser Arbeit wurde für die Elektroporation RGS1-IVT mRNA verwendet, welche gentechnisch hergestellt wurde. Als Kontroll-RNA wurde EGFP (enhanced green fluorescent protein)-IVT eingesetzt.

2.7.2 Vorgehen

Reife DCs wurden an Tag 7 zweimal mit X-Vivo Medium gewaschen und in einer Konzentration von 2×10^7 DCs/ml Medium aufgenommen. 200 μl der Zellsuspension

sion wurden mit 10 μg RNA in einer 4 mm Küvette elektroporiert (Easyject Plus^Runit, EquiBio/Peqlab, Erlangen, Germany; Einstellungen: Spannung: 300V, Kapazität: 150 μF , Widerstand 1540 Ω). Direkt im Anschluß wurden die Zellen in 1 ml RP10 überführt und in den Inkubator gestellt.

2.8 Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten (CTLs) und Restimulation

Die mit RNA-IVT elektroporierten DCs wurden mit autologen PBMNCs ko-kultiviert. Hierbei präsentierten die DCs den naiven T-Lymphozyten MHC-I-gebunden das aus dem "gewünschten" Tumorantigen abgeleitete Peptid an ihrer Oberfläche über deren T-Zell Rezeptor. Nach Aktivierung entstand eine spezifische Immunantwort gegen dieses AG gerichteter T-Zell-Klon, welcher expandierte- es wurde eine primäre Immunantwort initiiert (*CTL-Induktion*).

Nach 7 Tagen erfolgte eine *Restimulation*, die bis zu 3 mal wiederholt wurde. Das Vorgehen ist analog, wobei hier zusätzlich autologe, bestrahlte PBMNCs (standardmässig $2,5 \times 10^6$ /well) sowie IL-2 (2 ng/ml an Tag 1,3 und 5) zur Wachstumsstimulation der heranreifenden CTLs zugegeben wurden. Die bestrahlten PBMNCs haben nur "Füllfunktion".

2.8.1 Vorgehen

CTL-Induktion: Es wurden standardmässig 5×10^5 elektroporierte DCs mit $3,0 \times 10^6$ PBMNCs pro well angesetzt. Hierzu wurden autologe PBMNCs aufgetaut, gewaschen und zu den RNA-transfizierten DCs in eine 24-well-Platte gegeben (Endvolumen: 2ml RP10). Es erfolgte eine siebentägige Kultivierung im Brutschrank (ohne Wachstumsstimulation).

Restimulation: Da die DCs nach einiger Zeit absterben, müssen die CTL nach 7 Tagen restimuliert werden, indem man sie mit frisch transfizierten, autologen DCs sowie mit bestrahlten autologen PBMNCs ko-kultiviert (routinemässig $2,5 \times 10^6$ /well). Hierzu wurden die DCs am Vortag der Restimulation aufgetaut, gewaschen, in einer 6-well-Platte kultiviert (3ml RP/well) und mit 100ng/ml GM-CSF sowie 10ng/ml TNF- α versetzt. 24 Stunden später erfolgte dann die Elektroporation. Die stimulierten Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen mit PBS aus der 24-well-Platte entfernt, es wurde die Zellzahl ermittelt. Standardmässig wurden 5×10^5 CTL in 1 ml RP10 pro well in eine 24-well-Platte pipettiert, dann die elektroporierten DCs hinzugegeben (5×10^5 DC/well). Die PBMNCs wurden aufgetaut,

gewaschen und mit 30 Gy bestrahlt. Wie oben beschrieben wurde ab nun zur Wachstumsstimulation der CTLs IL-2 beigegeben. Dieses Verfahren wird nach 7, eventuell auch noch einmal nach 14 Tagen wiederholt. Letztendlich wurde die zytolytische Aktivität 5-7 Tage im Anschluss an die letzte Restimulation in einem *Chrom*- ^{51}Cr -*Release-Assay* getestet.

2.9 Standard *Chrom*- ^{51}Cr *Release-Assay*

Zur Überprüfung der lytischen Potenz der Effektorzellen (CTLs) wurden *Chrom*- ^{51}Cr -*Release-Assays* durchgeführt. Hierbei inkubiert man Targets (Zielzellen) mit radioaktivem Chrom [^{51}Cr , *Natrium – Chromat*], so dass sie es inkorporieren. Das überschüssige freie Chrom wurde abgewaschen. Nun konnten die reifen, stimulierten CTLs hinzugegeben werden. Erkennen die Effektorzellen ihre Targets, lysieren sie diese. Die dadurch freigesetzte Radioaktivität konnte in den Überständen gemessen werden. Die Tumorzelllinie K562 (Zellen einer CML-Linie), welche keine MHC-Klasse-I-Moleküle exprimiert, wurde zum Ausschluß einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität in jedem *Chrom*- ^{51}Cr -*Release-Assay* als Kontrolle verwendet. Durch das Fehlen der MHC-Klasse-I-Moleküle können diese Zellen von NK-Zellen erkannt und lysiert werden.

Die DCs wurden, wie oben beschrieben, mit RNA-IVT elektroporiert (RGS1-RNA oder irrelevante RNA wie EGFP, die als Negativ-Kontrolle dient) und danach mit den anderen Targetzellen (Tumorzelllinien) 1 h bei 37°C mit *Chrom*- ^{51}Cr inkubiert. Im Anschluß wurde das überschüssige Chrom [^{51}Cr] abgewaschen und die Targets in einer Konzentration von 1×10^4 pro well in 100 μl RP 10 Medium in eine 96-well-Platte (U-Form/Round-Bottomed) pipettiert. Die CTLs wurden mit PBS aus der 24-well-Platte geerntet, gewaschen und die Zellzahl ermittelt. Entsprechend der Konzentration der Targets wurden verschiedene CTL-Konzentrationen zu einem Gesamtvolumen von 200 μl /well zugegeben. Standardmäßig wurden folgende CTL-Verdünnungsreihen hergestellt: Ausgangspunkt bildete ein Effektor-zu-Target-Zellen Verhältnis von 30:1 im ersten well bei einer Zellzahl von 3×10^5 CTL. Davon ausgehend wurde in 5 Schritten jeweils gedrittelt (10:1 im zweiten, 3:1 im dritten, 1:1, 0,3:1, 0,1:1 im jeweils vierten und fünften und sechsten well). Die spontane *Chrom* [^{51}Cr]-Freisetzung der Targets wurde in 3 wells ermittelt, welche ausschließlich Targets, jedoch keine Effektorzellen enthalten. Die maximale *Chrom* [^{51}Cr]-Freisetzung wurde in den letzten 3 wells ermittelt. Darin wurden die Targets mit je 100 μl 2% Triton X-100 versetzt, welches die Zellmembran zerstört. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurden pro well 50

μl des Überstandes auf Luma PlatesTM (Packard Bioscience BV) pipettiert um diese über Nacht trocknen zu lassen. Am nächsten Tag wurde die Radioaktivität in einem Betacounter gemessen (Betaplatte liquid scintillation counter, Perkin Elmar Wallac). Die Lyserate in Prozent errechnete sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}}{\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}} \cdot 100 = \% \text{ spez. Lyse}$$

Die spontane Chrom-Freisetzung der DCs als Zielzellen betrug in allen Experimenten 15-20%.

2.10 Antikörperblockierung im Chrom [⁵¹Cr]-Release-Assay

Um die HLA-Restriktion der CTLs nachzuweisen, wurde ein Ansatz mit ausgewählten Chrom [⁵¹Cr]-markierten Targetzelllinien (z.B. RGS1 exprimierende Tumorzelllinie A498) mit spezifisch gegen HLA-Klasse-I-Moleküle gerichteten, monoklonalen Antikörpern blockiert (W6/32, 20 $\mu\text{g/ml}$). Nach einstündiger Inkubation bei 37°C in 1 ml RP10 Medium bindet der Antikörper spezifisch an das HLA-Klasse-I-Molekül und verhinderte dadurch das Erkennen des MHC-Rezeptorkomplexes durch den spezifischen T-Zell-Rezeptor der Effektorzellen. Die Targetzelle "blieb unerkant" - sie wurde nicht lysiert.

Parallel hierzu wurde ein Kontrollansatz mit einem Antikörper mitgeführt, der spezifisch an HLA-Klasse-II-Moleküle bindet. Dieser blockiert die Erkennung des MHC-I-Rezeptormolekülkomplexes nicht. Somit kann die Targetzelle von den spezifischen CTLs erkannt werden.

2.11 Cold Target Inhibition

Die antigenspezifische Lyse der Effektorzelle wurde belegt, indem die Kapazität unmarkierter, RGS1-IVT transfizierterer PBMNCs analysiert wurde, Tumorzellyse zu blockieren. Mit dieser Methode konnte belegt werden, dass die induzierten CTLs in HLA-restringierter und antigenspezifischerweise Tumorantigen erkennen und konsekutiv eliminieren.

PBMNCs wurden mit RGS1-IVT transfiziert, jedoch nicht mit Chrom [⁵¹Cr] beladen (*Cold Targets*). Diese wurden dann zu Chrom [⁵¹Cr] markierten RGS1-positiven Tumorzellen (*Hot Targets*, z.B. Skov) in je 50 μl Medium in einem Verhältnis von 20:1 gegeben. Da die *Cold Targets* im Überschuss vorhanden sind,

werden fast nur diese von den spezifischen Effektorzellen lysiert - es wird kein Chrom freigesetzt. Die *Hot Targets* bleiben von den CTLs unangetastet .

Parallel dazu wurde ein Ansatz mitgeführt, in dem PBMNCs mit irrelevanter EGFP-RNA transfiziert wurden. Diese wurden von den RGS1-spezifischen CTLs nicht erkannt - die mit Chrom [^{51}Cr] markierten Hot Targets wurden lysiert und Chrom [^{51}Cr] in das umgebende Medium abgegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten durch die AG Stevanović

3.1.1 Genexpressionsanalysen in Nierenzellkarzinomen (RCC)

Mittels Microarraytechnologien wurde das Ausmaß der RGS1-mRNA Expression in humanen Nierenzellkarzinomen (RCCs) im Vergleich zu dessen Expression in normalen Nierengeweben analysiert. Hier wurde durchweg eine Überexpression von RGS1 detektiert (in 9 von 11 getesteten Tumoren, RGS1 war hier achtzehnfach überexprimiert; hier nicht gezeigt).

(Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD DR. rer. nat. Stefan Stevanović des interfakultären Institutes für Zellbiologie der Universität Tübingen, Institut für Zellbiologie, Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen, Deutschland)

3.2 Ergebnisse dieser Arbeit

3.2.1 Expressionsanalyse von RGS1 mittels RT-PCR

Um die mögliche Anwendbarkeit von RGS1 als breit einsetzbares Zielantigen in der Entwicklung von Vakzinierungstherapien zu untersuchen, wurden RT-PCRs mit primär leukämischen Zellen und etablierten Tumorzelllinien durchgeführt. Wie in Abbildung 2A zu sehen, konnte eine RGS1 Expression in den Tumorzelllinien SD-1, CCRF7, SKOV-3, U266, Caki-1, KASUMI-1, NT-2, A498, HL-60, MZ1774, Mel1479 und CROFT detektiert werden (Abbildung 2A). Ebenso konnte RGS1 in drei primären lymphatischen Leukämien (CLL), in drei von fünf akuten myeloischen Leukämien (AML), in einer von fünf chronisch myeloischen Leukämien (CML) sowie in zwei von fünf akuten lymphatischen Leukämien (ALL) nachgewiesen werden (Abbildung 2B).

