INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin Ebil-lun Gelen

aus Mainz

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 2004

Untersuchungen des adjuvanten Effekts des viralen Tegumentproteins VP22 auf die Induktion Melanom-spezifischer cytotoxischer T-Zellen in C57BL/6 Mäusen nach DNA-Immunisierung

Gutachter: Prof. Dr. Dirk Schadendorf

Prof. Dr. Jürgen Wolfrum

Meinen Eltern

und

Peter

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dirk Schadendorf für die Bereitstellung des Themas und die Übernahme des Gutachtens. Ebenso danke ich Herrn Prof. Jürgen Wolfrum für die Übernahme des Koreferats.

Ganz besonders möchte ich weiterhin Herrn Dr. Wolfram Osen und Frau Dr. Annette Paschen für die Betreuung und die vielen Anregungen danken.

Allen Kollegen und Kolleginnen des Labors am Mannheimer Klinikum und des Labors 2.108/2.109 am Institut für angewandte Tumorvirologie (ATV) möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen.

Bedanken möchte ich mich bei all meinen Freunden, die mich in der ganzen Zeit ertragen mussten und mich dennoch unterstützt haben, u.a.
meinen lieben DAV'lern – für die Adrenalinausschüttungen am Fels, dem Seilriss und den vielen tollen dienstäglichen Schmucker-Abende.
Rubén Castillo Verdejo – para el tiempo maravilloso en Andalucía.
Ricarda Heber – für Deine Hilfe im Labor und für Deine Katzenbabys.
Dr. Arndt C. Heerwagen – für Dein ausgeprägtes Wissen über Wein- und Whisky, für Schalke und für die blau-weiss lackierten Nägel nach dem Pokalsieg.
Dr. Dirk Schwendel – dafür dass Du da bist, wenn Du gebraucht wirst.
Petra Schmitz – dafür dass Du so bist, wie Du bist!
Isabell Kämmerer – für Deine Freundschaft all die Jahre!
Meinen Eltern – die mich nicht nur finanziell unterstützt haben

Nicht zuletzt gilt mein Dank Peter, der mit mir durch dick und dünn geht und immer für mich da ist!

Kurzfassung

Melanomzellen können durch zytotoxische T Zellen, die spezifisch das TRP-2 Differenzierungsantigen erkennen, zerstört werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher eine TRP-2 DNA-Vakzine hergestellt und die Aktivierung TRP-2-spezifischer T-Zellen in der C57BL/6 Maus nach DNA Immunisierung evaluiert werden. Die Immunogenität der Vakzine sollte durch die Fusion von TRP-2 an VP22, dem Tegumentprotein des Herpes Simplex Virus 1, gesteigert werden. VP22 besitzt die Fähigkeit, interzellulären Transport von Proteinen zu vermitteln, so dass VP22-TRP-2 Fusionsproteine effizienter in professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC), den Initiatoren spezifischer zytotoxischer Immunantworten, transferiert werden sollten. Verschiedene DNA Vakzine wurden hergestellt, die für VP22-TRP-2 Fusionsproteine mit jeweils unterschiedlichen TRP-2 Anteilen (gesamtes TRP-2 Protein oder interne TRP-2 Fragmente) kodieren. Durch die Deletion hydrophober N- und C-terminaler TRP-2 Sequenzen sollte ein effizientes Aus- und Einschleusen der Fusionsproteine ermöglicht werden. Zu Kontrollzwecken wurden entsprechende DNA-Vakzine ohne VP22-Anteil hergestellt. In vivo induzierten VP22-TRP-2 DNA Vakzine tatsächlich verbesserte TRP-2-spezifische T-Zellantworten: 30 % der VP22-TRP2 immunisierten C57BL/6 Mäuse zeigten eine TRP-2-spezifische T-Zellantwort, während entsprechende Kontrollvakzine (ohne VP22-Anteil) nur in 4 % der Tiere eine TRP-2-spezifische Immunantwort induzierten. Desweiteren konnte mittels Westen Blot Analysen und Immunfluoreszenz-Mikrokopie ein Einfluss von VP22 auf die Stabilität beziehungsweise die intrazelluläre Lokalisation fusionierter TRP-2 Proteinfragmente nachgewiesen werden.

Abstract

Melanoma cells can be killed by cytotoxic T lymphocytes specifically recognizing the TRP-2 differentiation antigen. Therefore, a DNA vaccine encoding TRP-2 should be constructed and evaluated for its efficiency to activate TRP-2-specific T cells in C57BL/6 mice. The immunogenicity of the vaccine should be enhanced by fusion of the TRP-2 antigen to the tegument protein VP22 of the herpes simplex virus 1. VP22 can mediate intercellular transport of proteins, thus VP22-TRP-2 fusion proteins should be taken up by professional antigen presenting cells more efficiently. Different DNA vaccines were constructed encoding VP22-TRP-2 fusion proteins with different length fragments of TRP-2 (entire TRP-2 or internal TRP-2 fragments). The deletion of hydrophobic N- and C-terminal TRP-2 sequences should enhance the intercellular transfer of the fusion proteins. As a control, corresponding constructs lacking the VP22 part were generated. In vivo, VP22-TRP-2 DNA vaccines induced TRP-2 specific T cell responses with increased efficiency: 30 % of the mice immunized with different VP22-TRP-2 vaccines exhibited a TRP-2-specific T cell response, while immunization with the corresponding control constructs, lacking the VP22 part, induced TRP-2-specific T cell activation in only 4 % of the mice. Furthermore, Western Blot analysis and immunofluorescence microscopy revealed an influence of VP22 onto the stability and intracellular localization, respectively, of fused TRP-2 proteiɑn fragments.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung 1

1.1 Das Immunsystem 1
1.2 T-Lymphozyten 2
1.3 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) 3
1.4 Antigenpräsentation für T-Zellen 6
1.4.1 MHC-Klasse I restringierte Antigenpräsentation 6
1.4.2 MHC-Klasse II restringierte Antigenpräsentation 8
1.5 Tumorantigene 9
1.6 Das maligne Melanom 10
1.6.1 Ursachen und Entstehung 10
1.6.2 Immuntherapeutische Ansätze 11
1.7 Tegumentprotein VP22 des HSV-1 15
1.8 Zielsetzung der Arbeit 16

2 Material 17

2.1 Abkürzungen und Symbole 17
2.2 Material 19
2.3 Verbrauchsmaterial 21
2.4 Geräte 22
2.5 „Kits“ 23
2.6 Radiochemikalien 24
2.7 Puffer und Lösungen 24
2.8 Antikörper 25
2.8.1 Primärantikörper 25
2.8.2 Sekundärantikörper 26
2.9 Materialien für molekularbiologische Arbeiten 26
2.9.1 Synthetische Oligopeptide 26
2.9.2 Expressionsplasmide 27
2.9.3 Synthetische Oligodesoxynucleotide (Primer) 27
2.10 Biologische Materialien 28
2.10.1 Bakterienstamm (*Escherichia coli*) 28
2.10.2 Kultivierung von Bakterien 29
2.10.3 Zellinien 29
2.10.4 Kulturmedium für Eukaryotische Zelllinien 29
2.11 Tierversuche 30
2.11.1 Mausstämme 30
2.11.2 Immunisierung 30
2.12 Protein-Arbeiten 31
2.12.1 Polyacrylamidgele zur Proteinaufreinigung 31
2.12.2 Western-Blot 31
2.12.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen 32
2.12.4 Transfektion eukaryotischer Zellen 32
2.12.5 RT-PCR 32
2.12.6 Indirekte Immunfluoreszenz 32
2.13 Computerprogramme 32

3 Methoden 34

3.1 Zellkultur 34
3.1.1 Auftauen von Zellen 34
3.1.2 Kultivierung von Zellen 34
3.1.3 Einfrieren von Zellen 34
3.1.4 Zellzahl-Bestimmung mittels Neubauer-Kammer 35
3.1.5 Transiente Transfektion mittels FuGENE™ 6 35
3.1.6 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation 36
3.1.7 Nachweis der Transfektionseffizienz über β-Galaktosidaseaktivität 36
3.1.8 Nachweis der Proteinexpression mittels Immunfärbung 37
3.1.9 Detektion von Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz 37
3.2 Mikrobiologische Methoden 38
3.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien 38
3.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien 38
3.3 Molekularbiologische Methoden 39
3.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA 39
3.3.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA 39
3.3.3 „Endofree“ Megapräparation von Plasmid-DNA 40
3.3.4 Bestimmung des Endotoxingehalts (*Limulus amebocyte lysate test*) 41
3.3.5 Phenol-Chloroform-Extraktion 41
3.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 42
3.3.7 RNA-Isolierung 42
3.3.8 DNase-Behandlung 43
3.3.9 cDNA-Synthese aus RNA 43
3.3.10 PCR (polymerase-chain-reaction) 44
3.3.11 Spaltung von DNA mittles Restriktionsendonucleasen 45
3.3.12 Analytische und präparative Gelelektrophorese 45
3.3.13 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 46
3.3.14 Ligation 46
3.3.15 Ligation eines PCR-Fragments in den TOPO TA Cloning® Vektor 46
3.3.16 Transformation mittels Hitzeschock-Methode 47
3.3.17 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 47
3.3.18 Western Blot (Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen) 48
3.3.19 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch ECL (enhanced chemiluminescence) 48
3.4 Tierexperimentelle Methoden 49
3.4.1 Immunisierung mit Plasmid-DNA 49
3.4.2 Milzzell-Isolierung 50
3.4.3 Zellinaktivierung 50
3.4.4 *In vitro*-Restimulierung von Milzzellen 51
3.4.5 Charakterisierung der Zielzellen mittels FACS (flourescence activated cell sorting)-Analyse 51
3.4.6 Herstellung von IL-2-haltigem Überstand aus Concanavalin A-stimulierten induzierten Rattenmilzzellkulturen 52
3.4.7 Proliferationstest zur Überprüfung des Überstands von Con A-induzierten Rattenmilzzellkulturen 52
3.5 Verwendete Methoden zum Nachweis cytotoxischer T-Lymphozyten 53
3.5.1 INF-γ ELISpot (enzyme-linked immunospot) 53
3.5.2 ^{51}Cr-Freisetzungstest 55

4 Ergebnisse 58

4.1 Herstellung und Charakterisierung der Fusionskonstrukte VP22-TRP2, VP22-TRP2 dC, VP22-TRP2 511, VP22-TRP2 445 und der entsprechenden Konstrukte ohne VP22-Anteil 58
4.1.1 Klonierung des TRP2-Gens und seiner Deletionsvarianten in den Expressionsvektor pVP22/*Myc*-His 58
4.1.2 Klonierung des TRP2-Gens und seiner Deletionsvarianten in den „TOPO-Vektor“ 61
4.2 Nachweis der TRP2-Expression 64
4.2.1 Expressionsnachweis auf RNA-Ebene mittels RT-PCR 64
4.2.2 Expressionsnachweis auf Protein-Ebene 66
4.3 Einfluss des VP22-Anteils auf die TRP2-spezifische Immunogenität der hergestellten DNA-Konstrukte in C57BL/6 Mäusen 74
4.3.1 Charakterisierung TRP2-exprimierender Stimulator- und Zielzellen 74
4.3.3 DNA-Immunisierungsexperimente zur Induktion TRP2-spezifischer CTLs in C57BL/6 Mäusen 77

5 Diskussion 121

5.1 Induktion TRP2-spezifischer T-Zellantworten nach DNA-Immunisierung 123
5.2 *In vitro* Nachweis der Expression plasmidkodierter Antigene 126
5.3 Effizientere Induktion TRP2-spezifischer cytotoxischer T-Lymphozyten durch DNA-Immunisierung mit pVP22-TRP2, pVP22-TRP2 511 und pVP22-TRP2 445 128

6 Zusammenfassung 130

7 Literaturverzeichnis 132

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems besteht in der Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“, d.h. körperfremde Strukturen und Zellen zu attackieren, ohne dabei die körpereigenen Zellen und Gewebe zu schädigen. Hierbei unterscheidet man zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität:
Bei den Zellen der angeborenen Immunität handelt es sich in erster Linie um Granulozyten und Makrophagen, die Antigene unspezifisch durch Phagozytose eliminieren, wogegen die Zellen der erworbenen Immunität Antigene spezifisch über membranständige Antigenrezeptoren erkennen. Darüber hinaus ist die erworbene Immunität in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden, d.h. bei einem wiederholten Kontakt mit einem Antigen entsteht eine schnellere und stärkere Immunreaktion.
Die humorale Immunität wird von B-Lymphozyten gebildet. Für die zelluläre Immunität sind T-Lymphozyten verantwortlich. Beide bestreiten gemeinsam die Mechanismen der Antigenerkennung und deren Zerstörung. Dabei spüren B-Zellen Antigene aus dem extrazellulären Raum über membranständige Immunglobuline (Ig) auf und übernehmen durch die Sekretion von Antikörpern die Aufgabe der humoralen Antwort. T-Zellen dagegen erkennen Antigene in Form von Peptiden, die über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden, mit Hilfe ihres antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors (TCR).
Sämtliche Zellen des Immunsystems werden aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet. Lymphozyten werden in B- und T-Lymphozyten unterschieden: Erstere reifen im Knochenmark (*bone marrow derived*) heran, während letztere im Thymus differenzieren. Die Eigenschaft von B-Zellen besteht in ihrer Fähigkeit, Antikörper produzieren zu können, die bei der naiven B-Zelle zunächst in membrangebundener Form vorliegen und die von der B-Zelle nach Aktivierung und Differenzierung zur Plasmazelle in löslicher Form sezerniert werden.

1.2 T-Lymphozyten

Ein wesentlicher Aspekt bei der Antigenerkennung durch T-Zellen, ist die spezifische Erkennung von Peptidfragmenten (sog. Epitopen) im Kontext mit MHC-Klasse I- oder MHC-Klasse II-Molekülen (MHC-Restriktion). Im Unterschied zu B-Zellen bleibt der T-Zellrezeptor membranständig und wird nicht sezerniert.
T-Zellen haben die gleiche lymphatische Vorläuferzelle wie B-Zellen. Allerdings durchlaufen T-Zellen einen Reifungs- und Selektionsprozess im Thymus, der gewährleistet, dass autoreaktive T-Zellen durch Apoptose eliminiert werden (Negative Selektion). Dahingegen überleben T-Zellen mit einer Spezifität für autologe MHC-Moleküle (siehe Kapitel 1.3) plus potentiellem Fremdpeptid (Positive Selektion) (Bommhardt *et al.*, 2004). Somit verlassen vorwiegend reife $CD8^+$- bzw. $CD4^+$-T-Zellen mit einer Spezifität für antigene Peptide fremden Ursprungs den Thymus. Die Gesamtzahl der Spezifitäten des T-Zellrepertoires innerhalb eines Individuums wird hierbei auf ca. 10^{15} geschätzt (Casrouge *et al.*, 2000; Davis and Bjorkman, 1988).
$CD8^+$-T-Zellen erkennen hierbei das prozessierte Antigen im Komplex mit einem MHC-Klasse I-Molekül, während $CD4^+$-T-Zellen zur Erkennung die Kombination aus prozessiertem Antigen und MHC-Klasse II-Molekül benötigen (Davis and Bjorkman, 1988). Nach Aktivierung und bei Erkennung schütten $CD8^+$-T-Zellen porenbildende Stoffe (Perforine) aus und induzieren die Apoptose der Zielzellen. Sie werden deshalb auch cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) genannt. $CD4^+$-T-Zellen bilden dagegen zwei funktionelle Klassen aus: Sie können sich nach ihrer Aktivierung entweder zu einer T_H1- oder einer T_H2-Zelle entwickeln. T_H1-Zellen setzen nach ihrer Stimulierung Cytokine wie z.B. INF-γ oder IL-2 frei, die die zellvermittelte Immunität unterstützen. T_H2-Zellen fördern dagegen u.a. durch IL-4-Sekretion die Induktion einer B-Zellantwort (Mosmann and Coffman, 1989; Mosmann and Sad, 1996; O'Garra and Arai, 2000). Eine wichtige Funktion bei der Aktivierung der T-Zellen übernehmen die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, die von professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen exprimiert werden (Chen *et al.*, 1993; Davis and Bjorkman, 1988; Ma *et al.*, 2004). CD28 ist der entsprechende Rezeptor auf der T-Zelle (Espinoza-Delgado, 2002). Ohne diese Moleküle finden weder Proliferation noch Differenzierung der T-Zelle zur Effektorzelle statt.

Stattdessen kann das fehlende kostimulatorische Signal Anergie auslösen, d.h. naive T-Zellen werden trotz Peptidpräsentation nicht aktiviert sondern arretiert.
Die Funktion der beiden Korezeptoren CD8 und CD4 besteht darin, bei der Antigenerkennung die Wechselwirkung zwischen dem TCR und dem MHC-Klasse I- bzw. MHC-Klasse II-Molekül auf der antigenpräsentierenden Zelle (APC) durch Interaktion mit der α_3-Domäne des MHC-Klasse I- bzw. der β_2-Domäne des MHC-Klasse II-Moleküls zu stabilisieren.

1.3 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) besteht aus einer Gruppierung gekoppelter Gene, die für membranständige Glykoproteine kodieren. Im humanen System wird er HLA (*human leukocyte antigen*) genannt und liegt auf Chromosom 6. Für das MHC-Klasse I-Molekül sind im humanen System drei Genloci bekannt, die HLA-A, HLA-B und HLA-C genannt werden und die Peptide mit einer Länge von 8-11 Aminosäuren präsentieren können (Hopkins *et al.*, 2004; Momburg *et al.*, 1994). Ebenso gibt es drei Genloci für MHC-Klasse II-Moleküle: Sie werden als HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP bezeichnet und können Peptide der Länge 12-25 präsentieren (Chicz *et al.*, 1992). Im murinen System liegt der MHC auf Chromosom 17 und wird als H-2 bezeichnet. Hier befinden sich die Gene, die für die murinen MHC-Klasse I-Moleküle H2-K, -D und –L bzw. die Gene, die für H2-M, -A und E des MHC-Klasse II- Systems kodieren. Die Gene, die für den TAP (*transporter associated with antigen processing*) und die LMP-Proteine, die Untereinheiten des Proteasoms kodieren, sind sowohl im humanen als auch im murinen System innerhalb der MHC-II-Region lokalisiert.
MHC-Moleküle zeichnen sich durch zwei Eigenschaften aus: Zum einen sind sie hoch polymorph, da für jedes Gen mehrere Allele existieren. Desweiteren sind sie polygen, d.h. es gibt viele Isotypen, die eine gleiche Funktion bei unterschiedlicher Struktur besitzen. Somit kann eine große Bandbreite an Peptiden präsentiert werden.

Die Unterscheidung in MHC-Klasse I- bzw. MHC-Klasse II-Moleküle wird aufgrund struktureller und funktioneller Eigenschaften getroffen (Gromme and Neefjes, 2002; Saveanu *et al.*, 2002): Das MHC-Klasse I-Molekül ist ein Heterodimer. Es besteht aus einer membranständigen glykosylierten schweren Polypeptidkette (*heavy chain*) mit einem Molekulargewicht von 45 kDa und aus einem β_2-Mikroglobulin-Protein (*light chain*) mit einer Größe von 12 kDa, das nicht kovalent assoziiert ist. Dabei bilden die α_1- und α_2-Domänen den polymorphen, allelspezifisch peptidbindenden Teil und die α_3-Domäne den extrazellulären, nicht polymorphen Teil der schweren Kette des MHC-Klasse I-Moleküls (s. Abbildung 1.1).

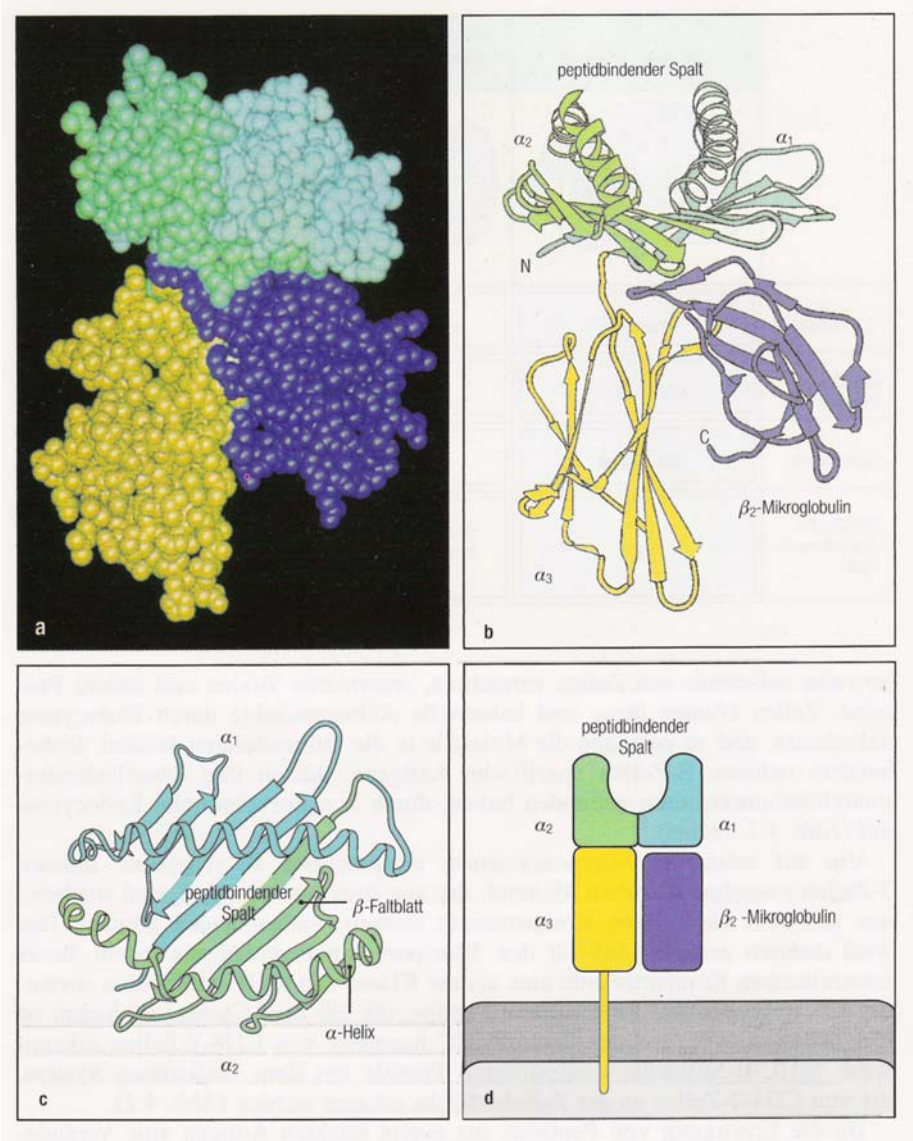


Abbildung 1.1: Aufbau und Struktur des MHC-Klasse I-Moleküls. Erklärung im Text. Abbildung aus Janeway *et al.* 2001.

Von der Peptidbindungsfurche (in Abbildung 1.1 als peptidbindender Spalt bezeichnet) werden Peptide mit einer Länge von 8-11 Aminosäuren gebunden; dabei bleiben die Enden in der Bindungsfurche, die hier geschlossen ist, verborgen (Längenrestriktion). MHC-Klasse I-Moleküle weisen allelspezifische Peptidbindungstaschen auf, in die das antigene Peptid über zwei bis drei Ankerpositionen gebunden wird. Daraus ergibt sich, dass Peptide bestimmte allelspezifische Bindungsmotive aufweisen müssen, um von MHC-Molekülen präsentiert werden zu können (Falk *et al.*, 1991).

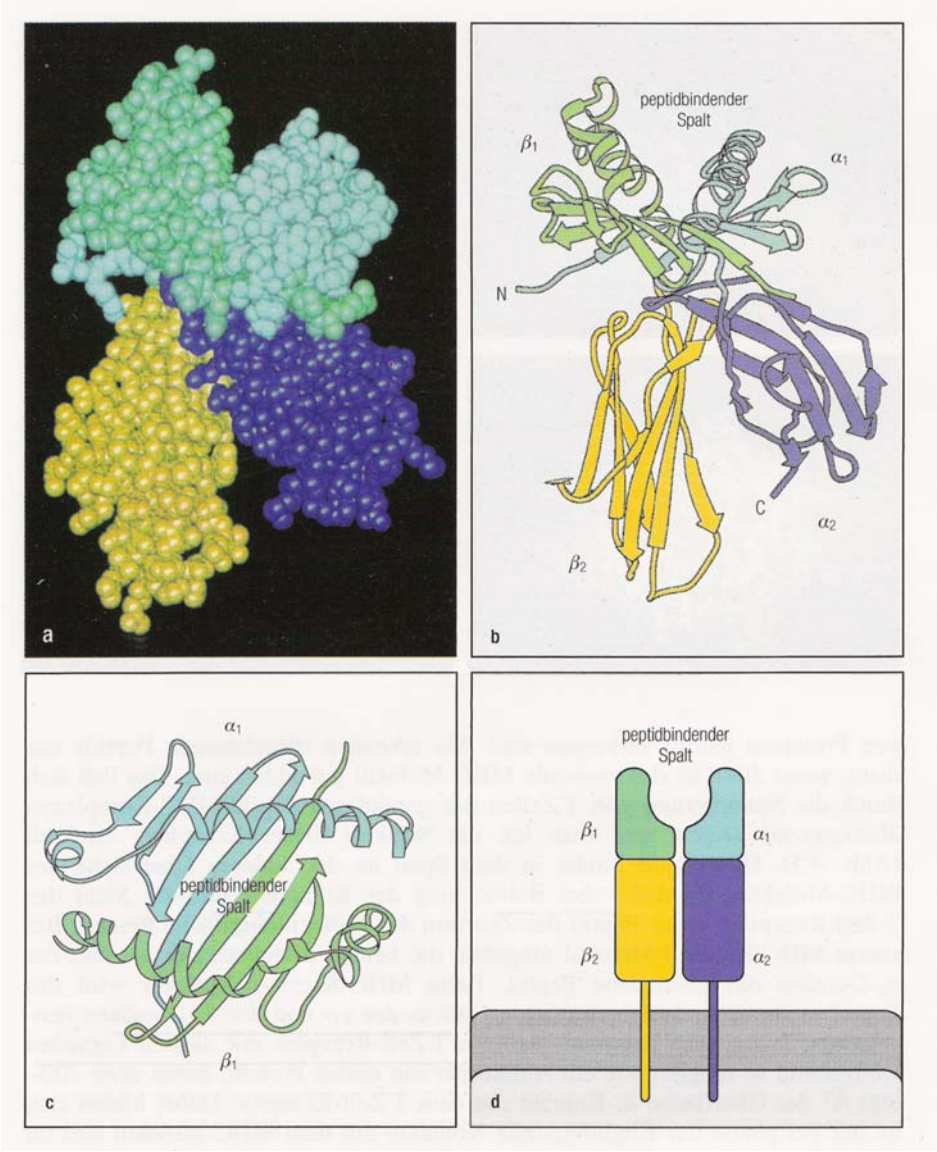


Abbildung 1.2: Aufbau des MHC-Klasse II-Moleküls. Erklärung im Text. Abbildung aus Janeway *et al.* 2001.

Das MHC-Klasse II-Molekül ist ebenfalls ein Heterodimer. Es besteht aus Transmembranglykoproteinketten α (34 kDa) und β (29 kDa), die jeweils aus zwei Domänen zusammengesetzt sind. Der peptidbindene polymorphe Teil besteht bei diesem Molekül aus einer α_1- und einer β_1- Domäne, α_2- und β_2- Domäne bilden den nicht-polymorphen Anteil. Eine Transmembranregion und ein cytoplasmatischer Anteil bilden den dritten und vierten Teil des MHC-Klasse II-Moleküls. MHC-Klasse II-Moleküle werden auf professionellen antigen-präsentierenden Zellen (dendritischen Zellen, Monozyten/Macrophagen, B-Zellen) exprimiert. Chicz *et al.* (1992) zeigten, dass die Länge der auf MHC-Klasse II-Molekülen gebundenen Peptide im Gegensatz zu Peptiden, die von MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden, zwischen 12 und 25 Aminosäuren variiert, da die Peptidbindungsfurche im Gegensatz zu MHC-Klasse I-Molekülen an beiden Enden offen ist (s. Abbildung 1.2) (Chicz *et al.*, 1992; Hunt *et al.*, 1992).

1.4 Antigenpräsentation für T-Zellen

1.4.1 MHC-Klasse I restringierte Antigenpräsentation

MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren Peptide, die sich in der Regel von cytosolischen Proteinen ableiten: Neben den zellulären Proteinen können auch virale oder bakterielle Proteine Ursprung solcher Peptide sein. An der Präsentation eines Peptids als Peptid/MHC-Komplex an der Zelloberfläche sind eine Reihe von Prozessen und Stationen beteiligt: Der erste Schritt besteht in der Linearisierung und folgenden Ubiquitinierung des endogen vorliegenden Proteins. Dieses wird anschließend durch das Proteasom, einem zylindrisch geformten Komplex aus proteolytischen Enzymen, zu sog. Vorläuferpeptiden degradiert. Diese Vorläuferpeptide werden durch den TAP (*transporter-associated with antigen processing*) vom Cytosol in das Endoplasmatische Retikulum (ER) ATP-abhängig transportiert (Howard et al., 1995). Hier treffen sie nach weiterer Prozessierung (Saric *et al.*, 2002; Serwold *et al.*, 2002) auf die schwere Kette teilweise gefalteter MHC-Klasse I-Moleküle, die zur Stabilisierung an sog. Chaperone wie etwa Calnexin gebunden sind. Nach Assoziation mit β_2-Microglobulin (leichte Kette), löst sich der Komplex aus schwerer und leichter

Kette von Calnexin und geht eine Bindung mit Calreticulin und TAP-assoziiertem Tapasin ein (Neefjes *et al.*, 1993). Nach Bindung eines Peptides mit ausreichender Affinität löst sich das MHC-Klasse I-Molekül von Calreticulin und Tapasin, wird als Peptid/MHC-Komplex über Vesikeln in den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert und an $CD8^+$-T-Zellen präsentiert (s. Abbildung 1.3). Durch die Behandlung der Zellen mit Brefeldin A wird der Transport durch den Golgi-Apparat unterbrochen, so dass der klassische MHC-Klasse I-Präsentationsweg blockiert werden kann (Yewdell and Bennink, 1989).

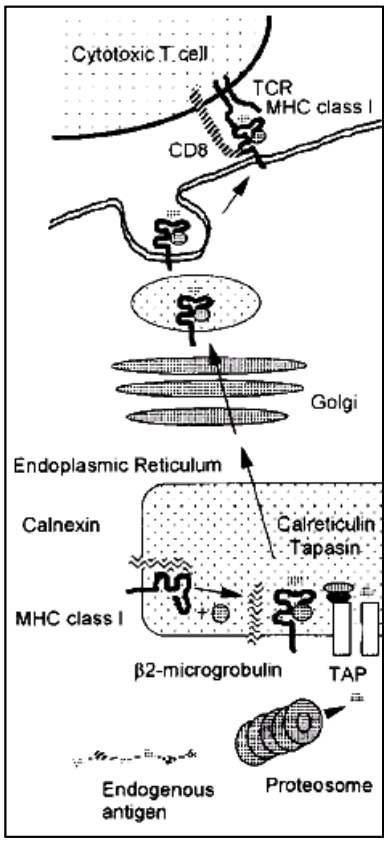


Abbildung 1.3: Klassischer MHC-Klasse I-Antigenpräsentationsweg. Endogene Proteine werden durch das Proteasom enzymatisch zu Peptiden abgebaut. Diese werden durch den TAP in das Endoplasmatische Retikulum (ER) geschleust. Im ER treffen die Peptide auf MHC-Klasse I-Moleküle. Der stabile Peptid/MHC-Klasse I-Komplex gelangt an die Zelloberfläche und wird dort an $CD8^+$-T-Zellen präsentiert. Abbildung aus (Nagata *et al.*, 2004).

Peptide von Antigenen exogenen Ursprungs können unter bestimmten Bedingungen von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) auch über MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden (sog. *Cross*-Präsentation). Die Aktivierung von CTLs mit Spezifität für Peptide von Proteinen exogenen Ursprungs wird auch als *Cross-Priming* bezeichnet.

1.4.2 MHC-Klasse II restringierte Antigenpräsentation

Von MHC-Klasse II-Molekülen werden hauptsächlich Peptide von Proteinen exogenen Ursprungs präsentiert. Hierbei wird das exogene Protein über Endozytose aufgenommen und im sauren Millieu der Endosomen durch Cathepsine proteolytisch degradiert, d.h. die Proteine werden nicht wie im MHC-Klasse I-Präsentationsweg über das Proteasom abgebaut.

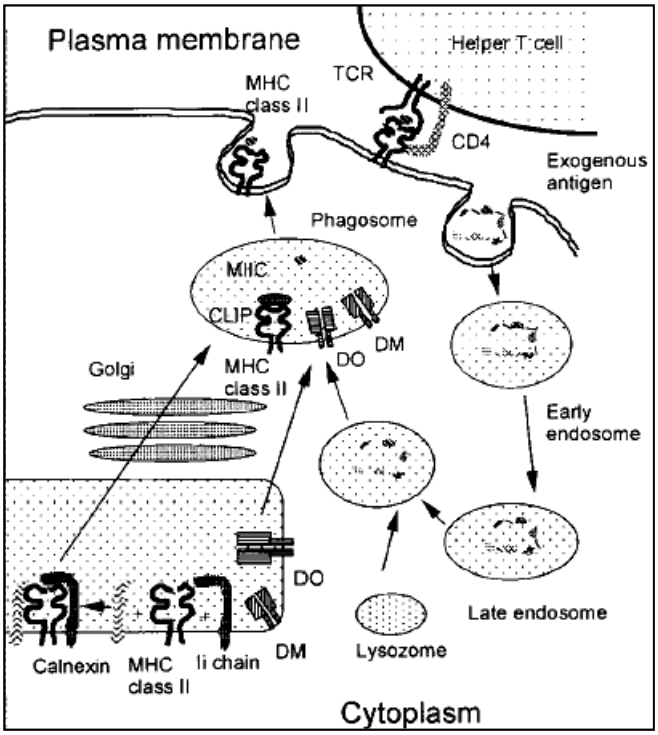


Abbildung 1.4: MHC-Klasse II-Präsentationsweg. Exogenes Antigen wird über Endozytose aufgenommen und trifft im MIIC (s. Text) auf endosomal vorliegende MHC-Klasse II-Moleküle. Dort werden sowohl das Antigen als auch die invariante Kette (Ii) gespalten, so dass Peptidfragmente auf MHC-Klasse II-Molekülen gebunden werden können und als Peptid/MHC-Klasse II-Komplex an die Zelloberfläche gelangen. Abbildung aus (Nagata *et al.*, 2004).

MHC-Klasse II-Moleküle werden wie MHC-Klasse I-Moleküle kotranslational in das ER synthetisiert. Die sog. invariante Kette (Ii) blockiert dabei zum einen die Bindungsfurche des MHC-Klasse II-Moleküls und verhindert dadurch die Bindung der prozessierten Peptide im ER. Zum anderen werden MHC-Klasse II-Moleküle durch die Ii stabilisiert, die in „leerer“ Form degradiert würden. Eine dritte Funktion der invarianten Kette besteht darin, den Komplex aus invarianter Kette und MHC-Klasse II-Molekül in das endosomale Kompartiment zu dirigieren. Hier erfolgt die proteolytische Degradation der invarianten Kette durch Cathepsine. Ein kleiner

Teil der invarianten Kette, das sog. CLIP (*class II-associated invariant-chain peptide*), bleibt allerdings an die Bindungsfurche des MHC-Klasse II-Moleküls gebunden. Die komplette Degradation der invarianten Kette und die gleichzeitige Peptidbeladung erfolgt in einer besonderen Region des endosomalen Kompartiments, dem sog. MIIC (*MHC class II compartment*). Dieser Vorgang wird durch das Chaperon-Molekül HLA-DM unterstützt (Denzin and Cresswell, 1995; Morris *et al.*, 1994). Durch die Bindung des Peptids stabilisiert, gelangt das MHC-Klasse II-Molekül schließlich an die Zelloberfläche und kann mit $CD4^+$-T-Zellen interagieren (s. Abbildung 1.4).

1.5 Tumorantigene

Peptide, die von Tumorzellen über MHC-Moleküle präsentiert und von T-Zellen spezifisch erkannt werden, bezeichnet man als T-Zell-Epitope. Die entsprechenden Proteine, von denen sich diese T-Zell- oder B-Zell-Epitope ableiten, werden Tumorantigene genannt.

Tumor-*spezifische* Antigene werden ausschließlich von Tumorzellen exprimiert und kommen in normalem Gewebe nicht vor. Hierzu zählen virale Onkoproteine, die nur im infizierten Gewebe exprimiert werden (z.B. HPV 16 E6/E7) wie auch autologe Proteine, die aufgrund von Mutationen eine veränderte Aminosäuresequenz aufweisen, was zur Präsentation von neuen T-Zell-Epitopen führen kann; Beispiele hierfür sind p53 (Volkenandt *et al.*, 1991), ras (Herlyn and Satyamoorthy, 1996) oder CDK4 (Wolfel *et al.*, 1995; Zuo *et al.*, 1996).

Zu den Tumor-*assoziierten* Antigenen, die sowohl in Tumorzellen als auch in normalem Gewebe exprimiert werden, zählen sowohl die Cancer/Testis-Antigene, wie z.B. die Genprodukte der MAGE-Familie wie MAGE-1 (van der Bruggen *et al.*, 1991), MAGE-3 (Gaugler *et al.*, 1994) oder das NY-ESO-1-Gen (Chen *et al.*, 1997). Desweiteren gibt es die Differenzierungsantigene des Melanomsystems. Wichtige Differenzierungsantigene stellen innerhalb des Melanomsystems hauptsächlich eine Reihe von Enzymen dar, die an der Melaninbiosynthese beteiligt sind, wie z.B. Tyrosinase (Brichard *et al.*, 1993), Melan A/MART-1 (Coulie *et al.*, 1994) oder TRP2 (Tsukamoto *et al.*, 1992).

1.6 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein aggressiver Tumor der Pigmentzellen. Er weist eine steigende Inzidenz und Mortalität auf wobei mit 10 bis 12 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner gerechnet wird. Diese Zahl der Neuerkrankungen erhöht sich jährlich um 3 bis 7 % (Beddingfield, 2003; de Braud *et al.*, 2003; Garbe, 2003). Während der Primärtumor im frühen Stadium operativ entfernt werden kann und somit eine Chance zur völligen Heilung besteht, ist eine chirurgische oder chemotherapeutische Maßnahme im metastasierten Stadium nur selten effizient. Die genaue Ursache für die Tumorentstehung ist bisher nicht bekannt. Einwirkungen von Zigarettenrauch, Ernährung und vor allem erhöhte Exposition gegenüber UV-Strahlung im Kindesalter zählen zu einigen Einflüssen, die genetische Veränderungen hervorrufen und zur Melanomentstehung beitragen können. Trotz der Fähigkeit, immunologisch gegen Tumorzellen reagieren zu können, scheint das Immunsystem in der klinischen Situation häufig zu versagen.

1.6.1 Ursachen und Entstehung

Starke Sonnenexposition und genetische Prädisposition werden als Hauptfaktoren der Melanomentstehung betrachtet. Beide Faktoren haben Mutationen in den Melanozyten zur Folge, die bei Anhäufung zu einem malignen Melanom führen können. Ein erhöhtes Risiko der Melanomentstehung wird für Menschen mit heller Hautpigmentierung und heller Haarfarbe (Typ I und II) beschrieben (de Gruijl, 1999; Wei *et al.*, 1995). In Australien und Neuseeland wurden bei etwa 2100 Sonnenstunden pro Jahr die höchsten Inzidenzen verzeichnet: 55,8 Neuerkrankungen in Australien und 77,7 Neuerkrankungen in Neuseeland (jeweils gemessen pro 100 000 Einwohner) wurden angegeben (Jones *et al.*, 1999; MacLennan *et al.*, 1992). Die UV-Strahlung des Sonnenlichts (200-400 nm) führt zur Zerstörung der DNA, woraus zelluläre Mutationen hervorgehen. Während die UVC-Strahlung (200-280 nm) von der Ozonschicht abgehalten wird und daher unbedeutend für die Melanomentstehung zu sein scheint, werden in der Literatur UVA- (320-400 nm) und UVB-Strahlung (280-320 nm) als Risikofaktoren für die Melanomentstehung diskutiert: Obwohl UVA-Strahlung tiefer in die Haut eindringen kann, scheint sie keinen direkten jedoch

einen indirekten Einfluss zu haben (Jhappan *et al.*, 2003). Die Strahlung wird in diesem Fall absorbiert und erzeugt Sauerstoff-Radikale, die zur DNA-Zerstörung führen und Mutationen hervorrufen können. UVB-Strahlung wird dagegen als direkter karzinogener Faktor angesehen, der sich in der Entstehung von Photoprodukten und Cyclobutanpyrimidin-Dimeren äußert (Tornaletti and Pfeifer, 1996).

Neben der Einwirkung des Sonnenlichts scheinen auch genetische Faktoren eine Rolle bei der Melanomentstehung zu spielen. Stam-Posthuma *et al.* zeigten, dass eine erhöhte Zahl atypischer melanozytärer Nävi und Melanome in der Verwandtschaft das Risiko der Melanomentstehung steigern (Stam-Posthuma *et al.*, 2001). Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen werden in der Literatur beschrieben. Dabei können Punktmutationen Auslöser der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen sein, aber auch die Aktivierung von Proto-Onkogenen bewirken (Polsky and Cordon-Cardo, 2003). In diesem Zusammenhang werden CDK4, p16 und ARF häufig genannt (Hayward, 2003). CDK4 stellt in aktivierter Form ein Onkogen dar, welches durch die Assoziation mit dem Tumorsuppressorprotein p16 inhibiert wird, während das Tumorsuppressorprotein ARF indirekt die Funktion des p53 blockiert.

Die Entwicklung des Melanoms ist durch zwei Stadien charakterisiert: i) Die radiale Wachstumsphase (*radial growth phase, RGP*) ist gekennzeichnet durch epidermales Wachstum. Ausgangspunkt ist hierbei ein Melanozyt, der sich durch Mutationen (z.B. ras) zu einem Nävus entwickelt. Er immortalisiert durch Telomeraseaktivierung und wächst weiter ohne zu metastasieren. Kommt es jedoch zudem zu Mutationen, die eine Überexpression von Proteintyrosinkinasen oder die Aktivierung von ras oder β-Catenin auslösen, können diese in ihrer Gesamtheit die ii) vertikale Wachstumsphase (*vertical growth phase, VGP*) bewirken und durch den Durchbruch der Dermis zur Metastasierung führen (Bennett, 2003).

1.6.2 Immuntherapeutische Ansätze

Das maligne Melanom ist in seiner metastasierten Form gekennzeichnet durch seine Resistenz gegenüber chemo- oder strahlentherapeutischer Behandlung.