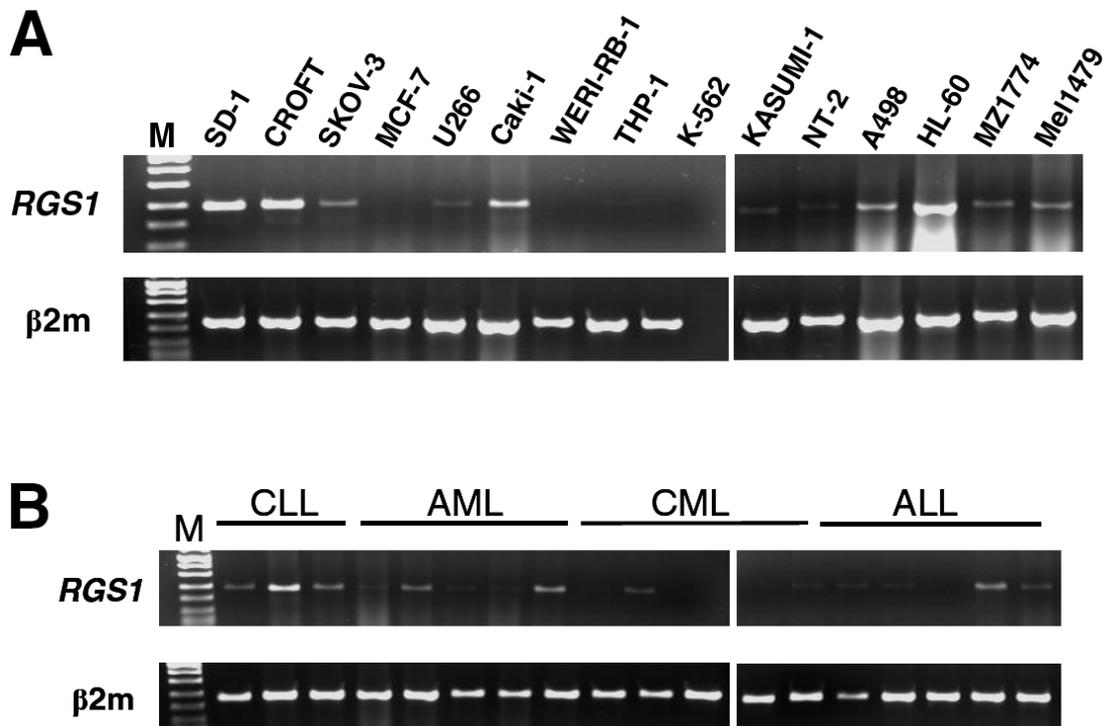


Abbildung 2: Expressionsanalyse von RGS1: Die RT-PCR mit RGS1-spezifischen Primern analysiert die RGS1 Expression sowohl in humanen Tumorzelllinien (A), als auch in primär normalen und Tumorzellen (B). Kontroll RT-PCR mit $\beta 2$ -Mikroglobulin ($\beta 2m$)-spezifischen Primern (M: Roche Molecular Weight Marker VIII)

3.2.2 RGS1-spezifische CTLs lysieren Tumorzellen sowohl epithelialen, als auch hämatologischen Ursprungs

In der ersten Serie der Experimente wurden DCs von gesunden, *HLA-A2 positiven* Spendern generiert.

Diverse Tumorzelllinien und RGS1-IVT transfizierte DCs wurden als Zielzellen eingesetzt. Wie die Ergebnisse des Chrom- ^{51}Cr -*Release-Assay* zeigen, lysierten die CTLs die mit *full-length*-RGS1-IVT elektroporierten Zellen (Abbildung 3) sowie die RGS1⁺/HLA-A2⁺ Tumorzelllinien MZ1774 und A498 (Abbildung 3 und 4). Im Gegensatz dazu wurden die als Negativkontrollen eingesetzten RGS1⁺/HLA-A3⁺ Tumorzelllinien SKOV-3, sowie die mit irrelevanter EGFP-IVT elektroporierten DCs nicht erkannt und blieben somit von der Lyse verschont (Abbildung 3). Hier zeigt sich, dass die RGS1-spezifischen CTLs HLA-restringiert lysieren. Zum Ausschluß einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität wurde die Kontroll-Zelllinie K562 eingesetzt.

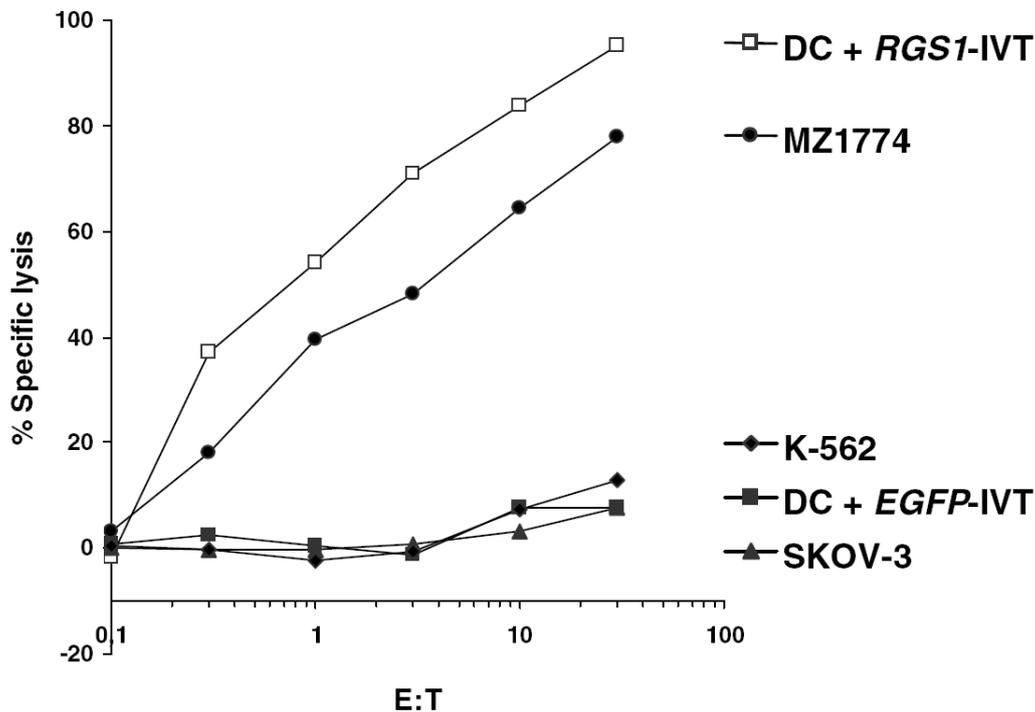


Abbildung 3: Induktion RGS-1-spezifischer CTLs mittels RGS1-IVT elektroporierter DCs. Unreife DCs von gesunden, HLA-A2⁺ Spendern wurden mit RGS1-IVT transfiziert und als APCs zur Induktion antigenspezifischer CTLs verwendet. Die zytolytische Potenz der CTLs wurde nach wiederholten, wöchentlichen Restimulationen in einem *Chrom*-^[51Cr]-*Release-Assay* ermittelt. Sowohl mit RGS1-IVT transfizierte DCs, als auch die Tumorzelllinien MZ1774 (HLA-H2⁺) und SKOV-3 (HLA-A3⁺) wurden als Targets eingesetzt. Die mit irrelevanter EGFP-IVT transfizierten DCs und K562 fungierten als Negativkontrollen. K562 diente zum Ausschluß einer NK-Zell vermittelten Zytotoxizität.

Die HLA-Spezifität der induzierten CTLs wurde darüberhinaus mittels HLA-Molekül-spezifischer monoklonaler Antikörper bestätigt. Wie in Abbildung 4 zu sehen, können die CTLs ihre Targets (A498 + anti-class-I) nicht erkennen wenn ein anti-HLA-I-Antikörper zugegeben wird. Der spezifisch an das HLA-Klasse-I-Molekül bindende Antikörper verhindert das Erkennen des MHC-Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor der CTL und dadurch die Lyse der Targetzellen. Dies zeigt, dass die induzierte T-Zell Antwort in HLA-restringierter Weise abläuft.

Zur Kontrolle wurde parallel dazu ein Ansatz mit einem AK gegen das HLA-Klasse-II-Molekül durchgeführt, welcher die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch spezifische CTLs nicht blockiert und dadurch ein Lyse zulässt.

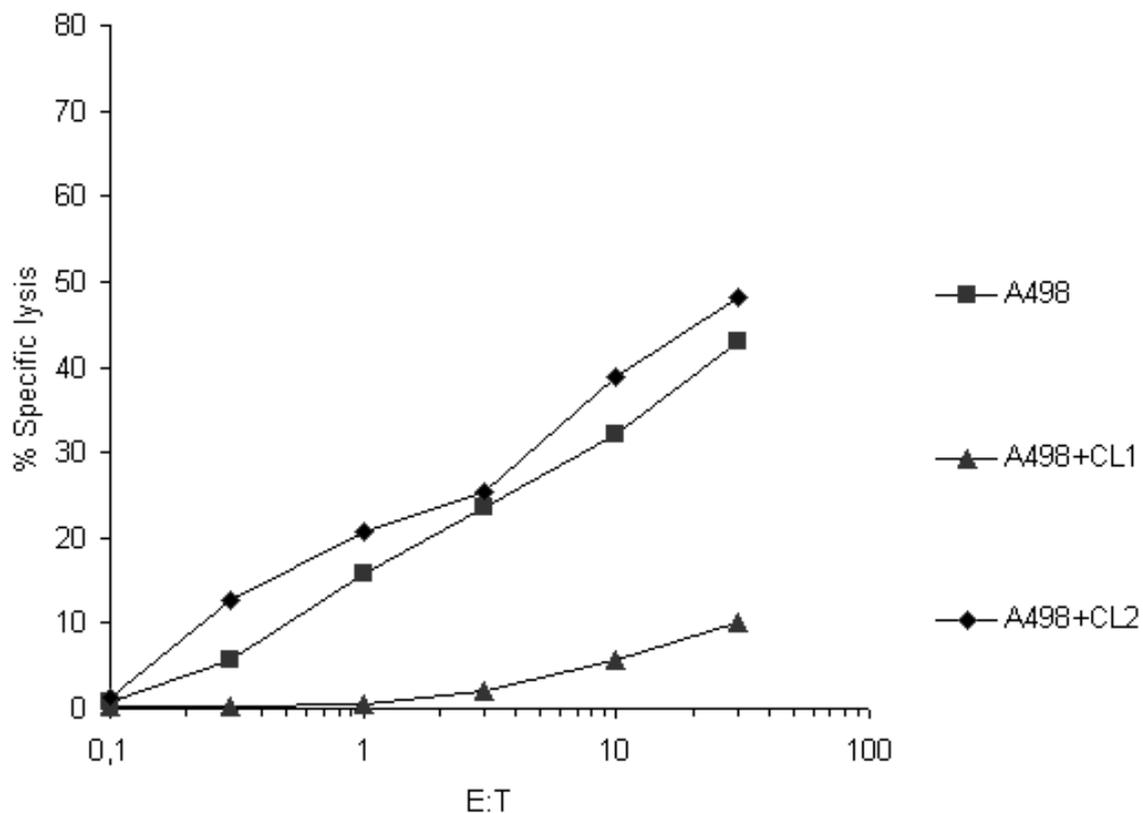


Abbildung 4: A498 wurde als Target eingesetzt. Zur HLA-Klasse-I- oder -Klasse-II Inhibition erfolgte vor dem Assay eine Inkubation der Targetzellen mit einem HLA-Klasse-I- oder -Klasse-II-Antikörper.

Diese Daten demonstrieren, dass DCs, die mit einem Überschuss an *full-length*-RGS1-IVT transfiziert wurden, Klasse-I-restringierte CTLs induzieren können, welche *in-vitro* Tumorzellen, die endogen RGS1 exprimieren, in antigenspezifischer und HLA-restringierter Weise erkennen.

In der nächsten Serie an Experimenten wurden DCs aus PBMNCs gesunder, *HLA-A3-positiver* Spender generiert, welche mit einem Überschuss von *full-length*-RGS1-IVT transfiziert wurden. Wie die Ergebnisse des Chrom-[^{51}Cr]-*Release-Assay* zeigen, lysierten die induzierten CTLs die mit RGS1-IVT elektroporierten Zellen sowie die RGS1⁺/HLA-A3⁺Tumorzelllinien SKOV-3 und Mel 1479 (Abbildung 5). Im Gegensatz dazu erkannten sie weder die RGS1⁺/HLA-A2⁺Tumorzelllinie A498 noch die mit irrelevanter EGFP-IVT elektroporierten Zellen. Somit blieben diese von der Lyse verschont (Negativkontrolle, Abbildung 5). Zum Ausschluss einer NK-Zell vermittelten Zytotoxizität wurde die Kontroll-Zelllinie K562 eingesetzt (Abbildung 5)

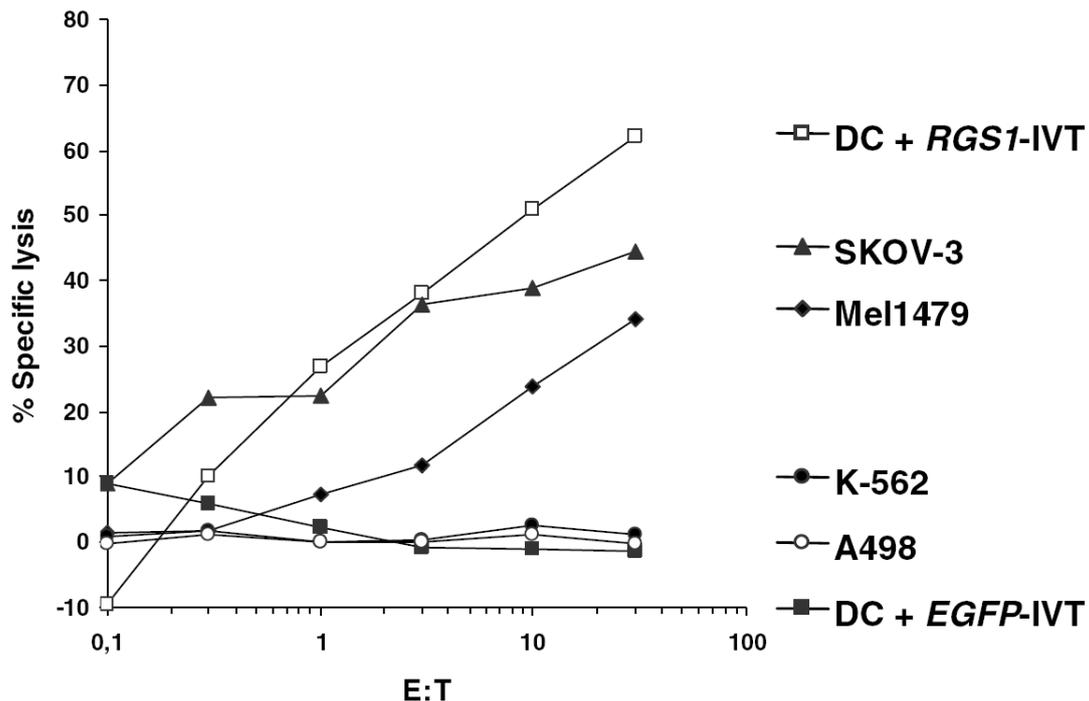


Abbildung 5: Induktion RGS1-spezifischer CTLs mittels RGS1-IVT elektroporierter DCs. Unreife, von Monozyten generierte DCs wurden von gesunden *HLA-A3⁺* Spendern mit RGS1-IVT elektroporiert, um als APCs antigenspezifische CTLs zu induzieren. Die zytolytische Aktivität der generierten CTLs wurde nach mehrmaliger, wöchentlicher Restimulation im *Chrom-⁵¹Cr-Release-Assay* bestimmt. Sowohl mit RGS1-IVT transfizierte DCs, als auch SKOV-3 (*HLA-3⁺*) und A498 (*HLA-A2⁺*) wurden als Targets eingesetzt. Mit irrelevanter EGFP-IVT transfizierte DCs dienten als Kontrolle. Zum Ausschluß einer NK-Zell vermittelten Zytotoxizität wurde K562 eingesetzt.

Die antigen-spezifische Zelllyse wurde hier nun mittels *Cold Target Inhibition Assay* bestimmt (Abbildung 6). Hierbei wird die Fähigkeit beziehungsweise Kapazität unmarkierter, autologer, mit RGS1-IVT transfizierter PBMNCs bestimmt, Tumorzelllyse zu blockieren. Hier hemmen die in zwanzigfach höherer Konzentration vorliegenden *Cold Targets* (nicht Chrom markiert) die Lyse der *Hot Targets* (Chrom markiert). In diesem Ansatz wurde die RGS1-exprimierende Tumorzelllinie SKOV-3 eingesetzt, die in vorangegangenen Versuchsreihen sehr effizient lysiert wurde (Abbildung 5/6). Wie in Abbildung 6 dargestellt, inhibieren die RGS1 transfizierten PBMNCs (*Cold Target*) die Lyse der RGS1⁺/HLA-A3⁺SKOV-3 (*Hot Target*) Zellen höchst effektiv (Verhältnis *Cold Target* : *Hot Target* = 20 : 1). Im Gegensatz dazu konnten PBMNCs, welche mit irrelevanter EGFP-IVT elektroporiert wurden, die Erkennung der aus Tumorantigenen abgeleiteten RGS1 Epitope nicht verhindern.

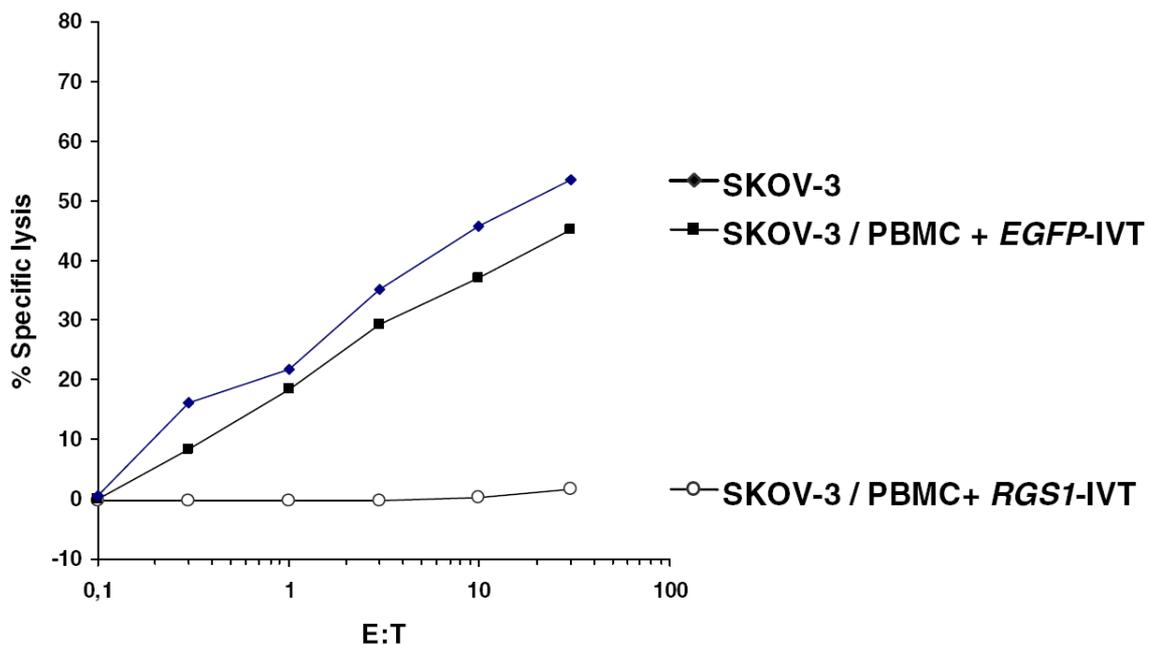


Abbildung 6: *Cold Target Inhibition*. Unmarkierte, mit RGS1-IVT transfizierte PB-MNCs bzw. mit irrelevanter EGFP-IVT transfizierte PB-MNCs als Kontrollen wurden zu Chrom $[^{51}Cr]$ -markierten SKOV-3 Zellen im Verhältnis *Cold Target* : *Hot Target* = 20:1 gegeben.

Zusammengefasst bestätigen die Ergebnisse dieser Experimente, dass die *in-vitro* induzierten CTLs spezifisch sind für RGS1 abgeleitete Epitope und Zielzellen und in antigenspezifischer- und HLA-restringierter Weise "ihre" Zielzellen erkennen und konsekutiv eliminieren.

Im nächsten Schritt unserer Experimentreihe wiederholten wir obigen Ansatz mit dem Unterschied, dass wir PB-MNCs eines gesunden, *HLA-A2*⁺/*-A3*⁺ Spenders für die Generierung der von Monozyten abstammenden DCs verwendeten. Diese Zellen wurden, analog zum obigen Vorgehen, mit einem Überschuss an *full-length*-RGS1-IVT transfiziert und als APCs zur Induktion RGS1-spezifischer CTLs verwendet. Wie die Ergebnisse des *Chrom*- $[^{51}Cr]$ -*Release-Assay* zeigen, lysieren diese CTLs die mit RGS-IVT elektroporierten Zellen (Abbildung 7).

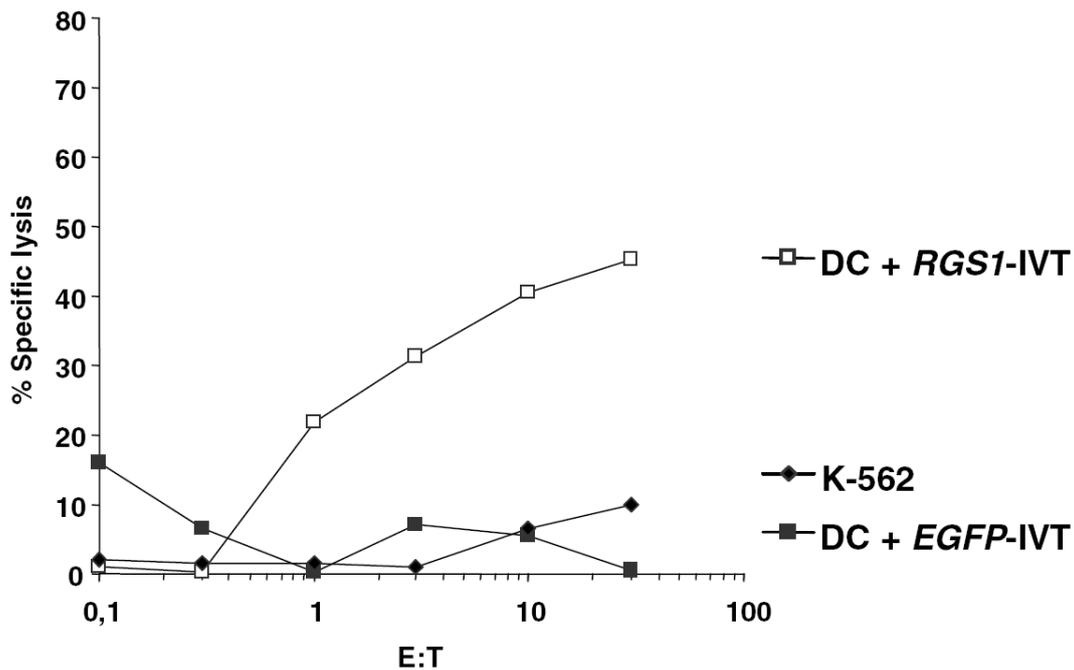


Abbildung 7: Induktion RGS1-spezifischer CTLs mittels RGS1-IVT elektroporierter DCs. Unreife, von Monozyten abgeleitete DCs von gesunden *HLA-A2⁺/A3⁺* Spendern wurden mit RGS1-IVT elektroporiert und als APCs zur Induktion antigen-spezifischer CTLs verwendet. Die zytolytische Aktivität der generierten CTLs wurde nach mehrmaligen, wöchentlichen Restimulationen im *Chrom-[⁵¹Cr]-Release-Assay* bestimmt. RGS1-IVT transfizierte DCs wurden als Targets eingesetzt. Mit irrelevanter EGFP-IVT transfizierte DCs dienten als Kontrolle. Zum Ausschluss einer NK-Zell vermittelten Zytotoxizität wurde die Kontroll-Zelllinie K562 eingesetzt.