Seine steigende Inzidenz macht es notwenig, neue therapeutische Maßnahmen zu finden, die dem Patienten höhere Heilungschancen geben.
Basierend auf der Identifizierung von Tumorantigenen wurden verschiedene Immunisierungsstrategien beschrieben. Wie andere Therapien auch, hat die Immuntherapie zum Ziel, den Patienten effektiv zu behandeln und dabei Nebenwirkungen möglichst auszuschließen. Einige der bisher in der Literatur beschriebenen Ansätze zur Behandlung des malignen Melanoms sollen nachfolgend dargestellt werden:

1.6.2.1 Zelluläre Vakzinen

Die Vakzinierung mit allogenen oder autologen Tumorzellen stellt eine Methode der zellulären Vakzine dar. Livingston et al. konnten bei Melanompatienten, die mit bestrahlten, autologen Tumorzellen immunisiert worden waren, eine erhöhte Antikörperproduktion beobachten (Livingston *et al.*, 1982). Um die Immunantwort gegen den Tumor effizient zu steigern, wurden in weiteren Versuchen genetisch veränderte Tumorzellen angewandt. Dabei zeigten Untersuchungen von Dranoff *et al.*, dass der Einsatz bestrahlter GM-CSF (*granulocyte-macrophage colonystimulating factor*)-sekretierender Tumorzellen, die zuvor transduziert worden waren, im murinen System eine Tumorabstoßung für das B16-Melanommodell lieferte (Dranoff *et al.*, 1993). Soiffer *et al.* konnten durch eine Immunisierung mit bestrahlten Tumorzellen, die zuvor transduziert worden waren, eine spezifische Antitumorantwort in Patienten auslösen (Soiffer *et al.*, 1998). Auch die Injektion von TRP2 exprimierenden Tumorzellen, die mit Interleukin-2-, Interleukin-12- oder GM-CSF-Genen transfiziert worden waren, konnte spezifische CTL-Antworten gegen das TRP2-Protein im Mausmodell induzieren (Kircheis *et al.*, 2000; Yei *et al.*, 2002).
Allerdings birgt die Immunisierung mit Tumorlysat den Nachteil mit sich, durch fehlende kostimulatorische Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzelle Anergie zu induzieren.
Alternativ dazu wurden dendritische Zellen (DC) als professionelle antigenpräsentierende Zellen in weiteren zellbasierenden Immunisierungs-experimenten eingesetzt. Die Beladung von DCs mit Peptiden (Schuler-Thurner *et*

al., 2002; Svane *et al.*, 2004), Tumorlysaten (Nestle *et al.*, 1998) oder RNA (Coughlin *et al.*, 2004) fand sowohl im humanen als auch im murinen System Anwendung (Ashley *et al.*, 1997; Eggert *et al.*, 1999; Schreurs *et al.*, 2000). Die Methode der Beladung dendritischer Zellen ist jedoch sehr kosten- und zeitaufwendig.

1.6.2.2 Peptidvakzinen

Die Identifizierung von MHC-Klasse I-restringierten Eptiopen lieferte einen weiteren Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Immunisierungsstrategien zur Induktion einer gesteigerten Immunantwort und einer spezifisch gegen den Tumor gerichteten Antwort. In klinischen Versuchen wurden Peptide, die sich von Cancer-Testis-Antigenen (MAGE-3) oder auch Differenzierungsantigenen (gp100, MART-1/Melan A) ableiten, zur Peptidvakzinierung eingesetzt. So konnten Marchand *et al.* in klinischen Untersuchungen mit MAGE-3A.1-Peptid Tumorregressionen nachweisen (Marchand *et al.*, 1999). Salgaller *et al.* beschrieben den Einsatz von modifiziertem gp100 zur gesteigerten Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort bei Patienten (Salgaller *et al.*, 1996) basierend auf dessen stärkerer Bindung an HLA-A2-Moleküle (Rosenberg, 1997). Da peptidbasierte Immunisierungen nur selten eine Steigerung der Immunantwort hervorrufen, finden Adjuvantien wie *Freund's Incomplete Adjuvant* (Aichele *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999), CpG-Motive (Davila and Celis, 2000; Weeratna *et al.*, 2000) oder Cytokine wie GM-CSF (Scheibenbogen *et al.*, 2003) häufig Anwendung. Davila *et al.* zeigten eine gesteigerte CTL- und Anti-Tumorantwort für das murine B16-Melanommodell durch die Kombination von CpG-Motiven und der gleichzeitigen CTLA-4-Blockade in einer $TRP2_{180-188}$-basierten Immunisierung (Davila and Celis, 2000).

Den Vorteilen einer Peptidimmunisierung wie etwa der einfachen Herstellung stehen jedoch auch Nachteile gegenüber: i) Der erforderliche Einsatz von Adjuvantien, ii) es wird nur ein einzelnes Epitop präsentiert, d.h. eine vorausgehende HLA-Typisierung ist erforderlich, um das entsprechende Peptid effizient einsetzen zu können und iii) durch die Präsentation des Peptids über nicht-professionelle APC kann Toleranz hervorgerufen werden.

1.6.2.3 Vakzinierungen mit Plasmid DNA

Im Gegensatz zu Peptidvakzinen oder auch zellulären Vakzinen stellt die DNA-Immunisierung mit nackter, antigenkodierender Plasmid-DNA theoretisch eine vorteilhaftere Strategie dar. Die Zelle, die mit der Vakzine transfiziert wurde oder die Vakzine aufnimmt, besitzt die Fähigkeit, Antigene endogen zu generieren, so dass diese für einen MHC-Klasse I-Präsentationsweg zugänglich sind. Der hauptsächliche Vorteil der Vakzinierung mit Plasmid-DNA liegt in der Induktion sowohl einer humoralen als auch einer zellulären Immunantwort. Desweiteren überzeugt diese Methode durch geringen Kostenaufwand für Herstellung und Lagerung.

Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme durch professionelle antigen-präsentierende Zellen (APC) ist noch ungeklärt, jedoch werden drei verschiedene Mechanismen postuliert: i) An der Injektionsstelle vorhandene Muskelzellen können transfiziert werden und das antigene Peptid über MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren. Allerdings besitzen diese keine zusätzlichen kostimulatorischen Moleküle, so dass ein effizientes *Priming* von cytotoxischen T-Zellen nicht stattfinden kann. ii) professionelle APCs können direkt transfiziert werden und das Protein endogen synthetisieren. iii) Das Antigen kann von transfizierten Zellen sekretiert oder von apoptotischen transfizierten Zellen freigesetzt und somit für APCs zugänglich werden. Sekretierte Proteine werden dann über Endozytose aufgenommen und prozessiert; davon abgeleitete Peptide gelangen über den MHC-Klasse I-Präsentationsweg an die Zelloberfläche, wo sie von $CD8^+$-T-Zellen erkannt werden können (*cross-priming*) (Gurunathan *et al.*, 2000).

Der erfolgreiche Einsatz von DNA-Vakzinen zur Induktion von Immunantworten gegen Differenzierungsantigene wurde in mehreren tierexperimentellen Studien gezeigt: Schreurs *et al.* konnten nach Immunisierung mit humanem gp100 eine tumorspezifische Antwort im murinen B16-Melanommodell erhalten (Schreurs *et al.*, 1998). In Untersuchungen von Bronte *et al.* konnte eine Abstoßung des Tumors nach intramuskulärer Injektion TRP2-kodierender DNA im murinen B16-Melanommodell nachgewiesen werden (Bronte *et al.*, 2000). In klinischen Studien konnten Tagawa *et al.* beobachten, dass eine intranodale Injektion Tyrosinase-kodierender DNA eine Immunantwort auslösen kann, während erwartete klinische Antworten jedoch ausblieben (Tagawa *et al.*, 2003).

1.7 Tegumentprotein VP22 des HSV-1

Ein limitierender Faktor einer DNA-Vakzine besteht in ihrer Unfähigkeit, in Zellen amplifiziert zu werden und sich *in vivo* auf andere Zellen zu verteilen. Eine erhöhte Verteilung des Proteins auf viele Zellen ist jedoch anzustreben, da sie darauf abzielt, eine möglichst hohe Anzahl APCs zu treffen (dendritische Zellen). VP22 stellt eine Möglichkeit dar, eine DNA-Vakzine effektiver zu gestalten. Es besteht aus 301 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von 38 kDa. Als Tegumentprotein des Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) ist es ein Strukturprotein, das vom viralen U_L49 Gen des HSV-1 kodiert wird. Es ist im Bereich zwischen der Capsid-Region und der Virus-Hülle lokalisiert (Elliott and O'Hare, 1997).

VP22 gehört zu einer Gruppe von sog. Proteintransduktionsdomänen (PTD), zu denen auch das Tat-Protein des HIV-1 (Vives *et al.*, 1997) oder auch Bakterientoxine (Hung *et al.*, 2001b) gezählt werden. Dabei ermöglichen PTDs die Weitergabe von nicht-membrandurchlässigen polaren oder großen Molekülen in lebende Zellen (Namiki *et al.*, 2003). Bei VP22 liegen verschiedene Funktionen auf spezifischen Regionen: Dabei wird der Bereich von 267 bis 301 Aminosäuren für den interzellulären Transport verantwortlich gemacht (Aints *et al.*, 2001). Die Fähigkeit, interzellulären Transport vermitteln zu können, wird dem Protein VP22 in der Literatur mehrmals zugeschrieben (Elliott and O'Hare, 1997; Phelan *et al.*, 1998; Wybranietz *et al.*, 1999). Ebenso fand es Anwendungs in der Induktion einer gesteigerten T-Zellantwort (Hung *et al.*, 2001a). Als Mechanismus des interzellulären Transports des Proteins wird ein nicht-klassischer Golgi-unabhängiger Weg postuliert (Kuchler, 1993). Da VP22 keine N-terminale hydrophobe Signalsequenz besitzt, wird angenommen, dass der Transport nicht über das ER und den Golgi-Apparat stattfindet.

Trotz der bisher gezeigten Ergebnisse der Arbeiten von z.B. Elliot und O'Hare, stellen weitere Arbeiten das Lokalisationsphänomen als Fixierungsartefakt dar (Lundberg and Johansson, 2001). Dabei wurde gezeigt, dass eine Fixierung transfizierter Zellen zu einer Permeabilisierung der Zellmembran führt. Gleichzeitig wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich das Protein transfizierter Zellen an der Zellmembran befindet und erst durch die Fixierung ins Zellinnere gelangt. Dennoch wurde ein adjuvanter Effekt durch den großen Anteil von CpG-Motiven des VP22 in verschiedenen Arbeiten postuliert (Michel *et al.*, 2002b;

Zavaglia *et al.*, 2003). Hierbei gehen die Autoren davon aus, dass das Fusionsprotein nach der DNA-Immunisierung von transfizierten Zellen aus- und in untransfizierte professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) eingeschleust wird, so dass T-Zell-Antworten durch cross-priming induziert werden (s. Abschnitt 1.4.1).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der Arbeit war die Induktion von Melanom-assoziierten TRP2-spezifischen cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) im Mausmodell durch DNA-Immunisierung mit TRP2-spezifischen VP22-Fusionskonstrukten und die Überprüfung eines adjuvanten Effekts durch den VP22-Anteil im Hinblick auf die TRP2-spezifische CTL-Antwort. Im Rahmen dieser Arbeit sollten neben dem Gesamt-TRP2-Gen (aa 1-517) verschiedene Deletionskonstrukte getestet werden: die Deletion von 153 bp am C-Terminus (aa 1-467), der Einsatz des Fragments aa 171-302 und des Fragments aa 148-220. Diese Deletionsvarianten sollten gewährleisten, dass hydrophobe Bereiche eliminiert werden, die ein Ein- bzw. Ausschleusen des Fusionsproteins verhindern könnten.

In Immunisierungsexperimenten sollten Melanom-assoziierte TRP2-spezifische CTLs im Mausmodell *in vivo* induziert werden, die eine cytotoxische Immunantwort selektiv gegen Zellen des malignen Melanoms hervorrufen.

In anschließenden Expressionsstudien zur Lokalisation der Proteine im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen intrazellulärer Lokalisation und gesteigerter Immunogenität der TRP2-spezifischen VP22-Fusionskonstrukte hergestellt werden kann.

2 Material

2.1 Abkürzungen und Symbole

αMEM	Alpha minimal essential medium
Amp	Ampicillin
Ak	Antikörper
α	anti
APCs	Antigen präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATV	Angewandte Tumorvirologie (Forschungsschwerpunkt des DKFZ)
bp	Basenpaar
BES	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*)
CMV	Cytomegalievirus
Con A	Concanavalin A
cpm	Aktivität pro Minute (*counts per minute*)
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
DAPI	4',6'-Diamino-2-phenyl-indoldihydrochlorid
DCs	dendritische Zellen
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum (Heidelberg)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
E	Effektorzelle
ER	endoplasmatisches Retikulum
ECL	enhanced chemiluminescence
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP	Elektrophoresepuffer
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Durchflusszytometer (*fluorescence activated cell sorter*)
FCS	Fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde

HLA	Genetische Bezeichnung für humanen MHC (*human leukocyte antigen*)
H_2O bidest	HPLC gereinigtes bidestilliertes Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (*high pressure liquid chromatography*)
HRP	Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*)
HSV	Herpes Simplex Virus
HWZ	Halbwertszeit
IFN	Interferon
i.m.	Intramuskulär
kb	Kilobasenpaar
kDA	Kilodalton
LB	Luria Broth
M	Molar/Molekulargewicht
mM	Millimolar
mAK	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitäskomplex (*major histocompatibility complex*)
Min	Minute
mRNA	Boten-RNA (*messenger RNA*)
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
NaCl	Natriumchlorid
neo	Gen für die Aminoglykosid-Phosphotransferase (Neomycinresistenz)
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OD_{600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymer-chain-reaction*)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pmol	Pikomol
PVDF	Polyvinyldifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*)

sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (*sodiumdodecylsulfate*)
SDS-PAGE	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese
T	Zielzelle (*target*)
TAP	*transporters associated with antigen processing*
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP2	*Tyrosinase related protein 2*
U	internationale Enzymeinheiten der Aktivität (*units*)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
Vol.	Volumen
wt	Wildtyp

2.2 Material

Alle allgemein gebräuchlichen Säuren, Basen, Salze und Lösungsmittel wurden in der Regel in p.A. Qualität von den Firmen Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Riedel de Hean (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Acrylamid-Lösung (30%)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Roche Diagnostics,Mannheim
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche Diagnostics,Mannheim
Bacto-Agar	Difco, Hamburg
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Hamburg
Bacto-Trypton	Difco, Hamburg
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Baker, Holland
D(+)-Glucose (Monohydrat)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
dNTPs	Hybaid
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure-Disodium Ethanol absolut	Merck, Darmstadt Riedel-de-Haen, Seelze
Essigsäure	Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll	Amersham Pharmacia, Schweden
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt
Fugene 6 Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Geneticin/ G418	Gibco BRL, Eggstein
Glycerol (Glycerin)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol)	Riedel-de-Haen, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200mM)	Biochrom KG
Luminol	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel-de-Haen, Seelze
MOPS (3-[N-morpholino]-2-hydroxypropansulfonic acid)	Gerbu, Gaiberg
Natriumacetat wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat-Dihydrat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Eggstein
NP40 Detergenz	Sigma, Deisenhofen
NEBuffer	BioLabs, Frankfurt a.M.
One-Phor-All-Plus Puffer	Amersham Pharmacia, Schweden
Paraformaldeyd	AppliChem, Darmstadt
PCR Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Pokeweed Mitogen	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin (1000U/ 100µg/ml)	Gibco BRL, Eggstein
Phenol/Chlorophorm: Roti®-Phenol-Chlorophorm	Roth, Karlsruhe
Protein-Marker	BioRad, München
RPMI 1640	Gibco BRL, Eggstein
Salzsäure HCl	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	GERBU, Gaiberg
T4-DNA-Ligase	MBI-Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
TEMED	Serva, Heidelberg

Tris Trizma® Base (2-Amino-2-(hydromethyl)-propan-1,3-diol)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	GERBU, Gaiberg
Trypanblau (0,5%(w/v))	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA (10fach)	Gibco BRL, Eggstein
Tween 20	Gerbu, Gaiberg
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Sigma, Deisenhofen

2.3 Verbrauchsmaterial

24-Loch Platte	Costar, Bodenheim
6-Loch Platte	TPP, Schweiz
96-Loch Platte	NUNC, Roskilde, DK
Edelstahlnetze (3x5 cm, 0,5 mm Maschenweite)	DKFZ, Heidelberg
Einmalhandschuhe	Meditrade, Baxter, Thetford, UK
Einmal-Skalpelle	Feather (Vertrieb durch pfm, Köln)
Einmalspritze (1ml, steril)	Braun, Melsungen
FACS®-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Festphasen-Szintillationsplatten (LUMA plate)	Packard Bioscience, USA
Frischhaltefolie	Melitta, Minden
Gel-Blotting-Papier GB 002 (Whatman-Papier)	Schleicher & Schüll, Dassel
Glasfiber-Matten für Cell Harvester	Perkin Elmer, Turku, Finnland
Glaspipetten (2, 5, 10 und 20 ml)	
Immobilon-P (Transfer Membrane, 0,45µm)	Millipore, Eschborn
Kanülen 0,3x13	Becton Dickinson, Drogheda, Irland
Kryokonservierungs-Röhrchen 2 ml	Nalgene, Rochester, USA
Mediumfilter (Membrex 25, 0,2µm)	Membra Pure, Bodenheim
MultiScreen-HA 96-Loch Filtrationsplatte	Millipore, Eschborn
Parafilm	American National Can
PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Peptid-Sterilfilter (Millex®-GV, 0,22µm, 4mm)	Millipore, Eschborn
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Steinbrenner Laborsysteme, Eberbach
Pipettier-Wannen	Greiner, Frickenhausen
Plastikküvetten	Terumo, Frankfurt Main
Plastikspritzen (10, 30 und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen

PP-Rundbodenröhrchen (15 ml, steril)	Ritter, Schwabmünchen
Präzisions-Dispensertips (25 µl, 50 µl, 100 µl)	Ritter, Schwabmünchen
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme, Kodak X-Omat Blue XB-1	Kodak (vertrieben von Perkin Elmer)
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Spritzenstempel	Terumo, Frankfurt Main
Szintillationswachs	Perkin Elmer, Turku, Finnland
Zellkulturflasche (25 cm^2, 80 cm^2, 175 cm^2)	Greiner, Frickenhausen
Zellschredder QIAshredder	Qiagen, Hilden

2.4 Geräte

Bakterienschüttler SM 25	DuPont, Bad Homburg
Bakterienschüttler TR 125	E. Bühler
^{137}CS-Quelle Gammacell 1000	MDS, Nordion, Kanada
Cell Harvester Zell-Ernter	Dunn, Asbach
DNA Thermal Cycler 480	Perkin-Elmer
Durchflusszytometer FACSsort	Beckton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine AF-3	Scotsman, Glasgow, Schottland
Electrophoresekammern Horizon	Gibco BRL
Elektrotransfer Blotapparatur, semi dry	BioRad, München
ELISpot-Gerät AID	AID, Strassberg
Feinwaage 2002 MP1	Satorius, Göttingen
Gefrierschrank (-80°C)	Labotec, Göttingen
Geldokumentation	Herolab, Wiesloch
Inkubator steri-cult 2000	Labotec, Göttingen
Kippwippe Silent Rocker	CTI, Idstein
Kühlschrank (4°C, -20°C)	Liebherr
Konfokales Mikroskop Leica DM IRBE	Leica Heidelberg
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leitz Mikroskopie & Systeme GmbH
Magnetrührer	Jahnke & Kunkel, Stauffen
Mikrowelle Micromat 135	Bosch, Labotec, Göttingen
Multikanalpipette	Abimed, Langenfeld
Multistepp-Pipette	Eppendorf, Hamburg

Neubauer Zählkammer	Migge, Heidelberg
pH-Meter	Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim
Photometer	Hitachi, Japan
Pinzette	Dimeda, Tuttlingen
Pipetten 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Gilson-Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Rotor SLA 3000	DuPont, Bad Homburg
Spannungsgerät Powersupply EPS 3500	Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterile Werkbank, Biogard Hood	Baker Company, USA
Schweißgerät	TEW
Stickstofftank	Union Carbide, USA
Szintillationszähler Microbeta Trilux 1450	Wallac, Turku, Finnland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischschwenkplatte Duomax 1030	Heidolph, Schwalbach
Vortex Minishaker (MSI)	IKA, Wilmington
Waagen	Sartorius, Göttingen
Western Blot Kammer	CTI, Idstein
Wasserbad Thermomix 1460	Braun, Melsung
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

2.5 „Kits“

Elite Kit (ABC Kit)	Linaris, Wertheim
Fast DAB (3,3’-Diaminobenzidin)	Sigma, Deisenhofen
Revert Aid First^{TM} Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas
Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
EndoFree Plasmid Mega Kit	Qiagen, Hilden
E-TOXATE®	Sigma, Deisenhofen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Transfektionsreagenz FuGENE 6	Roche, Mannheim
TOPO TA Cloning (pCR®II-TOPO®)	Invitrogen

2.6 Radiochemikalien

[methyl-^{3}H]-Thymidin	Amersham, Freiburg
$Na_2{}^{51}CrO_4$	NEN DuPont, Bad Homburg

2.7 Puffer und Lösungen

ACT-Puffer (Erythrozytenlyse)	17 mM 160 mM	Tris NH_4Cl, pH 7,2
6 x DNA-Ladepuffer	20mM 2mM 50% 0,2% 0,2%	TrisHCl pH 7,5 EDTA Succrose Xylencyanol Bromphenolblau
2x BBS-Puffer	50 mM 280 mM 1,5 M	BES NaCl Na_2HPO_4 in H_2O gelöst und mit NaOH auf pH 6,95 eingestellt
X-Gal-Färbelösung	4 mM 4 mM 2 mM 5 %	$K_3Fe[CN]_6$ $K_4Fe[CN]_6$ $MgCl_2$ 20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid (v/v)
Einfriermedium	50 % 40 % 10 %	FCS, Biochrom komplettes Medium DMSO
Elektrophorese-Puffer (SDS-Gelelektrophorese)	12,5 mM 100 mM 0,1 %	Tris Glycin SDS
50 x Elektrophoresepuffer (Agarose-Gelelektrophorese)	2M 250mM 50 mM	TrisHCl Natriumacetat EDTA pH 7,8
FACS-Puffer	3 % 0,02 %	FCS NaN_3 in PBS pH 7,5
Restriktionsenzyme und 10x -puffer		MBI Fermentas
PBS	140 mM 2,7 mM 8,1 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4
Brefeldin A (BFA)-Lösung [1 mg/ml]	50 mg	BFA ad 50 ml Ethanol

Luminol-Lösung	1,25 mM 62 µl ad 200 ml	Luminol H_2O_2 0,11 M Tris/HCl pH 8,6 (lichtgeschützt bei 4°C gelagert)
ELISpot Substrat-Lösung (BCIP/NBT)		Sigma, Deisenhofen
T4 DNA-Ligase und 10x Ligationspuffer		MBI Fermentas
Magermilch-Lösung (5 % (w/v))	25 g ad 500 ml	Magermilchpulver PBS
Monensin-Lösung	3 mM	Monensin in Ethanol
Enhancer-Lösung	11 mg ad 10ml	β-Cumarinsäure DMSO
1 % Ethidiumbromid-Lösung [10 mg/ml]		Roth, Karlsruhe
Smart Ladder DNA Gößenmarker	Fragmentgröße [bp] 10000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200	MBI Fermentas
Puffer I	50 mM 25 mM 10 mM	Glucose TrisHCl pH 8,0 EDTA pH 8,0
Puffer II	200 mM 1%	NaOH SDS
Puffer III	60 ml 11,5 ml 28,5 ml	5 M Kaliumacetat Eisessig H_2O bidest
Ribonuklease A (RNase A)		Qiagen

2.8 Antikörper

2.8.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Typ	Spezifität	Referenz
anti-c-myc	monoklonal aus Maus, Clone 9E10	anti c-myc	Sigma, Deisenhofen
anti-VP22	polyklonal aus Kaninchen	anti-VP22	Dr. Hanswalter Zentgraf, ATV
anti-Calnexin (C-20)	polyklonal aus Kaninchen	anti-Calnexin	Santa Cruz, Heidelberg

anti-Golgi-Protein 58K (Clone 58K-9)	monoklonal aus Maus	anti-Golgi-Protein 58 kDa	Sigma, Deisenhofen
anti-mouse INF-γ (capture)	aus Ratte		
B22.249	monoklonal aus Maus (Hybridom-Überstand)	anti-H2-K^b	Lemke *et al.* 1979
E3-25	monoklonal aus Maus (Hybridom-Überstand)	anti-H2-D^b	Evan *et al.* 1983

2.8.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Einsatz in der Arbeit	Bezugsquelle
Peroxidase gekoppelter Ziege-α-Maus IgG	1:5000	Dianova, Hamburg
Ratte-α-Maus IFN-γ (biotinyliert)	1:5000	BDBiosciences
Ziege-α-Maus IgG Alexa 488	1:150	Molecular Probes, Niederlande
Ziege-α-Maus IgG Alexa 594	1:150	Molecular Probes, Niederlande
Ziege-α-Kaninchen Alexa 488	1:150	Molecular Probes, Niederlande
Ziege-α-Kaninchen Alexa 594	1:150	Molecular Probes, Niederlande

2.9 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

2.9.1 Synthetische Oligopeptide

Das Peptid $TRP2_{180\text{-}188}$ (Abteilung Peptidsynthese des DKFZ) hat die Aminosäuresequenz: **SVYDFFVWL** und ist ein promiskuitives CTL-Epitop, das sowohl über HLA-A2 als auch über das H2-K^b-Molekül präsentiert wird (Parkhurst *et al.*, 1998). Es wurde im Cytotoxizitätstest zur Markierung von Zielzellen und im Elispot zur Stimulierung von T-Zellen verwendet.

2.9.2 Expressionsplasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Bezugsquelle
pCMV-trp2	Trägt die Sequenz des TRP2 unter der Kontrolle des CMV-Promotor	Zur Verfügung gestellt von Dr. A. Paschen
pVP22/*Myc*-His	trägt die Sequenz des VP22 Gens des Herpes Simplex Virus 1 (HSV 1)	Invitrogen
pCR®II-TOPO®	zur direkten Insertion von *Taq* Polymerase amplifizierten PCR-Produkten in einen Plasmid-Vektor; hocheffiziente, One-step Klonierungs-strategie; der Vektor liegt linearisiert vor und trägt einen 3'-Thymidin (T)-Überhang zur Klonierung	Invitrogen

2.9.3 Synthetische Oligodesoxynucleotide (Primer)

Primer zur Amplifizierung des VP22-TRP2-Gens:
Sense-Primer: VP22/trp2-5' 5'- ATA ACC ATg gAT CCA TgA gCC CCC TTT ggT ggg ggT TTC TgC -3' *Bam*HI
Antisense-Primer: VP22/trp2-3' 5'- ATA ACC ATT CTA gAC Tgg CTT CTT CTg TgT ATC TCT TgC TgC -3' *Xba*I
Primer zur Amplifizierung des VP22-TRP2 dC-Gens:
Sense-Primer: VP22/trp2-5' 5'- ATA ACC ATg gAT CCA TgA gCC CCC TTT ggT ggg ggT TTC TgC -3' *Bam*HI
Antisense-Primer: VP22/trp2-dC-3' 5'- ATA ACC ATT CTA gAC TAC CTg gAg TTT CTT CAA CTg AAA CTg -3' *Xba*I
Primer zur Amplifizierung des VP22-TRP2 445-Gens:
Sense-Primer: VP22/trp2 445-5' 5'- ATA AgA ggA TCC AAg AAg AgA gTA CAC CCC gA -3' *Bam*HI
Antisense-Primer: VP22/trp2 660-3' 5'- ATA AgA TCT AgA CTg TgC CAg gTA ACA AAT gCA g -3' *Xba*I
Primer zur Amplifizierung des VP22-TRP2 511-Gens:
Sense-Primer: VP22/trp2 511-5' 5'- ATA TAA CCg gAT CCg gAA CCC AgC CgC AgT TTg CCA ACT gC -3' *Bam*HI
Antisense-Primer: VP22/trp2 906-3' 5'- ATA TAA CCT CTA gAC Tgg TTC CAT TgC ACA Agg TgA CCA gg -3' *Xba*I

Primer zur Amplifizierung des TRP2 myc-Gens:
Sense-Primer: trp2-myc-5’ 5’- ATA ACC ATA AgC TTA TTA TgA gCC CCC TTT ggT ggg ggT TTC -3’ *Hind*III Antisense-Primer: VP22/trp2-3’ 5’- ATA ACC ATT CTA gAC Tgg CTT CTT CTg TgT ATC TCT TgC TgC -3’ *Xba*I
Primer zur Amplifizierung des TRP2 myc dC-Gens:
Sense-Primer: trp2-myc-5’ 5’- ATA ACC ATA AgC TTA TTA TgA gCC CCC TTT ggT ggg ggT TTC -3’ *Hind*III Antisense-Primer: VP22/trp2-dC-3’ 5’- ATA ACC ATT CTA gAC TAC CTg gAg TTT CTT CAA CTg AAA CTg -3’ *Xba*I
Primer zur Amplifizierung des TRP2 myc 445-Gens:
Sense-Primer: trp2-myc 445-5’ 5’- ATA TAA CCA AgC TTA TTA TgA AgA AgA gAg TAC ACC CCg A -3’ *Hind*III Antisense-Primer: VP22/trp2 660-3’ 5’- ATA AgA TCT AgA CTg TgC CAg gTA ACA AAT gCA g -3’ *Xba*I
Primer zur Amplifizierung des TRP2 myc 511-Gens:
Sense-Primer: trp2-myc 511-5’ 5’- ATA TAA CCA AgC TTA TTA Tgg gAA CCC AgC CgC AgT TTg CCA AC -3’ *Hind*III Antisense-Primer: VP22/trp2 906-3’ 5’- ATA TAA CCT CTA gAC Tgg TTC CAT TgC ACA Agg TgA CCA gg -3’ *Xba*I
Primer zur Amplifizierung des murinen TRP2-Gens:
Sense-Primer: mtrp2-5’ 5’- ATA Agg ATC CgC ggC CgC Atg ggC CTT gTg ggA Tgg ggg CT -3’ *Bam*HI Antisense-Primer: mtrp2-3’ 5’- ATA AgT CgA CgC ggC CgC TAg gCT TCC TCC gTg TAT CTC TT -3’ *Sal*I

2.10 Biologische Materialien

2.10.1 Bakterienstamm (*Escherichia coli*)

XL2 Blue

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F’ proAB lac1^{q}ZΔM15*Tn*10 (Tet) Amy Cam]*

2.10.2 Kultivierung von Bakterien

Medium	Zusammensetzung	
LB (Luria-Bertani)	10 g 5 g 5 g ad 1 l	Bacto-Trypton Bacto-Yeast-Extract NaCl H_2O bidest
LB-Agar-Platten	400 ml 6 g	LB-Medium Bacto-Agar

2.10.3 Zellinien

Bezeichnung	Organismus	Gewebe	Beschreibung	Referenz
B16-F10	Maus (C57BL/6J)	Haut, Melanom	Melanom Zell-Linie; ATCC-Nr: CRL-6475	Fidler, 1975
COS-7	Affe	Niere, SV40 transformiert	ATCC-Nr: CRL-1651	
RMA	Maus (C57BL/6J)	Rauscher Virus-induziertes Thymom		Ljunggren and Karre, 1985
RMA-S	Maus (C57BL/6J)	siehe RMA	TAP-defiziente RMA-Zellen	Ljunggren *et al.*, 1990
RMA-TRP2 Klon 1	Maus (C57BL/6J)	siehe RMA	Transfektanten-Klon mit stabiler TRP2-Expression	

2.10.4 Kulturmedium für Eukaryotische Zelllinien

Zellen	Medium
B16-F10	RPMI-Medium
COS-7	RPMI-Medium
RMA	RPMI-Medium
RMA-S	RPMI-Medium
RMA-TRP2	RPMI-Medium + Geniticin (G418) [0,8 mg/ml]

Medium	Zusammensetzung	Bezugsquelle
RPMI-Medium	RPMI 1640/ 2 mM L-Glutamin 5 % FCS 1 % Penicillin/ Streptomycin 0,1 % β-Mercaptoethanol	Gibco BRL, Eggstein

RPMI-Medium + Geneticin	wie RPMI-Medium plus 0,8 mg/ml Geneticin [10 mg/ml]	Gibco BRL, Eggstein
αMEM-Medium	Minimal Essential Medium Eagle, alpha modification (αMEM) 10 % FCS (PAA) 2 mM L-Glutamin 1 % Penicillin/ Streptomycin 0,1 % β-Mercaptoethanol	Gibco BRL, Eggstein
„CTL-Medium“	αMEM-Medium 2,5 % (v/v) Überstand aus Concanavalin A induzierten Rattenmilzzellkulturen 25 mM Methyl-α-Mannopyranosid	 Sigma, Deisenhofen

Alle Medienzusätze wurden durch einen 0,2 µm Sterilfilter in das Medium filtriert. Inaktivierung des Komplementsystems in FCS geschah durch Inkubation bei 56°C für 30 Minuten.

2.11 Tierversuche

2.11.1 Mausstämme

Verwendet wurden weibliche C57BL/6 Mäuse mit einem Alter von 8-12 Wochen. Sie wurden in der Isolatorstation des Zentralen Tierlabors des DKFZ unter pathogenfreien Bedingungen gehalten und durch Standarddiät und Trinkwasser ad libitum ernährt. Vertrieben durch die Firma M&B A/S, Dänemark, Herkunft ist Firma Charles River WIGA.

Zur Herstellung von Concanavalin A induziertem Rattenmilzüberstand wurden weibliche Lewis Ratten mit einem Gewicht von 175-200g verwendet. Bezogen wurden sie über Charles River WIGA.

2.11.2 Immunisierung

Cardiotoxin aus *Naja nigricollis* Isofluran		Latoxan, Rosans, Frankreich

2.12 Protein-Arbeiten

2.12.1 Polyacrylamidgele zur Proteinaufreinigung

10x SDS-Laufpuffer	30,34g 145 g 10 g ad 1000 ml	Tris Glycin SDS H_2O
Tris-Puffer pH 6,8	1 M	Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen
Tris-Puffer pH 8,8	1 M	Tris mit HCl auf pH 8,8 einstellen
Sammelgel 3 %	13,6 ml 3,4 ml 2,5 ml 200 µl 200 µl 30 µl	H_2O 30 % Acrylamid 1 M Tris pH 6,8 10 % SDS 10 % APS TEMED
Trenngel 12 %	12,3 ml 24 ml 22,5 ml 600 µl 600 µl 30 µl	H_2O 30 % Acrylamid 1 M Tris pH 8,8 10 % SDS 10 % APS TEMED
Trenngel 15 %	6,3 ml 30 ml 22,5 ml 600 µl 600 µl 30 µl	H_2O 30 % Acrylamid 1 M Tris pH 8,8 10 % SDS 10 % APS TEMED

2.12.2 Western-Blot

WB-Puffer I	0,3 M 20 %	Tris Methanol
WB-Puffer II	25 mM 20 %	Tris Methanol
WB-Puffer III	25 mM 20 % 40 mM	Tris Methanol DL-Norleucin
Blocklösung	5 % 0,05 %	Magermilchpulver Tween 20 in PBS

BSA-Blocklösung	50 µl 0,4 g	Tween 20 BSA In 10 ml PBS
Luminol-Lösung	1,25 mM 2,7 mM in 0,1 M	Natriumluminol Wasserstoffperoxid H_2O_2 Tris-HCl pH 8,6 Lichtgeschützt bei 4°C gelagert
Enhancer-Lösung	11 mg in 10 ml	Para-hydroxy-coumarsäure (trans) DMSO Lichtgeschützt bei RT gelagert

2.12.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Roti-Quant	Roth, Karlsruhe

2.12.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

FuGene 6 Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
RPMI-Medium ohne Zusätze	Gibco BRL, Eggstein
RPMI-Medium	Gibco BRL, Eggstein

2.12.5 RT-PCR

Desoxyribonuklease I (DNase I) und Puffer	Boehringer, Mannheim
Ribonuklease Inhibitor	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase und Puffer	Perkin Elmer, Weiterstadt

2.12.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Fluoprep	Bio Mérieux sa, France
Runde Deckgläschen, Ø 10 mm	Roth, Karlsruhe

2.13 Computerprogramme

Adobe Acrobat 5.0	Adobe, California, USA
Adobe Photoshop 5.0	Adobe, California, USA

AID Elispot Software	AID, Strassberg
Clone Manager for Windows and DNAstar	Scientific and Educational Software, Pennsylvania, USA
Cellquest	Beckton Dickinson
Endnote 6.0	ISI Research Software, Berkley, USA
Leica TCS NT Version 1.6.582	Leica, Heidelberg
Medline / PubMed	NIH Software
Microsoft Office 2000	Microsoft Corp., Redmont, USA
Microsoft Windows XP	Microsoft Corp., Redmont, USA

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in RPMI-Medium (s. Kapitel 2.10.4) im Brutschrank bei 37°C, gesättigter Wasserdampfatmosphäre und bei 7,5% CO_2.

3.1.1 Auftauen von Zellen

Die in Flüssigstickstoff tiefgefrorenen Zellen wurden bei 37°C aufgetaut, sofort in 10 ml RPMI-Medium (s. Kapitel 2.10.4) überführt und 5 Min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 10 ml frischem RPMI-Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Bei Bedarf wurde am darauffolgenden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.1.2 Kultivierung von Zellen

Adhärent wachsende Zellen wurden zur weiteren Passage durch Trypsin/EDTA-Behandlung abgelöst und im Verhältnis 1:10 bis 1:20 verdünnt. Suspensionszellen wurden ohne Trypsin/EDTA-Behandlung im Verhältnis 1:10 verdünnt.

3.1.3 Einfrieren von Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von eukaryotischen Zellen in flüssigem Stickstoff wurden adhärent wachsende Zellen bei einer Konfluenz von 70-80% mit Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin/EDTA durch Zugabe von 10 ml RPMI-Medium inaktiviert und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (s. Kapitel 2.7) aufgenommen, in Aliquots zu 1 ml (5×10^6 – 1×10^7 Zellen/ml) in Einfrierröhrchen (s. Kapitel 2.3) portioniert und in vorgekühlten Einfriergefäßen (Cryo-Einfriergeräte) bei -70°C eingefroren. In

diesen Einfriergefäßen wird ein langsames Einfrieren gewährleistet, wodurch DMSO in der Lage ist, einer Eiskristallbildung in den Zellen vorzubeugen und somit deren Zerstörung zu verhindern. Am folgenden Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff umgelagert.

3.1.4 Zellzahl-Bestimmung mittels Neubauer-Kammer

Frisch in RPMI-Medium aufgenommenen Zellsuspensionen wurden Aliquots entnommen und in einer bestimmten Verdünnung (1:2, 1:5, 1:10 etc) mit Trypanblau (0,18%) gefärbt. 10 µl einer solchen Verdünnung wurden auf die Zählkammer gegeben und ausgezählt. Die Lebendzellzahl kann mit dieser Methode bestimmt werden, da sich Trypanblau an Proteinstrukturen des Cytoplasmas anlagert, d.h. es kann nur in Zellen mit permeabler Zellmembran eindringen und somit tote Zellen selektiv blau anfärben. Der Titer wurde nach folgender Formel berechnet:

Zellzahl in 16 Kleinquadraten x Verdünnungsfaktor x Konstante (10^4/ml) = Zellzahl/ml

3.1.5 Transiente Transfektion mittels FuGENE™ 6

Um die Expression des TRP2-Proteins zu untersuchen, wurden COS-7-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA transient transfiziert. Verwendet wurde das Transfektionsreagenz " FuGENE™ 6" (nicht-liposomales Lipid) von Roche.
Einen Tag vor der Transfektion wurde je ein Deckgläschen pro Loch einer 24-Loch-Platte gelegt und die Zellen versuchsabhängig in einer Dichte von $1x10^5$-$2x10^6$ Zellen pro Loch in RPMI-Medium ausgesät und über Nacht bei 37°C und 7,5% CO_2 inkubiert, um am folgenden Tag eine Konfluenz von etwa 70% zu erreichen.
Zur Vorbereitung der Transfektion wurden pro Loch 3 µl FuGENE™ 6 zu 97 µl RPMI-Medium (ohne Zusätze) gegeben. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde diese Mischung auf 1 µg Plasmid-DNA gegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde anschließend mit RPMI-Medium auf ein Gesamtvolumen von 2 ml aufgefüllt. Bei

einem größeren Ansatz wurde der prozentuale Anteil des Transfektionsreagenzes geringer gewählt.
Von der 24-Loch-Platte wurde das Medium vom Vortag entfernt und das vorbereitete Transfektionsmedium auf die adhärierten Zellen gegeben. Nach 36 Stunden Inkubation wurde dieses Transfektionsgemisch entfernt und die Proteinexpression mittels Immunfärbung nachgewiesen.

3.1.6 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation

Bei dieser Methode der Transfektion bedient man sich der Eigenschaft des Ausfallens von Calciumphosphat, das durch Zugabe von $CaCl_2$ zu Na_2HPO_4 entsteht. Das ausgefallene Calciumphosphat lagert sich an die DNA an, die über die Zellmembran als DNA/Salz-Komplex endozytotisch aufgenommen wird. Ein Teil der DNA gelangt in den Zellkern und wird transkribiert.
Am Vortag der Transfektion von COS-7-Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte pro Loch bis zu drei runde Deckgläschen gelegt und $3x10^5$ Zellen in 1 ml Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden 3 µg DNA mit 50 µl 3 M $CaCl_2$ und 450 µl H_2O bidest gemischt. Anschließend wurden 500 µl 2x BBS-Puffer (2.7) tropfenweise hinzupipettiert. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 15 Min inkubiert und vorsichtig zu den Zellen in der 6-Loch-Platte getropft. Diese Zellen wurden über Nacht bei 35°C und 3% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen bei Standardbedingungen weiterkultiviert.

3.1.7 Nachweis der Transfektionseffizienz über β-Galaktosidaseaktivität

Über eine Farbreaktion, bei der das Enzym β-Galaktosidase das Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid) in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo umsetzt, kann die Effizienz der Transfektion überprüft werden.
Dazu wurden Zellen nach der Transfektion mit einem Kontroll-Plasmid, das für β-Galaktosidase kodiert, mit PBS gewaschen und in 100% eiskaltem Methanol bei -20°C für 10 Min fixiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und für 10 Min in frischem PBS rehydriert. Die Färbelösung (s. Kapitel 2.7) wurde auf die Zellen gegeben und etwa 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend

wurde die Transfektionseffizienz anhand der Anzahl der blaugefärbten Zellen unter dem Mikroskop ermittelt.