Zur Überprüfung der Antigen-spezifität ergänzten wir den Assay mit einem *Cold Target Inhibition Assay*. Abbildung 8 veranschaulicht, dass PBMNCs, die mit RGS1-IVT transfiziert wurden, sowohl die Lyse von RGS1⁺/HLA-A2⁺ A498 Zellen, als auch die Lyse von RGS1⁺/HLA-A3⁺ SKOV-3 Zellen wirkungsvoll inhibieren. Im Gegensatz dazu vermögen die mit irrelevanter EGFP-IVT elektroporierten PBMNCs es nicht, die Erkennung der RGS1⁺/HLA-A2⁺ oder -HLA-A3⁺ Tumorzellen zu verhindern.

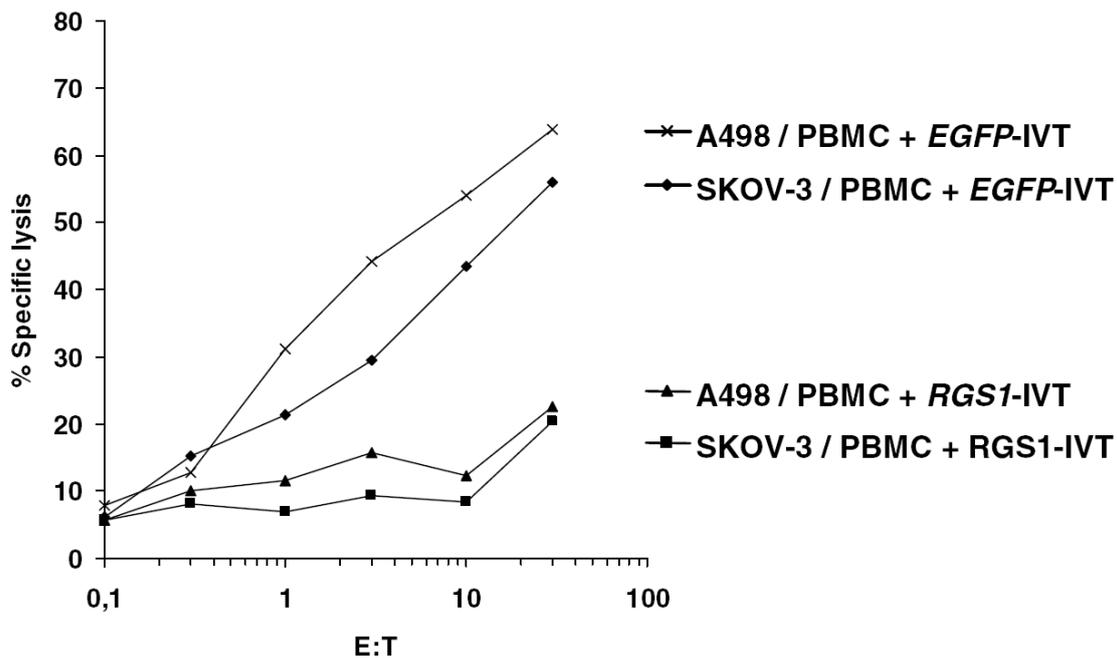


Abbildung 8: *Cold Target Inhibition*. Unmarkierte, mit RGS1-IVT transfizierte PB-MNCs oder mit irrelevanter EGFP-IVT transfizierte PB-MNCs als Kontrollen wurden zu Chrom $[^{51}Cr]$ -markierten SKOV-3 (HLA-A3⁺) oder A498 (HLA-A2⁺) im Verhältnis *Cold Target* : *Hot Target* = 20:1 gegeben.

Diese Experimente demonstrieren, dass die Transfektion mit RGS1-IVT zur Präsentation von RGS1 abgeleiteten Epitopen - sowohl auf HLA-A2⁺ als auch auf HLA-A 3⁺ -Molekülen führt und zur Induktion von RGS1-spezifischen, HLA-A2⁺ oder -A3⁺-restringierten CTLs führt.

3.2.3 RGS1-spezifische CTLs können autologe CLL-Blasten lysieren

Die RT-PCR-Analysen zeigten, dass alle CLL Blutproben RGS1 exprimieren (Abbildung 2B). In einer letzten Versuchsreihe sollte daher festgestellt werden, ob die bisherigen Ergebnisse auf CLL-Blasten anwendbar sind und sich somit im autologen System verifizieren lassen. Hierzu wurden aus Monozyten eines CLL Patienten DCs generiert (Pat. 1), welcher sich nach einer Chemotherapie mit Fludarabin in kompletter Remission befand. Diese DCs wurden mit RGS1-IVT transfiziert und als APCs zur Induktion antigenspezifischer CTLs verwendet. Wie Abbildung 9 veranschaulicht, wurden die CLL Blasten höchst effizient durch die RGS1-spezifischen CTLs erkannt und lysiert. Zusätzlich setzten wir in diesem Assay autologe T-Zellen als Targets ein. Diese Zellen blieben jedoch verschont (Abbildung 9). Die Spezifität sowie die HLA-Klasse-I-Restritivität der

induzierten T-Zellen wurde darüber hinaus durch Zugabe eines spezifisch gegen HLA-Klasse-I-Moleküle gerichteten monoklonalen Antikörpers bestätigt, welcher die spezifische Lyse der Zielzellen blockieren konnte (Abbildung 9).

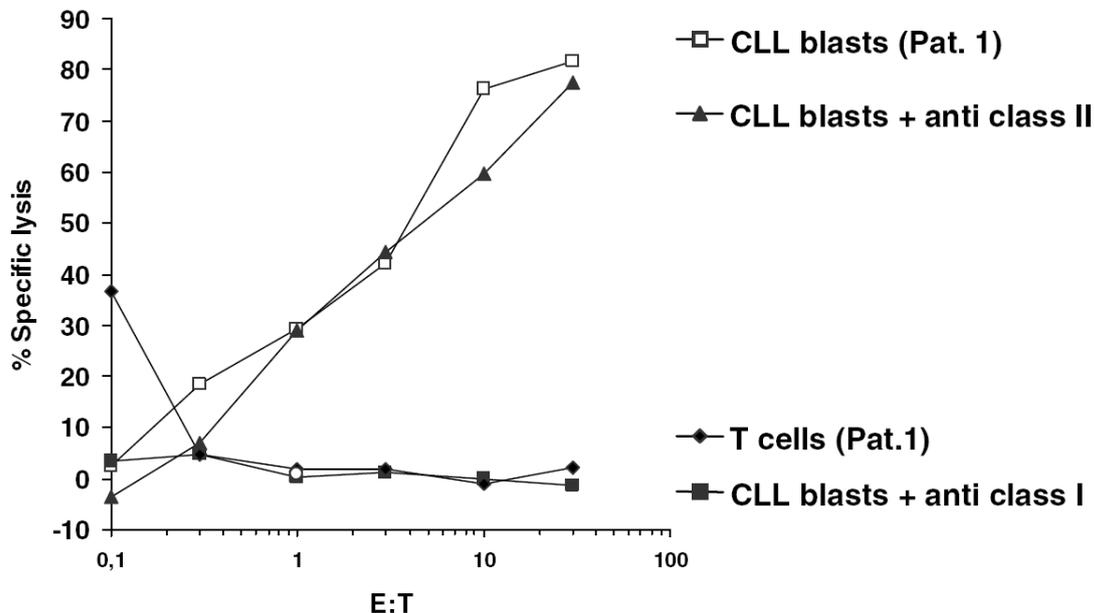


Abbildung 9: Induktion RGS1-spezifischer CTLs mittels RGS1-IVT elektroporierter DCs. Unreife, aus Monozyten abgeleitete DCs eines Patienten, der an CLL leidet und sich in kompletter Remission nach Chemotherapie befindet (Pat.1). Die RGS1-spezifischen CTLs wurden als Effektorzellen gegen autologe, maligne CLL Blasten eingesetzt, welche zum Zeitpunkt der Diagnose kryokonserviert worden waren. Normale T-Zellen wurden zusätzlich als Targets im *Chrom*- ^{51}Cr -Release-Assay eingesetzt.

Um die RGS1-Spezifität weiter zu verifizieren, wurden DCs als Targetzellen im *Chrom*- ^{51}Cr -Release-Assay eingesetzt, die mit Gesamt-RNA aus den CLL-Blasten von Patient 1 (Abbildung 10, Pat.1) und aus den Blasten eines zweiten RGS1-positiven Patienten (Abbildung 10, Pat.2) transfiziert wurden. Als Kontrolle dienten DCs, die mit der Gesamt-RNA aus den Blasten eines RGS1-negativen AML-Patienten (Abbildung 10, Pat. 3) transfiziert wurden. Die so behandelten Zellen wurden dann als Targets im *Chrom*- ^{51}Cr -Release-Assay eingesetzt. In diesem Experiment wurden ausschließlich DCs durch die CTLs lysiert, welche zuvor mit RGS1⁺RNA transfiziert wurden. Alle Zellen, die mit RGS1⁻AML RNA transfiziert wurden, blieben unangetastet. Als weitere Kontrolle wurden DCs mit RGS1-IVT transfiziert, welche effizient lysiert wurden. Im Gegensatz dazu blieben die mit irrelevanter EGFP-IVT transfizierten DCs unangetastet.

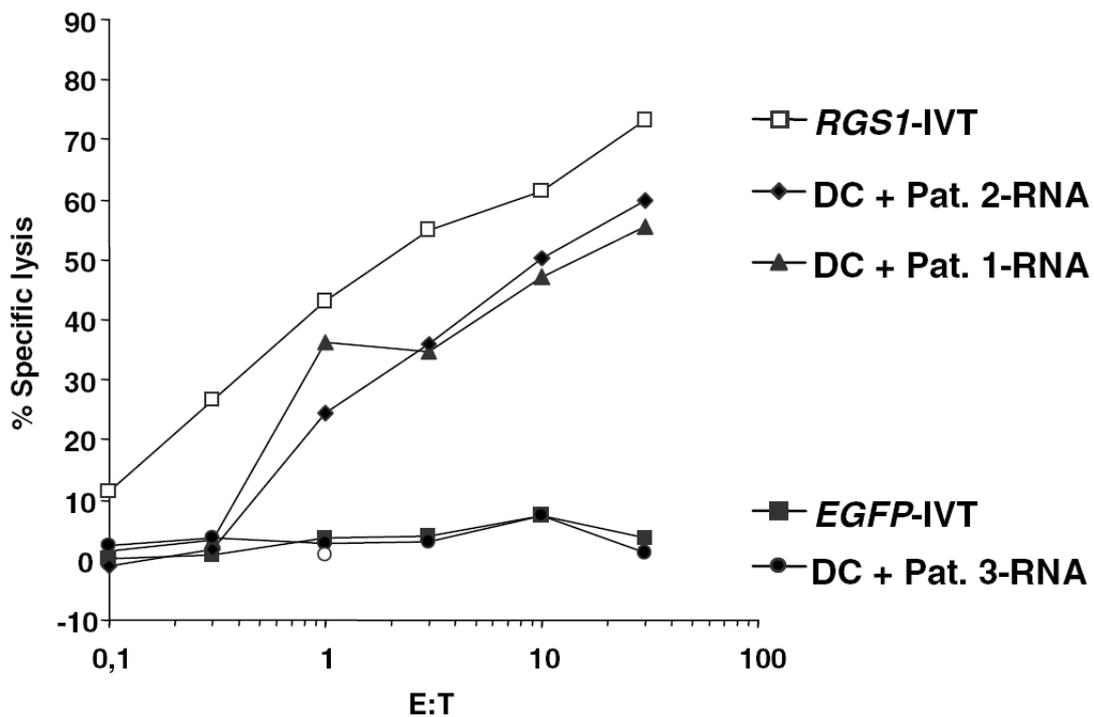


Abbildung 10: Mit RNA eines zweiten RGS1⁺ CLL Patienten (Pat.2) oder mit RNA von RGS1⁻ AML Blasten (Pat.3) transfizierte DCs wurden als Targets zugegeben. Die mit RGS1-IVT oder mit irrelevanter EGFP-IVT transfizierten DCs dienten als Kontrollen.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente auf anschauliche Art und Weise die Realisierbarkeit der Induktion von RGS1-spezifischen CTLs aus CLL Patienten in kompletter Remission nach Chemotherapie, welche dazu in der Lage sind, höchst effizient autologe Blasten in antigenspezifischer- und HLA-restringierter Weise zu lysieren.

4 Diskussion

Durch die sich konsequent verbessernden radio-/chemotherapeutischen Behandlungsmethoden sowie innovativen Operationstechniken und nicht zuletzt durch die verbesserten Primärprophylaxemöglichkeiten haben maligne Erkrankungen heute zu Tage zunehmend bessere Heilungschancen. Dennoch bieten die bislang etablierten Therapien keine befriedigenden Langzeitherstellungen. Der Bedarf an weiteren Therapieoptionen - neben Operation, Radio- und Chemotherapie - ist also gegeben.

Die Tumormimmuntherapie hat sich klinisch in den letzten beiden Jahrzehnten zunehmend zu einer Behandlungsalternative entwickelt, die zur Primär- und Rezidivtherapie maligner Erkrankungen eingesetzt werden kann. Dieser Therapieform liegt die Idee zugrunde, durch Aktivierung des Immunsystems die Sensibilität des Organismus gegenüber Tumorzellen zu erhöhen - mit dem Ziel, diese autark und spezifisch eliminieren zu können.

Es bestehen unterschiedliche Möglichkeiten, das Immunsystem im Kampf gegen den Krebs zu unterstützen. Eine Möglichkeit besteht in der Gabe von monoklonalen Antikörpern, wie beispielsweise der gegen B-Lymphozyten gerichtete, chimäre Anti-CD20 Antikörper Rituximab, welcher in der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome eingesetzt wird. Weitere Therapieformen sind die Gabe von Immunmodulatoren, wie z.B. Interleukine oder Interferone, welche das Immunsystem beeinflussen.

In dieser Arbeit wurden DCs mit gentechnisch hergestellter *full-length*-RGS1-mRNA transfiziert und als APCs verwendet. Die DCs präsentierten das Tumorentigen RGS1 MHC-gebunden an der Zelloberfläche. Mit ihrer Hilfe gelang die *ex-vivo* Generierung CD8⁺ Effektorzellen, welche in der Lage sind, hochspezifisch Tumorzellen zu eliminieren.

Eine der Herausforderungen in der Entwicklung immuntherapeutischer Verfahren ist die Identifizierung relevanter TAAs mit der Fähigkeit, tumorspezifische T-Zellantworten zu induzieren. Hinzu kommt, dass diese immunogenen Strukturen des Tumors "lebenswichtige" Schlüsselstrukturen in Bezug auf Entwicklung, Wachstum sowie dessen Fähigkeit zur hämatogenen Ausbreitung darstellen sollten.

Genexpressionsprofile, die mittels Microarray-Technologien erstellt wurden, zeigten eine starke RGS1 Überexpression in Nierenzellkarzinomen verglichen mit Proben aus normalem Nierengewebe. Darüber hinaus konnte mittels RT-PCR Analysen RGS1 in etlichen etablierten menschlichen Tumorzelllinien sowie ein-

zelenen Proben von Patienten, die unter akuter und chronischer Leukämie litten detektiert werden. Dies impliziert, dass dieses Gen in einer umfassenden Auswahl menschlicher maligner Tumoren exprimiert wird.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gehören zu einer großen Familie von Proteinen, deren Funktion darin besteht, extrazelluläre Stimuli nach intrazellulär zu übermitteln. Dazu gehören die durch Licht aktivierbaren Rezeptoren im Auge (Rhodopsin), die olfaktorischen Rezeptoren in der Nase von Säugern, oder diverse Hormon- sowie Neurotransmitterrezeptoren. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor führt zum Austausch von GDP zu GTP am zytosolisch gebundenen G-Protein. Dieser Austausch führt zur Dissoziation der α - von der $\beta\gamma$ -Untereinheit, welche beide als *second-messenger* fungieren. RGS1 steigert die GTP-ase Aktivität der α -Untereinheit und führt so zu einer Wiederherstellung des inaktiven heterotrimeren Moleküls. Kurz gesagt: RGS1 ist ein funktionell negativer Feedback-Regulator in diesen Signalschleifen.

Die Tatsache, dass G-Proteine und RGS1 Bestandteil vieler zellulärer Signalkaskaden sind, führt zu der Annahme, dass eine Überexpression von RGS1 in maligne transformierten Geweben, wie sie in dieser Arbeit festgestellt worden ist, in kausalem Zusammenhang mit dem Phänotyp maligner Tumoren steht.

Die Induktion antigenspezifischer Immunreaktionen ist stark abhängig von der Art und Weise, in der eine APC dazu gebracht wird, Antigen zu präsentieren bzw. wie es prozessiert wird. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass DCs, welche mit RNA transfiziert wurden, die für ein TAA oder Gesamt-RNA kodiert, potente, antigen- und tumor-spezifische T-Zell-Antworten gegen multiple Epitope induzieren können. Die Realisierbarkeit und Effektivität dieses Ansatzes wurde in verschiedenen Studien getestet und analysiert, in dem man die mit RNA transfizierten DCs Tumorpatienten verabreichte [39, 68, 70, 92, 95]. In dieser Arbeit wurde ein RNA-basierter Ansatz gewählt, um die Induktion RGS1 spezifischer CTLs sowie deren lytische Aktivität *in-vitro* zu testen. Dazu wurden die Monozyten zur Herstellung von DCs HLA-A2⁺, -A3⁺ oder -A2⁺/-A3⁺ positiver Spender herangezogen, und sechs Tage unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Ausreifung der DCs wurden in dieser Arbeit neue Erkenntnisse von Boullart et. al. genutzt, wobei die Reifung mit TLR3- (Poly I:C) und TLR7-Ligand (R848) durchgeführt wurde (*In-vitro* Immunisierungsprotokoll) [10]. Zur CTL-Induktion wurden diese DCs mit *in-vitro* transkribierter RGS1-RNA (RGS1-IVT) transfiziert. Die so behandelten Zellen wurden als APCs verwendet. Die auf diese Weise *in-vitro* induzierten, RGS1-spezifischen CTLs konnten Tumorzellen, welche das RGS1 Protein endogen exprimieren, in antigenspezifischer und HLA-restringierter Weise erkennen

und lysieren, darunter Nierenzellkarzinome, Melanome, Ovarialkarzinome, sowie Tumoren hämatologischen Ursprungs. Die Spezifität der Lyse wurde mittels monoklonaler, HLA-Moleküle-blockierender Antikörper oder mittels *Cold Target Inhibition Assay* bestätigt.

Um weiterhin die Spezifität der induzierten CTLs zu analysieren, wurden DCs, welche zuvor ebenfalls mit einem Überschuss an RGS1-IVT transfiziert wurden, als Targetzellen im *Chrom-[⁵¹Cr] – Release-Assay* eingesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass die *in-vitro* generierten CTLs effizient diese Targetzellen lysieren, was bedeutet, dass durch Transfektion mit RGS1-IVT von RGS1 abgeleitete Peptide prozessiert und an der Zelloberfläche präsentiert werden.

Diese Ergebnisse waren sowohl für HLA-A2⁺, -A3⁺ oder auch für -A2⁺/-A3⁺ Spender reproduzierbar. Dies bestätigte vorausgegangene Studien, in denen anschaulich demonstriert werden konnte, dass die DC-Transfektion mit spezifischer oder Gesamt-RNA zur Induktion polyklonaler T-Zell Antworten führt, wobei Epitope erkannt werden, obwohl sie über verschiedene HLA-Moleküle präsentiert werden. Darum besitzt diese Methode das Potential zur breiten klinischen Anwendung [32, 34, 38, 61, 62, 63, 64], da man jedem Patienten der an einem (in diesem Fall) RGS1⁺ Tumor erkrankt ist, diese Therapie zukommen lassen könnte, ohne dessen HLA-Typ zu kennen. Dies wäre nicht der Fall, hätte man ein Peptid-basiertes Vorgehen gewählt - hierfür ist die genaue Kenntnis des HLA-Typs des Patienten Voraussetzung - die klinische Einsetzbarkeit somit also eingeschränkt. Da RGS1 ein noch sehr neues, unerforschtes, wenn auch vielversprechendes Tumorabstoßungsantigen ist, war es zum Zeitpunkt der Experimente nur in Form von RNA, nicht aber als Peptid verfügbar. Somit ist es leider momentan nicht möglich, Vergleichbarkeit im Hinblick auf lytische Aktivität der CTLs bzw. letztendlich auf Wirksamkeit/Nebenwirkungen herzustellen. Vom wissenschaftlichen Standpunkt aus gilt es nun Epitope zu suchen, Peptide herzustellen, um ein tieferes Verständnis für die molekularen Abläufe zu bekommen, und in letzter Konsequenz zu analysieren, ob - und wenn ja, welches Verfahren zu wählen wäre.

Zum Abschluß der Untersuchungen wurde die Anwendbarkeit des RNA-basierten Ansatzes im autologen, pathologisch veränderten System getestet. Es wurde die Möglichkeit analysiert, mittels äquivalentem Vorgehen eine CTL-Antwort bei Tumorpatienten zu induzieren. Dazu wurden CTL-Linien aus PBMNCs eines CLL-Patienten, der sich nach Behandlung mit Fludarabin in kompletter Remission befand, durch *in-vitro* Immunisierung mit RGS1-IVT transfizierten, autologen DCs, induziert. Diese autologen CTLs wurden als CD8⁺ Effektorzellen gegen autolo-

ge, maligne Zellen eingesetzt, welche zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mittels Kryokonservierung eingefroren wurden. Die *in-vitro* generierten CTLs waren in der Lage, die leukämischen Zellen in effizienter, HLA-restringierter und antigenspezifischer Weise zu lysieren, wobei nicht-transformierte Zellen bzw. DCs verschont blieben, die mit irrelevanter, Gesamt-RNA aus RGS1-negativen AML-Blasten elektroporiert wurden [31]. Diese Ergebnisse zeigen, dass *in-vitro* induzierte, RGS1-spezifische CTLs aus Patienten mit malignen Erkrankungen dazu fähig sind, primär autologe Tumorzellen in antigenspezifischer Weise zu erkennen und zu eliminieren.