3.1.8 Nachweis der Proteinexpression mittels Immunfärbung

Zur Fixierung der transient transfizierten COS-7-Zellen wurde 36 h später das Medium entfernt, die Zellen mit 1x TBS gewaschen und 10 Min in TBS mit 4% Formaldehyd bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde erneut mit TBS gewaschen und zur Permeabilisierung 2 Min mit TBS/0,2% TritonX-100 inkubiert. Es wurde zweimal mit TBS gewaschen und anschließend mit Normalserum (Verdünnung 1:50 in TBS) für 20 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Normalserum wurde anschließend entfernt und eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper anti-c-myc (s. Kapitel 2.8.1) angeschlossen (Verdünnung 1:1000 in TBS mit 0,1% TritonX-100 und 0,5% Magermilchpulver). Nach einmaligem Waschen mit je TBS/0,1% TritonX-100 und TBS/0,1% TritonX-100/0,5% Magermilchpulver erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (s. Kapitel 2.8.2) (Verdünnung 1:5000 in TBS/0,1%TritonX-100/ 0,5% Magermilchpulver). Während der Inkubationszeit wurde das ABC-Reagenz (s. Kapitel 2.5) vorbereitet, indem zu 10 ml TBS/ 0,1% TritonX-100 je zwei Tropfen Reagenz A und Reagenz B (s. Kapitel 2.5, beides im Kit enthalten) gegeben und 30 Min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nachdem je einmal mit TBS/0,1% TritonX-100 und einmal mit TBS/0,1% TritonX-100/0,5% Magermilchpulver gewaschen worden war, schloss sich eine einstündige Inkubation mit dem vorbereiteten ABC-Reagenz an. Es wurde erneut mit TBS/0,1% TritonX-100 und mit TBS/0,1% TritonX-100/0,5% Magermilchpulver gewaschen und anschließend mit dem Fast DAB-Reagenz unter Sichtkontrolle gefärbt. Die Farbreaktion wurde mit Wasser gestoppt und die Deckgläschen mit den adhärierten Zellen nach unten gerichtet in Kaisers Glyceringelatine (s. Kapitel 2.2) auf Objektträgern (s. Kapitel 2.3) eingedeckt.

3.1.9 Detektion von Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz wurden COS-7-Zellen (s. Kapitel 2.10.3) auf sterilen runden Deckgläschen (s. Kapitel 2.12.6)

kultiviert und wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben transient transfiziert. 36 Stunden später wurde das Medium über den adhärent wachsenden Zellen entfernt, die Zellen vorsichtig mit sterilem PBS (s. Kapitel 2.7) gewaschen und mit frisch hergestelltem 2,5 % Paraformaldehyd (s. Kapitel 2.2) in PBS bei Raumtemperatur für 30 Min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für je 5 Min wurde weitere 5 Min mit 50 mM NH_4Cl (s. Kapitel 2.2) in PBS und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde das Präparat mit 1 % BSA (s. Kapitel 2.2) in PBS geblockt, und anschließend mit in 0,1 % BSA in PBS gelöstem Erstantikörper (s. Kapitel 2.8.1) für 60 Min bei Raumtemperatur in einer befeuchteten Küvette inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal je 5 Min mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (s. Kapitel 2.8.2) für 60 Min bei Raumtemperatur lichtgeschützt in einer feuchten Küvette inkubiert. Die Zellen wurden mit Fluoprep (s. Kapitel 2.12.6) auf Objektträgern fixiert und bei 4°C gelagert.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

Zur Kultivierung von XL2 Blue Bakterien (*Escherichia coli*) wurde eine frische Zellkolonie in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Zur Selektion wurde dem Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Von jeder Über-Nacht-Kultur wurde ein Aliquot 1:1 (vol/vol) mit sterilem 50 % igem Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Eine Übernachtkultur des XL2 Blue-Stammes wurde in antibiotikumfreiem LB-Medium angeimpft. Am Folgetag wurde eine 1:50 Verdünnung bei 200 rpm und 37°C geschüttelt bis eine optische Dichte OD_{600nm} zwischen 0,5 und 0,6 erreicht wurde. Die anschließenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt: Die Bakteriensuspension wurde 10 Min bei 4000 rpm und 4°C in einem Sorvall ST-H750 Rotor zentrifugiert und das Pellet mit 50 % des Kulturvolumens eiskalter 50 mM $CaCl_2$-Lösung resuspendiert. Nach Inkubation für 30 Min auf Eis und

erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 10% des Kulturvolumens eiskalter 50 mM $CaCl_2$-Lösung aufgenommen. Zur Aufbewahrung wurden zu 500 µl kompetenter Bakterien 250 µl 50 % iges steriles Glycerin pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Identifizierung von Transformanten, die das gewünschte Plasmid tragen, wurden am Vortag einzelne Bakterienkolonien von LB-Amp-Agarplatten (s. Kapitel 2.10.2) in jeweils 5 ml LB-Amp-Medium (s. Kapitel 2.10.2) über Nacht bei 37°C kultiviert. 2 ml der Bakterienkultur wurden 5 Min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Puffer I resuspendiert. Anschließend wurde mit 200 µl Puffer II lysiert, 5 Min auf Eis inkubiert und das Lysat mit 150 µl Puffer III neutralisiert. Danach wurden die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation (5 Min bei 13000 rpm) abgetrennt und die im Überstand enthaltene DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (s. Kapitel 3.3.4) gereinigt. Schließlich wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt, einmal mit 70 % igem Ethanol gewaschen und in 30 µl bidestilliertem und autoklaviertem Wasser gelöst. Zur Analyse der isolierten DNA wurde 1 µl der Lösung einem Testverdau mit geeigneten Restriktions-endonucleasen unterzogen und im 1 % igen Agarosegel aufgetrennt.

3.3.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Größere Mengen Plasmid-DNA werden für Klonierungen, Transformationen, Transfektionen und Sequenzanalysen benötigt. Dazu wurde das „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen verwendet. 250 ml LB-Amp-Medium (s. Kapitel 2.10.2) wurden mit der entsprechenden Bakterien-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C mit 200 rpm geschüttelt. Am Folgetag wurde die Kultur für 10 Min bei 4°C in einem SLA3000-Rotor bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 10 ml Puffer I resuspendiert und mit 10 ml Puffer II für 5 Min lysiert. Mit 10 ml Puffer III wurde die Lyse gestoppt und die Proteine für 10 Min bei 4°C in einer Sorvall 3000-Zentrifuge abzentrifugiert. Die DNA wurde auf eine zuvor mit QBT-Puffer

äquilibrierte Säule gegeben, zweimal mit QC-Puffer gewaschen und die DNA mit 15 ml QF-Puffer in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eluiert. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt, 60 Min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde bei Raumtemperatur für 20 Min an Luft getrocknet und mit 500 µl autoklaviertem bidestilliertem Wasser gelöst, anschließend wurde die Konzentration durch Absorptionsmessung einer 1:50- oder 1:100-Verdünnung mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

3.3.3 „Endofree“ Megapräparation von Plasmid-DNA

Um bei Immunisierungen genügend Plasmid-DNA zur Verfügung zu haben und gleichzeitig den Endotoxin-Gehalt möglichst gering zu halten, wurde das „Qiagen Plasmid Endofree Mega Kit“ verwendet. Dazu wurden 5 ml LB-Amp-Medium mit dem entsprechenden Baterien-Klon angeimpft und über Tag bei 37°C und 200 rpm kultiviert. 750 ml LB-Amp-Medium wurden mit 3 ml dieser Vorkultur angeimpft und über Nacht unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Am Folgetag wurde die Bakterien-Kultur für 15 Min bei 4°C und 6000 rpm in einem SLA3000-Rotor zentrifugiert. Qiafilter-Kartuschen wurden auf 500 ml Schott-Flaschen geschraubt. Das Zellpellet wurde mit 50 ml Puffer I resuspendiert. Zur Lyse wurden 50 ml Puffer II hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. 50 ml des gekühlten Puffers III wurden zur Neutralisierung zum Gemisch pipettiert und solange vorsichtig gemischt, bis keine viskosen Bestandteile mehr zu erkennen waren. Diese Mischung wurde direkt auf die Kartuschen gegeben und 10 Min bei Raumtemperatur zur vollständigen Ausfällung der Proteine stehen gelassen. Anschließend wurde die Mischung vakuumfiltriert und das Präzipitat mit 50 ml FWB2-Puffer gewaschen.
Zum filtrierten Lysat wurden 12,5 ml Endotoxin-Removal-Puffer gegeben, gut gemischt und für 30 Min auf Eis inkubiert. Inzwischen wurde eine Qiagen-tip 2500-Säule mit dem QBT-Puffer äquilibriert und anschließend das inkubierte Lysat auf die Säule gegeben. Nach dem Durchtropfen des Lysats wurde die Säule mit 200 ml QC-Puffer gewaschen. Danach wurde die DNA mit 35 ml QN-Puffer in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eluiert, mit 24,5 ml Isopropanol präzipitiert und bei 12500 rpm für 30 Min bei 4°C in einem SLA-1500-Rotor zentrifugiert. Das Pellet

wurde mit 7 ml 70 % igem Ethanol gewaschen und erneut bei 12500 rpm für 10 Min bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die DNA in autoklaviertem H_2O aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

3.3.4 Bestimmung des Endotoxingehalts (*Limulus amebocyte lysate test*)

Um bei einer Immunisierung den pyrogenen Effekt von Endotoxin (ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien) zu detektieren, wurde der Endotoxingehalt der DNA-Proben nach Herstellerangaben bestimmt.
Dazu wurde in pyrogenfreien Rundbodenröhrchen eine serielle Verdünnungsreihe der DNA sowie eine angegebene Verdünnungsreihe der mitgelieferten Endotoxin-Standard-Lösung angesetzt. Als Positivkontrolle wurde die DNA-Probe mit 100 µl Endotoxin-Standard-Lösung einer Konzentration von 4 EU/ml versetzt, während als Negativkontrolle endotoxinfreies H_2O eingesetzt wurde. Nach dem angegebenen Pipettierschema wurden die Lösungen pipettiert, die Öffnungen der Röhrchen mit Parafilm abgedichtet und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Röhrchen um 180° gedreht und die Gelierung des Röhrcheninhalts beobachtet. Die Bestimmung des Endotoxingehalts erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{Endotoxin [EU/ml]} = \frac{1}{1/64} * 0{,}06 = 3{,}8 \text{ EU/ml}$$

Diese Gleichung kann angewendet werden, wenn die Probe bei einer Verdünnung von 1/64 geliert ist, jedoch nicht mehr bei einer Verdünnung von 1/128 und die Standard-Lösung positiv ist bei 0.06 EU/ml, jedoch nicht mehr bei 0.03 EU/ml.

3.3.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um kontaminierende Proteine aus DNA- oder RNA-Lösungen zu entfernen, wurde die zu reinigende Lösung mit einem Volumenteil Roti®-Phenol-Chloroform (s. Kapitel 2.12.3) versetzt, gevortext und 30 Sek bei 13000 rpm zentrifugiert. Die

obere der zwei Phasen wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 2 Volumenteilen 100 % igem Ethanol, 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat versetzt und für 20 Min bei –20°C inkubiert. Anschließend wurde 15 Min bei 4°C mit 13000 rpm zentrifugiert, das Pellet mit 70 % igem Ethanol gewaschen und 8 Min zentrifugiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur an Luft getrocknet und die DNA in autoklaviertem bidestilliertem Wasser gelöst.

3.3.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung wässriger DNA-, RNA- oder Oligonukleotid-Lösungen erfolgte photometrisch bei 260 nm im UV-Photometer. Hierzu wurden 5 µl der zu messenden Lösung mit 495 µl PBS verdünnt (1:100 Verdünnung). Hierbei entspricht eine OD_{260nm} = 1 bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei RNA und einzelsträngiger DNA einer Konzentration von 40 µg/ml und bei Oligonukleotiden einer Konzentration von 33 µg/ml. Um den Reinheitsgrad der isolierten DNA zu bestimmen, wird das Verhältnis der OD_{260nm} und OD_{280nm} ermittelt, wobei möglichst ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 erreicht werden sollte.

3.3.7 RNA-Isolierung

Durch reverse Transkription isolierter Gesamt-RNA in cDNA und anschließender Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) lässt sich die mRNA eines bestimmten Gens spezifisch nachweisen.
Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde das „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen verwendet. Hierzu wurde eine etwa 70 % konfluente Kultur trypsiniert und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS aufgenommen, ausgezählt und auf einen Titer von $1x10^7$/ml eingestellt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 8000 rpm für 10 Min bei 4°C wurde das Pellet entweder schock-gefroren und in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert, oder zur weiteren RNA-Isolierung verwendet. Zur RNA-Isolierung wurde das Pellet in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert, gevortext und dirket auf eine Qiashredder-Säule gegeben. Nach Zentrifugation bei 13 000 rpm für 2 Min wurde das Lysat mit gleichem Volumen 70 % igem Ethanol gemischt und durch eine „RNeasy“ Säule bei 10 000 rpm für 20 sec zentrifugiert.

Die Säule wurde anschließend durch Zentrifugation mit den Puffern RW1 und RPE gewaschen. Nach einem zweiten Waschschritt mit RPE-Puffer wurde die Säule bei 13 000 rpm für 1 Min zentrifugiert. Die an die Säule gebundene RNA wurde durch zweimalige Inkubation für 1 Min mit je 30 µl RNA-freiem H_2O von der Säule eluiert.

3.3.8 DNase-Behandlung

In der isolierten RNA eventuell vorhandene genomische DNA wurde durch eine DNase-Behandlung entfernt. Dazu wurden pipettiert:

4 µg	RNA
add 16 µl	H_2O
2 µl	10x DNase Reaktionspuffer
2 µl	DNase

Der Ansatz wurde zunächst 20 Min bei Raumtemperatur und anschließend 10 Min bei 65°C inkubiert.

3.3.9 cDNA-Synthese aus RNA

Für die reverse Transkription wurde das Revert Aid First^{TM} Strand cDNA Synthesis Kit von MBI Fermentas verwendet.
Nach der DNase-Behandlung wurden für die reverse Transkription 10 µl RNA aus dem DNase-Verdau mit 1 µl (0,5 µg/µl) Oligo (dT_{18})-Primer gemischt und für 5 Min bei 70°C inkubiert. Die weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt:
Zum Ansatz wurden hinzugefügt:

4 µl	5x Reaktionspuffer
1 µl	RNase Inhibitor
2 µl	dNTP Mix

und weitere 5 Min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl MuLV-Reverse Transkriptase wurde der Ansatz weitere 10 Min bei 25 °C, 60 Min bei 37°C und 10 Min bei 70°C inkubiert und anschließend eingefroren oder direkt in einer Polymeraseketten-Reaktion (s. Kapitel 3.3.10) eingesetzt.

3.3.10 PCR (polymerase-chain-reaction)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient dazu, bestimmte DNA-Abschnitte mit Hilfe spezifischer Primer durch Aktivität einer DNA-Polymerase spezifisch zu vermehren. Die Primer hybridisieren im ersten Schritt an die DNA und katalysieren dadurch die Anhaftung der Polymerase an die 3'-OH-Enden der DNA und somit die Synthese der komplementären DNA-Sequenzen. Die Denaturierung erfolgt bei einer Temperatur von 94°C. Daran schließt sich die erneute Anhaftung der Primer an die DNA an und der Zyklus beginnt von neuem. Diese Zyklusabfolge (Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese) wird durchschnittlich 30mal wiederholt, was zu einer millionenfachen Amplifikation der Ausgangs-DNA führt. Als Polymerase wurde die thermostabile DNA-Polymerase aus dem Archaebakterium *Thermophilus aquaticus* verwendet.
Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert:

2 µl Plasmid-DNA [0,5-5 ng/µl] oder 5 µl cDNA aus RT-Ansatz
5 µl 10x PCR-Puffer ohne $MgCl_2$
2 µl $MgCl_2$ [25 mM]
4 µl dNTPs [2,5 mM]
1 µl Sense-Primer [10-100 pmol/µl]
1 µl Antisense-Primer [10-100 pmol/µl]
ad 34,5 µl H_2O bidest
0,5 µl *Taq*-Polymerase [5 U/µl]

und anschließend direkt in einer PCR-Maschine zur Amplifizierung eingesetzt:

I	94°C	180 sec
II	94°C	45 sec
III	57°C	60 sec
IV	68°C	120 sec
V	72°C	600 sec
VI	4°C	o/n

Dabei bildeten die Schritte II bis IV einen Cyclus, der 30mal wiederholt wurde. Aus dem Reaktionsansatz wurden 5 µl mittels Agarose-Gelelektrophorese

überprüft. Bei Erhalt einer einzigen Bande der richtigen Größe, wurde der restliche Ansatz über eine präparative Gelelektrophorese (s. Kapitel 3.3.12) aufgereinigt oder zur direkten Klonierung in den TOPO-Vektor eingesetzt.

3.3.11 Spaltung von DNA mittles Restriktionsendonucleasen

Die Kontrolle und Analyse von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen. Diese Enzyme bakteriellen Ursprungs erkennen spezifisch kurze Nukleotidsequenzen innerhalb der DNA und spalten daraufhin die Phosphodiester-Bindungen in beiden Strängen des DNA-Moleküls. Ein Reaktionsansatz von 10 µl setzte sich zusammen aus 1 µg in autoklaviertem und bidestilliertem Wasser gelöster DNA, 1 µl enzymspezifischem 10x Reaktions-Puffer und 1 U/µg DNA des jeweiligen Restriktionsenzyms. Hierbei sollte der Volumenanteil des Enzyms 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, um Aktivität und Spezifität des Enzyms nicht zu beeinflussen. Für einen Restriktionsverdau zu präparativen Zwecken wurden bis zu 10 µg DNA in einem Gesamtvolumen von bis zu 50 µl eingesetzt.

3.3.12 Analytische und präparative Gelelektrophorese

Je nach Größe des benötigten Gels wurde die entsprechende Menge an Agarose (1 % Agarosegel) in 1x EP (Elektrophorese)-Puffer durch Aufkochen gelöst, nach kurzem Abkühlen Ethidiumbromid-Lösung in einer Endkonzentration von 1 µg/ml dazugegeben und in den Gel-Schlitten gegossen. Die Restriktionsansätze wurden mit 6x Bromphenolblau-Ladepuffer versetzt (Endkonzentration 1x) und die Taschen des erstarrten Gels damit beladen. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde ein Größenmarker Smart Ladder (200 bp bis 10 000 bp) parallel auf das Gel geladen. Nach der Elektrophorese in 1x Elektrophorese-Puffer bei 60 – 120 V für zwei bis vier Stunden wurde das Gel unter kurzwelligem Licht bei 254 nm fotografiert. Fragmente aus präparativen Gelen wurden unter langwelligem Licht bei 366 nm ausgeschnitten, um DNA-Brüche zu vermeiden. Die Agarose-Blöckchen wurden zur Elution der enthaltenen DNA-Fragmente in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt.

3.3.13 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion der DNA aus Agaroseblöckchen wurden die ausgeschnittenen Agarosebanden zunächst mit dem entsprechenden Volumen an QX1-Puffer und 30 µl Qiaex II-Reagenz aus dem verwendeten „QIAEX II Agarose Gel Extraktionskit“ (Qiagen, Hilden) versetzt und für 10 Min bei 50°C inkubiert. Dadurch wird das Gel aufgelöst und die DNA geht in Lösung bzw. bindet an die Silizium-Matrix des Qiaex II-Reagenz. Im Anschluß wurde 30 Sekunden bei 13 000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl QX1-Puffer gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für 30 Sekunden bei 13 000 rpm wurde das Pellet zweimal mit 500 µl PE-Puffer gewaschen und dieses für 30 Min an der Luft getrocknet. Die DNA wurde mit 30 µl autoklaviertem bidestilliertem Wasser eluiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert und 30 Sekunden bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit der extrahierten DNA wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

3.3.14 Ligation

Um DNA-Fragmente zu verknüpfen wurde das Enzym T4 DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5’-Phosphatgruppe und einer 3’-Hydroxygruppe von DNA-Strängen. Für einen Ligationsansatz wurden linearisierte DNA und Fragment-DNA (Insert) in einem Verhältnis von 1:10 eingesetzt und zusammen mit 1 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl Ligasepuffer (10x) über Nacht bei 16°C inkubiert. Im Anschluß wurde der Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert.

3.3.15 Ligation eines PCR-Fragments in den TOPO TA Cloning® Vektor

Um das gewünschte PCR-Fragment in den TOPO TA Cloning® Vektor zu klonieren, wurde bei der vorgeschalteten PCR (s. Kapitel 3.3.10) die *Taq*-Polymerase zur Vervielfältigung des Inserts eingesetzt. Diese Polymerase besitzt die Eigenschaft, an den neugebildeten Strang ein Adenosin anzuhängen, so dass das doppelsträngige PCR-Produkt jeweils am 3’-Ende einen A-Überhang hat. Der TOPO TA Cloning® Vektor ist ein linearisierter Vektor mit überstehenden

Thymidinen an den 3'-Enden, der eine direkte Ligation des PCR-Fragments ohne Aufreinigung in den Vektor und eine direkte Transformation des neuen Konstrukts ermöglicht. Zur weiteren Klonierung wurde eine TOPO®-Klonierungsreaktion angeschlossen, bei der zu 1 µl unaufgereinigtem PCR-Produkt, 1 µl Salt Solution (s. Kapitel 2.5), 3 µl steriles Wasser und 1 µl mitgelieferter TOPO®-Vektor gegeben wurden. Nach sieben minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion anschließend auf Eis gestellt. Eine Hitzeschock-Transformation (s. Kapitel 3.3.16) wurde angeschlossen.

3.3.16 Transformation mittels Hitzeschock-Methode

Transformationskompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Für die Transformation eines Ligationsansatzes wurde die Hälfte des Ansatzes zu 200 µl transformationskompetenten Zellen gegeben. Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden 50-100 ng eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde 60 Min auf Eis inkubiert, einem Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42°C unterzogen und anschließend nochmals für 2 Min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde der Transformationsansatz 60 Min bei 37°C inkubiert und anschließend auf einer Agaroseplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Dabei wurden bei der Transformation einer Ligation auf je eine Platte 20 µl und auf eine weitere 50 µl des Transformationsansatzes ausgestrichen.
Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden 10 µl des Ansatzes ausgestrichen.

3.3.17 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird verwendet, um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Dazu wird zunächst die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch Reduktion mit β-Mercaptoethanol oder DTT zerstört. Detergenzien wie SDS denaturieren die Proteine, wobei sich SDS mit seinem hydrophoben Rest an die Proteine anlagert und ihnen durch die hydrophile Sulfatgruppe eine von der Proteingröße abhängige negative Ladung

verleit. Entsprechend dieser Größe trennen sich die denaturierten Proteine unterschiedlich schnell im Gel voneinander auf.
Die aufzutrennenden Proben werden vor der Beladung mit entsprechender Menge 6x Proteingel-Ladepuffer (Endkonzentration 1x) versetzt und 5 min bei 95°C hitzedenaturiert. Die Spannung während der Elektrophorese im Sammelgel beträgt je nach Größe 60 - 90 V, im Trenngel etwa 80 - 120 V.

	Sammelgel 3 %	**Trenngel 12 %**	**Trenngel 15 %**
H_2O bidest	13,6 ml	12,3 ml	6,3 ml
1 M Tris pH 6,8	2,5 ml		
1 M Tris pH 8,8		22,5 ml	22,5 ml
30 % Acrylamid	3,4 ml	24 ml	30 ml
10 % SDS	200 µl	600 µl	600 µl
10 % APS	200 µl	600 µl	600 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl

3.3.18 Western Blot (Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen)

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mit einem „Elektroblotter“ (Fa. CTI) auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde die PVDF-Membran für 1 Min in Methanol benetzt und anschließend ebenso wie das Gel in WB-Puffer II äquilibriert. Für den Aufbau des Blots wurden 2 Lagen 3MM-Papier erst in WB-Puffer I getränkt und anschließend auf die Anode aufgelegt. Darauf folgten 4 Lagen in WB-Puffer II getränktes 3MM-Papier bevor die PVDF-Membran und das Polyacrylamidgel aufgelegt wurden. Zum Abschluss wurden 5 Lagen in WB-Puffer III getränkte 3 MM-Papier aufgelegt und die Kathodenplatte aufgesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass die Lagen blasenfrei aufgebracht wurden. Der Transfer erfolgte bei 185 mA für 60 Min.

3.3.19 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch ECL (enhanced chemiluminescence)

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zunächst für 1,5 h in Blocklösung (s. Kapitel 2.12.2) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Anschließend wurde die PVDF-Membran einmal in PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C im ersten Antikörper (anti-c-myc, Verdünnung 1:500 in BSA-Blocklösung) auf der Kippwippe Silent Rocker (s. Kapitel 2.4) inkubiert. Am Folgetag wurde die PVDF-Membran dreimal für 10 Min mit Blocklösung gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Eine Inkubation für 1,5 h mit dem gegen den ersten Antikörper gerichteten mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (*horse-radish-peroxidase*) wurde angeschlossen. Nach der Inkubation wurde die PVDF-Membran einmal mit PBS und dreimal für 10 Min mit Blockpuffer gewaschen. Für die Chemilumineszenz-Reaktion (ECL) wurden 8 ml Luminol-Lösung mit 20 µl Enhancer-Lösung (s. Kapitel 2.12.2) und 2 ml H_2O gemischt und die PVDF-Membran eine Minute darin geschwenkt. Bei der durch HRP katalysierten Oxidation wird das Luminol in einen höheren energetischen Zustand angeregt. Beim Übergang in den Grundzustand wird die aufgenommene Energie in Form von Photonen abgegeben, die durch Exposition (5 bis 30 sec) eines Röntgenfilms abgelichtet wird.

3.4 Tierexperimentelle Methoden

3.4.1 Immunisierung mit Plasmid-DNA

3.4.1.1 Inhalationsnarkose

Die Applikation von Cardiotoxin sowie die Immunisierung mit Plasmid-DNA erfolgten unter Inhalationsnarkose mit Hilfe eines Isofluran-Narkotisier-Gerätes. Dieses Gerät konnte an sterile Werkbänke angeschlossen werden. Druckluft wurde in das Narkotisier-Gerät geleitet, wodurch das Isofluran/N_2O-Gemisch in die sterile Werkbank geleitet werden konnte. Über einen Drei-Wege-Hahn konnte dieses Gemisch wahlweise entweder in ein Schraubdeckel-Gefäß oder eine 30 ml-Spritze ohne Stempel umgeleitet werden. Zur Narkose-Einleitung wurden die Tiere einzeln in das entsprechend präparierte Schraubdeckel-Gefäß gesetzt. Über den Deckel dieses Gefäßes konnte das Isofluran/N_2O-Gemisch eingeleitet werden. Sobald das Tier betäubt war, wurde das Isofluran/N_2O-Gemisch zur

Spritze umgeleitet und die Maus kopfüber in die Spritze gelegt, um die Narkose während der Cardiotoxin-Injektion oder der Immunisierung aufrecht zu erhalten. Die Atmung der Maus wurde während der Behandlung durchgehend beobachtet.

3.4.1.2 Intramuskuläre DNA-Injektion

Fünf Tage vor der DNA-Immunisierung wurden die Mäuse mit 50 µl Cardiotoxin (s. Kapitel 2.11.2) pro Unterschenkelmuskel (2 x 3 µg) (*tibialis anterior*) mittels einer 0,3 mm Kanüle behandelt. Den Mäusen wurde in jeden Unterschenkelmuskel 50 µl Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 1 µg/µl über eine 0,3 mm Kanüle injiziert.

3.4.2 Milzzell-Isolierung

Einer getöteten Maus wurde die Milz entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in 3-5 ml PBS auf Eis gestellt. Durch ein Drahtnetz (s. Kapitel 2.3) wurde diese mit Hilfe eines Spritzenstempels gedrückt, mit weiteren 5 ml PBS resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation für 5 Min bei 1500 rpm wurde das Zellpellet mit 5 ml ACT-Lyse-Puffer aufgenommen und 5 Min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die in der Suspension befindlichen Erythrozyten wurden dadurch mittels osmotischem Schock lysiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet mit 3 ml αMEM-Medium resuspendiert und für die *ex vivo* durchzuführenden Elispot-Tests verwendet oder *in vitro* restimuliert.

3.4.3 Zellinaktivierung

RMA-TRP2 Transfektanten und „Feeder“-Zellen wurden durch radioaktive Bestrahlung mit einer Dosis von 200 Gy bzw. 33 Gy inaktiviert. Als Quelle für die γ-Strahlung diente hierbei ^{137}Cs. Die Inaktivierung bewirkt nicht das sofortige Absterben der Zellen, jedoch wird die Zellteilung unterbunden und die Milzzellkulturen werden somit nicht überwachsen. Somit behalten die RMA-TRP2-Zellen ihre Fähigkeit zur TRP2-spezifischen Stimulierung noch einige Tage bei,

während die inaktivierten „Feeder“-Zellen in dieser Zeit zur Konditionierung des Kulturmediums beitragen.

3.4.4 *In vitro*-Restimulierung von Milzzellen

Präparierte Milzzellen wurden in αMEM-Medium (s. Kapitel 2.10.4) bei 37°C, gesättigter Feuchtigkeit und 7,5 % CO_2 kultiviert. Zur zweiten Restimulierung wurde dem αMEM-Medium 2,5 % (vol/vol) Überstand aus mit Concanavalin A stimulierten Rattenmilzzellkulturen (s. Kapitel 2.10.4) zugesetzt („CTL“-Medium). Die Kultivierung wurde in aufrechtstehenden 25 cm^2-Zellkultur-Flaschen mit Belüftungslöchern vorgenommen.
Zur Inkulturnahme wurden $2x10^7$ Milzzellen verwendet, denen $2x10^6$ inaktivierte RMA-TRP2-Zellen zur TRP2-spezifischen Stimulierung beigemischt wurden. Das Gesamtvolumen der Kultur wurde mittels αMEM-Medium auf 10 ml aufgefüllt. Nach fünf Tagen wurde ein Teil der Kultur auf vorhandene cytotoxische Aktivität der enthaltenen CTL getestet. Die restlichen Milzzellen wurden in einer 24-Loch-Platte austitriert und zwei Tage später mit $2x10^5$ inaktivierten RMA-TRP2-Zellen sowie $5x10^6$ inaktivierten „feeder“-Zellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml/Loch restimuliert.

3.4.5 Charakterisierung der Zielzellen mittels FACS (flourescence activated cell sorting)-Analyse

Zur Charakterisierung der Zielzellen wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden in einer 96-Rundboden-Platte $2x\ 10^5$ Zellen in 200 µl pro Loch pipettiert und 2 Min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet auf einem Vortexer vorsichtig aufgelockert. Als Hintergrundkontrolle wurden pro Loch 100 µl FACS-Puffer (s. Kapitel 2.7) zu den Zellen gegeben. Die Proben wurden mit 100 µl Kulturüberstand des Hybridoms E3-25 (α-K^b) bzw. 100 µl B22.249 (α-D^b) für 30 Min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 2 Min bei 2000 rpm sedimentiert, das Pellet aufgelockert und jeweils 100 µl FITC-gekoppelter Zweitantikörper (Ziege anti-Maus Ig 1:100 verdünnt in FACS-Puffer) auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubationszeit von 30 Min bei 4°C wurden die Zellen erneut für 2 Min bei 2000 rpm zentrifugiert und

in 200 µl Propidiumiodid-Lösung (Endkonzentration 2,5 µg/ml) aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer untersucht.

3.4.6 Herstellung von IL-2-haltigem Überstand aus Concanavalin A-stimulierten induzierten Rattenmilzzellkulturen

Für die Kultivierung von CTLs wurde Kulturüberstand aus Concanavalin A-stimulierten Rattenmilzzellen als IL-2-Quelle eingesetzt. Hierfür wurden Milzzellen aus weiblichen Lewis-Ratten mit einem Gewicht zwischen 175-220 g auf eine Konzentration von $5x10^6$ Zellen/ml eingestellt und mit Concanavalin A in einer Endkonzentration von 5 µg/ml für 24 Stunden im Inkubator kultiviert. Am Folgetag wurde der Überstand geerntet, bei 4500 rpm für 15 Min zentrifugiert und nach Sterilfiltration (0,2 µm-Sterilfilter) bei -20°C gelagert.

3.4.7 Proliferationstest zur Überprüfung des Überstands von Con A-induzierten Rattenmilzzellkulturen

Der IL-2-Gehalt des neu hergestellten Überstands wurde indirekt abgeschätzt, indem eine Vergleichstestung mit einem Restbestand von noch vorhandenem Con A-induziertem Überstand durchgeführt wurde. Dazu wurde in einer 96-Loch-Rundbodenplatte sowohl der neu hergestellte als auch der Restbestand in einer seriellen Verdünnung von 1:2 bis 1:128 in Triplikaten vorgelegt. Das Endvolumen pro Loch betrug 100 µl. Dazu wurden $5x10^3$ CTLL2 Zellen in 100 µl α-MEM-Medium pro Loch hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h im Inkubator bei 37°C und 7,5 % CO_2 wurde pro Loch 1 µCi ^{3}H-Thymidin hinzugegeben und für weitere 24 h in den Inkubator gestellt. Das ^{3}H-Thymidin wurde in dieser Zeit in die DNA der proliferierenden CTLL2 Zellen eingebaut. Geerntet wurden die Zellen im *Cell Harvester*, auf eine Glasfiber-Matte pipettiert und zweimal mit Hilfe des *Cell Harvesters* mit H_2O gespült, um nicht eingebautes ^{3}H-Thymidin zu entfernen. Die Glasfiber-Matte wurde auf einem beheizbaren Magnetrührer mit Szintillationswachs überzogen und per Microbeta-Zähler vermessen.

3.5 Verwendete Methoden zum Nachweis cytotoxischer T-Lymphozyten

3.5.1 INF-γ ELISpot (enzyme-linked immunospot)

Das Prinzip des INF-γ-Elipsot-Tests besteht darin, aus stimulierten T-Zellen freigesetztes INF-γ spezifisch zu detektieren. Der Test wurde *ex vivo* (am Tag der Milzentnahme) und am Tag der ersten und der zweiten Restimulierung durchgeführt. Dazu wurde die Membran einer MAHAS4510 Platte (Millipore) am Vortag unter sterilen Bedingungen mit 200 µl PBS pro Loch für 5 Min bei Raumtemperatur äquilibriert und anschließend mit 100 µl anti-mouse INF-γ (capture) (Erstantikörper 1:1000 gelöst in PBS) beschichtet. Die Platte wurde in Frischhaltefolie eingewickelt und über Nacht bei 4°C gelagert. Am folgenden Tag wurde der Erstantikörper unter sterilen Bedingungen verworfen, einmal mit 200 µl PBS pro Loch gewaschen und mit 200 µl RPMI-Medium pro Loch für 2 h bei 37°C im Inkubator geblockt, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde das Medium wieder verworfen und in die Reihen B, D, F und H je 100 µl frisches RPMI-Medium vorgelegt. In die Reihen A, C, E und G wurden jeweils 200 µl einer Milzzellsuspension mit einem Titer von $1x10^6$/Loch vorgelegt. Anschließend wurden aus diesen Reihen jeweils 100 µl in die Reihen B, D, F und G überpipettiert und somit 1:2 Verdünnungen hergestellt (s. Abbildung 3.1).

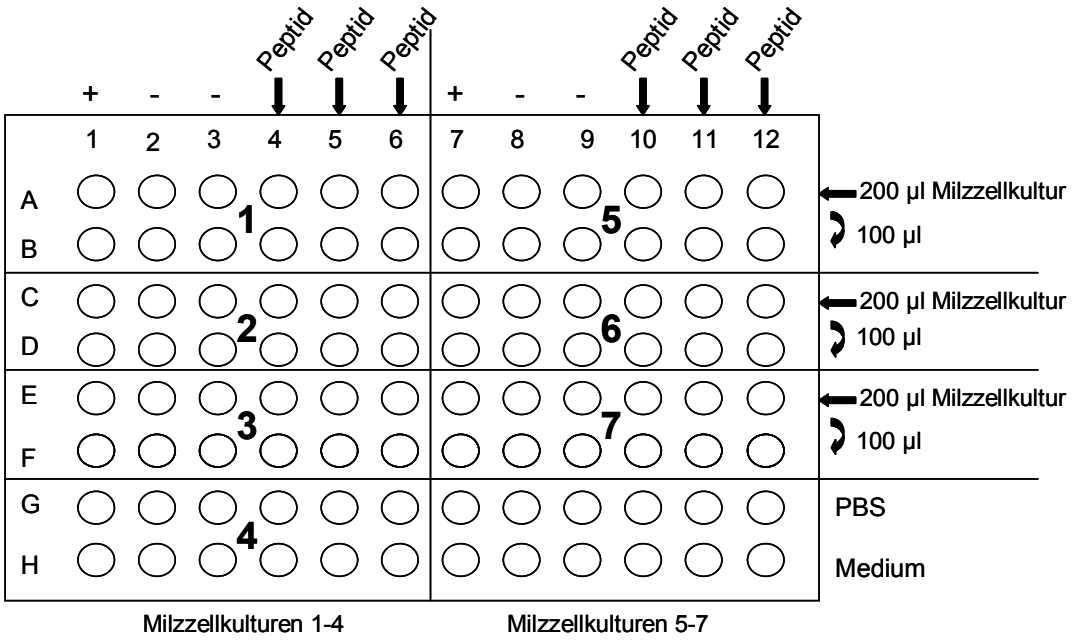


Abbildung 3.1: Beladung einer Elispot Platte. Beschreibung siehe Text.

Zur spezifischen Stimulierung der T-Zellen wurden je 25 µl aus einer 1 µM $TRP2_{180-188}$-Peptidlösung in die Spalten 4-6 und 10-12 pipettiert, so dass die Endkonzentration 10 nM betrug. Als Positivkontrolle (+) wurde das Pokeweed Mitogen (Lectin) verwendet, das die T-Zellen unspezifisch aktiviert. Von diesem Mitogen wurden 2 µl in die Spalten 1 und 7 gegeben, so dass die Endkonzentration 1 µg/ml betrug. Negativkontrollen (-) enthielten keine Peptidlösung. Alle Vertiefungen der Platte wurden mit RPMI-Medium ad 225 µl aufgefüllt und über Nacht im Inkubator bei 37°C und 7,5% CO_2 inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen verworfen und die Platten 5 x mit je 200 µl PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen. Danach wurden jeweils 100 µl des Zweitantikörpers (Ratte-α-Maus-INF-γ (biotinyliert), 1:5000 verdünnt in PBS; s. Kapitel 2.8.2) pro Loch pipettiert und die Platte erneut über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am vierten Tag wurde der Zweitantikörper verworfen und die Platte viermal mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Streptavidin-AP (1:500 verdünnt in PBS; s. Kapitel 2.1) pro Loch pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurde die Platte viermal mit PBS gewaschen und gebundenes INF-γ durch Zugabe von 50 µl des Substrats 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate/Nitro Blue pro Loch detektiert. Hierzu wurde die Platte im Dunklen bis zur Ausbildung erster Farbspots inkubiert und die Reaktion durch Waschen der Platte unter fließendem Wasser gestoppt. Anschließend wurde die Platte bei Raumtemperatur getrocknet und

mittels „Elispot-Reader“ ausgewertet. Diese Methode liefert Angaben zur INF-γ-Sekretion, die nur nach spezifischer T-Zell-Rezeptor-Interaktion erfolgt. In Abbildung 3.2 ist das Schema des INF-γ-Elispot-Tests dargestellt:

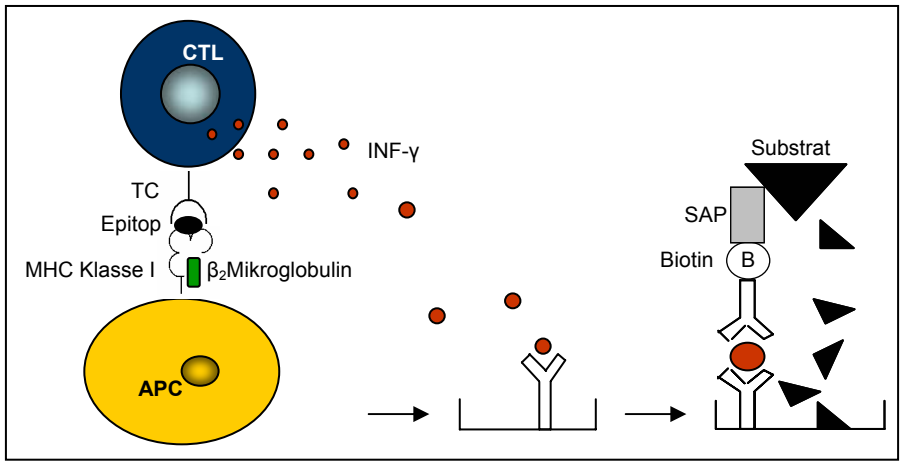


Abbildung 3.2: INF-γ-Elispot. Die cytotoxische T-Lymphozyte (CTL) entstammt der Milz einer immunisierten Maus. Durch spezifische Erkennung des T-Zellrezeptors (TCR) des Komplexes aus MHC Klasse I-Molekül der antigenpräsentierenden Zelle (APC) und dem spezifischen Epitop, wird die INF-γ-Produktion und –Sekretion initialisiert. Das INF-γ wird an einen INF-γ-spezifischen Antikörper gebunden, mit dem zuvor eine Membran gecoatet wurde. Ein biotinylierter (B) Antikörper erkennt das gebundene INF-γ. Streptavidin-alkalische Phosphatase (SAP) bindet an das Biotin und setzt das Substrat um. Ausfallendes Substrat wird auf der Membran als Spot sichtbar. Diese werden am Elispot-Reader ausgewertet.

Zur Berechnung der erhaltenen Spots wurde folgende Gleichung zugrunde gelegt:

$$2*10^5\ Zellen = \frac{Anzahl\ der\ Spots * 2*10^5\ Zellen}{Anzahl\ der\ eingesetzten\ Zellen}$$

3.5.2 ^{51}Cr-Freisetzungstest

Jeweils am fünften Tag nach einer vorausgegangenen Restimulierung wurde die Aktivität der cytotoxischen T-Zellen im ^{51}Cr-Freisetzungstest analysiert. Das Prinzip dieser Analysemethode liegt in der spezifischen Erkennung des Komplexes aus MHC Klasse I-Molekül und Peptid durch den T-Zell-Rezeptor des cytotoxischen T-Lymphozyten. Zuvor mit $Na_2{}^{51}CrO_4$ radioaktiv markierte Zielzellen werden mit CTLs inkubiert, wobei die Lyse der Zielzellen durch die CTLs zur Freisetzung des radioaktiven $Na_2{}^{51}CrO_4$ aus den Zielzellen führt. Die im Überstand enthaltene Radioaktivität wird im „β-Counter“ gemessen und dient somit als Maß für die cytotoxische Aktivität der CTLs.

In die Reihen A und D bis H von 96-Loch-Rundboden-Platten wurden jeweils 100 µl RPMI-Medium pro Loch vorgelegt und in Reihe C wurden jeweils 200 µl der Milzzellsuspension pipettiert. Anschließend wurde von Reihe C bis H eine Verdünnungsreihe angelegt, indem jeweils 100 µl der Milzzellsuspensionen überpipettiert wurden (s. Abbildung 3.3).