Somit lässt sich abschließend schlussfolgern, dass RGS1 ein Tumorabstoßungsantigen ist, welches in vielen soliden und hämatopoetischen malignen Tumoren exprimiert wird, die Potenz zur Induktion einer T-Zell-Immunantwort besitzt und somit als Tumor-Vakzine zur Anwendung kommen kann. Dies kann entweder durch Transfusion *ex-vivo* generierter und mit Tumor-mRNA elektroporierter DCs erfolgen [58, 67], wobei es hierbei dann *in-vivo* zur Aktivierung und Proliferation spezifischer CTLs kommt. Eine andere Möglichkeit bietet die direkte Verabreichung aktivierter, hochspezifischer CD8⁺ Effektorzellen, welche dann direkt Tumorzellen attackieren [15, 74, 24, 81, 44, 94, 109].

4.1 Grenzen der Arbeit

Interessant wäre es herauszufinden, an welcher Position im RGS1-Protein die spezifischen Epitope für HLA-A2 und -A3 lokalisiert sind, welche von der CTL erkannt werden. Darüber hinaus könnte gezeigt werden, dass autologe DCs, die zuvor mit aus RGS1 abgeleitetem Peptid beladen wurden, in der Lage sind, hochpotente, antigenspezifische T-Zellantworten zu induzieren - wie es auch in unserem RNA-basierten Vorgehen der Fall war. Da RGS1 noch ein sehr "neues" TAA ist, war zum Zeitpunkt der Experimente RGS1 nur als RNA, nicht aber als Peptid verfügbar. Ein soches Vorgehen würde eine Vergleichbarkeit der Methoden herstellen, d.h. man könnte analysieren ob, und wenn ja warum die eine bzw. die andere Methode eine bessere, eine effektivere Immunantwort induzieren würde. Kurz gesagt: es würde das molekulare Basiswissen, das Verständnis auf zellulärer Ebene verbessern.

In dieser Arbeit wurden alle Experimente *in-vitro* durchgeführt, so dass sich die Ergebnisse nur begrenzt auf das komplexe System des menschlichen Immunsystems übertragen lassen. Zur Induktion der DC-Reifung wurden z.B. definierte Zytokinkonzentrationen verwendet, welche nur schwer im menschlichen Organis-

mus, in dem ein sich ständig ändernder Cocktail an biogenen Molekülkonzentrationen herrscht, reproduzierbar sind.

Zusätzlich ignoriert dieser Ansatz die Bedeutung von CD4⁺ T-Helfer-Zellen bei Induktion und Erhaltung der T-Zell-vermittelten Immunantwort.

5 Zusammenfassung

Auf der Suche nach neuen Tumorantigenen identifizierte die Arbeitsgruppe von PD Dr. rer. nat. Stefan Stevanović des interfakultären Instituts für Zellbiologie der Universität Tübingen, Deutschland, mittels vergleichender Expressionsprofile (Microarraytechnologien), das Tumorantigen RGS1 (regulator of G-Protein-signalling). RGS1 ist an vielen intrazellulären Regulationsprozessen, Signaltransduktionswegen sowie an der Regulation verschiedener Migrationsprozesse beteiligt. Dies, sowie die Tatsache, dass RGS1 auf vielen menschlichen soliden und hämatologischen Tumoren stark überexprimiert wird und die Potenz zur Induktion antigen- und tumorspezifischer T-Zellantworten besitzt, macht es zu einem interessanten neuen TAA. Somit kann es als Zielscheibe für maligne Tumoren verwendet werden, welche dieses Protein exprimieren, und bietet vielversprechende Ansatzpunkte für die Etablierung einer breit anwendbaren Tumorstimmungs- und Tumorvakzinierung.

In dieser Arbeit wurde ein RNA-basierter Ansatz gewählt, um die Funktion von RGS1 als neues Tumorantigen näher zu analysieren. Hierzu wurden RGS1-spezifische CTLs induziert, die dann unter Zugabe von Zytokinen, mit RGS1-IVT transfizierten, autologen DCs mehrfach stimuliert wurden. Diese CTLs lysierten effektiv alle im *Chrom*- $[^{51}\text{Cr}]$ -*Release-Assay* eingesetzten RGS1-positiven Zielzellen in HLA-restringierter und tumorantigen-spezifischer Weise, was mittels Blockade der HLA-I- und HLA-II-Moleküle sowie mittels *Cold Target Inhibition* bestätigt werden konnte. Darüber hinaus waren die CTLs auch zur Lyse von Leukämieblasten fähig, wobei in allen Ansätzen RGS1-negative Zellen verschont blieben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass ein RNA-basiertes Vorgehen im Rahmen der Tumorstimmungs- und Tumorvakzinierung das Spektrum der klinischen Anwendbarkeit erheblich erweitert. Weiterhin zeigte sich RGS1 als hochinteressantes, neues Tumorantigen, welches die Kriterien zur Anwendung im Rahmen der klinisch-onkologischen Immuntherapie erfüllt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Februar 2008 im Journal *Cancer Immunology Immunotherapy* mit dem Titel "Generation of antigen-specific CTL responses using RGS1 mRNA transfected dendritic cells" publiziert.

Literatur

- [1] F. Agenès, N. Bosco, L. Mascarell, S. Fritah, and R. Ceredig. Differential expression of regulator of G-protein signalling transcripts and in vivo migration of CD4 naïve and regulatory T cells. *Immunology*, 115(2):179–188, 2005.
- [2] M. Ahmad, R.C. Rees, and S.A. Ali. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 53(10):844–854, 2004.
- [3] B. Albert et al. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, 1994.
- [4] ML Albert, B. Sauter, and N. Bhardwaj. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, 392(6671):86–9, 1998.
- [5] AN Antoniou and SJ Powis. Pathogen evasion strategies for the major histocompatibility complex class I assembly pathway. *Immunology*, 2008.
- [6] J. Banchereau and R.M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392:245–252, 1998.
- [7] JC Becker, T. Brabletz, C. Czerny, C. Termeer, EB Brocker, and L. Lanier. Tumor escape mechanisms from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4+; human T cell clone by the autologous MHC class II+ melanoma. *International Immunology*, 5(12):1501–1508, 1993.
- [8] P. Blanco, A.K. Palucka, V. Pascual, and J. Banchereau. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 19:41–52, Feb 2008.
- [9] D. Boczkowski. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 184(2):465–472, 1996.
- [10] A.C. Boullart, E.H. Aarntzen, P. Verdijk, J.F. Jacobs, D.H. Schuurhuis, D. Benitez-Ribas, G. Schreiberlt, M.W. van de Rakt, N.M. Scharenborg, A. de Boer, M. Kramer, C.G. Figdor, C.J. Punt, G.J. Adema, and I.J. de Vries. Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E(2) results in high

- interleukin-12 production and cell migration. *Cancer Immunol. Immunother.*, Mar 2008.
- [11] C. Brack, M. Hirama, R. Lenhard-Schuller, and S. Tonegawa. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*, 15(1):1–14, 1978.
- [12] P. Brossart. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Research*, 58(4):732–736, 1998.
- [13] P. Brossart, F. Grünebach, G. Stuhler, V.L. Reichardt, R. Möhle, L. Kanz, and W. Brugger. Generation of Functional Human Dendritic Cells From Adherent Peripheral Blood Monocytes by CD40 Ligation in the Absence of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood*, 92(11):4238, 1998.
- [14] P. Brossart, A. Schneider, P. Dill, T. Schammann, F. Grunebach, S. Wirths, L. Kanz, H.J. Buhning, and W. Brugger. The Epithelial Tumor Antigen MUC1 Is Expressed in Hematological Malignancies and Is Recognized by MUC1-specific Cytotoxic T-Lymphocytes 1, 2001.
- [15] P. Brossart, S. Wirths, W. Brugger, and L. Kanz. Dendritic cells in cancer vaccines. *Experimental Hematology*, 29(11):1247–1255, 2001.
- [16] P. Brossart, S. Wirths, G. Stuhler, V.L. Reichardt, L. Kanz, and W. Brugger. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood*, 96(9):3102, 2000.
- [17] M. Burnet. Cancer A Biological Approach 3 Viruses Associated with Neoplastic Conditions 4 Practical Applications. *British Medical Journal*, 1(5023):841, 1957.
- [18] MH Carabasi, JP Disanto, SY Yang, and B. Dupont. Activation of Peripheral CD 8+ T Lymphocytes via CD 28 plus CD 2: evidence for IL-2 gene transcription mediated by CD 28 activation. *Tissue antigens*, 37(1):26–32, 1991.
- [19] C.A. Chambers, M.S. Kuhns, J.G. Egen, and J.P. Allison. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy. *Annual Review of Immunology*, 19(1):565–594, 2001.

- [20] H.A. Chapman. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Current Opinion in Immunology*, 10(1):93–102, 1998.
- [21] C. Chiodoni, P. Paglia, A. Stoppacciaro, M. Rodolfo, M. Parenza, and M.P. Colombo. Dendritic Cells Infiltrating Tumors Cotransduced with Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF) and CD40 Ligand Genes Take Up and Present Endogenous Tumor-associated Antigens, and Prime Naive Mice for a Cytotoxic T Lymphocyte Response. *Journal of Experimental Medicine*, 190(1):125–134, 1999.
- [22] RT Costello, JA Gastaut, and D. Olive. Tumor escape from immune surveillance. *La Revue de médecine interne*, 20(7):579–588, 1999.
- [23] B.P. Dolan, K.D. Gibbs Jr, and S. Ostrand-Rosenberg. Dendritic Cells Cross-Dressed with Peptide MHC Class I Complexes Prime CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*, 177(9):6018, 2006.
- [24] M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, P.F. Robbins, J.C. Yang, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, R. Sherry, N.P. Restifo, A.M. Hubicki, et al. Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science*, page 10765141, 2002.
- [25] P. Ehrlich. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskde*, 5(part 1):273–290, 1909.
- [26] L.J. Fanning, A.M. Connor, and G.E. Wu. Development of the Immunoglobulin Repertoire. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 79(1):1–14, 1996.
- [27] B. Fineschi and J. Miller. Endosomal proteases and antigen processing. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(10):377–382, 1997.
- [28] Y. Fradet, V. Picard, A. Bergeron, and H. LaRue. Cancer-testis antigen expression in bladder cancer. *Prog Urol*, 15(6 Suppl 1):1303–1313, 2005.
- [29] E. Gilboa. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*, 11(3):263–270, 1999.
- [30] D.I. Godfrey, K.J.L. Hammond, L.D. Poulton, M.J. Smyth, and A.G. Baxter. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunology Today*, 21(11):573–583, 2000.

- [31] F. Grünebach, S. Erndt, M. Häntschel, A. Heine, and P. Brossart. Generation of antigen-specific CTL responses using RGS1 mRNA transfected dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother*, 2008.
- [32] F. Grünebach, K. Kayser, M.M. Weck, M.R. Müller, S. Appel, and P. Brossart. Cotransfection of dendritic cells with RNA coding for HER-2/neu and 4-1BBL increases the induction of tumor antigen specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Gene Therapy*, 12:749–756, 2005.
- [33] F. Grünebach, M.R. Müller, and P. Brossart. RNA Transfection of Dendritic Cells. *Methods Mol. Med*, 109:47–54, 2005.
- [34] F. Grünebach, MR Müller, A. Nencioni, and P. Brossart. Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. *Gene Therapy*, 10:367–374, 2003.
- [35] E.C. Guinan, V.A. Boussiotis, D. Neuberg, L.L.V. Brennan, N. Hirano, L.M. Nadler, and J.G. Gribben. Transplantation of Anergic Histoincompatible Bone Marrow Allografts. *New England Journal of Medicine*, 340(22):1704, 1999.
- [36] H.E. Hamm. *The Many Faces of G Protein Signaling*, 1998.
- [37] S.B. Han, C. Moratz, N.N. Huang, B. Kelsall, H. Cho, C.S. Shi, O. Schwartz, and J.H. Kehrl. Rgs1 and Gnai2 Regulate the Entrance of B Lymphocytes into Lymph Nodes and B Cell Motility within Lymph Node Follicles. *Immunity*, 22(3):343–354, 2005.
- [38] A. Heine, F. Grünebach, T. Holderried, S. Appel, M.M. Weck, D. Dörfel, C. Sinzger, and P. Brossart. Transfection of Dendritic Cells with in Vitro-Transcribed CMV RNA Induces Polyclonal CD8-and CD4-Mediated CMV-Specific T Cell Responses. *Molecular Therapy*, 13:280–288, 2006.
- [39] A. Heiser, D. Coleman, J. Dannull, D. Yancey, M.A. Maurice, C.D. Lallas, P. Dahm, D. Niedzwiecki, E. Gilboa, and J. Vieweg. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *Journal of Clinical Investigation*, 109(3):409–417, 2002.
- [40] JR Hepler and AG Gilman. G proteins. *Trends Biochem Sci*, 1992:383–7, 1910.