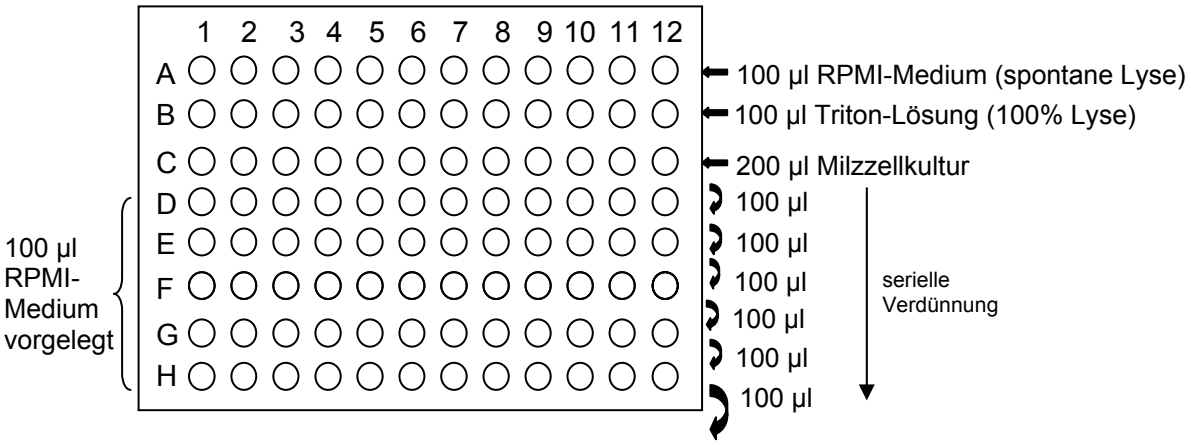


Abbildung 3.3: Pipettierschema für die Beschickung einer 96-Loch-Platte für einen ^{51}Cr-Freisetzungstest. In die Reihen A und D-H wurden 100 µl RPMI-Medium pro Loch vorgelegt. In Reihe C wurden 200 µl Milzzellsuspension pipettiert. Von Reihe C wurden jeweils 100 µl in Reihe D überführt und bis zu Reihe H eine serielle Verdünnung angelegt. Von dieser wurden letztlich 100 µl Suspension verworfen. Zuletzt wurden 100 µl einer 2 % igen TritonX-100-Lösung pro Loch in Reihe B pipettiert. Diese diente zur Berechnung der Maximallyse. Vor der Inkubation wurden pro Loch 100 µl der radioaktiv markierten Zielzellen hinzugefügt.

Als Zielzellen wurden RMA-Zellen, mit TRP2-Peptid beladene RMA-Zellen, RMA-TRP2-Transfektanten und B16F10-Zellen eingesetzt. Jeweils $3x10^6$ Zellen wurden in je ein 15 ml-Rundbodenröhchen vorgelegt, 2 Min bei 1500 rpm zentrifugiert und mit 50 µCi $Na_2{}^{51}CrO_4$ für 1 h in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurde überschüssiges Chromat durch dreimaliges Waschen mit je 5 ml RPMI-Medium entfernt. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet mit 1 ml RPMI-Medium resuspendiert und in ein mit 29 ml RPMI-Medium vorbereitetes 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, so dass eine Suspension mit einem Titer von $1x10^5$ entstand.

Anschließend wurden 100 µl der radioaktiv markierten Zielzellen ($1x10^4$ Zellen) pro Loch der 96-Loch-Platte gegeben. In Reihe B wurden als letztes 100 µl einer 2 % igen TritonX-100-Lösung pro Loch pipettiert und die Platte bei 37°C und 7,5 % CO_2 inkubiert. Nach 4 h wurden 50 µl des Überstandes pro Loch auf eine Szintillationsplatte übertragen, getrocknet und die Radioaktivität am Folgetag im Szintilationsgerät („*β-counter*“) gemessen

Berechnet wurde die spezifische Lyse nach der Formel:

$$SpezifischeLyse[\%] = \frac{Aktivität\ der\ Probe[cpm] - spontane\ Aktivität[cpm]}{Maximalaktivität[cpm] - spontane\ Aktivität[cpm]} * 100\%$$

Der Mechanismus, der dem ^{51}Cr-Freisetzungstest zu Grunde liegt, ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt.

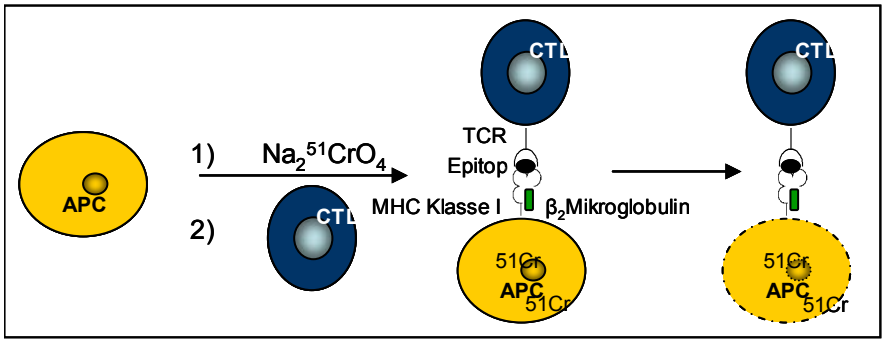


Abbildung 3.4: ^{51}Chromiumfreisetzungstest. Durch Inkubation mit $Na_2{}^{51}CrO_4$-Lösung wurden Zielzellen (RMA-, mit Peptid beladene RMA-, RMA-TRP2 und B16F10-Zellen) radioaktiv markiert. Anschließend wurden diese zu cytotoxischen T-Lymphozyten gegeben und für vier Stunden bei 37°C und einer CO_2-Sättigung von 7,5 % in den Brutschrank gestellt. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Überstand auf eine Szintillationsplatte gegeben, über Nacht getrocknet. Am Folgetag wurde die Radioaktivität im sog. β-Counter vermessen.

Einen Überblick über den zeitlichen Ablauf eines Immunisierungsexperimentes liefert Abbildung 3.5:

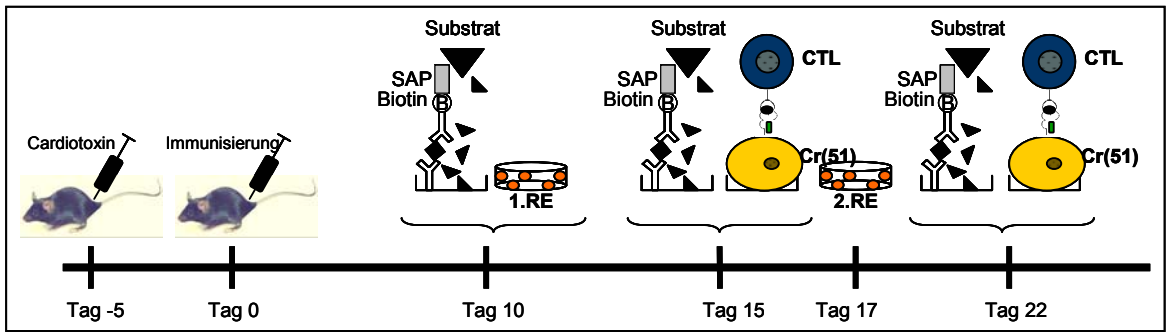


Abbildung 3.5: Zeitlicher Ablauf eines Immunisierungsexperiments. Fünf Tage vor der eigentlichen Immunisierung wurden die Tiere mit Cardiotoxin behandelt, um eine Anhäufung von dendritischen Zellen am Injektionsort hervorzurufen. Zehn Tage nach der Immunisierung wurde den Tieren die Milz entnommen und Zellkulturen angelegt. Eine *ex vivo* Elispot-Analyse lieferte erste Daten zum Zustand der *in vivo* generierten cytotoxischen T-Lymphozyten. Da fünf Tage nach Restimulierung die Spezifität der CTL am höchsten ist, wurden weitere *in vitro*-Tests jeweils fünf Tage nach der jeweiligen Restimulierung durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung und Charakterisierung der Fusionskonstrukte pVP22-TRP2, pVP22-TRP2 dC, pVP22-TRP2 511, pVP22-TRP2 445 und der entsprechenden Konstrukte ohne VP22-Anteil

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine DNA-Vakzine gegen das Melanom-assoziierte Tumorantigen TRP2 (*tyrosinase-related-protein 2*) zu entwickeln. Als Empfängervektor wurde das Plasmid pVP22/*Myc*-His verwendet, das für das Transduktionsprotein VP22 des Herpes Simplex Virus 1 kodiert. Von diesem Protein ist bekannt, dass es einen interzellulären Transport von Fusionsproteinen über ein Exportsignal und ein Signal für den Re-Import der Proteine vermitteln kann (Elliott and O'Hare, 1997). Durch eine Fusionierung des VP22 und des TRP2 sollte die Migration des Fusionsproteins in dendritische Zellen gewährleistet werden. Zu dem wurden verschiedene Deletionsvarianten des TRP2 hergestellt, d.h. das TRP2-Gen wurde sowohl als Wildtyp als auch in Form von Deletionsvarianten in den Vektor pVP22/*Myc*-His kloniert. Zweck dieser Deletionen war es, hydrophobe Bereiche des TRP2 zu eliminieren, um die Membrandurchlässigkeit des Proteins zu gewährleisten und somit das Ausschleusen des fusionierten Proteins aus der einen Zelle und das Einschleusen in die nächste Zelle effektiver zu gestalten. Durch die Fähigkeit des interzellulären Transports sollte eine effizientere Verteilung des Proteins vor allem an dendritische Zellen erzielt werden und somit zu einer verbesserten Induktion einer TRP2-spezifischen CTL-Antwort führen.

4.1.1 Klonierung des TRP2-Gens und seiner Deletionsvarianten in den Expressionsvektor pVP22/*Myc*-His

Für die Herstellung der Konstrukte pVP22-TRP2, pVP22-TRP2 dC, pVP22-TRP2 511 und pVP22-TRP2 445 wurden molekularbiologische Standardmethoden angewendet. In Abb. 4.1 sind die Klonierungsschritte für die Konstrukte mit VP22-

Anteil schematisch dargestellt. Dabei steht TRP2* stellvertretend für die entsprechenden Fusionskonstrukte VP22-TRP2, -TRP2 dC, -TRP2 511 oder -TRP2 445.

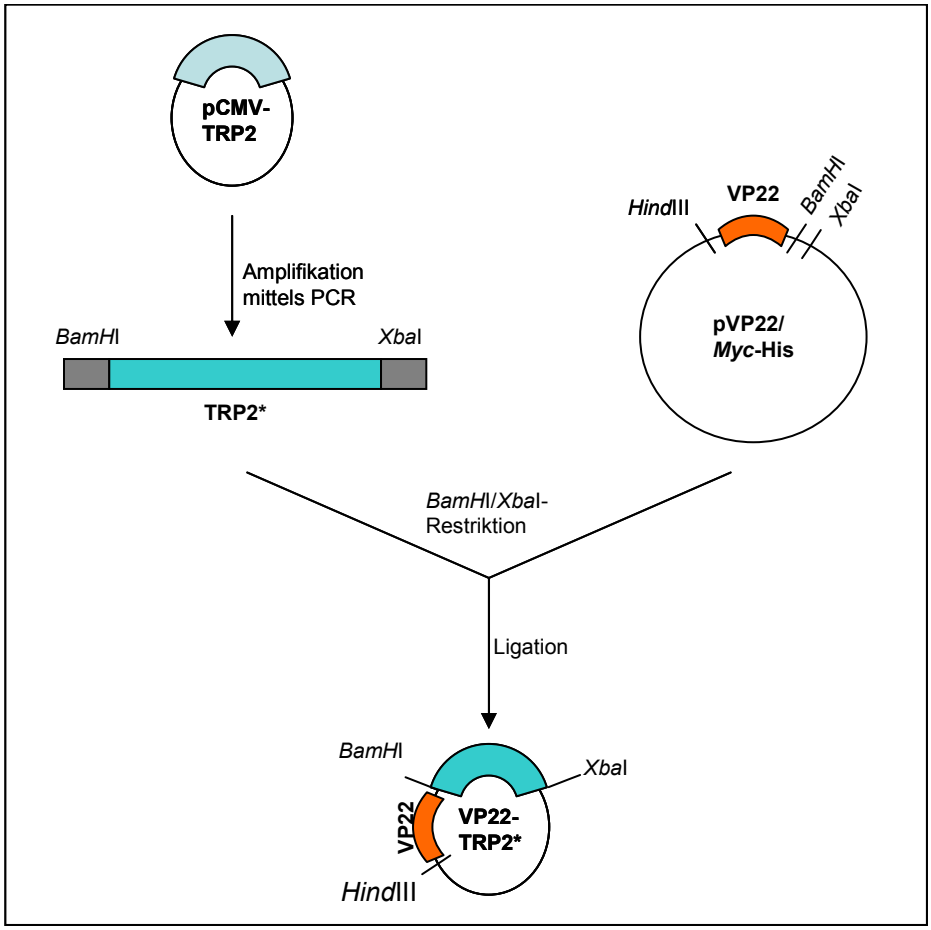


Abbildung 4.1: Schematische Ansicht der Klonierunsschritte zur Herstellung VP22-enthaltender Fusionskonstrukte. Die DNA-Sequenzen von TRP2, TRP2 dC, TRP2 511 und TRP2 445 wurden über PCR aus dem Vektor pCMV-TRP2 (s. Kapitel 2.9.2) amplifiziert und mit einer *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer *Xba*I-Schnittstelle am 3'-Ende versehen. Die PCR-Produkte wurden mit den Enzymen *Bam*HI und *Xba*I geschnitten. Der mit den gleichen Enzymen linearisierte pVP22/*Myc*-His-Vektor wurde anschließend mit dem geschnittenen PCR-Produkt ligiert.

Das TRP2-Gen wurde aus dem Vektor pCMV-TRP2 (s. Kapitel 2.9.2) über PCR (s. Kapitel 3.3.10) amplifiziert, wobei durch Verwendung entsprechender Primer jeweils am 5'-Ende eine *Bam*HI- und am 3'-Ende eine *Xba*I-Schnittstelle angefügt wurde. Im Falle des Konstrukts pVP22-TRP2 wurde das gesamte TRP2-Gen von nt 1 bis 1556 über PCR amplifiziert und in den Vektor pVP22/*Myc*-His kloniert. Verwendet wurden dazu die Primer VP22-trp2-5' und VP22-trp2-3' (s. Kapitel 2.9.3). Durch die Verwendung der Primer VP22-trp2-5' und VP22-trp2-dC (s. Kapitel 2.9.3) wurde das Konstrukt pVP22-TRP2 dC mit einer Deletion von 153

Nukleotiden am C-terminalen Ende hergestellt. Das Konstrukt pVP22-TRP2 511 enthält den Bereich des TRP2-Gens von den Basen 511 bis 906. Die eingesetzten Primer hierfür sind VP22-trp2 511-5' und VP22-trp2 906-3'. Für das Konstrukt pVP22-TRP2 445 wurden die Primer VP22-trp2 445-5' und VP22-trp2 660-3' verwendet. Es enthält den Bereich des TRP2-Gens mit den Basen 445 bis 660. Alle Konstrukte enthalten die Nukleotidsequenz, die für das promiskuitive CTL-Epitop ^{180}SVYDFFVWL^{188} kodiert. Auch bei den zuletzt genannten Konstrukten wurde durch Verwendung der genannten Primer am 5'-Terminus eine *Bam*HI- und am 3'-Terminus eine *Xba*I-Restriktionsschnittstelle in der PCR amplifiziert (s. Abbildung 4.2).

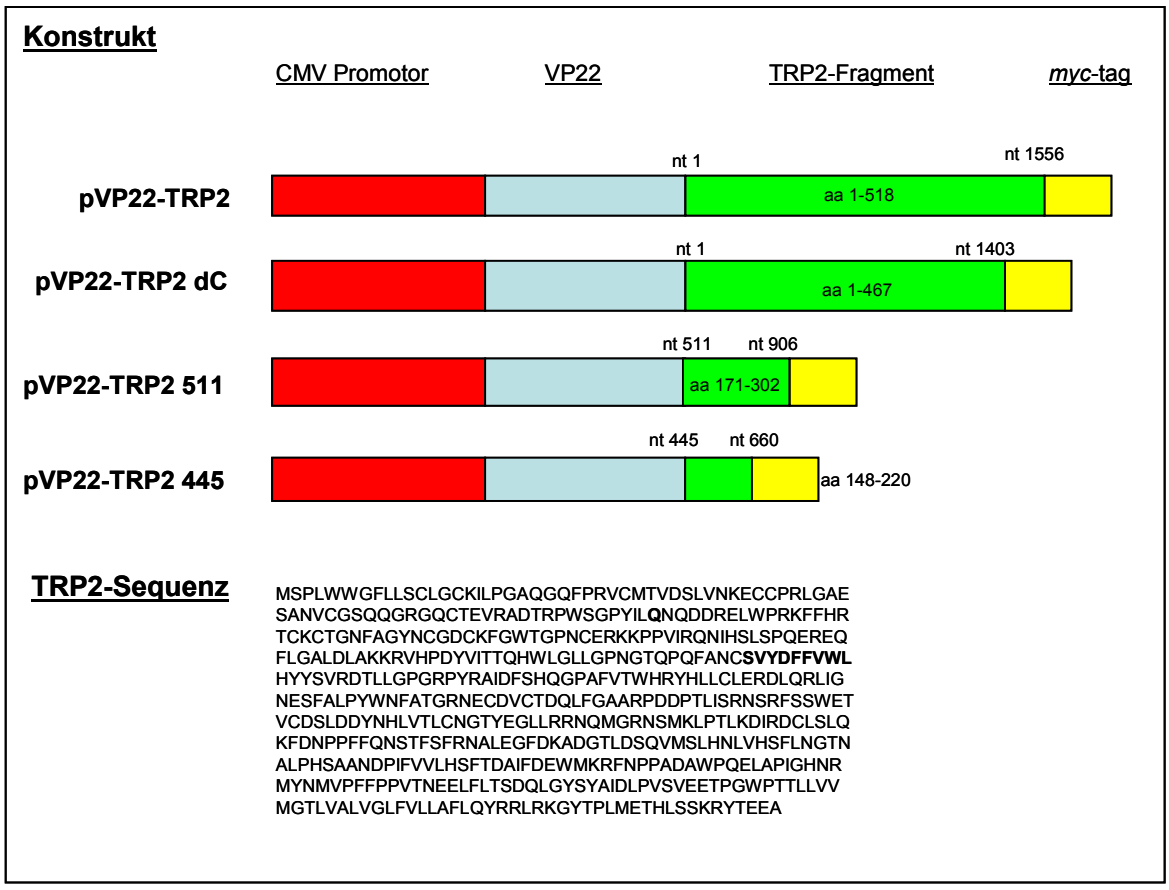


Abbildung 4.2: Übersicht über die hergestellten Fusionskonstrukte mit VP22-Anteil. Die Sequenz des promiskuitiven CTL-Epitops (#180-188) ist fett gedruckt hervorgehoben und im schematischen Aufbau grün unterlegt. Die verwendete Aminosäuresequenz weist eine Punktmutation an Position 233 auf (R→Q).

4.1.2 Klonierung des TRP2-Gens und seiner Deletionsvarianten in den „TOPO-Vektor“

Das TRP2-Gen wurde wie zuvor aus dem Vektor pCMV-TRP2 (s. Kapitel 2.9.2) durch Verwendung TRP2-spezifischer Primer über PCR (s. Kapitel 3.3.10) amplifiziert, wobei jeweils am 5’-Ende eine *Hind*III- und am 3’-Ende eine *Xba*I-Schnittstelle angefügt wurde (s. Abbildung 4.3):

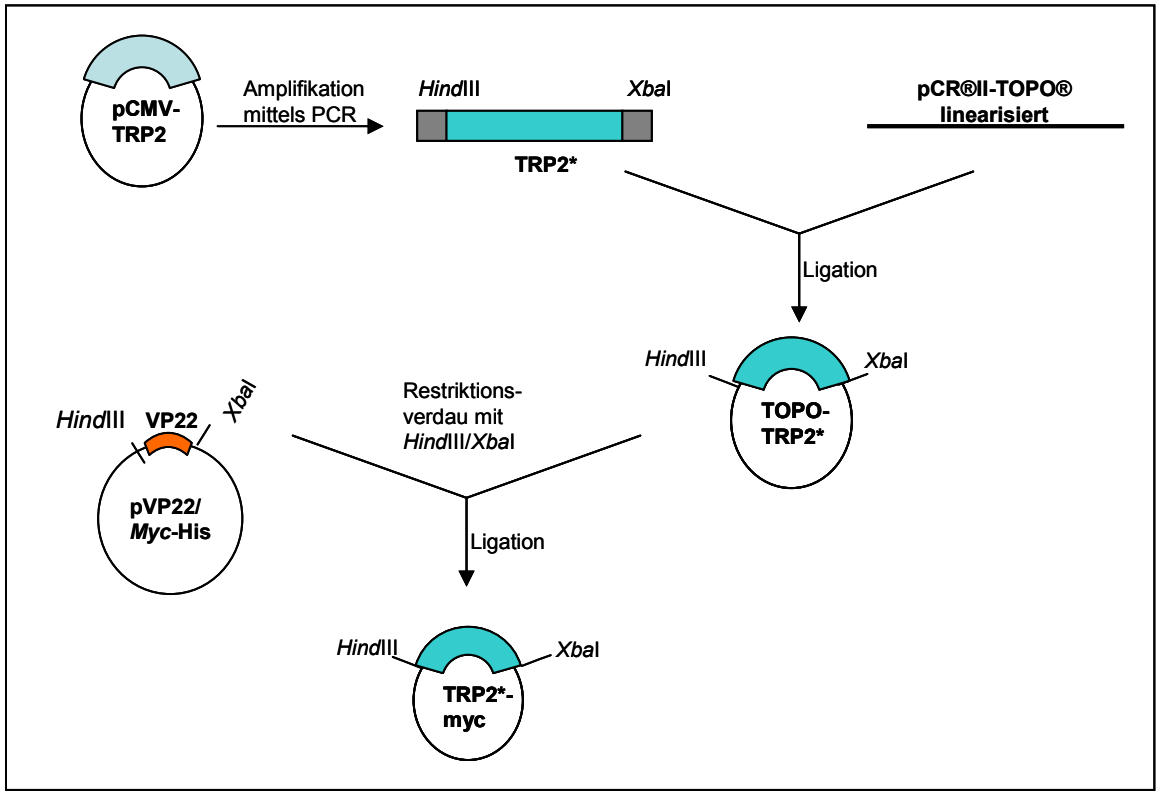


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zu Konstrukten ohne VP22-Anteil. Die DNA-Sequenz des TRP2-Gens wurde über PCR amplifiziert und zunächst in den linearisiert vorliegenden pCR®II-TOPO®-Vektor ligiert. Aus dem Vektor pVP22/*Myc*-His wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Xba*I ein 986 bp-Fragment herausgeschnitten. In den Vektor wurde das TRP2-Gen eingefügt, das mit den gleichen Enzymen aus dem TOPO-TRP2*-Vektor erhalten wurde.

Im Falle des Konstrukts pTRP2-myc wurde das gesamte TRP2-Gen von nt 1 bis 1556 über PCR amplifiziert und in den Vektor pVP22/*Myc*-His kloniert. Verwendet wurden dazu die Primer trp2-myc-5’ und VP22-trp2-3’ (s. Kapitel 2.9.3). Durch die Verwendung der Primer trp2-myc-5’ und VP22-trp2-dC-3’ (s. Kapitel 2.9.3) wurde das Konstrukt pTRP2-myc dC mit einer Deletion von 153 Nukleotiden am C-terminalen Ende hergestellt. Das Konstrukt pTRP2-myc 511 enthält den Bereich des TRP2-Gens von den Basen 511 bis 906. Die eingesetzten Primer hierfür sind

trp2-myc 511-5' und VP22-trp2 906-3'. Für das Konstrukt pTRP2-myc 445 wurden die Primer trp2-myc 445-5' und VP22-trp2 660-3' verwendet. Es enthält den Bereich des TRP2-Gens mit den Basen 445 bis 660. Auch hier enthalten alle Konstrukte das promiskuitive CTL-Epitop ^{180}SVYDFFVWL^{188}. Die amplifizierten TRP2-Gene wurden in den TOPO-Vektor (s. Kapitel 2.5) einkloniert. Nach einem Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonucleasen *Hind*III und *Xba*I konnte das entsprechende PCR-Produkt selektiv aus dem TOPO-Vektor herausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in den Vektor pVP22/*Myc*-His einkloniert werden.

Die Abbildungen 4.2 und 4.4 liefern eine Übersicht über sämtliche hergestellten Konstrukte:

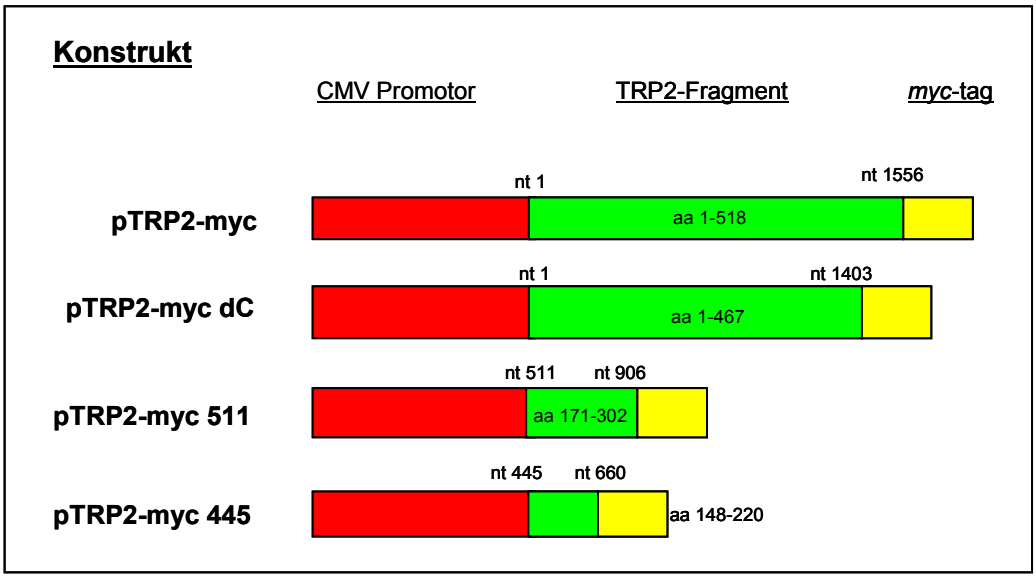


Abbildung 4.4: Überblick über die Konstrukte ohne VP22-Anteil.

Zur Überprüfung der in 4.1.1 und 4.1.2 beschriebenen Konstrukte wurden diese zunächst mittels Restriktionsverdau untersucht. Pro Konstrukt wurden jeweils zwei Restriktionsansätze mit zwei (*Bgl*II/ *Xba*I; *Hind*III/ *Xba*I) bzw. drei (*Bam*HI/ *Bgl*II/ *Xba*I) verschiedenen Restriktionsendonucleasen durchgeführt. Die Größen der in der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung detektierten Banden entsprachen den theoretisch errechneten Werten (s. Abbildung 4.5 und Tabelle 1).

Das beobachtete Bandenmuster der Kontroll-Elektrophorese ließ somit auf eine erfolgreiche Klonierung schließen:

	***Bgl*II, *Xba*I**	***Bam*HI, *Bgl*II, *Xba*I**	***Hind*III, *Xba*I**
pVP22-TRP2		252, 440, 873, 1814, 4528	2489, 5418
pVP22-TRP2 511		182, 222, 1814, 4528	1328, 5418
pVP22-TRP2 445		224, 1814, 4528	1148, 5418
pTRP2-myc	252, 873, 1333, 4528		1568, 5418
pTRP2-myc 511	222, 1078, 4528		410, 5418
pTRP2-myc 445	1120, 4528		230, 5418

Tabelle 1: Theoretisch errechnete Bandengrößen in bp. Durchgeführt wurden ein Zweifachverdau mit *Bgl*II und *Xba*I für die Konstrukte TRP2-myc, -myc 511 und –myc 445 bzw. ein Dreifachverdau mit *Bam*HI, *Bgl*II und *Xba*I für die Konstrukte VP22-TRP2, -TRP2 511 und –TRP2 445. Für alle Konstrukte wurde ein weiterer Restriktionsverdau mit *Hind*III und *Xba*I zur weiteren Kontrolle angefertigt.

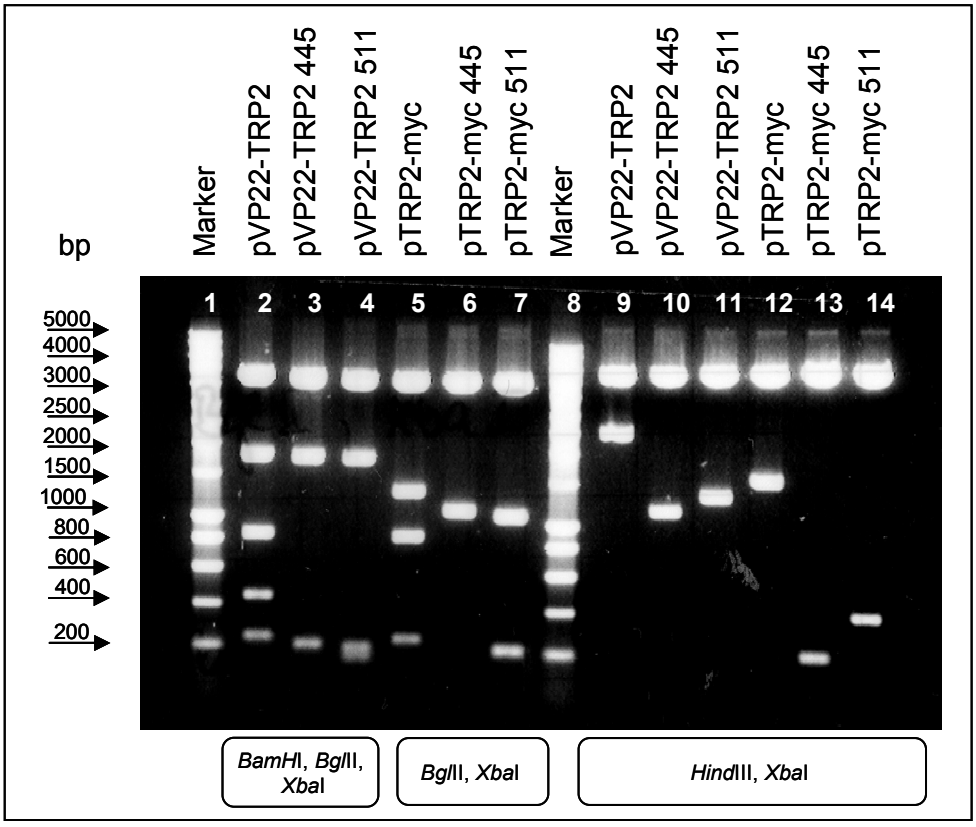


Abbildung 4.5: Restriktionsverdau der Konstrukte. Die Spuren 2 bis 4 zeigen die Bandenmuster nach Restriktionsverdau mit den Enzymen *BamH*I, *Bgl*II und *Xba*I – die Konstrukte ohne VP22-Anteil (Spuren 5 bis 7) wurden lediglich mit den Enzymen Bgl I und *Xba*I geschnitten. Die Spuren 9 – 14 stellen den Verdau der Konstrukte mit den Enzymen *Hind*III und *Xba*I dar. Als Marker wurde in den Spuren 1 und 8 ein „Smart Ladder" (Fa. MBI Fermentas) (2.7) verwendet.

Die im Labor Dr. Hunziker (DKFZ Heidelberg) durchgeführten Sequenzierungsanalysen bestätigten die korrekte Nukleotidsequenz der hergestellten Konstrukte. Nach erfolgreicher Klonierung der Konstrukte und deren Bestätigung durch Sequenzierung wurden diese in den anschließenden Experimenten eingesetzt.

4.2 Nachweis der TRP2-Expression

4.2.1 Expressionsnachweis auf RNA-Ebene mittels RT-PCR

Der Nachweis der Genexpression der transfizierten DNA-Konstrukte erfolgte in transient transfizierten COS7-Zellen mittels RT-PCR wie in Material und Methoden beschrieben.

Zum Expressionsnachweis mittels RT-PCR wurde das interne Primerpaar trp2-myc 445-5' und VP22-trp2 660-3' verwendet. Diese lieferten eine Bandengröße von etwa 200 bp. Lediglich für die Konstrukte pVP22-TRP2 511 und pTRP2-myc 511 wurden die Primer trp2-myc 511-5' und VP22-trp2 906-3' verwendet, die eine Bandengröße von etwa 400 bp lieferten. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die erwarteten Bandengrößen der PCR-Produkte bei entsprechend eingesetzten Primern:

Konstrukt	Verwendete Primer	Erwartete Bandengröße (bp)
Wasser (neg. Kontrolle)	trp2-myc 445-5', VP22-trp2 660-3'	
CMV-TRP2	trp2-myc 445-5', VP22-trp2 660-3'	215
VP22	trp2-myc 445-5', VP22-trp2 660-3'	
VP22-TRP2	trp2-myc 445-5', VP22-trp2 660-3'	215
VP22-TRP2 dC	trp2-myc 445-5', VP22-trp2 660-3'	215
VP22-TRP2 445	trp2-myc 445-5', VP22-trp2 660-3'	215
VP22-TRP2 511	trp2-myc 511-5', VP22-trp2 906-3'	395
TRP2-myc	trp2-myc 445-5', VP22-trp2 660-3'	215
TRP2-myc dC	trp2-myc 445-5', VP22-trp2 660-3'	215
TRP2-myc 445	trp2-myc 445-5', VP22-trp2 660-3'	215
TRP2-myc 511	trp2-myc 511-5', VP22-trp2 906-3'	395

Tabelle 2: Theoretisch erwartete Bandengrößen der PCR-Produkte. Mit Ausnahme der Konstrukte pVP22-TRP2 511 und pTRP2-myc 511, bei denen die Primer trp2-myc 511-5' und VP22-trp2 906-3' verwendet worden waren, wurde bei allen übrigen Konstrukten und bei den Kontrollen das Primerpaar trp2-myc 445-5' und VP22-trp2 660-3' eingesetzt.

Abbildung 4.6 zeigt das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte über ein 1 % iges Agarosegel:

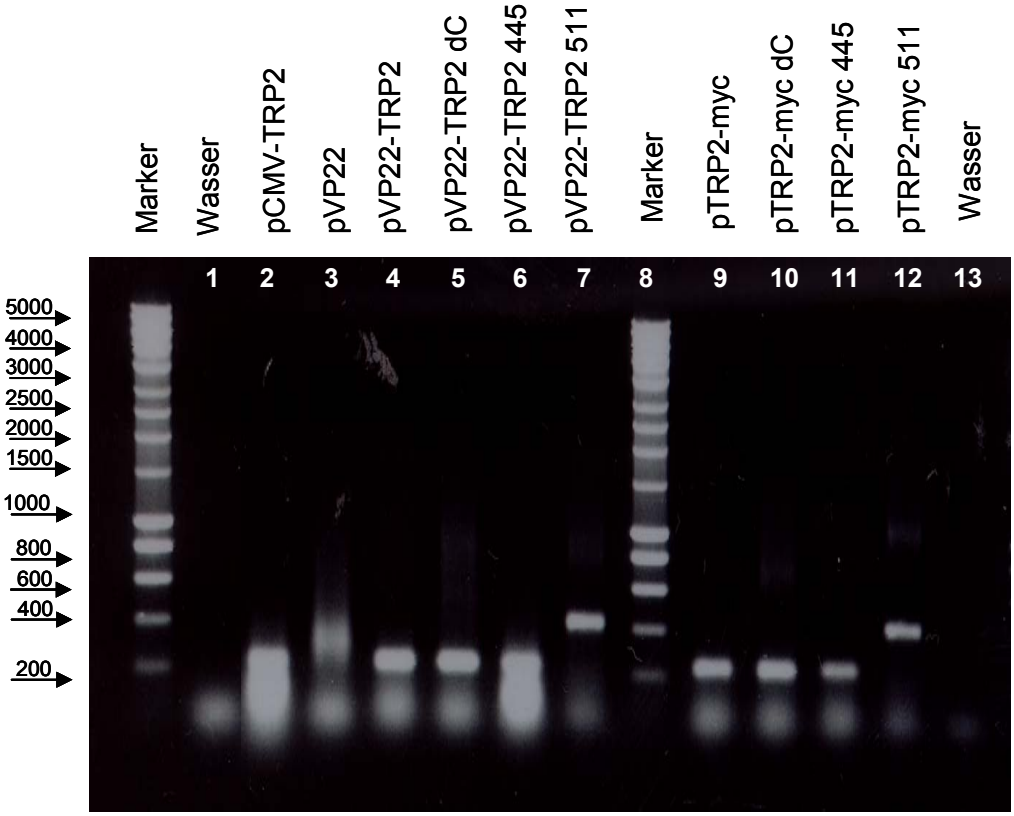


Abbildung 4.6: mRNA-Nachweis der klonierten TRP2-Derivate aus transient transfizierten COS7-Zellen mittels RT-PCR. COS7-Zellen wurden mit dem pVP22-*Myc*/His Expressionskonstrukt, das für TRP2, TRP2dC, TRP2 445, TRP2 511 oder für die entsprechenden analogen Konstrukte ohne VP22-Anteil kodiert transient transfiziert. 36 h nach Transfektion wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und eine RT-PCR mit Hilfe spezifischer Primer (siehe Tabelle 2) durchgeführt.

Spur 1 stellt eine Negativkontrolle dar, in der statt cDNA lediglich Wasser eingesetzt wurde. Spur 2 zeigt eine erwartete Bandengröße von etwa 215 bp für das Positiv-Kontrollkonstrukt pCMV-TRP2. Der Leervektor pVP22-*Myc*/His in Spur 3 trägt kein TRP2-Insert und liefert lediglich ein unspezifisches Amplifikat. Für die Konstrukte pVP22-TRP2 (Spur 4), pVP22-TRP2 dC (Spur 5) und pVP22-TRP2 445 (Spur 6) sind die Banden der erwarteten Größe von 215 bp ebenso gezeigt wie für die Konstrukte ohne VP22-Anteil (Spuren 9, 10, 11). Die für die Amplifizierung des TRP2-Gens aus den Konstrukten pVP22-TRP2 511 (Spur 7) und pTRP2-myc 511 (Spur 12) ausgewählten Primer lieferten PCR-Produkte mit einer Bandengröße von etwa 400 bp. Spur 13 stellt wiederum eine Negativkontrolle mit deionisiertem Wasser aus einem verwendeten Kit dar.

Somit konnte die Genexpression sämtlicher Konstrukte auf RNA-Ebene nachgesiesen werden.

4.2.2 Expressionsnachweis auf Protein-Ebene

Zum Expressionsnachweis auf Protein-Ebene wurden sowohl Western Blot-Analysen als auch immuncytologische Untersuchungen durchgeführt.

4.2.2.1 Expressionsnachweis über Western Blot-Analyse

Hierzu wurden COS7-Zellen mit den hergestellten Fusionskonstrukten pVP22-TRP2, pVP22-TRP2 511, pVP22-TRP2 445, pTRP2-myc, pTRP2-myc 511 und pTRP2-myc 445 transfiziert; 36 h später wurden die Zellen lysiert und die Konzentration der so aus diesen Zellen isolierten Proteine photometrisch (nach Bradford) bestimmt. Jeweils 15 µg Gesamtprotein von jeder Probe wurden auf ein 12 % iges denaturierendes SDS-Gel aufgetragen, wie in Kapitel 3.3.18 beschrieben mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und danach auf eine Membran transferiert (s. Kapitel 3.3.19). Um die Fusionsproteine über den *myc*-tag detektieren zu können, wurde der α-c-*myc*-Antikörper eingesetzt und drei verschiedene Kontrollen angefertigt: i) untransfizierte Zellen (Spur 1; zur Detektion von Kreuzreaktivität mit zellulären Proteinen, Hintergrundsignale); ii) mit pCMV-TRP2 transient transfizierte Zellen (Spur 2; in diesem Fall enthält der Vektor das TRP2-Gen ohne den antikörperspezifischen *myc*-tag); iii) mit pVP22/*Myc*-His transient transfizierte Zellen (Spur 3; der hierfür verwendete Vektor enthält lediglich den *myc*-tag ohne das TRP2-Gen). Abbildung 4.7 zeigt das Ergebnis der Western Blot Analyse. Aufgetragen sind hier zunächst die oben beschriebenen Kontrollen, gefolgt von den Proteinextrakten der jeweiligen Transfektante:

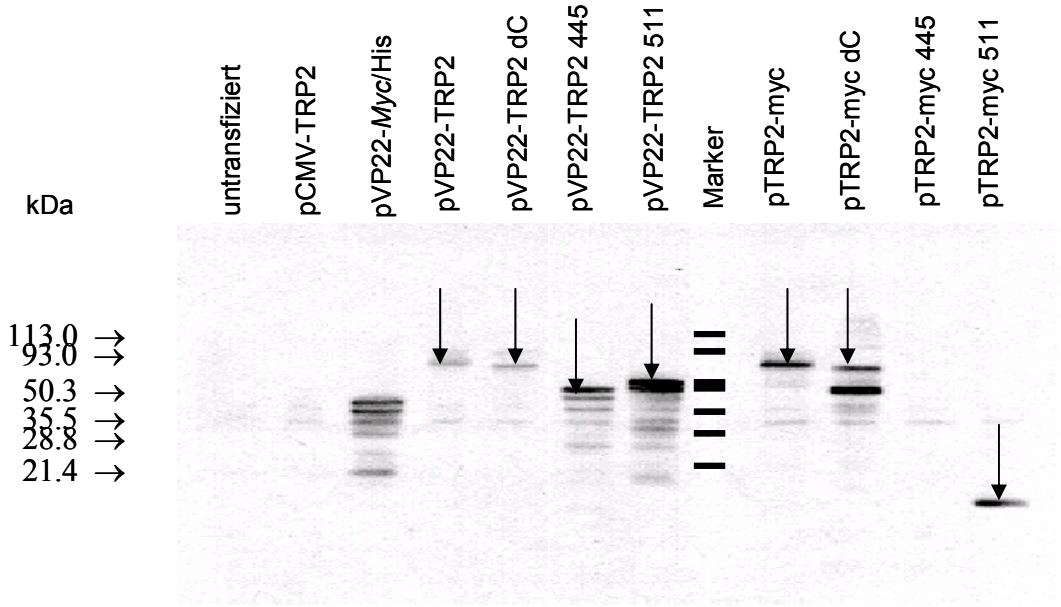


Abbildung 4.7: Expression der Fusionsproteine mit und ohne VP22-Anteil in transient transfizierten COS7-Zellen. Sämtliche Fusionsproteine sowie der myc-spezifische Leervektor wurden in Cos7-Zellen transient transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Proteinlysate über ein 12 %iges SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Fusionsproteine wurden durch *enhanced chemiluminescence* mit einem gegen das c-*myc*-tag gerichteten monoklonalen Antikörper 9E10 nachgewiesen.

Bis auf das TRP2-myc 445-Protein konnten alle Fusionsproteine in transient transfizierten COS7-Zellen mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Die beobachteten Größen aller Proteine mit und ohne VP22-Anteil entsprachen mit Ausnahme von pTRP2-myc 445 der theoretisch zu erwarteten Werte (Tabelle 3): Die Fusionsproteine setzen sich aus einem VP22-Anteil bestehend aus 38 kDa, einem myc-tag der Größe 1 kDa und einem TRP2-Anteil zusammen. Die analogen Konstrukte ohne VP22-Anteil besitzen dementsprechend ein um den VP22-Anteil kleineres Molekulargewicht (siehe Tabelle 3):

Konstrukt	Bp	aa	kDa
VP22-TRP2	2487	828	92
VP22-TRP2 dC	2334	777	86
VP22-TRP2 511	1326	442	49
VP22-TRP2 445	1147	382	42
Trp2-myc	1585	528	59
Trp2-myc dC	1432	477	53
Trp2-myc 511	424	141	16
Trp2-myc 445	245	82	9

Tabelle 3: Übersicht über die theoretischen Größen der TRP2-spezifischen Proteinkonstrukte.