- [41] S. Hollinger and J.R. Hepler. Cellular Regulation of RGS Proteins: Modulators and Integrators of G Protein Signaling. *Pharmacological Reviews*, 54(3):527, 2002.
- [42] JX Hong. Isolation and characterization of a novel B cell activation gene. *The Journal of Immunology*, 150(9):3895–3904, 1993.
- [43] N. Hozumi and S. Tonegawa. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(10):3628, 1976.
- [44] J. Huang, H.T. Khong, M.E. Dudley, M. El-Gamil, Y.F. Li, S.A. Rosenberg, and P.F. Robbins. Survival, persistence, and progressive differentiation of adoptively transferred tumor-reactive T cells associated with tumor regression. *J Immunother*, 28(3):258–67, 2005.
- [45] C. Janeway, P. Travers, et al. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Publishing New York:, 1997.
- [46] I. Kawashima, V. Tsai, S. Southwood, K. Takesako, A. Sette, and E. Celis. Identification of HLA-A3-restricted Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes from Carcinoembryonic Antigen and HER-2/neu by Primary in Vitro Immunization with Peptide-pulsed Dendritic Cells 1, 1999.
- [47] SC Knight and AJ Stagg. Antigen-presenting cell types. *Curr Opin Immunol*, 5(3):374–82, 1993.
- [48] H. Kobayashi. CD4+ T cells from peripheral blood of a melanoma patient recognize peptides derived from nonmutated tyrosinase. *Cancer Research*, 58(2):296–301, 1998.
- [49] H. Koga, K. Imada, M. Ueda, M. Hishizawa, and T. Uchiyama. Identification of differentially expressed molecules in adult T-cell leukemia cells proliferating in vivo. *Cancer Science*, 95(5):411–417, 2004.
- [50] V. Kolenko. Tumor-induced suppression of T lymphocyte proliferation coincides with inhibition of Jak3 expression and IL-2 receptor signaling: role of soluble products from human renal cell carcinomas. *The Journal of Immunology*, 159(6):3057–3067, 1997.

- [51] BF Kramer, O. Schoor, T. Kruger, C. Reichle, M. Muller, T. Weinschenk, J. Hennenlotter, A. Stenzl, HG Rammensee, and S. Stevanovic. MAGED4-Expression in Renal Cell Carcinoma and Identification of an HLA-A* 25-Restricted MHC Class I Ligand from Solid Tumor Tissue. *Cancer Biol Ther*, 4(9), 2005.
- [52] S. Krisanaprakornkit, J.R. Kimball, A. Weinberg, R.P. Darveau, B.W. Bainbridge, and B.A. Dale. Inducible Expression of Human beta-Defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in Oral Epithelial Cells: Multiple Signaling Pathways and Role of Commensal Bacteria in Innate Immunity and the Epithelial Barrier. *Infection and Immunity*, 68(5):2907, 2000.
- [53] T. Krüger, O. Schoor, C. Lemmel, B. Kraemer, C. Reichle, J. Dengjel, T. Weinschenk, M. Müller, J. Hennenlotter, A. Stenzl, et al. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 54(9):826–836, 2005.
- [54] LL Lanier. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*, 16:359–93, 1998.
- [55] S.C. Lee, M.E. Brummet, S. Shahabuddin, T.G. Woodworth, S.N. Georas, K.M. Leiferman, S.C. Gilman, C. Stellato, R.P. Gladue, R.P. Schleimer, et al. Cutaneous Injection of Human Subjects with Macrophage Inflammatory Protein-1 α Induces Significant Recruitment of Neutrophils and Monocytes 1. *The Journal of Immunology*, 164(6):3392–3401, 2000.
- [56] P. Li, J.L. Gregg, N. Wang, D. Zhou, P. O'Donnell, J.S. Blum, and V.L. Crozner. Compartmentalization of class II antigen presentation: contribution of cytoplasmic and endosomal processing. *Immunol Rev*, 207:206–217, 2005.
- [57] K.J. Liu, C.C. Wang, L.T. Chen, A.L. Cheng, D.T. Lin, Y.C. Wu, W.L. Yu, Y.M. Hung, H.Y. Yang, S.H. Juang, et al. Generation of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell responses in HLA-A* 0201 and HLA-A* 2402 late-stage colorectal cancer patients after vaccination with dendritic cells loaded with CEA peptides. *Clin Cancer Res*, 10(8):2645–2651, 2004.
- [58] L. Liu. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *International Immunology*, 10(8):1017–1026, 1998.

- [59] A. Mahdavi and B.J. Monk. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer: Promises and Challenges. *The Oncologist*, 10(7):528, 2005.
- [60] F. Meslin, J. Thiery, C. Richon, A. Jalil, and S. Chouaib. Granzyme B-induced Cell Death Involves Induction of p53 Tumor Suppressor Gene and Its Activation in Tumor Target Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(45):32991, 2007.
- [61] C. Milazzo, V.L. Reichardt, M.R. Müller, F. Grünebach, and P. Brossart. Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. *Blood*, 101(3):977, 2003.
- [62] M.R. Müller, F. Grünebach, K. Kayser, W. Vogel, A. Nencioni, W. Brugger, L. Kanz, and P. Brossart. Expression of Her-2/neu on Acute Lymphoblastic Leukemias: Implications for the Development of Immunotherapeutic Approaches. *Clinical Cancer Research*, 9(9):3448, 2003.
- [63] M.R. Müller, F. Grünebach, A. Nencioni, and P. Brossart. Transfection of Dendritic Cells with RNA Induces CD4- and CD8-Mediated T Cell Immunity Against Breast Carcinomas and Reveals the Immunodominance of Presented T Cell Epitopes 1. *The Journal of Immunology*, 170(12):5892–5896, 2003.
- [64] M.R. Müller, G. Tsakou, F. Grünebach, S.M. Schmidt, and P. Brossart. Induction of chronic lymphocytic leukemia (CLL)-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses using RNA-transfected dendritic cells. *Blood*, 103(5):1763, 2004.
- [65] C. Moratz, J.R. Hayman, H. Gu, and J.H. Kehrl. Abnormal B-cell responses to chemokines, disturbed plasma cell localization, and distorted immune tissue architecture in Rgs1^{-/-} mice. *Mol Cell Biol*, 24(13):5767–75, 2004.
- [66] LA Morrison. Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *Journal of Experimental Medicine*, 163(4):903–921, 1986.
- [67] M.A. Morse, Y. Deng, D. Coleman, S. Hull, E. Kitrell-Fisher, S. Nair, J. Schlom, M.E. Ryback, and H.K. Lyerly. A phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res*, 5(6):1331–8, 1999.

- [68] M.A. Morse, S.K. Nair, P.J. Mosca, A.C. Hobeika, T.M. Clay, Y. Deng, D. Boczkowski, A. Proia, D. Neidzwiecki, P.A. Clavien, et al. Immunotherapy with Autologous, Human Dendritic Cells Transfected with Carcinoembryonic Antigen mRNA. *Cancer Investigation*, 21(3):341–349, 2003.
- [69] S.K. Nair, D. Boczkowski, M. Morse, R.I. Cumming, H.K. Lyerly, and E. Gilboa. Induction of primary carcinoembryonic antigen(CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nature Biotechnology*, 16(4):364–369, 1998.
- [70] S.K. Nair, M. Morse, D. Boczkowski, R.I. Cumming, L. Vasovic, E. Gilboa, and H.K. Lyerly. Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. *Ann Surg*, 235(4):540–549, 2002.
- [71] A. Nencioni and P. Brossart. New perspectives in dendritic cell-based cancer immunotherapy. *BioDrugs*, 15(10):667–679, 2001.
- [72] P. Ohlschlager, W. Osen, K. Dell, S. Faath, R.L. Garcea, I. Jochmus, M. Muller, M. Pawlita, K. Schafer, P. Sehr, et al. Human papillomavirus type 16 L1 capsomeres induce L1-specific cytotoxic T lymphocytes and tumor regression in C57BL/6 mice. *J Virol*, 77(8):4635–4645, 2003.
- [73] T. Ojima, M. Iwahashi, M. Nakamura, K. Matsuda, T. Naka, M. Nakamori, K. Ueda, K. Ishida, and H. Yamaue. The boosting effect of co-transduction with cytokine genes on cancer vaccine therapy using genetically modified dendritic cells expressing tumor-associated antigen. *Int J Oncol*, 28(4):947–953, 2006.
- [74] M.R. Parkhurst, C. DePan, J.P. Riley, S.A. Rosenberg, and S. Shu. Hybrids of Dendritic Cells and Tumor Cells Generated by Electroporation Simultaneously Present Immunodominant Epitopes from Multiple Human Tumor-Associated Antigens in the Context of MHC Class I and Class II Molecules 1. *The Journal of Immunology*, 170(10):5317–5325, 2003.
- [75] MH Perdue. Mucosal immunity and inflammation. III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. *Am J Physiol*, 277(1 Pt 1):G1–5, 1999.
- [76] M.M. Pfeiffer. *Anreicherung von T-zell-depletierten NK-zellen und deren zytotoxische Aktivität gegenüber all-blatten in Abhängigkeit der HLA-klasse-I-expression*. PhD thesis, s. n, 2004.

- [77] L. Piali. Endothelial vascular cell adhesion molecule 1 expression is suppressed by melanoma and carcinoma. *Journal of Experimental Medicine*, 181(2):811–816, 1995.
- [78] P. Rayman, RG Uzzo, V. Kolenko, T. Bloom, MK Cathcart, L. Molto, AC Novick, RM Bukowski, T. Hamilton, and JH Finke. Tumor-induced dysfunction in interleukin-2 production and interleukin-2 receptor signaling: a mechanism of immune escape. *Cancer J Sci Am*, 6(1):S81–7, 2000.
- [79] K. Reif and J.G. Cyster. RGS Molecule Expression in Murine B Lymphocytes and Ability to Down-Regulate Chemotaxis to Lymphoid Chemokines 1 2. *The Journal of Immunology*, 164(9):4720–4729, 2000.
- [80] S.A. Rosenberg. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411(6835):380–384, 2001.
- [81] S.A. Rosenberg, J.C. Yang, P.F. Robbins, J.R. Wunderlich, P. Hwu, R.M. Sherry, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, N.P. Restifo, A. Filie, et al. Cell transfer therapy for cancer: lessons from sequential treatments of a patient with metastatic melanoma. *J Immunother*, 26(5):385–393, 2003.
- [82] J. Rosenblatt, D. Kufe, and D. Avigan. Dendritic cell fusion vaccines for cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*, 5(5):703–15, 2005.
- [83] E.M. Ross and T.M. Wilkie. GTPaseactivating proteins for heterotrimeric G proteins: Regulators of G Protein Signaling(RGS) and RGS-Like Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1):795–827, 2000.
- [84] F. Sallusto, P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C.R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology*, 28(9):2760–2769, 1998.
- [85] P. Scapini, J.A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M.A. Cassatella. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews*, 177:195, 2000.
- [86] S.M. Schmidt, K. Schag, M.R. Muller, M.M. Weck, S. Appel, L. Kanz, F. Grunebach, and P. Brossart. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood*, 102(2):571, 2003.