Das Konstrukt pTRP2-myc 445 bildet hier eine Ausnahme: Während die spezifische mRNA durch RT-PCR nachgewiesen werden konnte, war eine entsprechende Bande im Western Blot bei 9 kDa nicht zu erkennen. Auch in einem höherprozentigen SDS-PAGE-Gel (15 %) konnte keine Bande für das Konstrukt pTRP2-myc 445 detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.2 Immuncytologischer Expressionsnachweis

Wie in Kapitel 3.1.8 beschrieben, wurden COS7-Zellen mit den hergestellten Konstrukten pVP22-TRP2, pVP22-TRP2 511, pVP22-TRP2 445, pTRP2-myc, pTRP2-myc 511 oder pTRP2-myc 445 transient transfiziert und deren Proteinexpression 36 h später durch indirekte Immunfärbung untersucht. Da zum Zeitpunkt der Analysen kein TRP2 spezifischer Erstantikörper vorlag, wurden die Färbungen mittels eines myc-spezifischen Erstantikörpers durchgeführt (siehe Material und Methoden). In Abbildung 4.8 ist ein repräsentatives Ergebnis einer solchen Färbung dargestellt. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen eingesetzt und als positive Kontrolle COS7-Zellen, die mit dem myc-enthaltenden Leervektor pVP22/*Myc*-His transient transfiziert worden waren. In Abbildung 4.8 ist zu beobachten, dass die untransfizierten Zellen (4.8 A), wie erwartet, keine Färbung aufweisen, während die mit dem Leervektor transfizierten Zellen (4.8 B) entsprechend der myc-Expression eine Braunfärbung zeigen. Die Färbung der mit

den Konstrukten pVP22-TRP2 (4.8 C) bzw. pTRP2-myc (4.8 D) transient transfizierten Zellen, liefert eine starke Färbung, jedoch keine deutlich erkennbaren Unterschiede in der Lokalisation. Eine unterschiedliche Lokalisation der Signale ist beim Vergleich der gefärbten Zellen in 4.8 E) und 4.8 F) zu erkennen. Erstere wurden mit pVP22-TRP2 511 transfiziert und zeigen eine kernnahe Färbung, während die mit pTRP2-myc 511 transfizierten Zellen keine spezifische Lokalisation erkennen lassen. Auch der Vergleich der Färbung der Zellen, die mit pVP22-TRP2 445 G) und pTRP2-myc 445 H) transfiziert worden waren, zeigen einen deutlichen Unterschied: Die mit dem VP22-enthaltenden Konstrukt transfizierten Zellen zeigen ein Farbsignal, dessen Lokalisation als kernnah vermutet werden kann, während Zellen mit dem Vergleichskonstrukt ohne VP22-Anteil keine Färbung erkennen lassen. Dieses Ergebnis wurde in vier unabhäng durchgeführten Versuchen bestätigt.

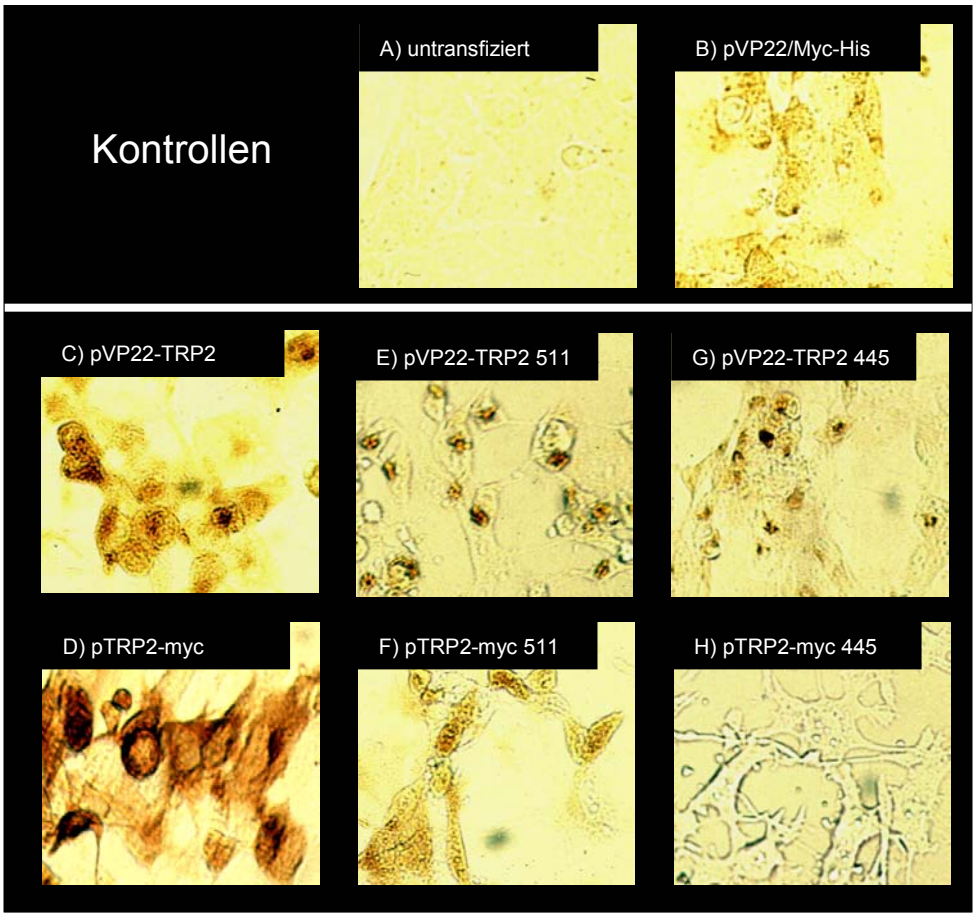


Abbildung 4.8: Immunfärbung transient transfizierter COS7-Zellen. Die Zellen wurden 36 h nach transienter Transfektion fixiert, permeabilisiert und gefärbt (1.AK: anti-Maus-c-*myc*, 1:1000; 2.AK: peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG, 1:5000). A) und B) zeigen Kontrollfärbungen von untransfizierten bzw. mit Leervektor transfizierten Zellen. Die Abbildungen in C), E) und G) zeigen Zellen, die mit den Konstrukten pVP22-TRP2, pVP22-TRP2 511 und pVP22-TRP2 445 transfiziert worden waren. D), F) und H) stellen die Färbungen von Transfektanten mit entsprechenden Konstrukte ohne VP22-Anteil dar.

Lediglich für die Produkte der Konstrukte pVP22-TRP2 511 und pVP22-TRP2 445 konnte eine kernnahe Lokalisationen angenommen werden, während dies bei entsprechenden Konstrukten ohne VP22-Anteil wie auch bei den Konstrukten pVP22-TRP2 und pTRP2-myc nicht beobachtet werden konnte.

4.2.2.3 Intrazelluläre Kolokalisationsexperimente mittels Laser-Scanning-Mikroskopie

Nachdem mit Hilfe von Western Blot-Analyse und immuncytologischer Färbung die Proteinexpression der hergestellten Konstrukte nachgewiesen werden konnte, sollte die intrazelluläre Lokalisation der exprimierten Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat über indirekte Immunfluoreszenzfärbung analysiert werden. Hierzu wurden zunächst exemplarisch die Konstrukte pVP22-TRP2 511 und pTRP2-myc 511 herausgegriffen und eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden COS7-Zellen transient transfiziert, 36 h später fixiert, permeabilisiert und gefärbt (s. Kapitel 3.1.9). Die Lokalisation der Proteine mit und ohne VP22-Anteil wurde jeweils für beide Konstrukte mittels eines spezifischen monoklonalen Maus-anti-myc-Erstantikörpers und eines Ziege-anti-Maus IgG Alexa 488 Zweitantikörpers (s. Kapitel 2.8.2) analysiert. Der Nachweis der Lokalisation des ER-spezifischen Markerproteins Calnexin wurde mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-anti-Maus Erstantikörpers und eines Ziege-anti-Kaninchen Alexa 594 Zweitantikörpers erbracht. Eine Kolokalisierung der Expression beider Proteine zeigt sich in Form einer Gelbfärbung, die auf eine ER-assoziierte Kolokalisierung des Fusionsproteins weisen. Die Überprüfung einer Kolokalisation mit dem für den Golgi-Apparat spezifischen Markerprotein 58K konnte lediglich für das Konstrukt VP22-TRP2 511 angefertigt werden, da nur ein polyklonaler VP22-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, der dankenswerter Weise von Herrn Hanswalter Zentgraf (ATV) überlassen wurde. Für die spezifische Färbung des Golgi-Appaprat-spezifischen Markerproteins 58K wurden ein Maus-anti-Golgi 58K-Erstantikörper und ein Ziege-anti-Maus IgG Alexa 594-Zweitantikörper verwendet. Die VP22-spezifische Färbung des Fusionsproteins wurde durchgeführt mittles eines Kaninchen-anti-VP22-Erstantikörpers und eines Ziege-anti-Kaninchen Alexa 488-Zweitantikörpers.

In Abbildung 4.9 ist die intrazelluläre Lokalisation der Proteine dargestellt, wie sie über Konfokalmikroskopie ermittelt wurde. Dabei zeigen A) und D) die spezifische Kompartimentfärbung des ER-spezifischen Markerproteins Calnexin. B) und E) liefern die Lokalisation des entsprechenden Fusionsproteins unter Verwendung eines c-myc-spezifischen Erstantikörpers und eines Ziege-anti-Maus IgG-

Zweitantikörpers. C) und F) stellen die überlagerten Lokalisationen dar: Eine Gelbfärbung deutet dabei auf eine Kolokalisation mit Calnexin. Diese ist für pVP22-TRP2 511 F) zu sehen, für pTRP2-myc 511 C) jedoch nicht:

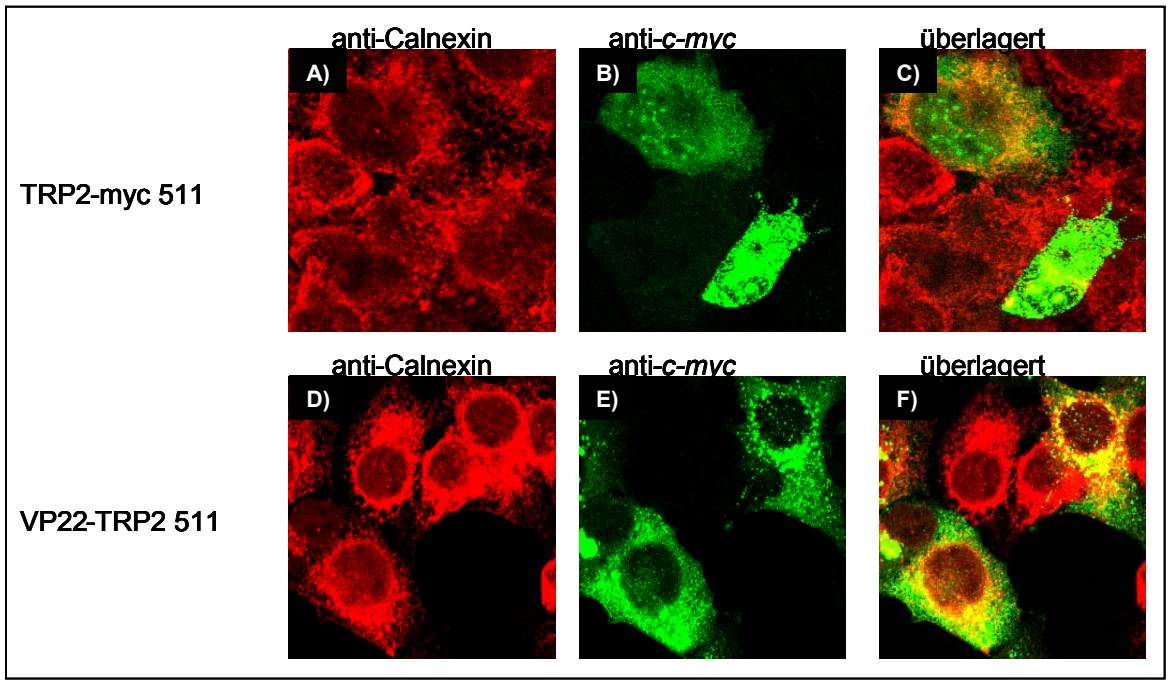


Abbildung 4.9: Intrazelluläre Lokalisation der untersuchten Fusionsproteine. VP22-TRP2 511 zeigt eine mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziierte Lokalisierung (Gelbfärbung bei F)), während TRP2-myc 511 vornehmlich eine cytoplasmatisch bzw. endosomal lokalisiert zu sein scheint. COS7-Zellen wurden mit pTRP2-myc 511 bzw. pVP22-TRP2 511 transient transfiziert und die Fusionsproteine über indirekte Fluoreszenz und konfokaler Lasermikroskopie detektiert. Erstantikörper für A) und D): 1:100 Kaninchen anti-Calnexin, Zweitantikörper: 1:300 Ziege-anti-Kaninchen Alexa 594; Erstantikörper für B) und E): 1:500 Maus anti-c-myc, Zweitantikörper: 1:300 Ziege-anti-Maus IgG Alexa 488.

In Abbildung 4.10 G) ist die spezifische Kompartimentfärbung mit einem für den Golgi-Apparat-spezifischen Antikörper (anti-Golgi 58K) und einem Ziege-anti-Maus IgG Alexa 594-Zweitantikörper (s. Kapitel 2.8.2) zu sehen: H) zeigt mittels Kaninchen-anti-VP22-spezifischem Erstantikörper und einem Ziege-anti-Kaninchen-Alexa 488 Zweitantikörper die Lokalisation des VP22-TRP2 511-Proteins, die bei Überlagerung eine Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat liefert (Gelbfärbung in I)). J), K) und L) zeigen die gleiche Färbung wie im Falle G), H) und I) nach Brefeldin A-Behandlung der Zellen. Während die Gelbfärbung in I) auf eine Kolokalisierung mit dem Golgi-Apparat deutet, zeigt L) für die auf die gleiche Weise gefärbten Zellen nach Brefeldin A-Behandlung eine diffuse Verteilung des Proteins.

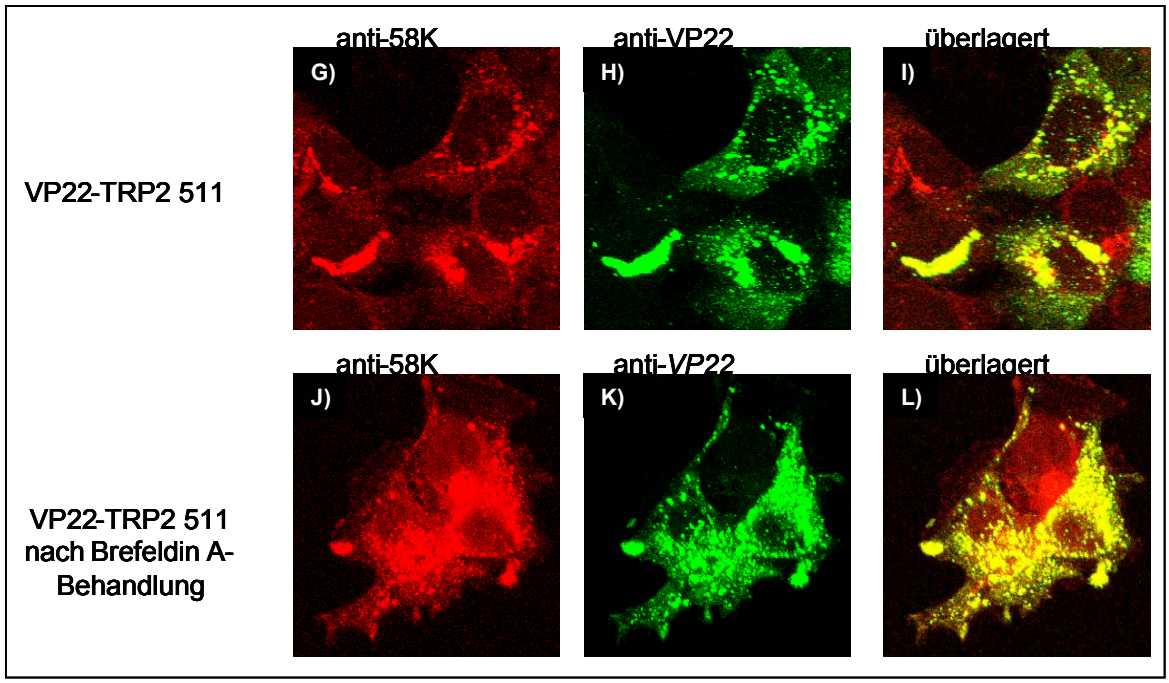


Abbildung 4.10: Intrazelluläre Lokalisation der untersuchten Fusionsproteine. VP22-TRP2 511 zeigt eine mit dem Golgi-Apparat assoziierte Lokalisierung (Gelbfärbung in I)), während diese Färbung nach Brefeldin A-Behandlung der Zellen vornehmlich cytoplasmatisch zu sein scheint. COS7-Zellen wurden mit pVP22-TRP2 511 transient transfiziert und die Fusionsproteine über indirekte Fluoreszenz und konfokaler Lasermikroskopie detektiert. Erstantikörper für G) und J): 1:100 Maus anti-Golgi 58K, Zweitantikörper: 1:300 Ziege-anti-Maus IgG Alexa 594; Erstantikörper für H) und K): 1:300 Kaninchen anti-VP22, Zweitantikörper: 1.300 Ziege-anti-Kaninchen Alexa 488.

Die in Abschnitt 4.2.2 durchgeführten Untersuchungen haben somit ergeben, dass auf RNA-Ebene für sämtliche Konstrukte ein Nachweis erbracht werden konnte. Auch die Proteinexpression für sämtliche Fusionskonstrukte mittels Western Blot-Analyse konnte nachgewiesen werden - eine Ausnahme bildete das Konstrukt pTRP2-myc 445, das sowohl im Western-Blot als auch in der Immuncytologie keine Expression zeigte. Die Konfokalmikroskopie ergab eine intrazelluläre Lokalisation des VP22-TRP2 511-Proteins sowohl mit dem ER-spezifischen Markerprotein Calnexin als auch mit dem Golgi-Apparat-spezifischen Markerprotein 58K. Während eine Lokalisation mit 58K für das Konstrukt pTRP2-myc 511 aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden konnte, war eine Kolokalisation mit Calnexin nicht zu beobachten.

4.3 Einfluss des VP22-Anteils auf die TRP2-spezifische Immunogenität der hergestellten DNA-Konstrukte in C57BL/6 Mäusen

4.3.1 Charakterisierung TRP2-exprimierender Stimulator- und Zielzellen

Um nach erfolgter Immunisierung TRP2-spezifische CTL-Antworten *in vitro* analysieren zu können, wurden syngene Zielzellen benötigt, die sowohl MHC Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche als auch das Zielantigen TRP2 intrazellulär exprimieren. Daher wurden die relevanten Zelllinien zunächst durchflusszytometrisch die Oberflächenexpression der murinen MHC-Klasse I-Moleküle K^b und D^b getestet wie auch die intrazelluläre TRP2-Expression mittels RT-PCR untersucht.

4.3.1.1 Analyse der TRP2-Expression

Der stabil transfizierte RMA-TRP2 Klon 1 und murine B16F10 Tumorzellen wurden bzgl. ihrer TRP2-Expression mittels RT-PCR untersucht. Dazu wurden für die B16F10-Zellen TRP2-spezifische Primer (s. Kapitel 2.9.3) verwendet, die das murine TRP2 amplifizieren und für die RMA-TRP2-Zellen, die in Kapitel 2.9.3 beschriebenen VP22-trp2-5'- und VP22-trp2-3'-Primer, die spezifisch für das humane TRP2 sind. Zur Überprüfung der TRP2-Expression standen verschiedene Sublinien des murinen B16 Melanoms zur Verfügung. Auch für diese konnte eine TRP2-Expression auf RNA-Ebene mittels RT-PCR nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.11).

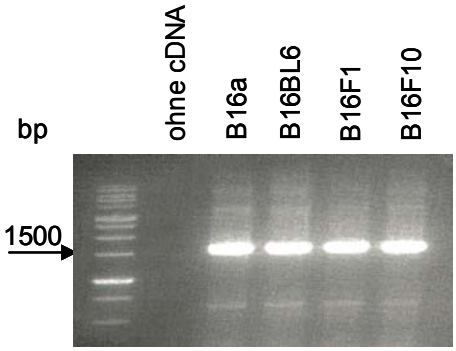


Abbildung 4.11: Expressionsnachweis des endogen exprimierten Tumorantigens TRP2 in B16-Sublinien. Aus B16a-, B16BL6-, B16F1- und B16F10-Zellen wurde jeweils RNA isoliert, mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und einer PCR mit TRP2-spezifischen Primern (spezifisch für murines TRP2) unterzogen. Diese Primer amplifizierten TRP2-spezifische Transkripte mit einer Größe von etwa 1500 bp.

In einer weiteren RT-PCR-Analyse konnte die TRP2-Expression der stabil transfizierten RMA-TRP2-Transfektante ebenfalls nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.12):

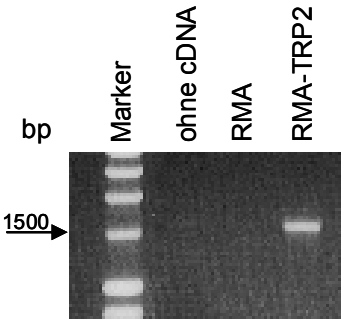


Abbildung 4.12: Expressionsnachweis des TRP2-Antigens in stabil transfizierten RMA-TRP2-Zellen. Aus RMA- bzw. RMA-TRP2-Zellen isolierter RNA wurde nach cDNA-Transkription in einer PCR-Reaktion mit TRP2-spezifischen Primern amplifiziert. Die untransfizierten RMA-Zellen liefern keine Bande, während für die stabil transfizierten RMA-TRP2-Transfektanten eine TRP2-spezifische Bande bei etwa 1500 bp erhalten wurde.

Da zum vorliegenden Zeitpunkt kein TRP2-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, konnte ein Nachweis für TRP2 auf Protein-Ebene nicht durchgeführt werden.

4.3.1.2 Analyse der MHC-Klasse I-Zelloberflächen-Expression

Um einen evtl. Einfluss der Expression des TRP2-Proteins auf die MHC-Klasse-I-Expression von RMA-TRP2-Transfektanten detektieren zu können, wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit den Hybridom-Überständen B22.249 (spezifisch für das D^b-Allel) bzw. E3.25 (K^b-spezifisch) durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 dargestellt:

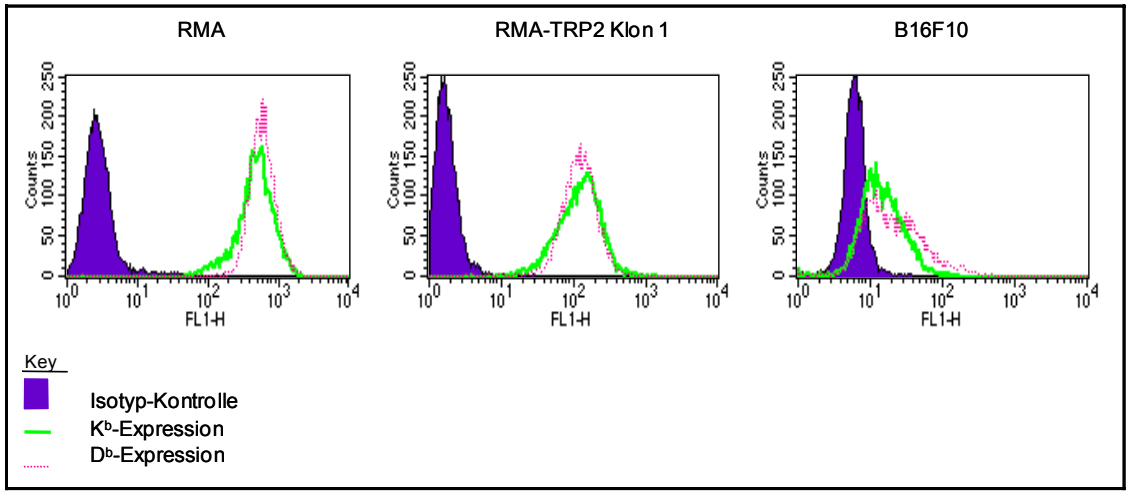


Abbildung 4.13: Expression der Zelloberfächenmoleküle D^b und K^b in RMA-TRP2 Transfektanten (Klon 1) im Vergleich zu den parentalen Zellen RMA und TRP2-exprimierenden B16F10-Zellen. RMA-Zellen, RMA-TRP2-Transfektanten und B16F10-Zellen wurden auf einen Titer von $1x10^6$/ml eingestellt. Pro well wurden $2x10^5$Zellen eingesetzt und zunächst mit 100 µl des entsprechenden Hybridom-Überstandes (D^b: B22.249; K^b: E3.25) inkubiert. Die Kontrolle wurde mit FACS-Puffer inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet. Zur Färbung wurden 200 µl/well Propidium-Iodid-Lösung (1:200 verdünnt) eingesetzt und die MHC-Expression im Durchflusszytometer untersucht.

Abbildung 4.13 kann entnommen werden, dass für RMA-Zellen sowie für RMA-Transfektanten eine Expression der Allele K^b und D^b vorhanden ist. Die parentalen RMA-Zellen liefern für beide MHC-Moleküle eine durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) zwischen 500 bzw. 800, während die RMA-TRP2-Transfektanten eine geringere Expression zwischen 100 bzw. 200 zeigen. Die MHC-Klasse-I-Expression für die Allele K^b und D^b der Zellen RMA und RMA-TRP2 war für die Transfektanten zwar weniger stark ausgeprägt, reichte jedoch für eine effektive Erkennung durch entsprechende Kontroll-CTL aus (W. Osen persönliche Mitteilung). Der Einfluss des einklonierten TRP2-Gens auf die MHC-Klasse I-Zelloberflächen-Expression

des RMA-TRP2-Transfektanten Klons 1 wurde als vernachlässigbar betrachtet. Auch die sehr geringe MHC-Klasse I-Expression der B16F10-Zellen reichte aus, um von TRP2-spezifischen cytotoxischen T-Lymphozyten erkannt zu werden.

4.3.3 DNA-Immunisierungsexperimente zur Induktion TRP2-spezifischer CTLs in C57BL/6 Mäusen

Es sollte bei der DNA-Immunisierung mit den hergestellten und oben charakterisierten TRP2-spezifischen DNA-Konstrukten untersucht werden, ob über den VP22-Anteil ein adjuvanter Effekt erzielt werden konnte.
Vier unabhängige Immunisierungen wurden durchgeführt. Eine Übersicht über die eingesetzten DNA-Konstrukte liefert Tabelle 4:

Exp.	Konstrukte							
	ohne VP22-Anteil				mit VP22-Anteil			
	pTRP2-myc 445	pTRP2-myc 511	pTRP2-myc dC	pTRP2-myc	pVP22-TRP2 445	pVP22-TRP2 511	pVP22-TRP2 dC	pVP22-TRP2
I	+	+	-	-	+	+	-	-
II	+	+	-	+	+	+	-	+
III	+	+	-	+	+	+	-	+
IV	+	+	-	+	+	+	-	+

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Konstrukte zur Immunisierung der C57BL/6 Mäuse (+: im Experiment eingesetztes Konstrukt, -: im Experiment nicht verwendetes Konstrukt).

4.3.3.1 Erstes Experiment: Test der Deletionsvarianten TRP2 445 und TRP2 511 mit bzw. ohne VP22-Anteil auf TRP2-spezifische Immunogenität

Die Tiere wurden wie unter 3.4.1 beschrieben immunisiert. Dabei erhielten jeweils drei Mäuse eine intramuskuläre Injektion des Vektors pVP22-TRP2 511, pVP22-TRP2 445, pTRP2-myc 511 bzw. pTRP2-myc 445. Drei weitere Mäuse blieben unbehandelt und dienten als Negativkontrolle. Zehn Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen der Tiere auf das Vorhandensein von TRP2-

spezifischen cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) mittels INF-γ-Elispot-Test (s. Kapitel 3.4.5) und ^{51}Cr-Freisetzungstest (s. Kapitel 3.4.6) untersucht. Am Tag der Milzentnahme wurde ein *ex vivo*-INF-γ-Elispot-Test durchgeführt, um CTLs bezüglich ihrer TRP2-spezifischen INF-γ-Sekretion nach Inkubation mit dem Peptid TRP2$_{180\text{-}188}$ *ex vivo* nachzuweisen (s. Abbildung 4.14).

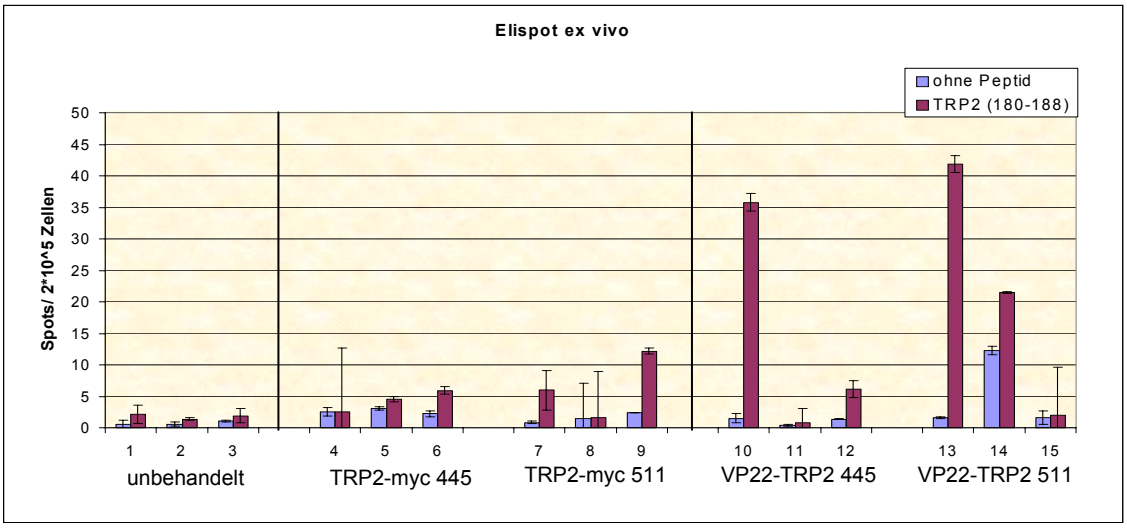


Abbildung 4.14: *Ex vivo*-Elispot-Analyse zum ersten Immunisierungsexperiment. Je Gruppe wurden drei C57BL/6 Mäuse mit 2 x 50 µg DNA immunisiert. Als Kontrolle dienten Mäuse, die lediglich mit Cardiotoxin vorbehandelt waren. Zehn Tage später wurden die Milzen entnommen und die TRP2$_{180\text{-}188}$-spezifischen cytotoxischen T-Zellen mit 1 µM TRP2$_{180\text{-}188}$-Peptid über Nacht stimuliert.

Für die Linien 10 und 13 konnte nach Immunisierung mit pVP22-TRP2 511 bzw. pVP22-TRP2 445 eine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion beobachtet werden (36 Spots bzw. 42 Spots gegenüber jeweils 2 Spots ohne Peptid). Die TRP2-Spezifität für Rezipient # 12 liegt mit 6 Spots (gegenüber 2 Spots ohne Peptid) nur wenig höher als der Hintergrundwert von 5 Spots. Rezipient # 14 liefert eine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion von 21 Spots, allerdings ist auch der Wert ohne Peptidstimulation mit 12 Spots sehr hoch, so dass in diesem Fall nur eine geringe Spezifität angenommen wird.

Im Falle der mit pTRP2-myc 445 immunisierten Tiere lieferte Linie 6 mit sechs TRP2-spezifischen Spots (gegenüber 2 Spots ohne Peptid) eine vernachlässigbar geringe INF-γ-Sekretion. In der Gruppe der mit pTRP2-myc 511 immunisierten Tiere konnte für Rezipient # 9 eine Spotzahl von 12 (gegenüber 2 Spots ohne Peptid) beobachtet werden. Die Konrolltiere lieferten keine TRP2-spezifische Reaktion.

Durch Restimulierung der verbliebenen Milzzellen mit TRP2-exprimierenden RMA-Transfektanten sollten TRP2-spezifischen CTLs in den Kulturen angereichert werden. Abbildung 4.15 zeigt die Elispot-Daten nach der ersten Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten:

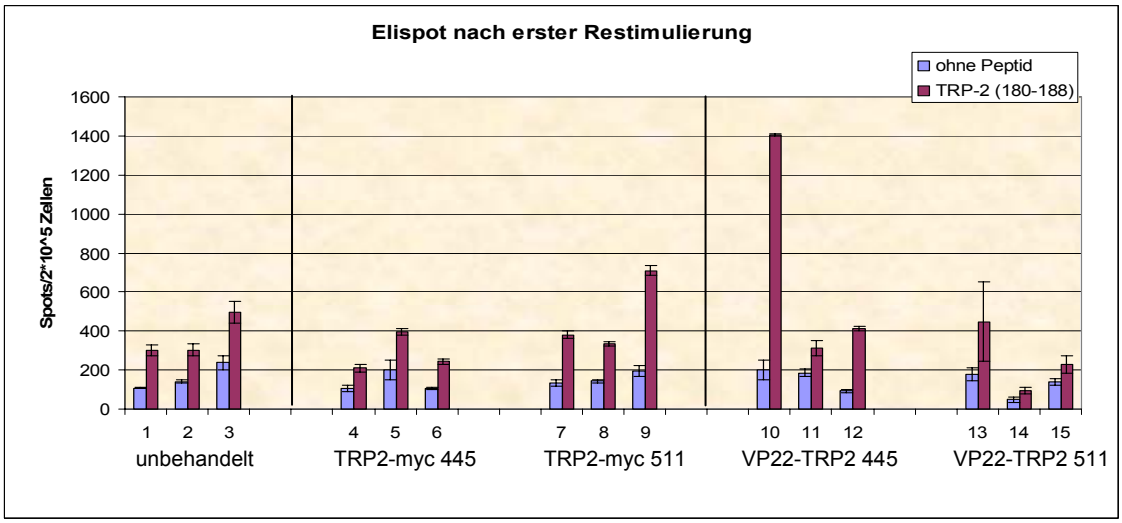


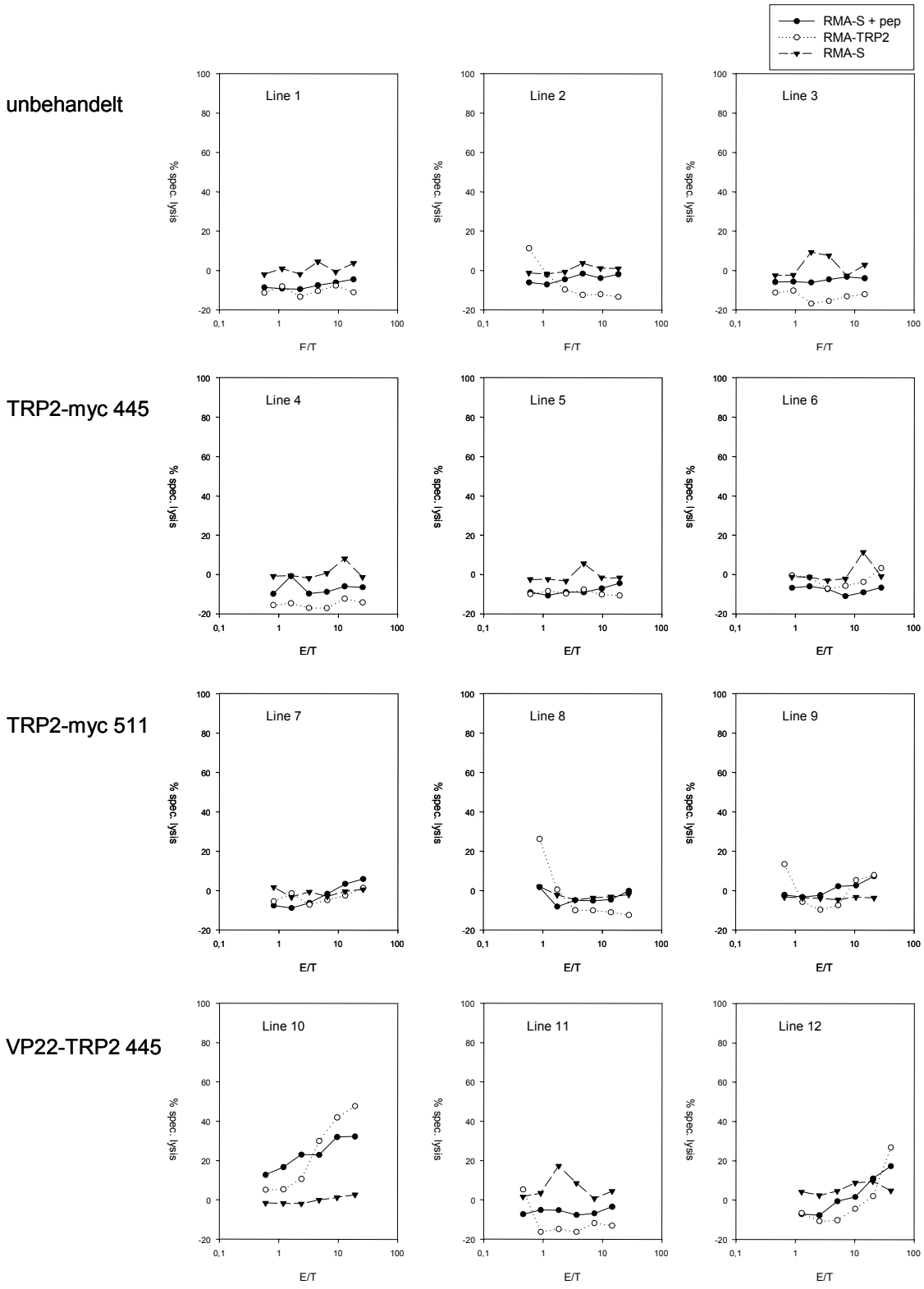
Abbildung 4.15: INF-γ-Elispot-Test nach erster *in vitro*-Restimulierung. Am Tag der Milzentnahme wurden die Milzzellen mit RMA-TRP2-Transfektanten restimuliert und fünf Tage danach auf INF-γ-Sekretion überprüft.

Der INF-γ-Elispot-Test nach der ersten Restimulierung zeigt gegenüber des *ex vivo* durchgeführten Tests einen starken Anstieg der TRP2-spezifischen INF-γ-Sekretion. Für Linie 10 konnten 1400 Spots (gegenüber 200 Spots ohne Peptid) erhalten werden (Berechnung s. Kapitel 3.5.2) - der *ex vivo*-durchgeführte Test lieferte 36 Spots. Die erhöhte TRP2-spezifischen INF-γ-Sekretion der Linie 13 blieb mit 412 Spots nur geringfügig über dem Hintergrundwert von 400 Spots. Rezipient # 12 lieferte mit 411 TRP2-spezifischen Spots eine geringe Antwort verglichen mit dem Hintergrundwert, dabei konnten allerdings nur 92 Spots für die unstimulierte Kultur erhalten werden. Die TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion für Rezipient # 14 konnte nach der ersten Restimulierung mit RMA-Transfektanten nicht bestätigt werden. Tiere, die mit pTRP2-myc 445 immunisiert worden waren, lieferten keine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion. Für Rezipient # 9 aus der Gruppe, der mit pTRP2-myc 511 immunisierten Tiere, konnten 700 TRP2-spezifische Spots (gegenüber 195 Spots ohne Peptid) erhalten werden. Für Linie 3 wurden 495 Spots erhalten, deren Spezifität jedoch fraglich ist, da ohne Peptid

bereits 237 Spots nachweisbar waren. Insgesamt lag lediglich für Rezipienten # 9 und # 10 eine TRP2-Spezifität vor.

In dem parallel angefertigten ^{51}Cr-Freisetzungstest wurde die TRP2-spezifische CTL-Antwort anhand der Lyse von TRP2-spezifischen Zielzellen (RMA-TRP2 Klon 1, $TRP2_{180-188}$-Peptid beladene RMA-S-Zellen) getestet. Unbeladene parentale RMA-S-Zellen wurden als Kontrolle eingesetzt. Ein Vergleich der Ergebnisse des INF-γ-Elispot-Tests mit den Ergebnissen aus dem ^{51}Cr-Freisetzungstest lieferte für Linie 10 eine gute Korrelation: Bei einem E:T-Verhältnis (Effektor:Target) von 18:1 wurde eine Lyse von 30 % auf $TRP2_{180-188}$-Peptid beladenen RMA-S-Zellen und 45 % auf RMA-TRP2-Transfektanten beobachtet. Linie 9 lieferte bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 mit 10 % Lyse auf TRP2-spezifische Zielzellen lediglich eine geringe Aktivität. Die TRP2-Spezifität der Linie 3 im Elispot-Test konnte im ^{51}Cr-Freisetzungstest nicht bestätigt werden. In den übrigen Fällen unterschied sich die TRP2-spezifische Cytolyse nicht von den Lysewerten der Kontrollen. Die entsprechenden Daten sind in Abbildung 4.16 gezeigt:

Milzentnahme 10 Tage nach Immunisierung,
1° in vitro Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten



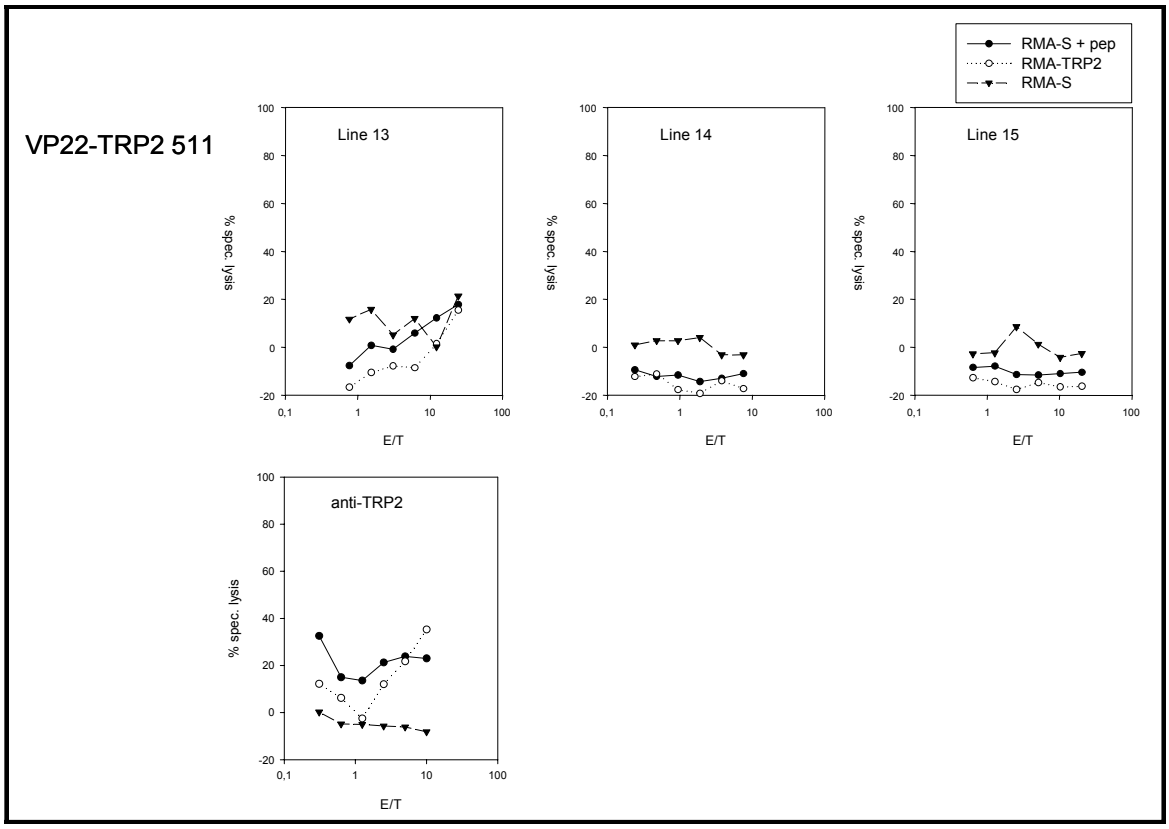


Abbildung 4.16: ^{51}Cr-Freisetzungdaten nach erster Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanen. Milzzellen aus Mäusen, die mit den Konstrukten TRP2-myc 445, TRP2-myc 511, VP22-TRP2 445 oder VP22-TRP2 511 immunisiert worden waren bzw. Milzzellen aus unbehandelten Mäusen wurden *in vitro* mit RMA-TRP2-Transfektanten einmal restimuliert. Anschließend wurden diese auf ihre cytotoxische Aktivität gegenüber RMA-S-Zellen, $TRP2_{180-188}$-Peptid [100 nM] beladene RMA-S-Zellen und RMA-TRP2-Transfektanten getestet. Die Effektorzellen wurden jeweils mit $1X10^4$ radioaktiv markierten Zielzellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die in 100µl Überstand enthaltene Radioaktivität jeder Kultur im β-Counter gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt (freundlicherweise von Dr. Wolfram Osen zur Verfügung gestellt).

Um möglichst selektiv TRP2-spezifische CTLs zu erhalten, wurde eine zweite Restimulierung der Milzzellkulturen angeschlossen. Fünf Tage danach wurden die Kulturen erneut sowohl im INF-γ-Elispot-Test als auch im ^{51}Cr-Freisetzungstest untersucht. Im INF-γ-Elispot-Test zeigten die Milzzellkulturen der Versuchstiere ein klar differenzierbares Sekretionsmuster (s. Abbildung 4.17):

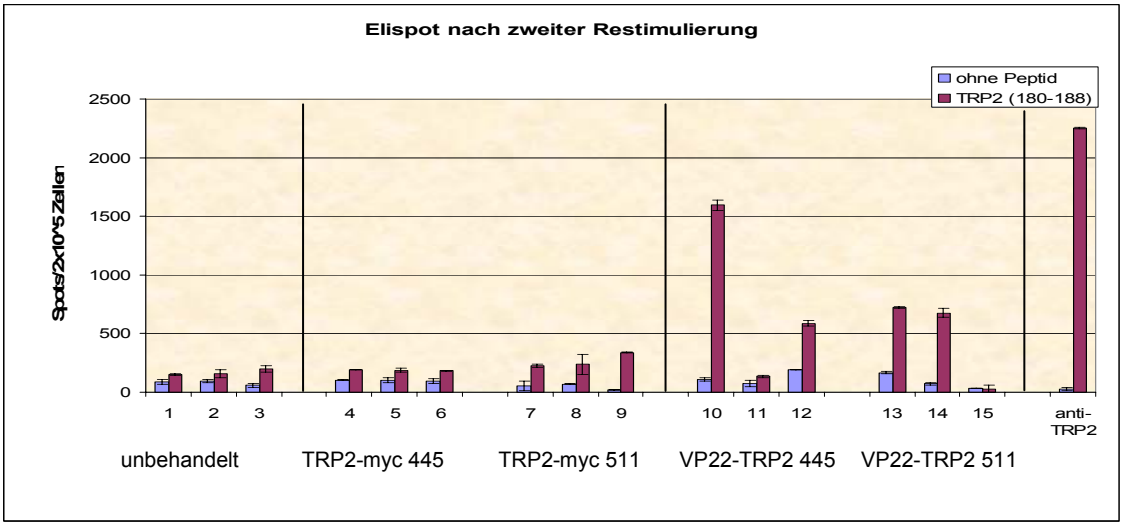


Abbildung 4.17: INF-γ-Elispot-Test nach zweiter *in vitro*-Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten. Die Milzzellkulturen wurden ein zweites Mal mit TRP2-exprimierenden Transfektanten restimuliert und fünf Tage danach deren INF-γ-Sekretion überprüft.

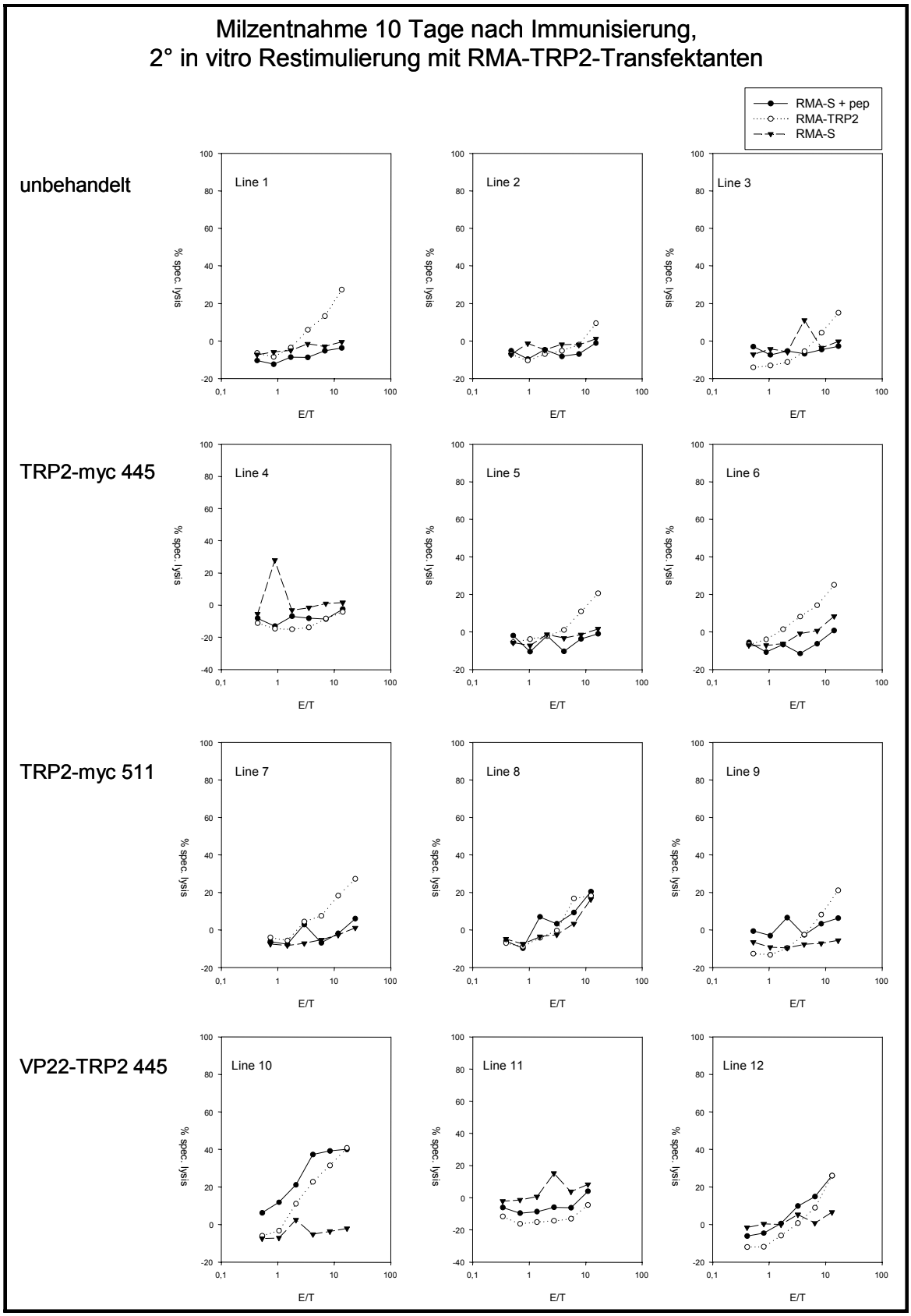
Nach der zweiten Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten konnte für die Rezipienten # 10 und # 12 aus der Gruppe mit pVP22-TRP2 445 immunisierter Tiere eine ausgeprägte TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion beobachtet werden: Linie 10 lieferte 1595 Spots (gegenüber 109 Spots ohne Peptid) und für Linie 12 konnten 586 Spots (gegenüber 192 Spots ohne Peptid) erhalten werden. Für die Linien 13 und 14 konnten mit 722 Spots (gegenüber 137 Spots ohne Peptid) bzw. 677 Spots (gegenüber 74 Spots ohne Peptid) starke TRP2-spezifische INF-γ-Sekretionen beobachtet werden. Bei einem Hintergrundwert von 250 Spots für die unbehandelten Tiere, konnte eine geringe TRP2-spezifische Aktivität für Rezipient # 9 aus der Gruppe mit pTRP2-myc 511 immunisierter Tiere gesehen werden: mit 340 TRP2-spezifischen Spots (gegenüber 21 Spots ohne Peptid) war die TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion nur gering erhöht.

Die Daten aus dem entsprechenden ^{51}Cr-Freisetzungstest zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit den Elispot-Daten:

Wie in Abbildung 4.18 zu sehen, konnte für Linie 10 bei einem E:T von 20:1 eine TRP2-spezifische cytolytische Aktivität von 40 % sowohl auf peptidbeladene RMA-S-Zellen als auch auf RMA-TRP2-Transfektanten beobachtet werden. Linie 12 lieferte für diese Zielzellen eine TRP2-spezifische Lyse von 35 % bei einem E:T von 13:1. Während für Rezipient # 13 bei einem E:T von 12:1 eine Lyse von 22 % auf peptidbeladene RMA-S-Zellen und eine Lyse von 20 % auf RMA-TRP2-Transfektanten erhalten wurde, konnte für Linie 14 keine cytolytische Aktivität

gesehen werden. Für Rezipient # 9 konnte im Ansatz bei E:T von 14:1 eine TRP2-Spezifität mit 25 % auf RMA-TRP2-Transfektanten und 4 % auf peptidbeladene RMA-S-Zellen beobachtet werden. Milzzellkulturen aus der Gruppe unbehandelter Tiere zeigten nach zweimaliger Restimulierung keine Lyseaktivität auf RMA-S- und peptidbeladene RMA-S-Zellen. Allerdings wurden RMA-TRP2-Transfektanten mit einer Lyseaktivität bis zu 25 % erkannt. Dies wurde auch für die Linien 5, 6 und 7 gesehen.

Werden die Daten nach zweimaliger Restimulierung und Analyse im INF-γ-Elispot zu grunde gelegt und definiert man alle Antworten mit einer Spotzahl >250 als positiv, konnte für Immunisierungen mit einem VP22-enthaltenden Konstrukt in vier von sechs Rezipienten (67 %) eine TRP2-spezifische Antwort erhalten werden. Immunisierungen mit Konstrukten ohne VP22-Anteil lieferten für eine der sechs Rezipienten (17 %) eine geringe TRP2-spezifische Aktivität, während für unbehandelte Kontrolltiere keine TRP2-Spezifität beobachtet werden konnte.


Milzentnahme 10 Tage nach Immunisierung,
2° in vitro Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten
RMA-S + pep
RMA-TRP2
RMA-S
unbehandelt
TRP2-myc 445
TRP2-myc 511
VP22-TRP2 445
Line 1
Line 2
Line 3
Line 4
Line 5
Line 6
Line 7
Line 8
Line 9
Line 10
Line 11
Line 12
% spec. lysis
E/T

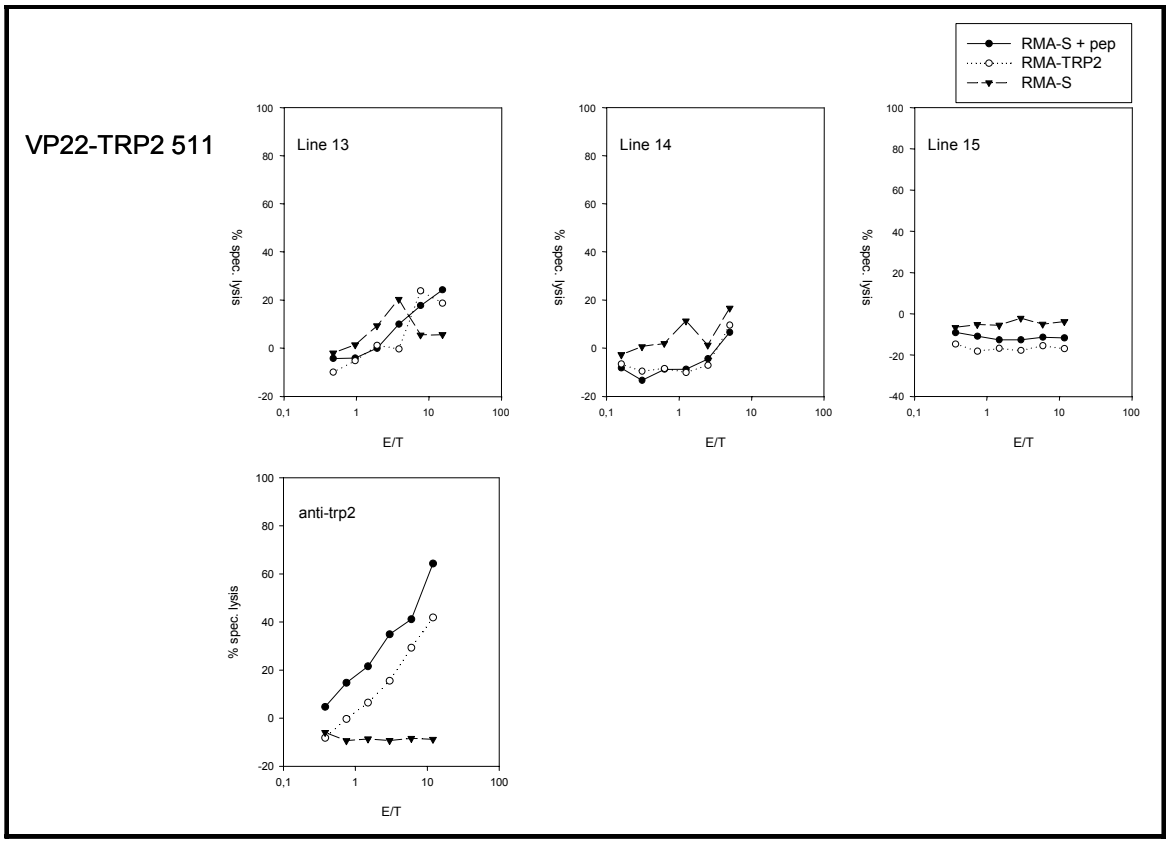


Abbildung 4.18: ^{51}Cr-Freisetzungdaten nach zweiter Restimulierung. Die Milzzellen aus den immunisierten Tieren wurden dreimal *in vitro* mit RMA-TRP2-Transfektanten restimuliert. Fünf Tage später wurden diese auf ihre cytotoxische Aktivität gegenüber RMA-S-Zellen, $TRP2_{180-188}$-Peptid [100 nM] beladene RMA-S-Zellen und RMA-TRP2-Transfektanten getestet. Die Effektorzellen wurden jeweils mit $1X10^4$ radioaktiv markierten Zielzellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Die in 100µl Überstand enthaltene Radioaktivität jeder Kultur wurde im β-Counter gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt.

4.3.3.2 Erstes Wiederholungsexperiment unter Miteinbeziehung der Konstrukte pVP22-TRP2 und pTRP2-myc und der gleichzeitigen Bestimmung des Endotoxingehalts in den Plasmidpräparationen

4.3.3.2.1 Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus dem ersten Experiment

Um zu überprüfen, ob die in Kapitel 4.3.3.1 beschriebenen Ergebnisse reproduziert werden können, wurde das Experiment nochmals wiederholt. Dabei wurde die Gruppengröße der Versuchstiere auf vier erhöht und zusätzlich die Induktion TRP2-spezifischer cytotoxischer T-Lymphozyten durch Immunisierung der für Gesamt-TRP2 kodierenden Konstrukte untersucht. Einer weiteren Gruppe von vier Mäusen wurde das Konstrukt pVP22-TRP2 und einer siebten Gruppe das Konstrukt pTRP2-myc injiziert. In diesem Experiment wurden allerdings Plasmide eingesetzt, die mit Hilfe eines „Endofree Kits“ isoliert worden waren, um einen potenziellen adjuvanten Effekt durch den in den Plasmidpräparationen vorhandenen Resten von Endotoxin ausschließen zu können. Zehn Tage nach der Immunisierung wurden die Tiere getötet, deren Milz entnommen und Milzzellkulturen angelegt. Direkt am Tag der Milzentnahme wurden die Milzzellen der Versuchstiere im *ex vivo*-Elispot auf das Vorhandensein aktivierter, TRP2-spezifischer CTLs getestet und deren INF-γ-Sekretion nach Stimulation mit dem $TRP2_{180\text{-}188}$-Peptid untersucht (s. Abbildung 4.19):

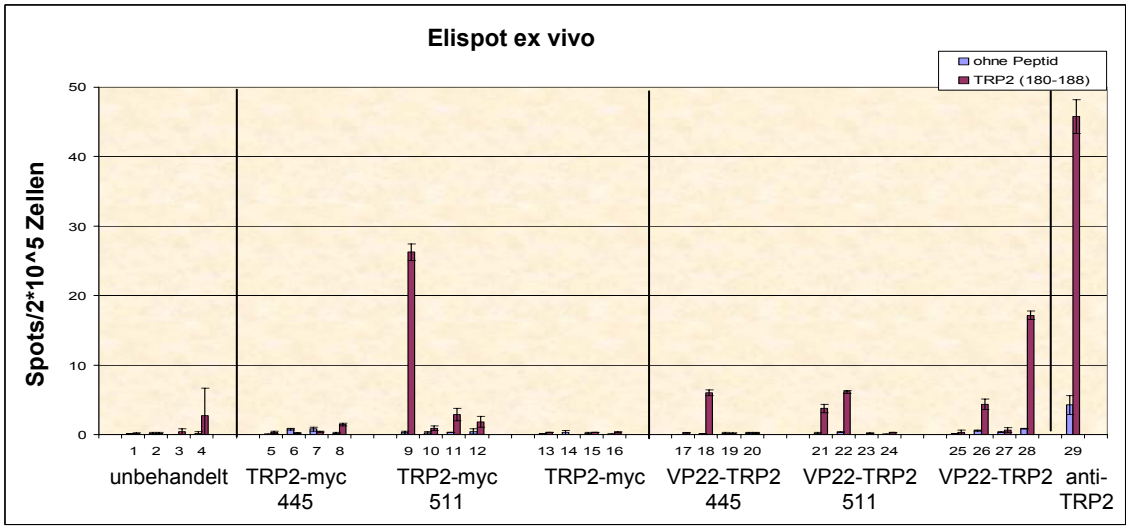


Abbildung 4.19: *Ex vivo*-Elispot zum zweiten Immunisierungsexperiment. Unbehandelte Tiere wurden als negative Kontrolle eingesetzt. Anti-Trp2 stellt eine auf das $TRP2_{180-188}$-Peptid spezifische Zelllinie cytotoxischer T-Lymphozyten dar, die als Positivkontrolle eingesetzt wurde (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. W.Osen).

Für Rezipient # 18 konnte nach Immunisierung mit pVP22-TRP2 445 eine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion beobachtet werden (6 Spots gegenüber 0 Spots ohne Peptid). Nach Immunisierung mit pVP22-TRP2 511 wurde für die Linien # 21 und # 22 mit 4 bzw. 6 Spots (gegenüber 0 Spots ohne Peptid) eine TRP2-Spezifität erhalten. Auch für die Immunisierung mit pVP22-TRP2 konnten für die Linien 26 und 28 TRP2-spezifische Antworten mit 4 bzw. 17 Spots (gegenüber je 1 Spot ohne Peptid) verzeichnet werden.

Legt man den Hintergrundwert für diesen Test bei 3 Spots, konnte für die Linien 11 und 12 aus der Gruppe pTRP2-myc 511-immunisierter Tiere keine Spezifität erhalten werden, jedoch lieferte Rezipient # 9 mit 26 Spots (gegenüber 0 Spots ohne Peptid) eine ausgeprägte TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion.

Die einzelnen Milzzellkulturen wurden anschließend mit TRP2-exprimierenden Transfektanten restimuliert und fünf Tage nach der Restimulierung sowohl über INF-γ-Elispot-Analyse als auch im ^{51}Cr-Freisetzungstest untersucht. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse aus beiden Untersuchungsmethoden konnte jedoch nur bedingt festgestellt werden. Die Daten des INF-γ-Elispot-Tests nach der ersten Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten ist in Abbildung 4.20 gezeigt:

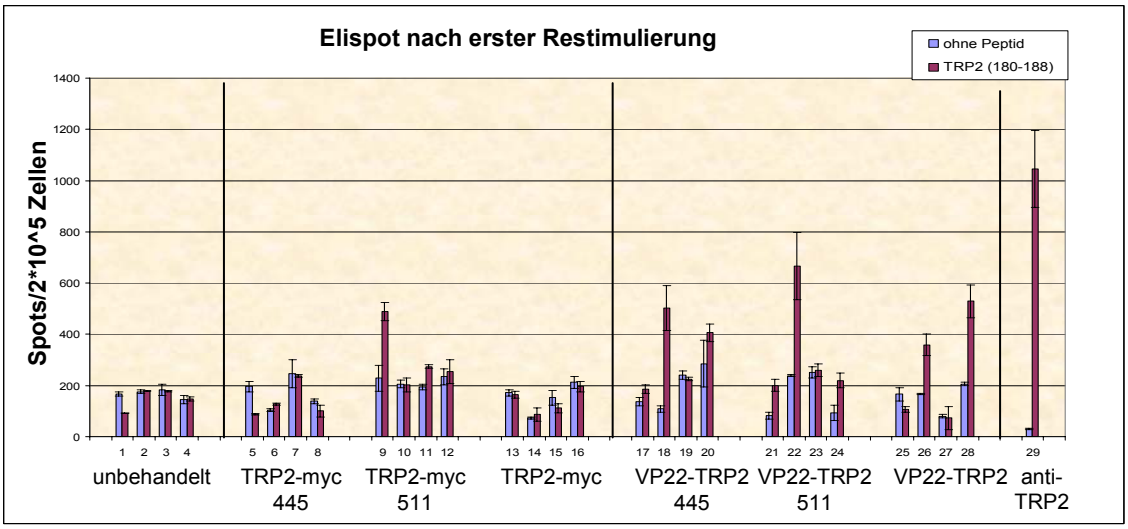
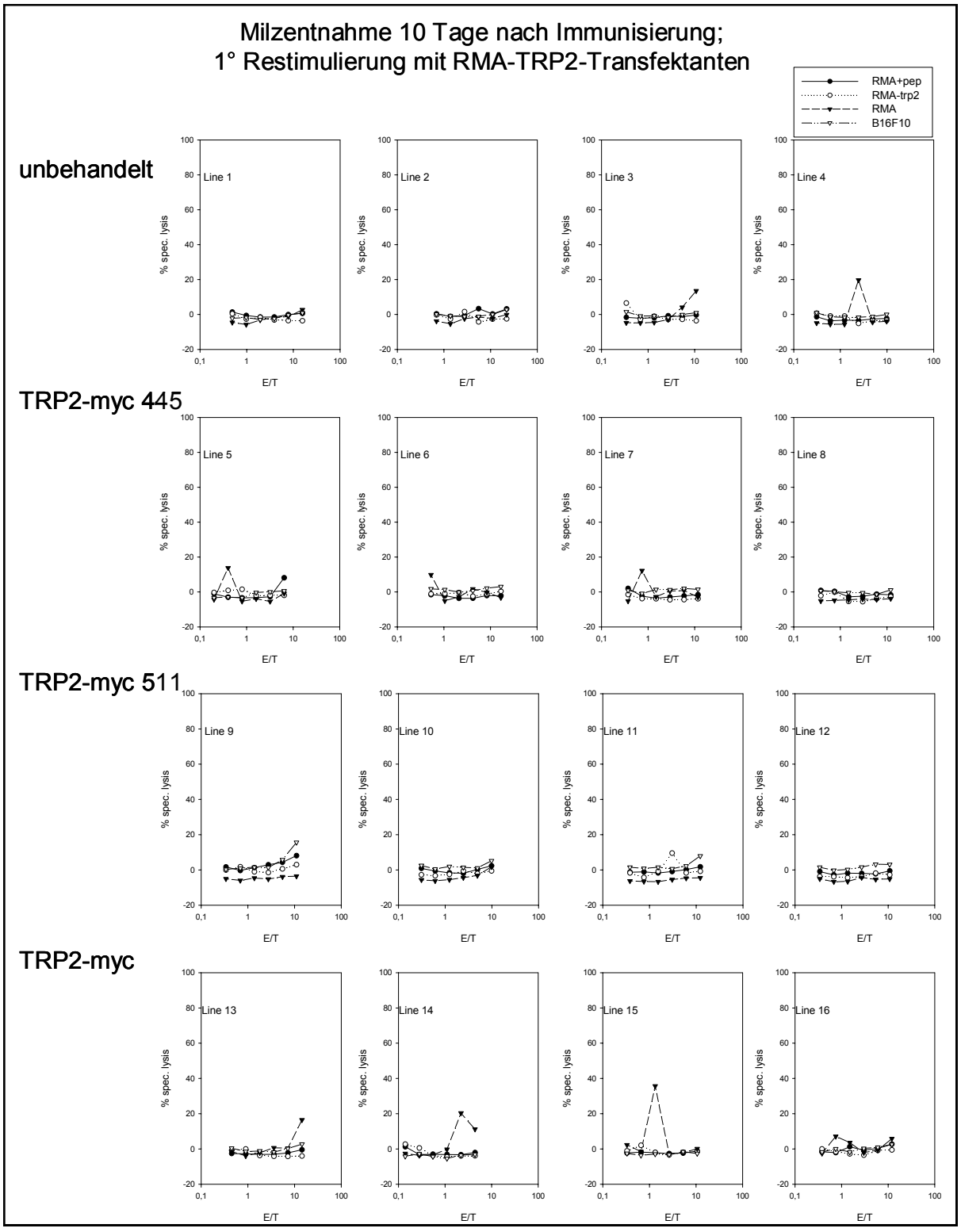


Abbildung 4.20: INF-γ-Elispot nach erster Restimulierung mit TRP2-exprimierenden Transfektanten. Nach der ersten Restimulierung der Milzzellen wurden diese im Elispot mit $TRP2_{180-188}$-Peptid stimuliert oder blieben unstimuliert. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt.

Tendenziell konnten nach der ersten Restimulierung der Milzzellkulturen mit RMA-TRP2-Transfektanten Ergebnisse aus der *ex vivo*-INF-γ-Elispot-Analyse bestätigt werden. Ein erhöhter Hintergrund von etwa 200 Spots wurde für sämtliche Linien erhalten. Dennoch treten die gleichen Linien hervor, die schon in der *ex vivo*-INF-γ-Analyse eine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion gezeigt haben: Linie 18 aus der Gruppe pVP22-TRP2-445-immunisierter Tiere zeigte eine INF-γ-Sekretion von 501 Spots (gegenüber 108 Spots ohne Peptid). In der Gruppe mit pVP22-TRP2 511 immunisierter Tiere lieferten die Linien 21 und 22 Werte von 200 Spots bzw. 660 Spots (gegenüber 81 Spots bzw. 238 Spots ohne Peptid). Rezipient # 24 aus der gleichen Gruppe kam als weitere Linie mit einem Wert von 220 (gegenüber 92 Spots ohne Peptid) dazu. Die Linien 26 und 28 zeigten TRP2-spezifische Spotzahlen von 358 bzw. 529 (gegenüber 167 Spots bzw. 206 Spots ohne Peptid). Linie 9 aus der Gruppe mit TRP2-myc 511 immunisierter Tiere erbrachte immer noch eine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion mit 489 Spots (gegenüber 228 Spots ohne Peptid).

Während die Elispot-Methode tendenziell für Milzzellkulturen aus Rezipienten, die mit einem VP22-enthaltenden Konstrukt immunisiert worden waren, eine TRP2-spezifische INF-γ-Freisetzung zeigte, waren entsprechende Ergebnisse des parallel durchgeführten ^{51}Cr-Freisetzungstests nur ansatzweise zu sehen (s. Abbildung 4.21):


Milzentnahme 10 Tage nach Immunisierung;
1° Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten
RMA+pep
RMA-trp2
RMA
B16F10
unbehandelt
TRP2-myc 445
TRP2-myc 511
TRP2-myc
Line 1
Line 2
Line 3
Line 4
Line 5
Line 6
Line 7
Line 8
Line 9
Line 10
Line 11
Line 12
Line 13
Line 14
Line 15
Line 16
% spec. lysis
E/T

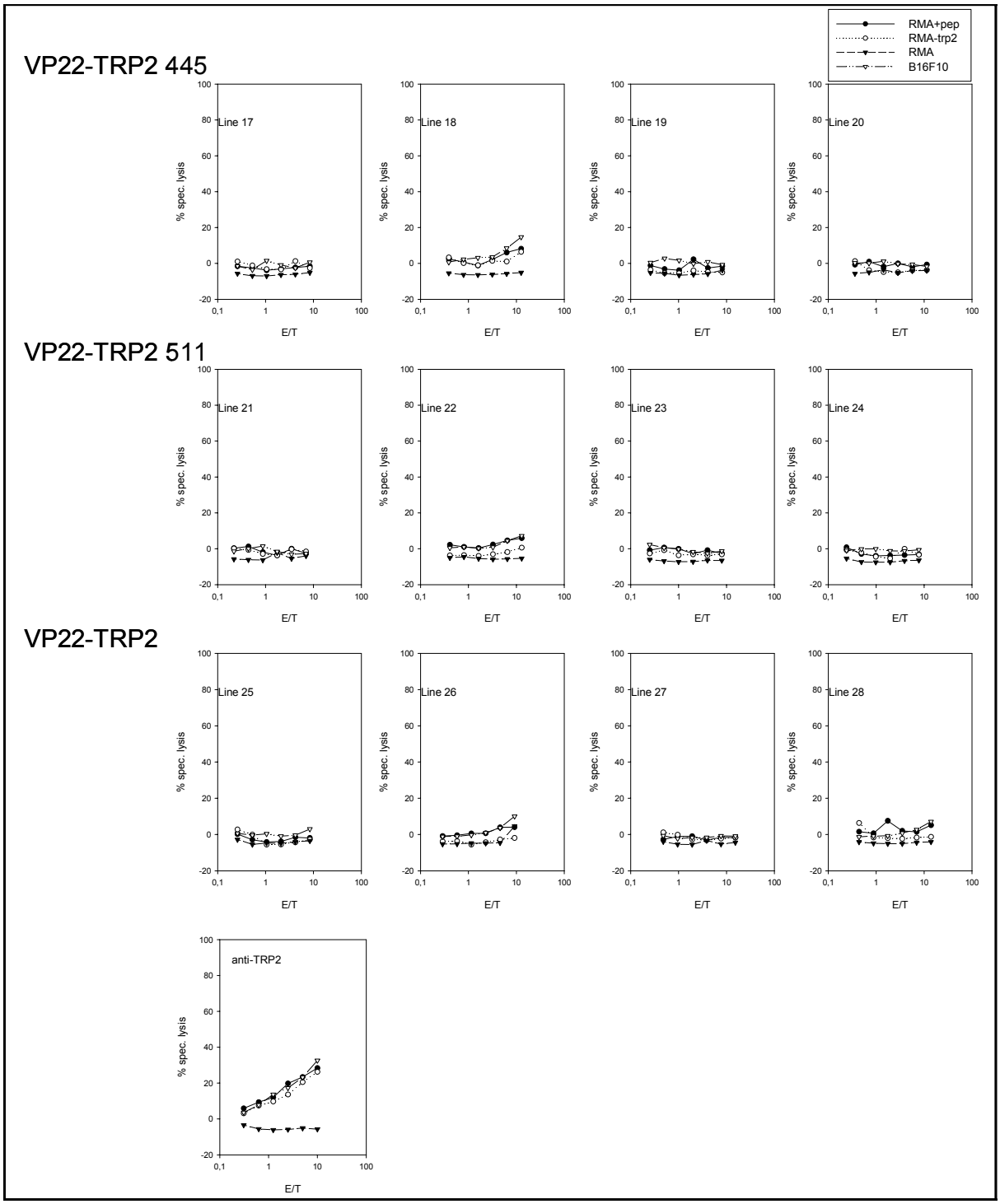


Abbildung 4.21: ^{51}Cr-Freisetzungdaten nach erster Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanen. Milzzellen aus Mäusen, die mit den Konstrukten pTRP2-myc 445, pTRP2-myc 511, pVP22-TRP2 445 oder pVP22-TRP2 511 immunisiert worden waren bzw. Milzzellen aus unbehandelten Mäusen wurden *in vitro* mit RMA-TRP2-Transfektanten einmal restimuliert. Anschließend wurden diese auf ihre cytotoxische Aktivität gegenüber RMA-Zellen, $TRP2_{180-188}$-Peptid [100 nM] beladenen RMA-Zellen, RMA-TRP2-Transfektanten und der murinen B16F10-Zelllinie getestet. Die Effektorzellen wurden jeweils mit $1X10^4$ radioaktiv markierten Zielzellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die in 100µl Überstand enthaltene Radioaktivität jeder Kultur im β-Counter gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt (freundlicherweise von Dr. Wolfram Osen zur Verfügung gestellt).

Ein Vergleich der Ergebnisse des INF-γ-Elispot-Tests mit den Ergebnissen aus dem ^{51}Cr-Freisetzungstest lieferte für die Linien # 9, # 18 und # 22 ansatzweise eine gute Korrelation, wenn auch auf niedrigem Niveau: Bei einem E:T-Verhältnis von 13:1 wurde für Linie # 18 eine Lyse von 7 % auf TRP2$_{180-188}$-Peptid beladenen RMA-Zellen, 7 % auf RMA-TRP2-Transfektanten und 15 % auf B16F10-Zellen beobachtet (gegenüber -5 % auf parentale RMA-Zellen). Linie 22 lieferte bei einem E:T-Verhältnis von 13:1 auf TRP2$_{180-188}$-Peptid beladene RMA-Zellen eine Lyse von 6 %, auf RMA-TRP2-Transfektanten eine Lyse von 1 % und auf B16F10-Zellen eine TRP2-spezifische Lyse von 7 % (gegenüber -5 % auf parentale RMA-Zellen). Für Linie 9 aus der Gruppe pTRP2-myc 511-immunisierter Tiere konnte bei E:T von 11:1 eine Lyse von 8 % auf TRP2$_{180-188}$-Peptid beladenen RMA-Zellen, 3 % auf RMA-TRP2-Transfektanten und 16 % auf B16F10-Zellen erhalten werden (gegenüber -3 % auf parentale RMA-Zellen). Eine TRP2-Spezifität für die übrigen im INF-γ-Elispot-Test positiven Linien konnte im ^{51}Cr-Freisetzungstest nicht bestätigt werden.

Nach einer zweiten Restimulierung der Milzzellkulturen mit RMA-TRP2-Transfektanten blieb das TRP2-spezifische INF-γ-Sekretionsmuster für alle Linien erhalten bzw. zeigte sich stärker ausgeprägt, d.h. es konnten Spotzahlen >600 erreicht werden, während der Hintergrund stets <200 blieb (s. Abbildung 4.22):

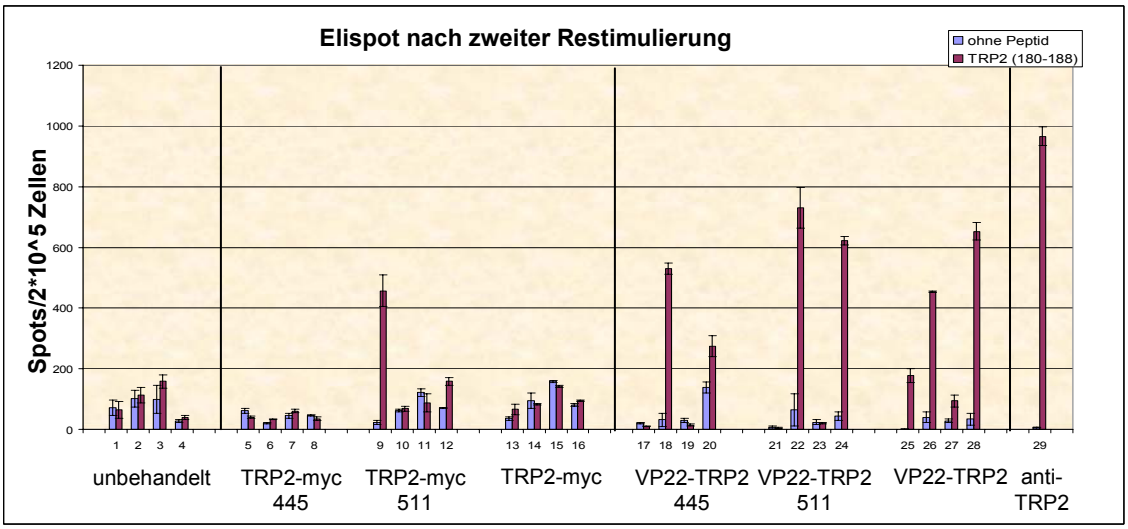
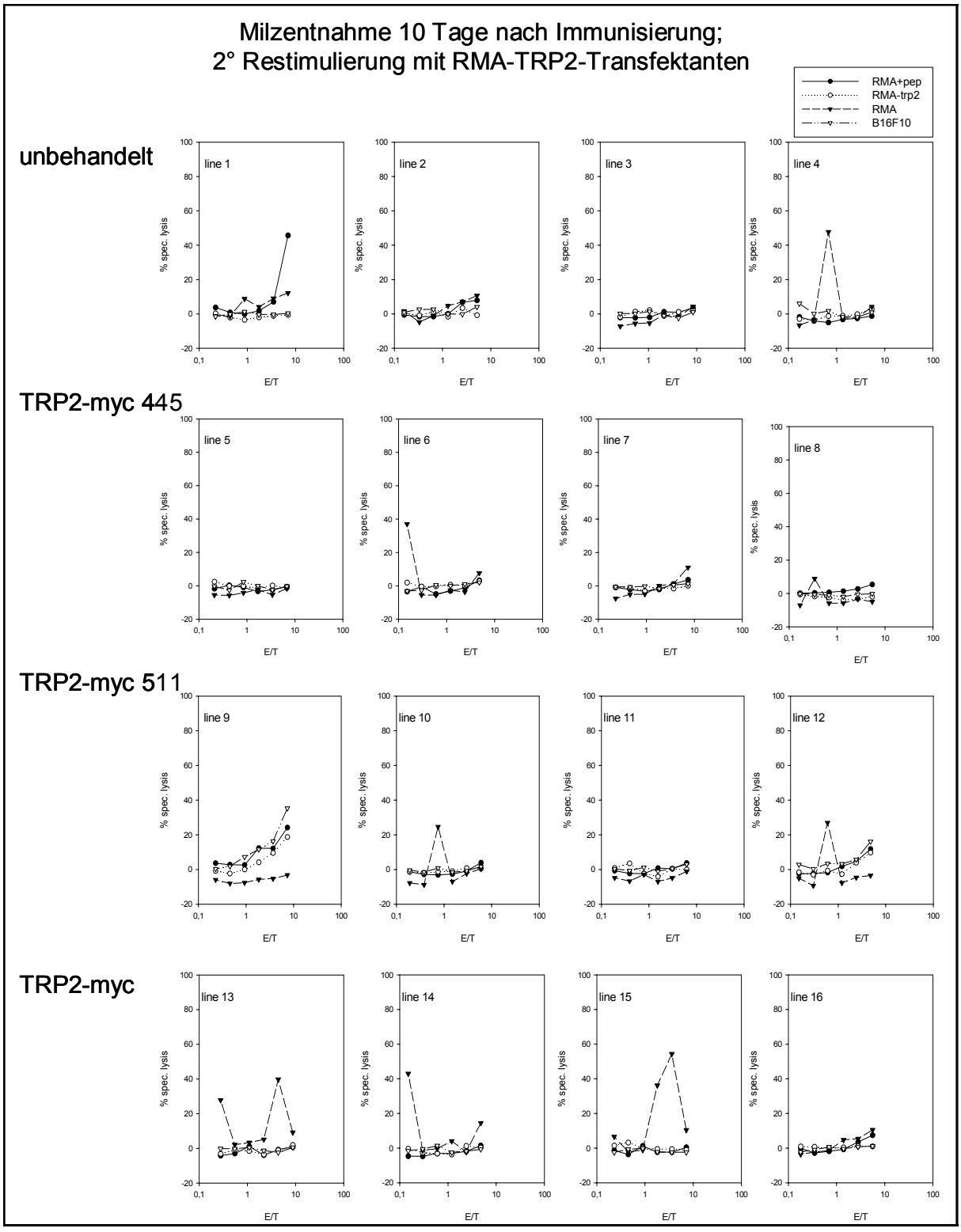


Abbildung 4.22: INF-γ-Sekretion nach zweimaliger Restimulierung. Milzzellkulturen wurden fünf Tage nach der zweiten Restimulierung mit TRP2-exprimierenden Transfektanten auf INF-γ-Sekretion bei Stimulierung mit 25 µl 1 µM TRP2$_{180-188}$-Peptid untersucht.