- [87] S.M. Schmidt, K. Schag, M.R. Muller, T. Weinschenk, S. Appel, O. Schoor, M.M. Weck, F. Grunebach, L. Kanz, S. Stevanovic, et al. Induction of Adipophilin-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Using a Novel HLA-A2-Binding Peptide That Mediates Tumor Cell Lysis, 2004.
- [88] H. Schreiber, TH Wu, J. Nachman, and WM Kast. Immunodominance and tumor escape. *Seminars in Cancer Biology*, 12(1):25–31, 2002.
- [89] R. Song. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *The Journal of Immunology*, 156(11):4182–4190, 1996.
- [90] GC Spagnoli, C. Schaefer, TE Willmann, T. Kocher, A. Amoroso, A. Jurcic, M. Zuber, U. Luscher, F. Harder, and M. Heberer. Peptide-specific CTL in tumor-infiltrating lymphocytes from metastatic melanomas expressing MART-1/Melan-A, gp 100 and Tyrosinase genes: a study in an unselected group of HLA-A 2. 1-positive patients. *International journal of cancer*, 64(5):309–315, 1995.
- [91] P. Spee and J. Neefjes. TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur J Immunol*, 27(9):2441–9, 1997.
- [92] RM Steinman. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med*, 68(3):106–66, 2001.
- [93] S. Stevanović and H. Schild. Quantitative aspects of T cell activation-peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Seminars in Immunology*, 11(6):375–384, 1999.
- [94] S.E. Strome, S. Voss, R. Wilcox, T.L. Wakefield, K. Tamada, D. Flies, A. Chapoval, J. Lu, J.L. Kasperbauer, D. Padley, et al. Strategies for Antigen Loading of Dendritic Cells to Enhance the Antitumor Immune Response 1, 2002.
- [95] Z. Su, J. Dannull, B.K. Yang, P. Dahm, D. Coleman, D. Yancey, S. Sichi, D. Niedzwiecki, D. Boczkowski, E. Gilboa, et al. Telomerase mRNA-Transfected Dendritic Cells Stimulate Antigen-Specific CD8+ and CD4+ T Cell Responses in Patients with Metastatic Prostate Cancer 1. *The Journal of Immunology*, 174(6):3798–3807, 2005.

- [96] A. Takashima and A. Morita. Dendritic cells in genetic immunization. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(2):350, 1999.
- [97] C. Thery, V. Brachet, A. Regnault, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, C. Bonnerot, and S. Amigorena. MHC Class II Transport from Lysosomal Compartments to the Cell Surface Is Determined by Stable Peptide Binding, But Not by the Cytosolic Domains of the α - and β -Chains 1. *The Journal of Immunology*, 161(5):2106–2113, 1998.
- [98] R.E.M. Toes, E.I.H. van der Voort, S.P. Schoenberger, J.W. Drijfhout, L. van Bloois, G. Storm, W.M. Kast, R. Offringa, and C.J.M. Melief. Enhancement of Tumor Outgrowth Through CTL Tolerization After Peptide Vaccination Is Avoided by Peptide Presentation on Dendritic Cells 1. *The Journal of Immunology*, 160(9):4449–4456, 1998.
- [99] S. Tomlinson. Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol*, 5(1):83–9, 1993.
- [100] S. Tonegawa, C. Brack, N. Hozumi, and V. Pirrotta. Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 42(Pt 2):921–31, 1978.
- [101] SL Topalian, L. Rivoltini, M. Mancini, NR Markus, PF Robbins, Y. Kawakami, and SA Rosenberg. Human CD4⁺ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20):9461, 1994.
- [102] V.F.I. Van Tendeloo, P. Ponsaerts, F. Lardon, G. Nijs, M. Lenjou, C. Van Broeckhoven, D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood*, 98(1):49, 2001.
- [103] S.D. Wagner and M.S. Neuberger. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol*, 14:441–57, 1996.
- [104] N.J. Waterhouse and J.A. Trapani. CTL: Caspases Terminate Life, but that's not the whole story. *Tissue Antigens*, 59(3):175–183, 2002.

- [105] M. Weigert, R. Perry, D. Kelley, T. Hunkapiller, J. Schilling, and L. Hood. The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature*, 283(5746):497–499, 1980.
- [106] J. Wienands. The B-cell antigen receptor: formation of signaling complexes and the function of adaptor proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 245(1):53–76, 2000.
- [107] J. Wierecky, M.R. Müller, S. Wirths, E. Halder-Oehler, D. Dörfel, S.M. Schmidt, M. Häntschel, W. Brugger, S. Schröder, M.S. Horger, et al. Immunologic and Clinical Responses after Vaccinations with Peptide-Pulsed Dendritic Cells in Metastatic Renal Cancer Patients. *Cancer Research*, 66(11):5910, 2006.
- [108] A.G. Wu, X. Liu, A. Mazumder, J.A. Bellanti, and K.R. Meehan. Improvement of Gene Transduction Efficiency in T Lymphocytes Using Retroviral Vectors. *Human Gene Therapy*, 10(6):977–982, 1999.
- [109] T. Yasuda, T. Kamigaki, T. Nakamura, T. Imanishi, S. Hayashi, K. Kawasaki, S. Takase, T. Ajiki, and Y. Kuroda. Dendritic cell-tumor cell hybrids enhance the induction of cytotoxic T lymphocytes against murine colon cancer: a comparative analysis of antigen loading methods for the vaccination of immunotherapeutic dendritic cells. *Oncol Rep*, 16(6):1317–24, 2006.
- [110] S. Zhang, Q. Wang, W.F. Li, H.Y. Wang, and H.J. Zhang. Enhanced antitumor immunity by murine cytokine activated T lymphocytes after cocultured with bone marrow derived dendritic cells pulsed with whole tumor lysates. *Leukemia Research*, 28(10):1085–1088, 2004.
- [111] T. Zhang, TC Tsang, and DT Harris. Efficient transduction of murine primary T cells requires a combination of high viral titer, preferred tropism, and proper timing of transduction. *J Hematother Stem Cell Res*, 12(1):123–30, 2003.
- [112] Y. Zheng, Y. Zha, and TF Gajewski. Molecular regulation of T-cell anergy. *EMBO Rep*, 9(1):50–5, 2008.
- [113] H. Zinsser. On the Essential Identity of the Antibodies. *The Journal of Immunology*, 6(5):289, 1921.

6 Danksagungen

Zu vorderst danke ich Prof. Dr. med. Peter Brossart ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas, die mir ein faszinierendes Forschungsfeld näher gebracht hat. Die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein Engagement sowie die stets gute Betreuung hat mir persönlich und fachlich sehr viel Freude gemacht.

Herrn PD. Dr. rer. nat. Frank Grünebach danke ich für die Herstellung der RNA, seine fachlich sowie persönlich vortreffliche Betreuung, für seine lückenlose Begleitung durch alle Arbeitsphasen und vor allem dafür, dass er mir auch bei den kleinen Widrigkeiten freundlich zur Seite stand.

Sylvia Stephan, für die exzellente Einführung in labortechnische Arbeiten, für die großartige technische Unterstützung sowie für die große Mühe und die vielen Überstunden die sie geduldig auf sich genommen hat.

Dr. rer. nat. Katharina Brauer fürs Korrekturlesen, für ihre - persönlich sowie fachlich - hochkompetente Beratung vom ersten bis zum heutigen Tag - und fürs Zellen füttern, wenn ich verhindert war.

Hanna Ruff für die jahrelange herzlich-innige Freundschaft, die Unterstützung in allem, was ich tue, für ihr Verständnis, für unzählige Kilometer des Sogschwimmens, für ihr rundum liebenswertes Wesen, was sie für mich einfach unersetzlich macht!!!

Uta Brandl für jahrelange unersetzliche Unterstützung, tolle sportliche Erfolge, viele schweisstreibende Trainingslager, viele, viele schöne Stunden und eine wunderbare Freundschaft.

Tobias Hoheisel für die schönen Zeiten, die lustigen Parties, die vielen im Wasser zurückgelegten Kilometer, das gemeinsame Frieren beim Freibadtraining und für die einzigartige Freundschaft.

Dr. med. Katrin Fink möchte ich für den letztendlichen Anstoss zu meiner Medizinerlaufbahn unendlich danken, für schöne Trainingslager, Parties, "ihre WG" sowie viele schöne Stunden.

Karin Zimmerman für die witzigen Parties, die wunderschönen Urlaube, für ihr scheinbar unerschöpfliches Verständnis und für eine tolle Freundschaft.

Anna Gatzek für ihr offenes, ehrliches, herzliches Wesen, für die Schokoladenorgien, für die hoffentlich weiterhin lustigen Fernsehabende. Danke Anna, macht einfach so viel Spaß!

Christian Haite für unersetzliche PC-Unterstützung, dafür dass sich der Tarif nicht erhöht hat und für eine ganz tolle Zeit in der Neuen Strasse.

Stephan Laible und Johannes Furch für die Zähmung auch der wüstesten Computerprogramme, viele lustige Parties und kulinarischen Wurstsalat.

Fridolin Eggers für die vielen schönen Stunden, die witzigen Parties, die Hilfsbereitschaft und eine ganz tolle Freundschaft.

Meiner Patentante Helma und ihrem Mann Hans möchte ganz herzlich für ihre Unterstützung danken

Gertrud, Joseph und Angelika Reith für die vielen wunderschönen, geselligen, in letzter Zeit leider viel zu seltenen Wochenenden, Geburtstage und Weihnachtsfeste.

Mama und Papa, dass sie trotz allem unendliches Verständnis für mich haben, mich so lieben, wie ich bin, für mich da sind, mir eine unersetzlich und unvergesslich schöne Kindheit beschert haben, und dafür, die besten Eltern auf der Welt zu sein.

Ganz besonderer Dank gilt auch Irina, dafür, dass sie nicht aufgibt, dass sie ein so herzliches, intelligentes Wesen hat und ich sie deshalb um nix in der Welt missen will!

Oma Toni für ihre Liebe, ihr besonderes Interesse an meinem Studium, sowie für die unermüdliche Unterstützung, die mir immer eine große Hilfe ist.

Oma Ingetraud für ihre Liebe, für ihr unerschütterlich frohes und positives

Wesen, die vielen schönen Sommer bei ihr und für ihre Aufmunterungen, die Balsam waren für wunde Seelen.

7 Lebenslauf

Name	Erndt
Vorname	Stefanie
Geboren am	7. Mai 1981
Geburtsort	Stuttgart-Ruit
Vater	Norbert Erndt, Verlagskaufmann, mittlerweile im Ruhestand
Mutter	Monika Erndt: medizinische Fußpflegerin, selbstständig
Grundschule	Grundschule: Schönbuchschule Dettenhausen 1987-1991
Weiterführende Schulen	Kepler Gymnasium, Tübingen 1991-1998 (5.-11. Klasse Gymnasium), Geschwisterschollschule, Tübingen 1998-2000 (Abitur 2000, LK's:Sport, Englisch)
Studium	WS2000/2001 1. Fachsemester Sport Diplom und SS01 und WS02/03 1.und 2. Fachsemester Physik an der Eberhard-Karl-Universität-Tübingen SS2003: 1. Fachsemester Humanmedizin an der Martin-Luther-Uni in Halle a.d.S. WS03/04:2.-4. Fachsemester Humanmedizin an der Universität Heidelberg SS05 bis jetzt (SS08, 6.klinisches Semester) Humanmedizin an der Universität Tübingen Staatsexamen in Tübingen am 27.11.2009