Aus der Gruppe mit pVP22-TRP2 445 immunisierter Tiere konnte für Rezipient #18 nach der zweiten Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten im INF-γ-Elispot-Test mit 529 Spots (gegenüber 32 Spots ohne Peptid) eine ausgeprägte TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion beobachtet werden. Linie 20 aus der gleichen Gruppe ist mit 274 Spots (gegenüber 138 Spots ohne Peptid) nur bedingt als spezifisch zu betrachten. Die Linien 22 und 24 aus der Gruppe der mit pVP22-TRP2 511 immunisierten Tiere lieferten mit 730 Spots bzw. 622 Spots(gegenüber 65 Spots bzw. 44 Spots ohne Peptid) eine TRP2-spezifische Antwort. Für Tiere, die mit pVP22-TRP2 immunisiert worden waren, zeigten die Rezipienten # 26 und # 28 nach der zweiten Restimulierung eine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion mit 454 Spots bzw. 653 Spots (gegenüber 40 Spots bzw. 34 Spots ohne Peptid). Die TRP2-speziifische INF-γ-Sekretion der Linien 25 und 27 blieb unter dem Hintergrundwert von 200 und wurden daher als nicht spezifisch gewertet. Eine ausgeprägte TRP2-spezifische Aktivität konnte ebenfalls für Linie 9 aus der Gruppe mit pTRP2-myc 511 immunisierter Tiere gesehen werden: Hier konnten 457 spezifische Spots gegenüber 23 Spots ohne Peptid erhalten werden.
Die Daten aus dem entsprechenden ^{51}Cr-Freisetzungstest zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit den Elispot-Daten (s. Abbildung 4.23):


Milzentnahme 10 Tage nach Immunisierung;
2° Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten
RMA+pep
RMA-trp2
RMA
B16F10
unbehandelt
TRP2-myc 445
TRP2-myc 511
TRP2-myc
line 1
line 2
line 3
line 4
line 5
line 6
line 7
line 8
line 9
line 10
line 11
line 12
line 13
line 14
line 15
line 16
% spec. lysis
E/T

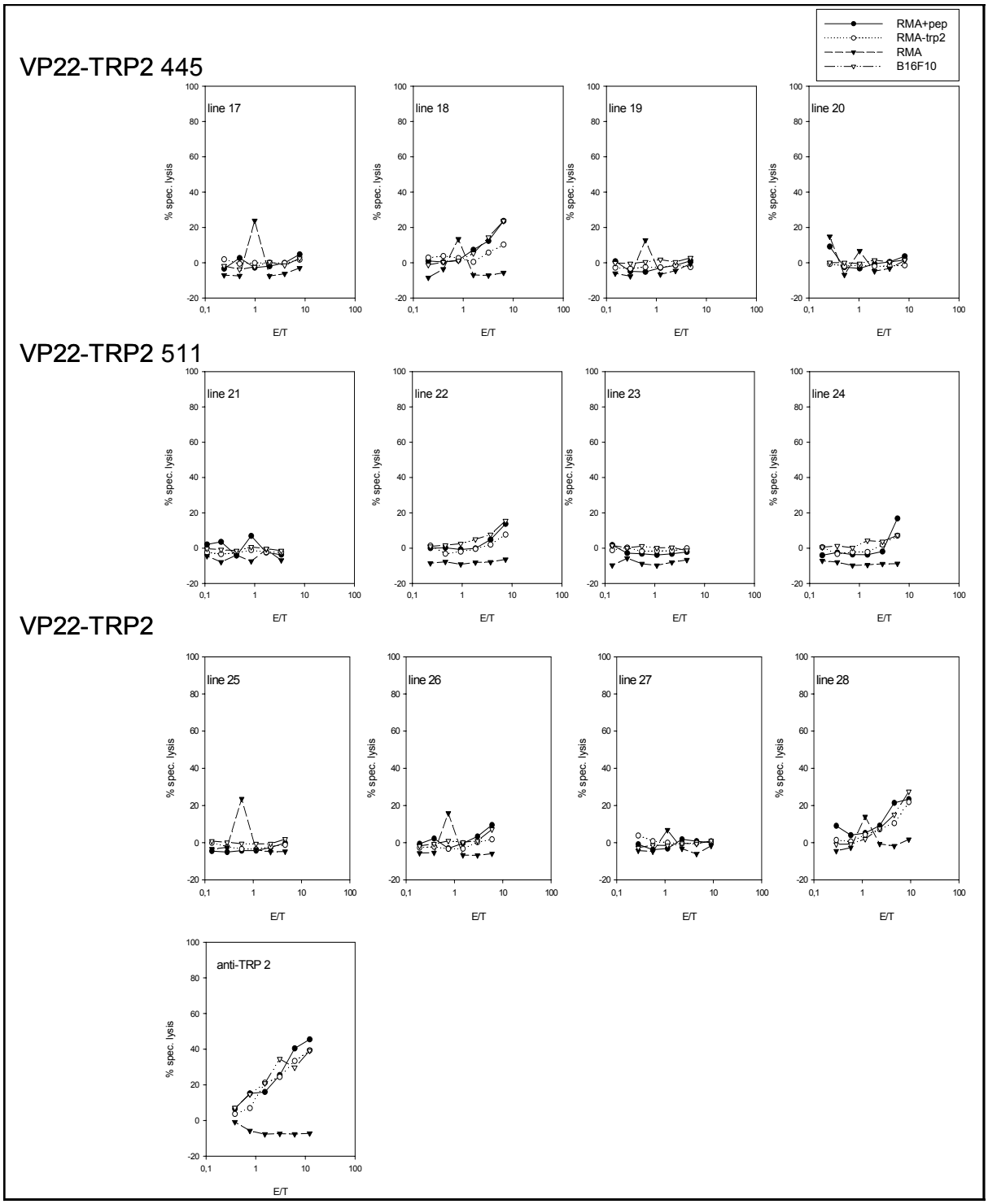


Abbildung 4.23: ^{51}Cr-Freisetzungdaten nach zweiter Restimulierung. Die Milzzellen aus den immunisierten Tieren wurden dreimal *in vitro* mit RMA-TRP2-Transfektanten restimuliert. Fünf Tage später wurden diese auf ihre cytotoxische Aktivität gegenüber RMA-Zellen, $TRP2_{180-188}$-Peptid [100 nM] beladenen RMA-Zellen, RMA-TRP2-Transfektanten und der murinen B16F10-Zelllinie getestet. Die Effektorzellen wurden jeweils mit $1X10^4$ radioaktiv markierten Zielzellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Die in 100µl Überstand enthaltene Radioaktivität jeder Kultur wurde im β-Counter gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt.

Wie in Abbildung 4.23 zu sehen, konnte für die Linie 18 bei einem E:T von 6:1 eine TRP2-spezifische cytolytische Aktivität von 10 % auf RMA-TRP2-

Transfektanten und 24 % sowohl auf peptidbeladene RMA-Zellen als auch auf B16F10-Zellen beobachtet werden (gegenüber -6 % auf RMA-Zellen). Linie 22 lieferte bei einem E:T von 7:1 eine TRP2-spezifische Lyse von 15 % auf B16F10-Zellen, 14 % auf $TRP2_{180-188}$-Peptid beladene RMA-Zellen und 8 % auf RMA-TRP2-Transfektanten (gegenüber -6 % auf RMA-Zellen). Für Rezipient # 24 wurde bei einem E:T-Verhältnis von 6:1 auf peptidbeladenen RMA-Zellen eine cytolytische Aktivität von 17 % beobachtet, während die Lyse sowohl auf B16F10-Zellen als auch auf RMA-TRP2-Transfektanten 7 % betrug (gegenüber -9 % auf RMA-Zellen). Die cytolytische Aktivität blieb auch für Rezipient # 26 mit 10 % auf peptidbeladene RMA-Zellen, 7 % auf B16F10-Zellen und nur 2 % auf RMA-Transfektanten (gegenüber -6 % auf RMA-Zellen) bei einem E:T von 6:1 gering. Für die Linie 28 konnte eine höhere Lyse beobachtet werden: Bei einem E:T von 9:1 wurden auf peptidbeladene RMA-Zellen 23 %, auf RMA-TRP2-Transfektanten 22 % und auf B16F10-Zellen 28 % Cytolyse erhalten (gegenüber 2 % auf RMA-Zellen). Weitere TRP2-spezifische Lysen konnten in der Gruppe mit pTRP2-myc 511 immunisierter Tiere beobachtet werden: Linie 9 zeigte bei einem E:T von 7:1 eine Lyse von 24 % auf peptidbeladene RMA-Zellen, 19 % auf RMA-TRP2-Transfektanten und 35 % auf B16F10-Zellen (gegenüber -3 % auf RMA-Zellen). Auch für die im INF-γ-Elispot-Test als unspezifisch betrachtet Linie 12 lieferte bei einem E:T von 5:1 12 % Lyse auf peptidbeladene RMA-Zellen, 10 % auf RMA-TRP2-Transfektanten und 16 % auf B16F10-Zellen (gegenüber -3 % auf RMA-Zellen).

Betrachtet man die INF-γ-Elispot-Analyse nach zweimaliger Restimulierung und definiert Werte >200 als positiv, wurde für Tiere, die mit einem VP22-enthaltenden Konstrukt immunisiert worden waren, in 6 von 12 Fällen eine TRP2-Spezifität beobachtet (50 %), während dies lediglich bei 1 von 12 Tieren, die mit einem Konstrukt ohne VP22-Anteil immunisiert worden waren, der Fall war (8 %). Eine Reproduzierbarkeit des ersten Experiments war somit gegeben. Auch die Immunisierung mit dem Konstrukt pVP22-TRP2 lieferte im Gegensatz zur Immunisierung mit pTRP2-myc eine effektivere Immunantwort, d.h. für die Induktion TRP2-spezifischer CTL-Antworten schien somit eine Deletion der hydrophoben Domänen nicht notwendig.

4.3.3.2.2 Bestimmung des Endotoxingehalts in den aufgearbeiteten Plasmidpräparationen

Da ein erhöhter Gehalt an Lipopolysaccharid (Endotoxin) zur unspezifischen Stimulierung des Immunsystems führen kann, wurde ein in Kapitel 3.3.4 beschriebener *Limulus amebocyte lysate* Test durchgeführt. Nach der in Kapitel 3.3.4 angegebenen Gleichung konnte für die Plasmidpräparationen folgender Endotoxingehalt berechnet werden:

	pVP22-TRP2	pVP22-TRP2 dC	pVP22-TRP2 511	pVP22-TRP2 445	pTRP2-myc	pTRP2-myc dC	pTRP2-myc 511	pTRP2-myc 445
EF	$1{,}9\times10^{-3}$	$1{,}9\times10^{-3}$	$7{,}5\times10^{-3}$	6×10^{-2}	6×10^{-2}	$7{,}5\times10^{-3}$	$7{,}5\times10^{-3}$	$7{,}5\times10^{-3}$
K	$3{,}7\times10^{-3}$	$7{,}5\times10^{-3}$	$7{,}5\times10^{-3}$	$1{,}5\times10^{-2}$	$7{,}5\times10^{-3}$	$7{,}5\times10^{-3}$	$7{,}5\times10^{-3}$	$1{,}5\times10^{-2}$
Faktor	1,9	3,9	1	4	8	1	1	2

Tabelle 5: Endotoxin-Gehalt der isolierten DNA. Angaben in EU/ml. (EF = „endofree“ aufgereinigte Plasmidpräparation, K = konventionelle Plasmidpräparation)

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass der Gehalt an Endotoxin in Präparationen konventionell aufgearbeiteter Plasmide zwischen $3{,}7*10^{-3}$ und $1{,}5*10^{-2}$ EU/ml schwankte und in Präparationen unter Verwendung eines „Endofree-Mega-Kit“ zwischen $1{,}9*10^{-3}$ und $6*10^{-2}$ EU/ml lag.

Der zunächst angenommene Einfluss des Endotoxingehalts in den verwendeten Plasmidpräparationen auf die Induktion einer Immunantwort, wurde in diesem Experiment nicht beobachtet. Dennoch wurden in den folgenden Experimenten Plasmidpräparationen verwendet, die mittels „endofree“-Kit aufgereinigt worden waren. Allerdings sollte hier beachtet werden, dass die gezeigte Untersuchung lediglich für eine einzelne Charge der verwendeten Kits durchgeführt wurde.

4.3.3.3 Zweites Wiederholungsexperiment mit TRP2-spezifischen Fusionskonstrukten nach Aufarbeitung mit sog. „Endofree“ Kits

Das in Kapitel 4.3.3.2 beschriebene Experiment wurde wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für die verwendete „Endofree“-aufgereinigte Plasmid-DNA zu überprüfen. Wie bei den Experimenten zuvor wurde aus den entnommenen Milzen Kulturen angelegt, die am Tag der Milzentnahme mit Hilfe des INF-γ-Elispot-Tests untersucht wurden, wobei die verbleibenden Milzzellen mit TRP2-exprimierenden Transfektanten *in vitro* restimuliert wurden. In Abbildung 4.24 sind die Daten zum *ex vivo* durchgeführten INF-γ-Elispot-Test zu sehen:

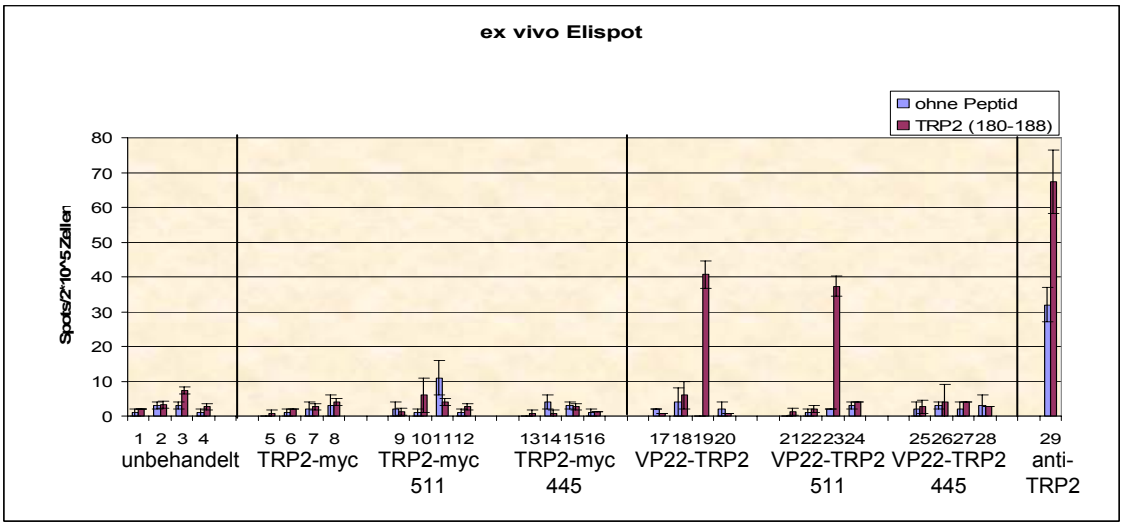


Abbildung 4.24: *Ex vivo*-Elispot-Test. Zehn Tage nach Immunisierung mit je 100 µg „Endofree aufgereinigter“ DNA pro Maus wurden C57BL/6 Mäuse getötet und deren Milzzellen auf INF-γ-Sekretion nach Stimulierung mit 25 µl 1 µM $TRP2_{180-188}$-Peptid untersucht. Unbehandelte Mäuse dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt (anti-TRP2).

Im *ex vivo* durchgeführten Elispot-Test konnte für die Linien 19 und 23 nach Immunisierung mit pVP22-TRP2 445 bzw. pVP22-TRP2 511 eine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion beobachtet werden (41 Spots bzw. 37 Spots gegenüber 0 bzw. 2 Spots). Fünf Tage nach der ersten Restimulierung mit RMA-TRP2 Transfektanten wurden die Kulturen erneut im Elispot-Test auf ihre INF-γ-Freisetzung und im ^{51}Cr-Freisetzungstest auf ihre TRP2-spezifische cytotoxische Aktivität untersucht.

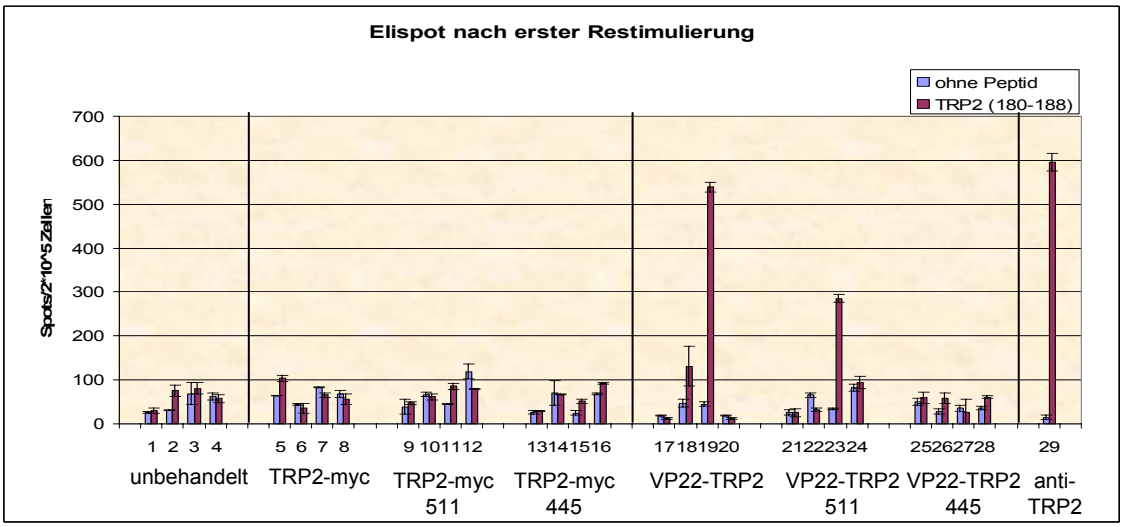
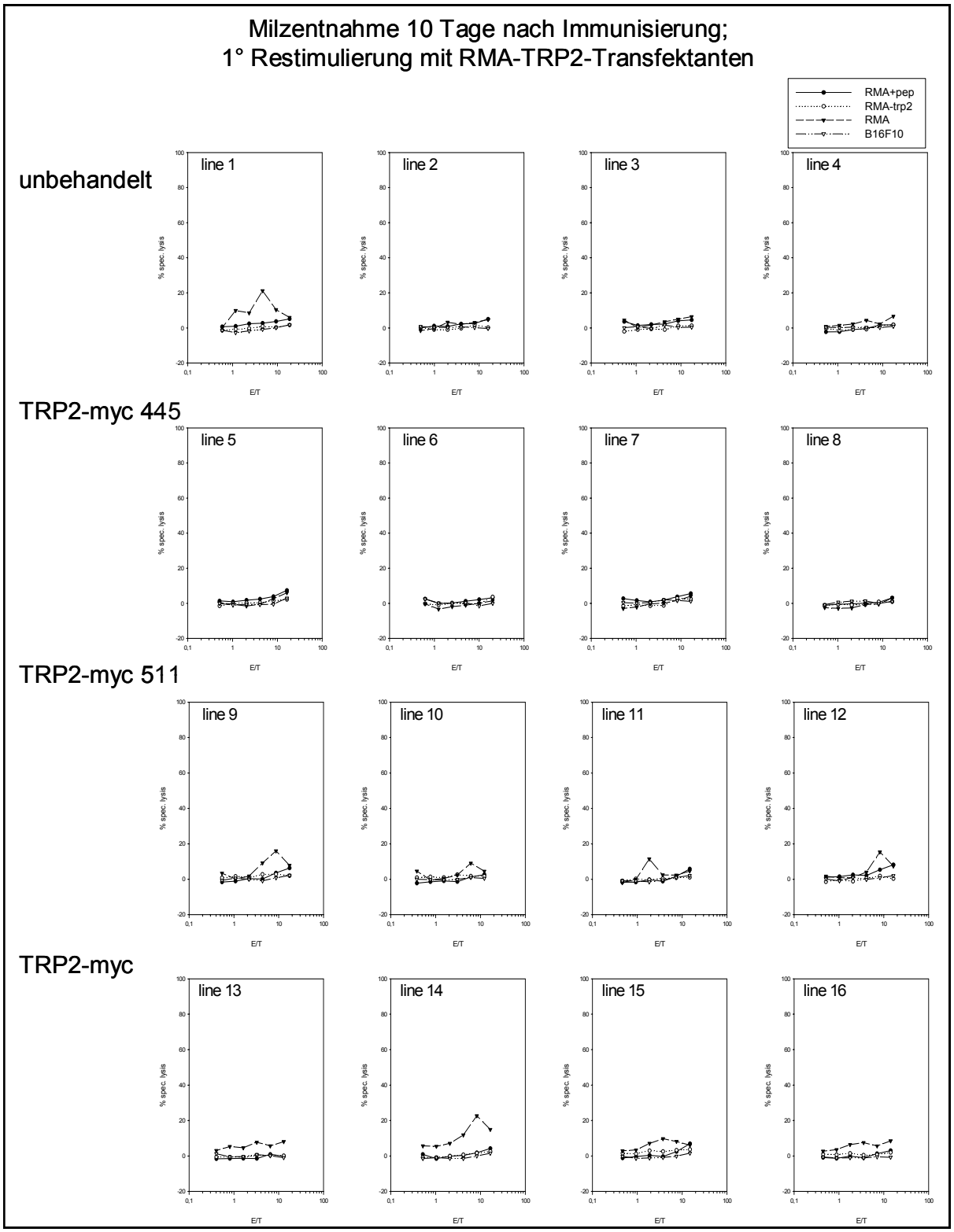


Abbildung 4.25: INF-γ-Elispot-Analyse nach erster Restimulierung. Restimulierte Kulturen wurden mit 25 µl [1 µM] $TRP2_{180-188}$-Peptid 16 Std. stimuliert. Als Negativkontrolle blieben diese Kulturen unbehandelt.

Hier ist erkennbar, dass die Linien 19 und 23 gegenüber der bereits in der *ex vivo*-durchgeführten Elispot-Analyse gezeigten TRP2-spezifischen INF-γ-Freisetzung mit einer Spezifität von 539 Spots (gegenüber 45 Spots ohne Peptid) für Rezipient # 19 bzw. 285 (gegenüber 35 Spots ohne Peptid) für Rezipient # 23 stark erhöht war. Linie 18 zeigte als weitere Kultur eine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion, die mit 131 Spots (gegenüber 47 Spots ohne Peptid) allerdings nur unwesentlich über dem Hintergrundwert von 100 Spots lag. Der parallel erstellte ^{51}Cr-Freisetzungstest ist in Abbildung 4.26 dargestellt:


Milzentnahme 10 Tage nach Immunisierung;
1° Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten
RMA+pep
RMA-trp2
RMA
B16F10
unbehandelt
TRP2-myc 445
TRP2-myc 511
TRP2-myc
line 1
line 2
line 3
line 4
line 5
line 6
line 7
line 8
line 9
line 10
line 11
line 12
line 13
line 14
line 15
line 16
% spec. lysis
% spec. lysis
E/T

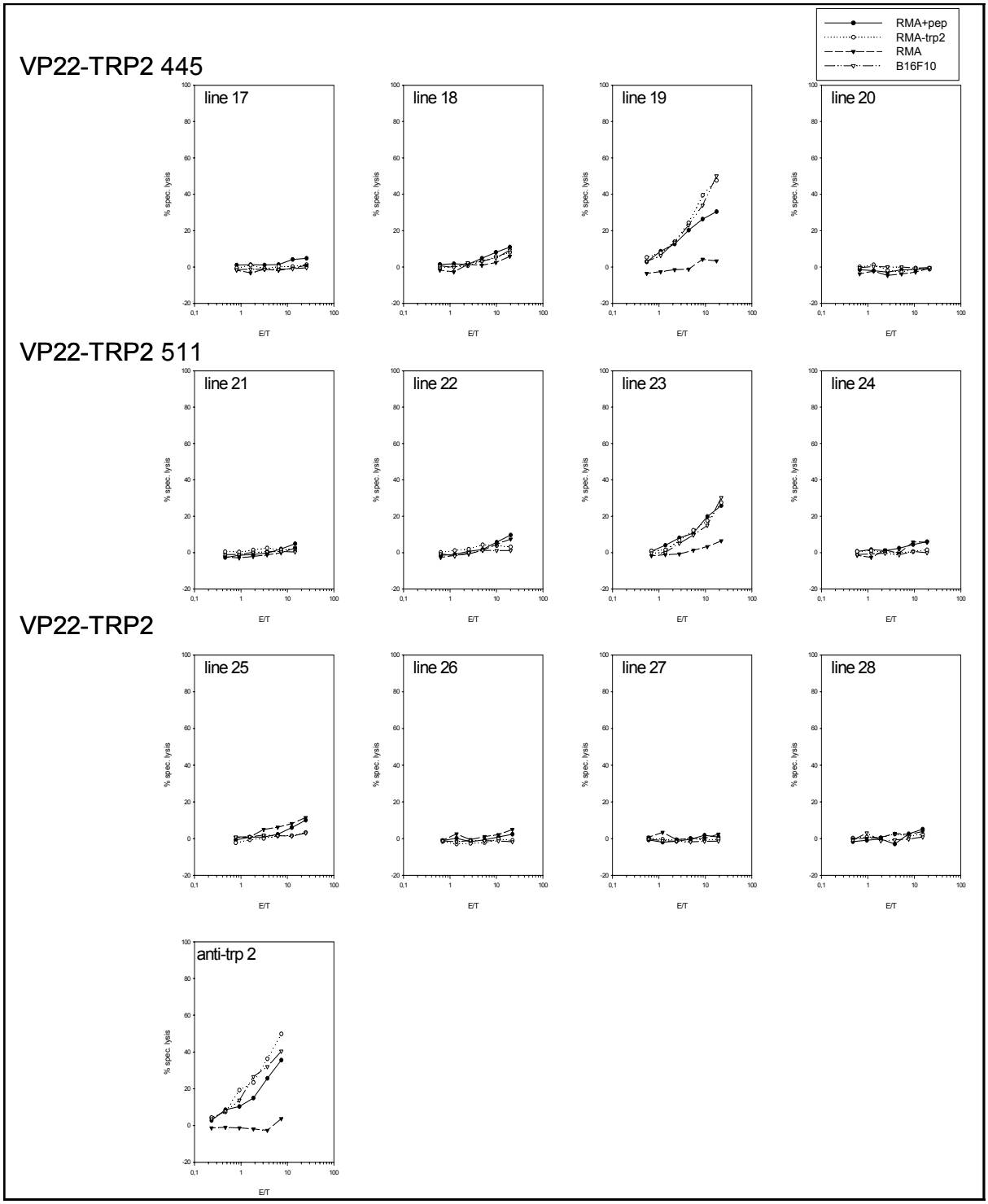


Abbildung 4.26: ^{51}Cr-Freisetzungdaten nach erster Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanen. Milzzellen aus Mäusen, die mit den Konstrukten pTRP2-myc 445, pTRP2-myc 511, pVP22-TRP2 445 oder pVP22-TRP2 511 immunisiert worden waren bzw. Milzzellen aus unbehandelten Mäusen wurden *in vitro* mit RMA-TRP2-Transfektanten einmal restimuliert. Anschließend wurden diese auf ihre cytotoxische Aktivität gegenüber RMA-Zellen, $TRP2_{180-188}$-Peptid [100 nM] beladenen RMA-Zellen, RMA-TRP2-Transfektanten und der murinen B16F10-Zelllinie getestet. Die Effektorzellen wurden jeweils mit $1X10^4$ radioaktiv markierten Zielzellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die in 100µl Überstand enthaltene Radioaktivität jeder Kultur im β-Counter gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt (freundlicherweise von Dr. Wolfram Osen zur Verfügung gestellt).

Für die Linien 19 und 23 konnte eine gute Korrelation zwischen der TRP2-spezifischen cytotoxischen Aktivität und dem TRP2-spezifischen INF-γ-Sekretionsmuster (s. Abbildung 4.25) nach erster Restimulierung beobachtet werden: Während Linie 19 bei einem E:T-Verhältnis von 17:1 eine ausgeprägte TRP2-spezifische Lyse von 50 % auf TRP2-exprimierenden B16F10-Melanomzellen, 48 % Cytolyse auf die RMA-TRP2-Transfektanten und 30 % auf Peptid-beladenen RMA-Zellen erkennen ließ, lieferte Linie 23 – bei einem E:T-Verhältnis von 22:1 eine Lyse von 30 % auf B16F10-Melanomzellen, 27 % auf RMA-TRP2-Transfektanten und 26 % auf peptidbeladene RMA-Zellen. Nach einer zweiten Restimulierung der Milzzellkulturen mit RMA-TRP2-Transfektanten konnten im INF-γ-Elispot-Test die in Abbildung 4.27 gezeigten Daten erhalten werden:

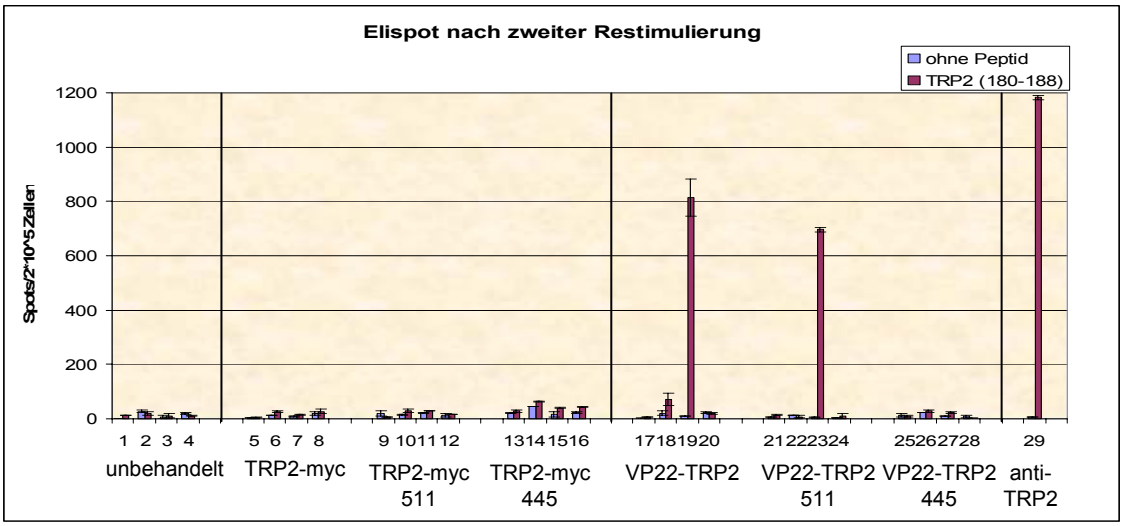
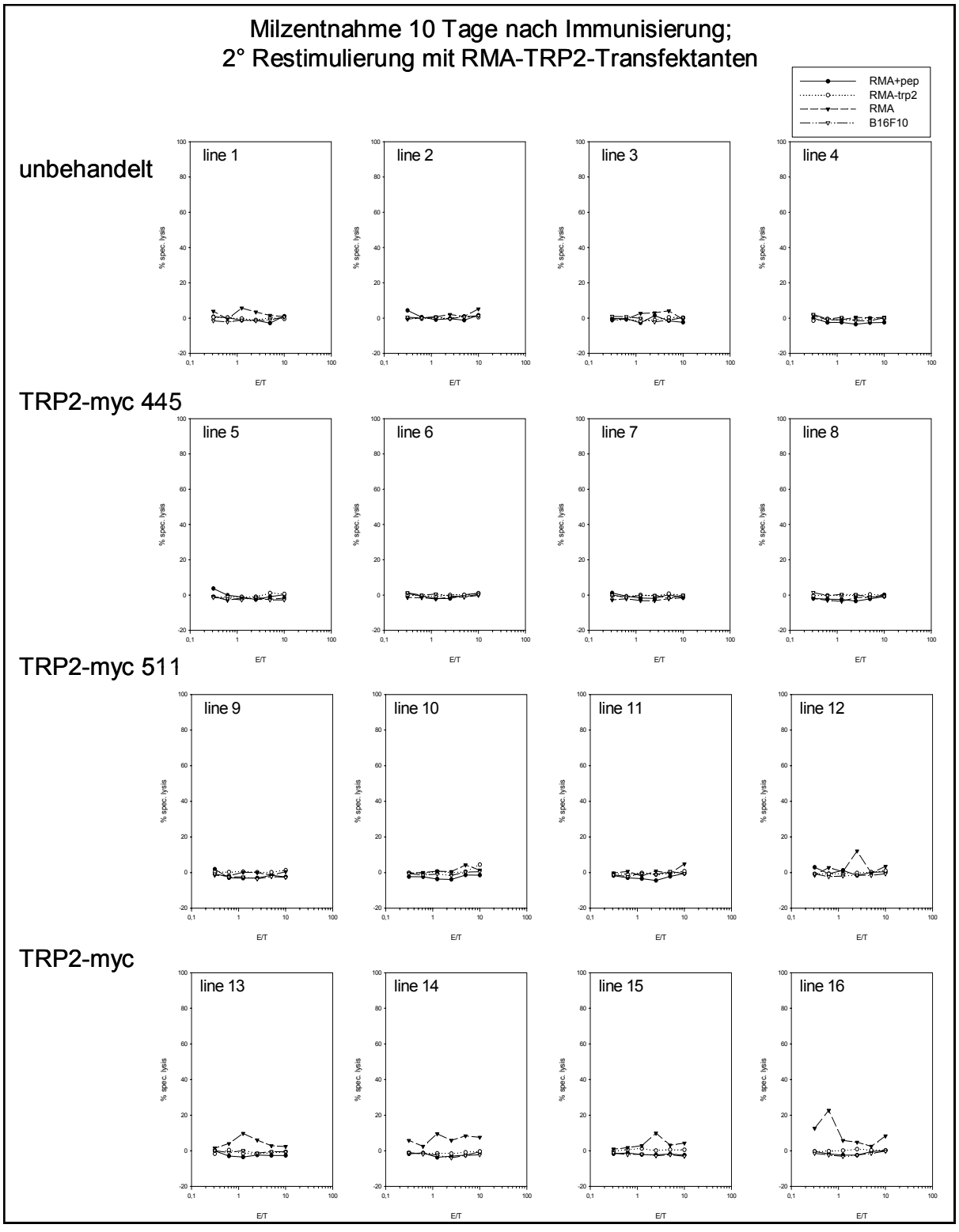


Abbildung 4.27: Elispotdaten zur INF-γ-sekretion nach zweiter Restimulierung. Milzzellkulturen wurden fünf Tage nach der zweiten Restimulierung mit TRP2-exprimierenden Transfektanten auf spezifische INF-γ-Sekretion bei Stimulierung mit 25 µl 1 µM $TRP2_{180-188}$-Peptid untersucht.

Die TRP2-Spezifität der Linien 19 und 23 aus den vorangegangenen Untersuchungen konnte in diesem Test bestätigt werden. Mit 814 Spots (gegenüber 10 Spots ohne Peptid) bzw. 697 Spots (gegenüber 5 Spots ohne Peptid) lieferten die Linien 19 und 23 eine stark ausgeprägte hoch spezifische INF-γ-Sekretion durch TRP2-spezifische CTLs. Die entsprechenden Diagramme zum parallel durchgeführten ^{51}Cr-Freisetzungstest sind in Abbildung 4.28 zu sehen:


Milzentnahme 10 Tage nach Immunisierung;
2° Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten
RMA+pep
RMA-trp2
RMA
B16F10
unbehandelt
TRP2-myc 445
TRP2-myc 511
TRP2-myc
line 1
line 2
line 3
line 4
line 5
line 6
line 7
line 8
line 9
line 10
line 11
line 12
line 13
line 14
line 15
line 16
% spec. lysis
E/T

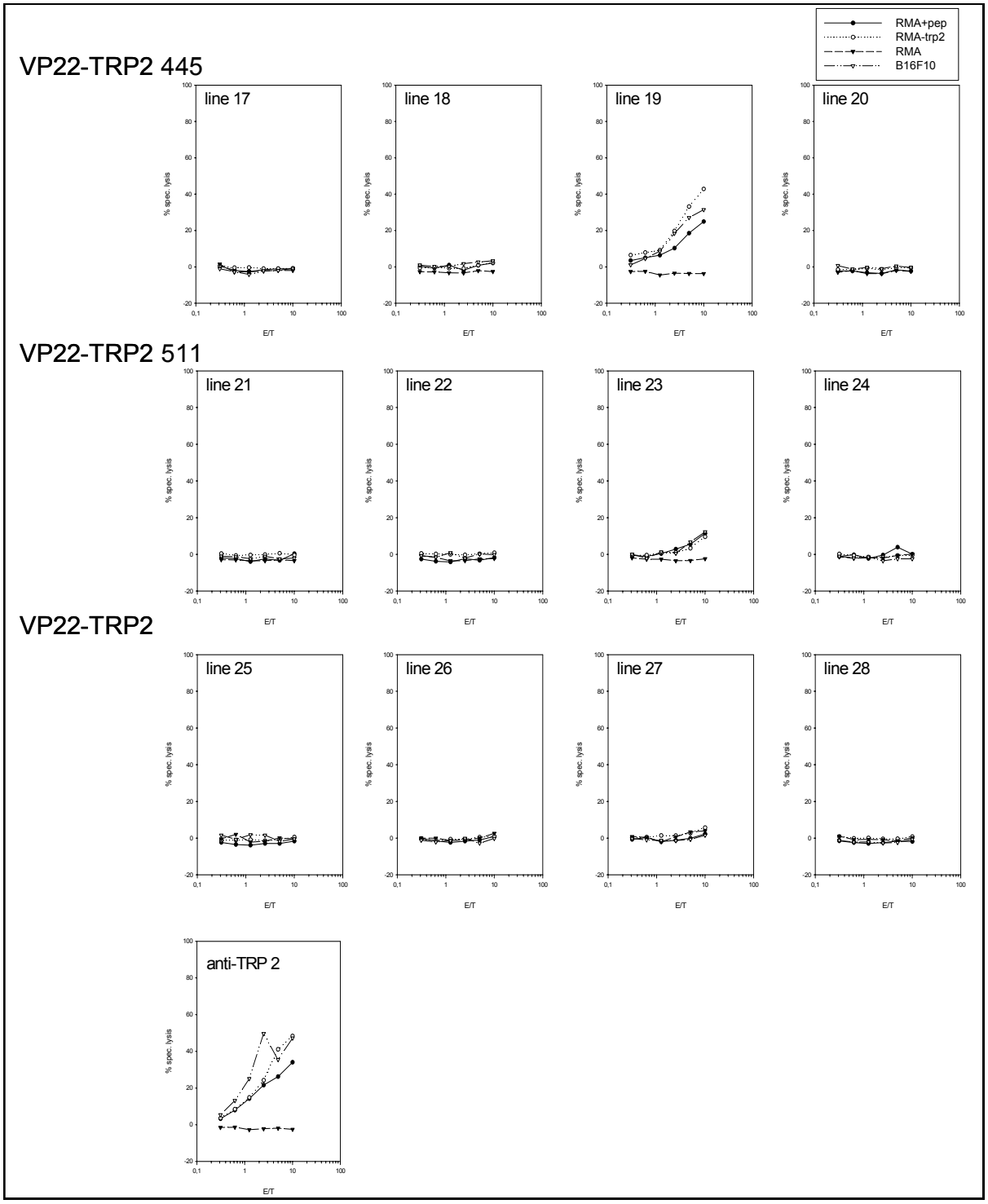


Abbildung 4.28: ^{51}Cr-Freisetzungstest nach zweiter Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten. Die Milzzellen aus den immunisierten Tieren wurden dreimal *in vitro* mit RMA-TRP2-Transfektanten restimuliert. Fünf Tage später wurden diese auf ihre cytotoxische Aktivität gegenüber RMA-Zellen, $TRP2_{180-188}$-Peptid [100 nM] beladenen RMA-Zellen, RMA-TRP2-Transfektanten und der murinen B16F10-Zelllinie getestet. Die Effektorzellen wurden jeweils mit $1X10^4$ radioaktiv markierten Zielzellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Die in 100µl Überstand enthaltene Radioaktivität jeder Kultur wurde im β-Counter gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt.

Während die cytolytische Aktivität der Linie 19 bei einem E:T-Verhältnis von 12:1 eine TRP2-spezifische Lyse von 31 % auf die TRP2-exprimierenden B16F10-Melanomzellen, 43 % Cytolyse auf die RMA-TRP2-Transfektanten und 25 % auf Peptid-beladenen RMA-Zellen liefert, konnte für Linie 23 bei einem E:T-Verhältnis von 16:1 eine Lyse von 12 % auf B16F10-Melanomzellen, 10 % auf RMA-TRP2-Transfektanten und 11 % auf peptidbeladene RMA-Zellen beobachtet werden.

Die Daten sowohl aus dem INF-γ-Elispot-Test als auch aus dem ^{51}Cr-Freisetzungstest nach zweimaliger Restimulierung führten zu der Annahme, dass möglicherweise ein geringerer Endotoxingehalt der hier verwendeten Plasmidpräparationen für die schwächere Induktion einer Immunantwort verantwortlich sein könnte. Der Endotoxingehalt der in diesem Experiment verwendeten Plasmid-DNA wurde hier jedoch nicht getestet. In diesem Experiment lieferten lediglich zwei von 12 der mit einem VP22-Konstrukt immunisierten Tiere eine TRP2-spezifische Antwort (16 %), während es im Vergleich dazu im ersten Wiederholungsexperiment 50 % waren.

4.3.3.4 Viertes Experiment: Einfluss einer wiederholten Immunisierung

In einem vierten Experiment sollte der Einfluss einer zusätzlichen Immunisierung (*boosten)* auf die erhaltene Immunantwort untersucht werden. Dazu wurde zunächst die zweifache Anzahl von Mäusen mit über „Endofree-Kit“-aufgereinigten Plasmidpräparationen immunisiert. Die eine Hälfte dieses Kollektivs wurde zehn Tage später getötet und deren Milzzellen wie oben beschrieben *in vitro* analysiert. Die zweite Hälfte wurde vierzehn Tage später erneut immunisiert und weitere zehn Tage später splenektomiert. Der *ex vivo* durchgeführte INF-γ-Elispot-Test für das erste Versuchstierkollektiv ergab das in Abbildung 4.29 zu sehende Diagramm:

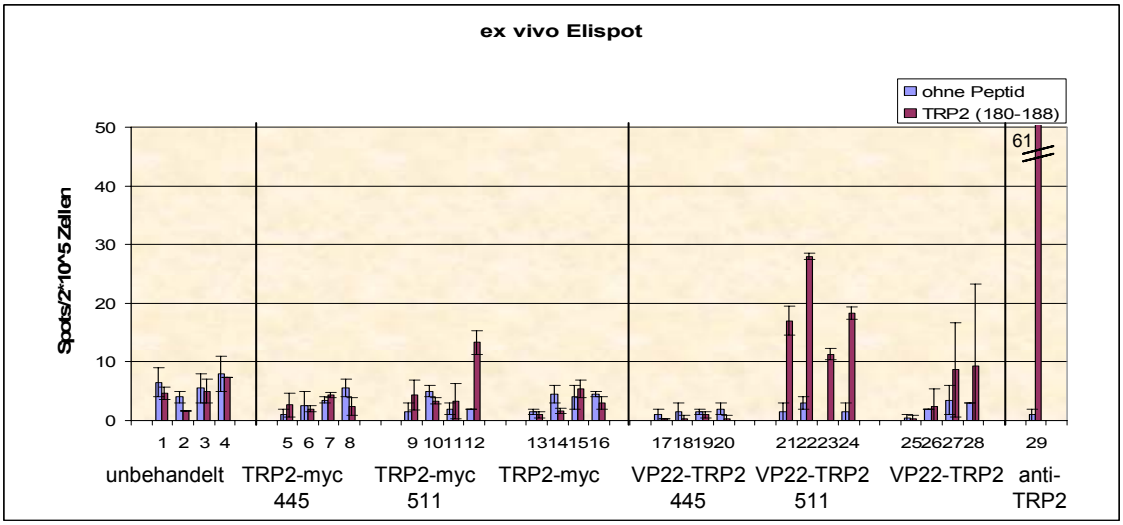


Abbildung 4.29: Elispot-Daten zu *ex vivo* untersuchten Milzzellkulturen des ersten Versuchstierkollektivs. Zehn Tage nach Immunisierung mit je 100 µg endfree aufgereinigter DNA pro Maus wurden C57BL/6 Mäuse getötet und deren Milzzellen auf INF-γ-Sekretion nach Stimulierung mit 1 µM $TRP2_{180-188}$-Peptid untersucht. Unbehandelte Mäuse dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt (anti-TRP2).

Schon im *ex vivo* durchgeführten INF-γ-Elispot-Test war in allen vier Rezipienten der Gruppe VP22-TRP2 511 (Linien 21 bis 24) eine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion zu erkennen. Während in der Gruppe mit pVP22-TRP2 511 immunisierter Tiere alle vier Milzzellkulturen mit 18 bis 28 Spots (gegenüber 0 bis 3 Spots ohne Peptid) eine TRP2-spezifische Antwort erkennen ließen, konnte diese in der analogen Gruppe ohne VP22-Anteil nur für Linie 12 mit 13 Spots (gegenüber 2 Spots ohne Peptid) festgestellt werden.

Nach einer ersten Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten wurden die Milzzellkulturen erneut auf das Vorhandensein TRP2-spezifischer CTLs und deren INF-γ-Sekretion mittels INF-γ-Elispot-Analyse untersucht (s. Abbildung 4.30):

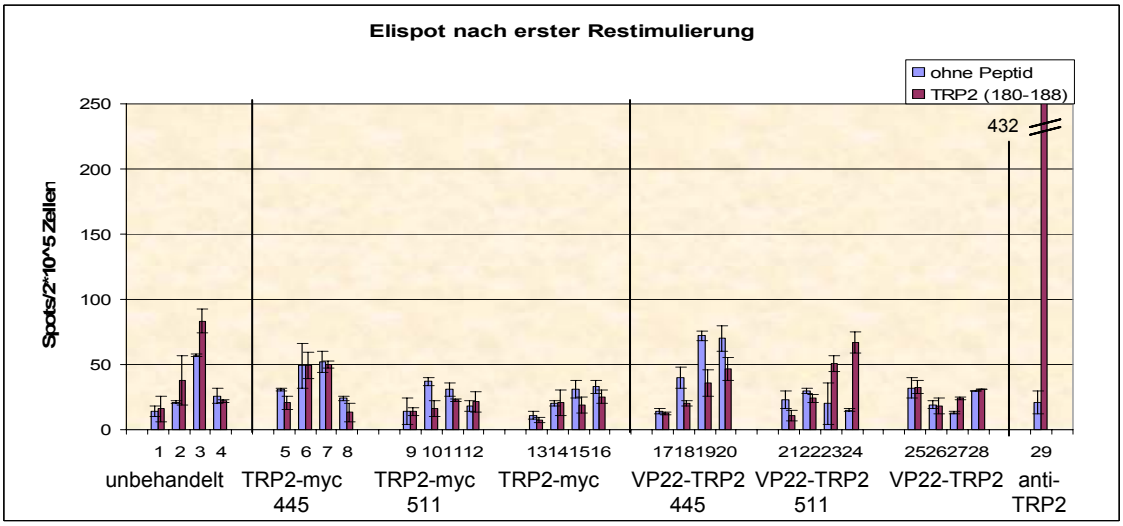
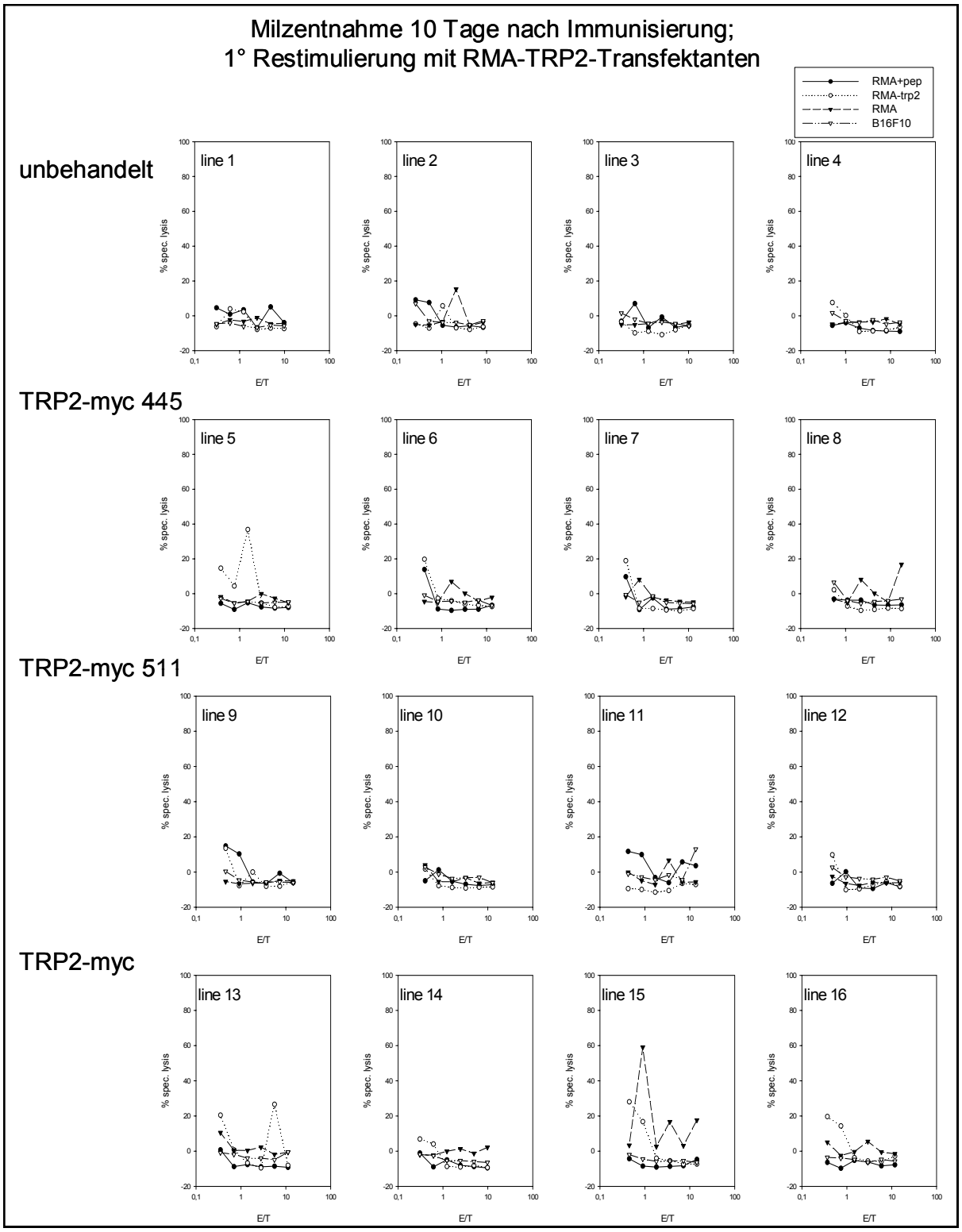


Abbildung 4.30: INF-γ-Elispot-Analyse nach erster Restimulierung. Restimulierte Kulturen des ersten Versuchstierkollektivs wurden mit 25 µl [1 µM] $TRP2_{180-188}$-Peptid 16 Std. stimuliert. Als Negativkontrolle blieben diese Kulturen unbehandelt.

In der Gruppe mit VP22-TRP2 511 immunisierter Tiere ist die TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion für die Linien 23 und 24 mit 51 bzw. 67 Spots (gegenüber 20 bzw. 15 Spots ohne Peptid) erhalten geblieben. Allerdings ist ein Verlust der Spezifität für die Linien 21 und 22, die Linien 27 und 28 sowie für Linie 12 zu erkennen. Alle anderen Gruppen zeigten keine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion. Der parallel erstellte ^{51}Cr-Freisetzungstest lieferte die in Abbildung 4.31 zu sehenden Diagramme:


Milzentnahme 10 Tage nach Immunisierung;
1° Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten
RMA+pep
RMA-trp2
RMA
B16F10
unbehandelt
TRP2-myc 445
TRP2-myc 511
TRP2-myc
line 1
line 2
line 3
line 4
line 5
line 6
line 7
line 8
line 9
line 10
line 11
line 12
line 13
line 14
line 15
line 16
% spec. lysis
E/T

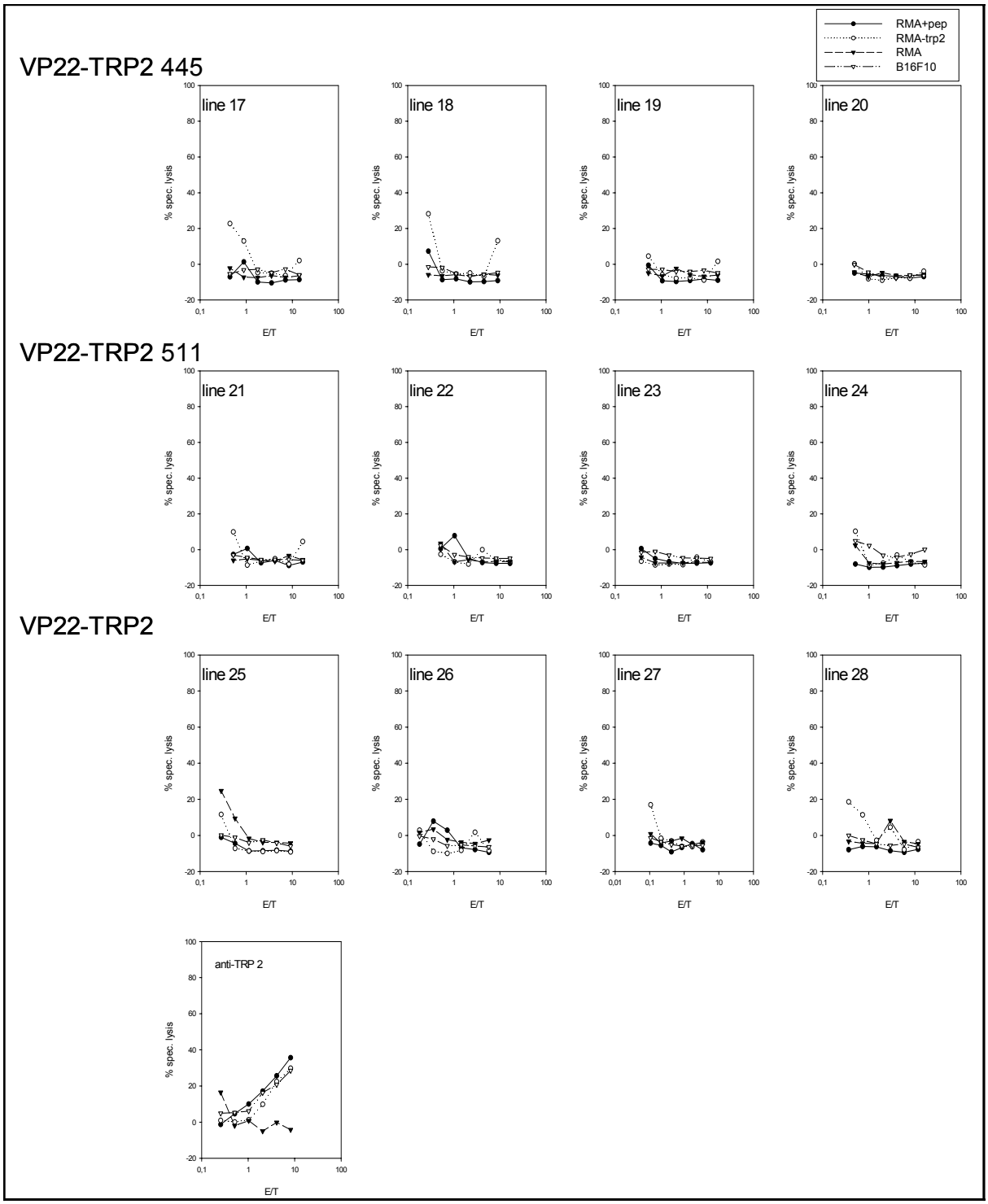


Abbildung 4.31: ^{51}Cr-Freisetzungdaten nach erster Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanen. Milzzellen aus Mäusen, die mit den Konstrukten pTRP2-myc 445, pTRP2-myc 511, pVP22-TRP2 445 oder pVP22-TRP2 511 immunisiert worden waren bzw. Milzzellen aus unbehandelten Mäusen wurden *in vitro* mit RMA-TRP2-Transfektanten einmal restimuliert. Anschließend wurden diese auf ihre cytotoxische Aktivität gegenüber RMA-Zellen, $TRP2_{180-188}$-Peptid [100 nM] beladenen RMA-Zellen, RMA-TRP2-Transfektanten und der murinen B16F10-Zelllinie getestet. Die Effektorzellen wurden jeweils mit $1X10^4$ radioaktiv markierten Zielzellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die in 100µl Überstand enthaltene Radioaktivität jeder Kultur im β-Counter gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt (freundlicherweise von Dr. Wolfram Osen zur Verfügung gestellt).

Die im INF-γ-Elispot-Test beobachtete schwach ausgeprägte TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion der Linien 23 und 24 konnte im ^{51}Cr-Freisetzungstest nicht bestätigt werden. Die als positive Kontrolle verwendete $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie (anti-TRP2) zeigt eine eindeutige Funktionalität des durchgeführten Tests, da TRP2-spezifische Zielzellen bis zu 40 % spezifische Lyse auf sämtlichen TRP2-exprimierende Zielzellen zeigen. Für allen anderen Milzzellkulturen konnte keine TRP2-spezifische Lyse erhalten werden. Nach einer weiteren Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten wurde erneut sowohl ein INF-γ-Elispot-Test als auch parallel ein ^{51}Cr-Freisetzungstest durchgeführt (s. Abbildungen 4.32 und 4.33):

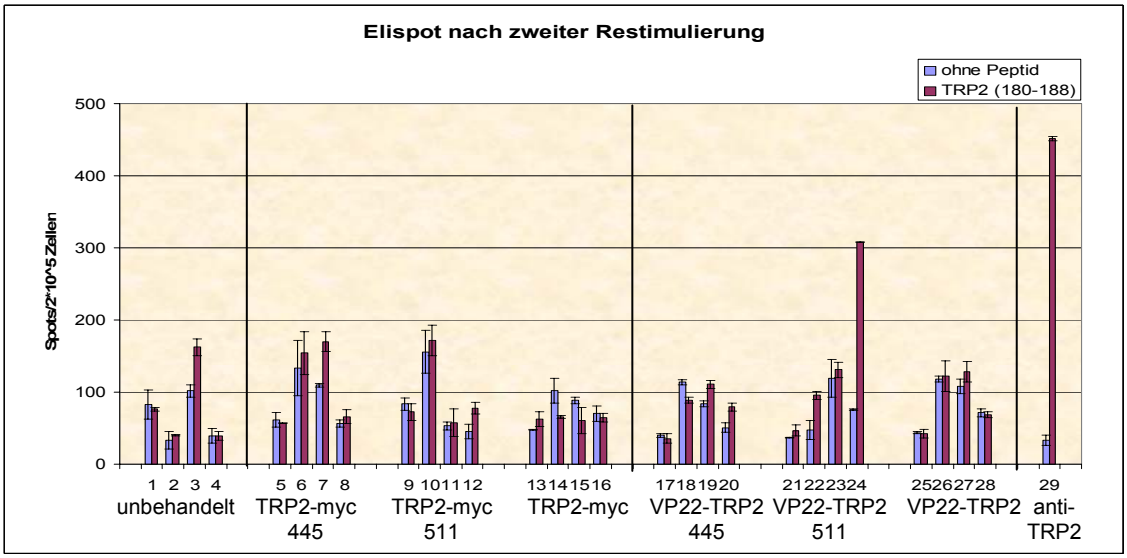
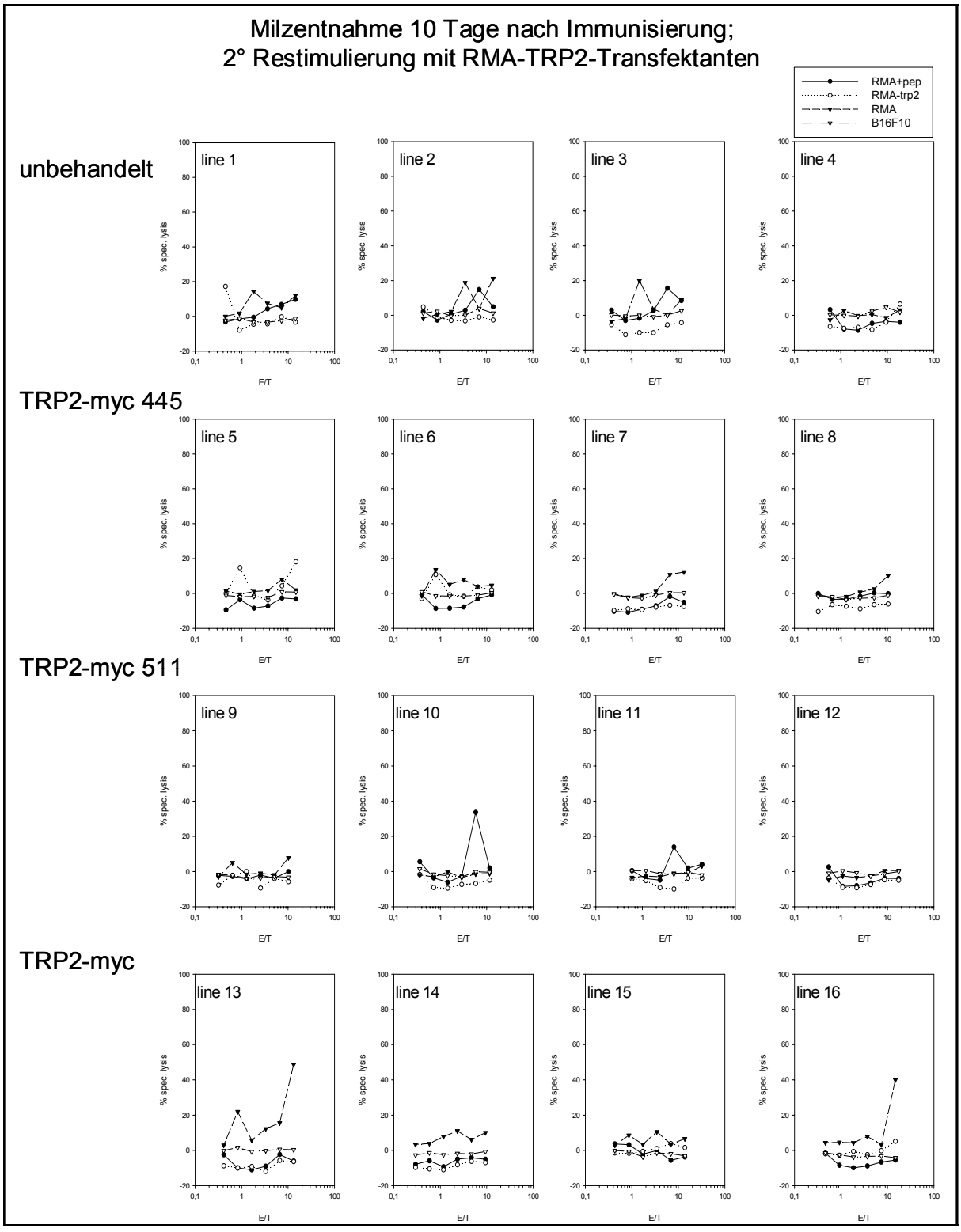


Abbildung 4.32: Elispotdaten zur INF-γ-Sekretion nach zweiter Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten. Milzzellkulturen des ersten Versuchstierkollektivs wurden fünf Tage nach der zweiten Restimulierung mit TRP2-exprimierenden Transfektanten auf spezifische INF-γ-Sekretion bei Stimulierung mit 25 µl [1 µM] $TRP2_{180-188}$-Peptid untersucht. Als Negativkontrolle blieben diese Kulturen unbehandelt.

Nach der zweiten Restimulierung konnte im INF-γ-Elispot-Test eine deutliche TRP2-Spezifität in der Gruppe mit VP22-TRP2 511 immunisierter Tiere für die Linie 24 gemessen werden, allerdings wurde gleichzeitig ein Rückgang der noch nach der ersten Restimulierung gesehenen Spezifität für Linie 23 beobachtet. In allen weiteren Gruppen konnte keine TRP2-Spezifität gemessen werden. Die entsprechenden Daten des ^{51}Cr-Freisetzungstest zeigt Abbildung 4.33:


Milzentnahme 10 Tage nach Immunisierung;
2° Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten
RMA+pep
RMA-trp2
RMA
B16F10
unbehandelt
TRP2-myc 445
TRP2-myc 511
TRP2-myc
line 1
line 2
line 3
line 4
line 5
line 6
line 7
line 8
line 9
line 10
line 11
line 12
line 13
line 14
line 15
line 16
% spec. lysis
E/T

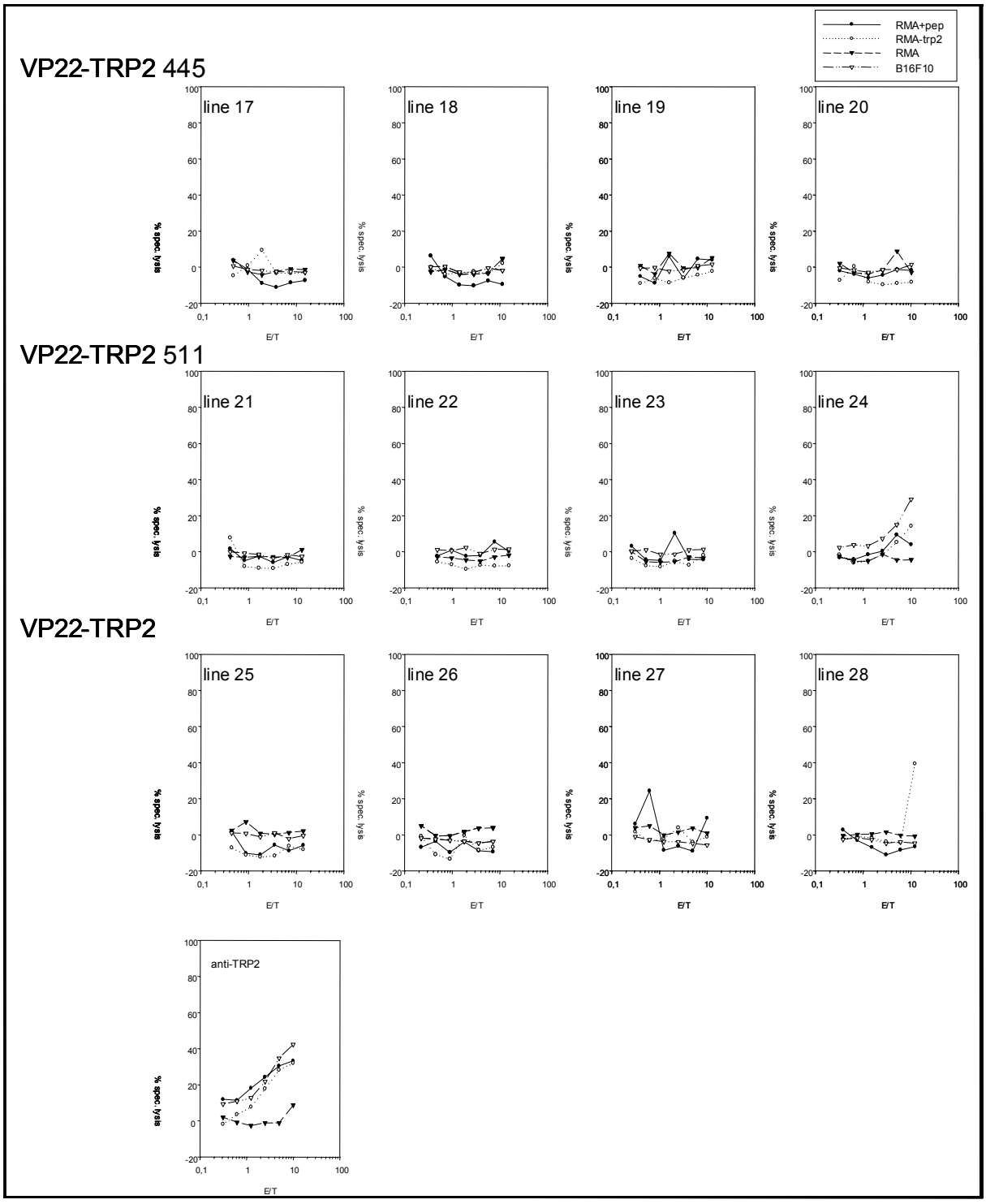
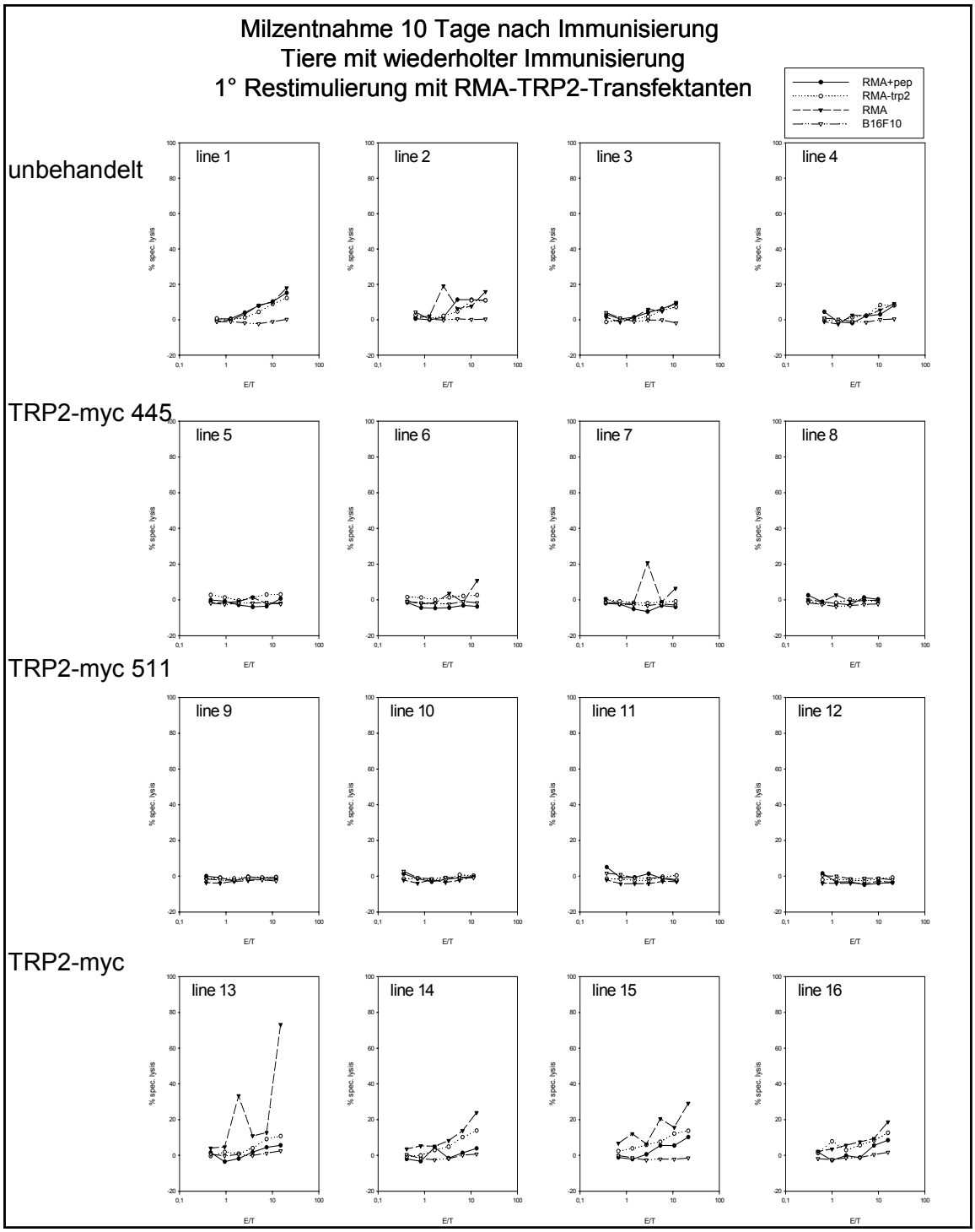


Abbildung 4.33: ^{51}Cr-Freisetzungstest nach zweiter Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten. Die Milzzellen aus den immunisierten Tieren des ersten Kollektivs wurden dreimal *in vitro* mit RMA-TRP2-Transfektanten restimuliert. Fünf Tage später wurden diese auf ihre cytotoxische Aktivität gegenüber RMA-Zellen, $TRP2_{180-188}$-Peptid [100 nM] beladenen RMA-Zellen, RMA-TRP2-Transfektanten und der murinen B16F10-Zelllinie getestet. Die Effektorzellen wurden jeweils mit $1X10^4$ radioaktiv markierten Zielzellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Die in 100µl Überstand enthaltene Radioaktivität jeder Kultur wurde im β-Counter gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt.

Während für Linie 24 bei einem E:T-Verhältnis von 11:1 eine TRP2-spezifische Lyse von 4 % auf $TRP2_{180-188}$-Peptid beladene RMA-Zellen, 14 % Lyse auf RMA-TRP2-Transfektanten bzw. 29 % Lyse auf die murinen B16F10-Zellen erhalten wurde (gegenüber -4 % auf RMA-Zellen), konnte die gering ausgeprägte TRP2-spezifische Aktivität der Linie 7 aus der INF-γ-Elispot-Analyse im ^{51}Cr-Freisetzungstest nicht bestätigt werden. Alle übrigen Linien wiesen keine mit dieser Methode messbare TRP2-Spezifität auf.

Werden die Daten aus dem INF-γ-Elispot-Test nach zweimaliger Restimulierung und ein Hintergrundwert bei 200 Spots zugrunde gelegt, konnte aus der Reihe der Tiere, die mit einem VP22-enthaltenden Konstrukt immunisiert worden waren für ein Tier von 12 (8 %) eine TRP2-spezifische Antwort erhalten werden.

Für das zweite Versuchstierkollektiv, das vierzehn Tage nach der ersten Immunisierung eine weitere Injektion des gleichen Konstrukts in gleicher Konzentration erhalten hatte, konnten im *ex vivo* durchgeführten INF-γ-Elispot-Test keine Spots detektiert werden. Dennoch wurden die Milzzellkulturen mit RMA-TRP2-Transfektanten restimuliert und fünf Tage später erneut mit beiden Methoden untersucht. Hierbei konnte der INF-γ-Elispot-Test aufgrund technischer Probleme nicht ausgewertet werden Die Ergebnisse des parallel angefertigten ^{51}Cr-Freisetzungstests sind in Abbildung 4.34 dargestellt:


Milzentnahme 10 Tage nach Immunisierung
Tiere mit wiederholter Immunisierung
1° Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten
RMA+pep
RMA-trp2
RMA
B16F10
unbehandelt
TRP2-myc 445
TRP2-myc 511
TRP2-myc
line 1
line 2
line 3
line 4
line 5
line 6
line 7
line 8
line 9
line 10
line 11
line 12
line 13
line 14
line 15
line 16
% spec. lysis
E/T

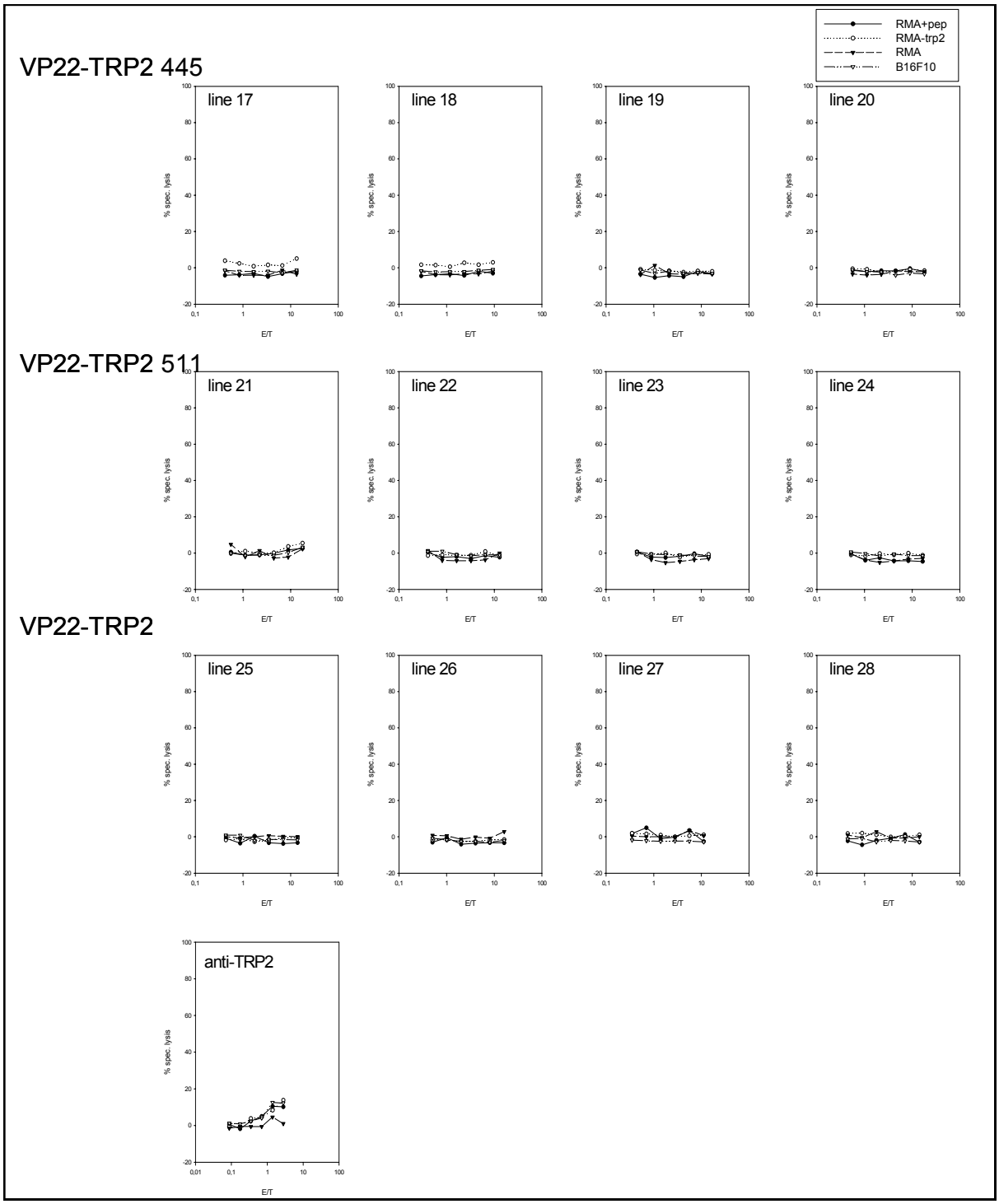


Abbildung 4.34: ^{51}Cr-Freisetzungdaten nach erster Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanen. Milzzellen aus Mäusen des zweiten Versuchstierkollektivs, die wiederholt mit den Konstrukten pTRP2-myc 445, pTRP2-myc 511, pVP22-TRP2 445 oder pVP22-TRP2 511 immunisiert worden waren bzw. Milzzellen aus unbehandelten Mäusen wurden einmal *in vitro* mit RMA-TRP2-Transfektanten restimuliert. Anschließend wurden diese auf ihre cytotoxische Aktivität gegenüber RMA-Zellen, $TRP2_{180-188}$-Peptid [100 nM] beladenen RMA-Zellen, RMA-TRP2-Transfektanten und der murinen B16F10-Zelllinie getestet. Die Effektorzellen wurden jeweils mit $1X10^4$ radioaktiv markierten Zielzellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die in 100µl Überstand enthaltene Radioaktivität jeder Kultur im β-Counter gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt (freundlicherweise von Dr. Wolfram Osen zur Verfügung gestellt).

Für keine der Rezipienten konnte im Cr-Freisetzungstest eine TRP2-spezifische cytolytische Aktivität erhalten werden. Die bei unbehandelten Tieren gesehene Spezifität ist RMA-spezifisch, da parentale RMA-Zellen erkannt wurden, d.h. es fand ein Zelllinien-spezifisches *in-vitro-priming* statt. In keiner weiteren Linie konnte eine TRP2-spezifische Aktivität nachgewiesen werden.
Auch hier wurden die Linien einer weiteren Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten unterzogen und anschließend mittels INF-γ-Elispot-Analyse und ^{51}Cr-Freisetzungstest untersucht (s. Abbildungen 4.35 und 4.36):

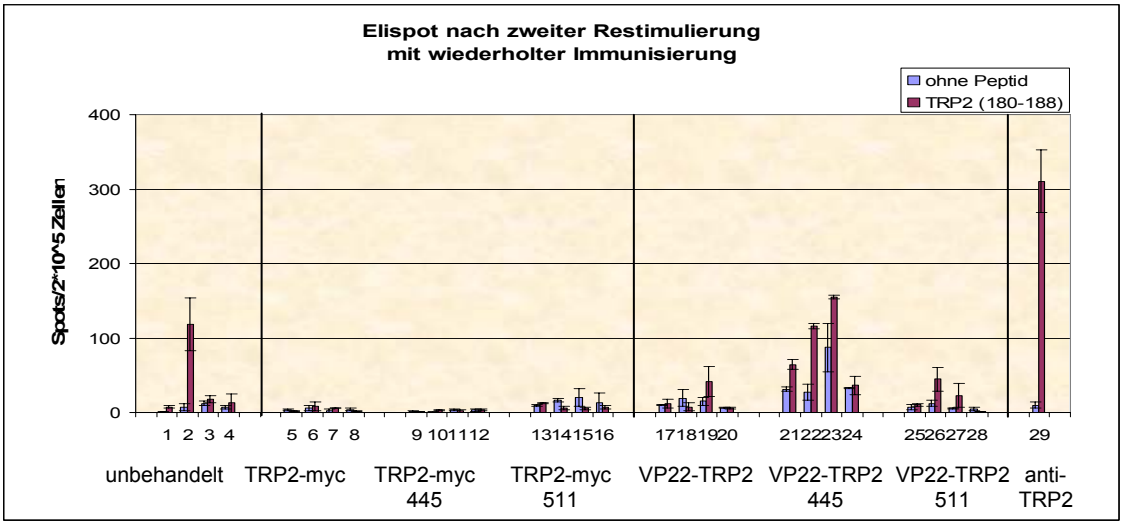
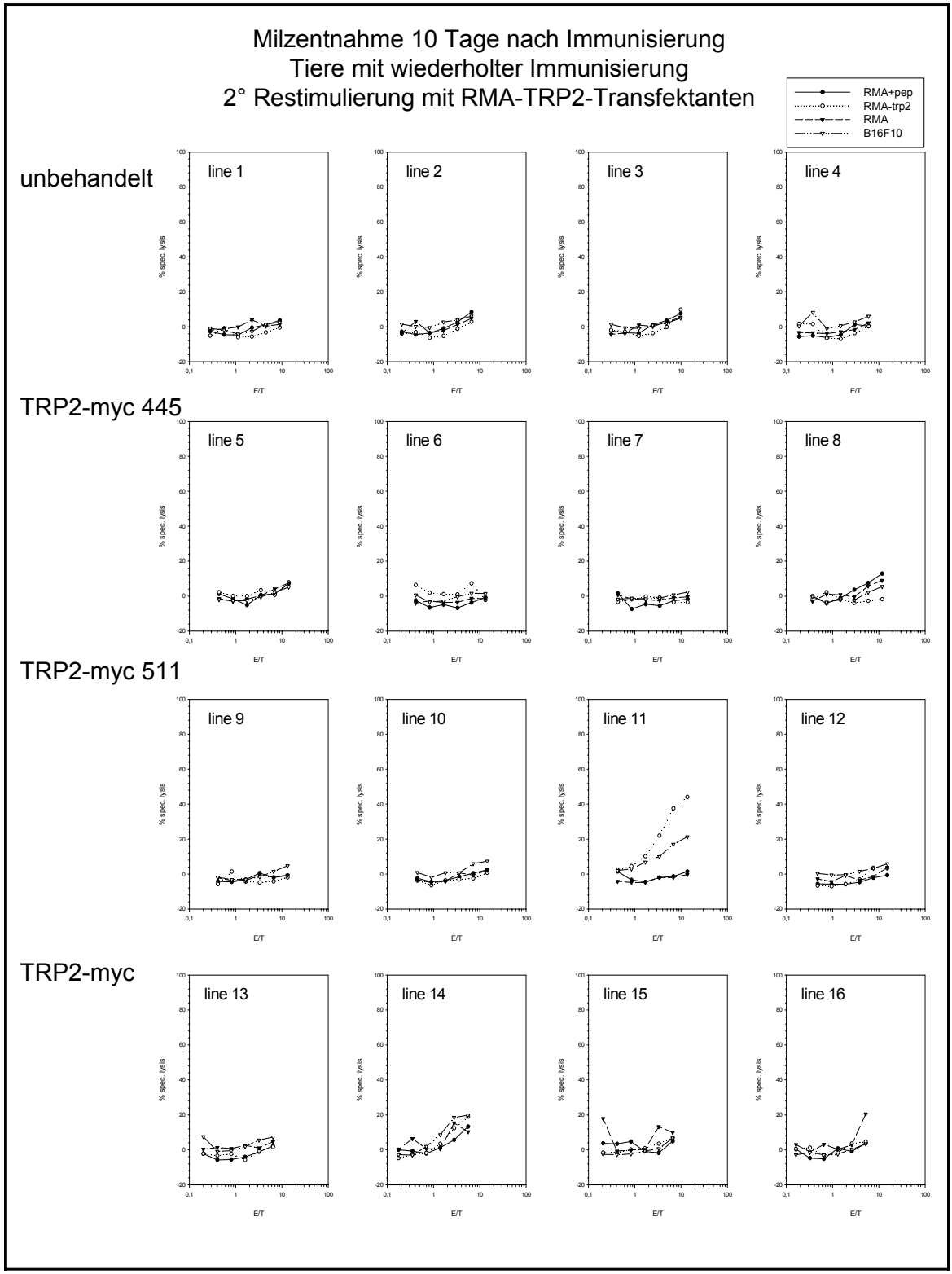


Abbildung 4.35: Elispotdaten zur INF-γ-Sekretion nach zweiter Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten. Milzzellkulturen des zweiten Versuchstierkollektivs wurden fünf Tage nach der zweiten Restimulierung mit TRP2-exprimierenden Transfektanten auf spezifische INF-γ-Sekretion bei Stimulierung mit 25 µl [1 µM] $TRP2_{180-188}$-Peptid untersucht. Als Negativkontrolle blieben diese Kulturen unbehandelt.

Die in den vorausgegangenen Experimenten beobachtete Tendenz der TRP2-spezifischen INF-γ-Sekretion bei Tieren, die mit einem VP22-enthaltenden Konstrukt immunisiert worden waren, konnte in diesem Test für die Gruppe VP22-TRP2 445 bestätigt werden: Drei von vier Tieren aus der Gruppe VP22-TRP2 445 (Linien 21, 22 und 23) zeigten eine TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion mit 64, 116 bzw. 155 Spots gegenüber 31, 27 bzw. 87 Spots ohne Peptid. Jeweils ein Tier aus der Gruppe VP22-TRP2 (Rezipient # 19) bzw. VP22-TRP2 511 (Rezipient # 26) lieferten mit 41 Spots bzw. 45 Spots (gegenüber 15 Spots bzw. 12 Spots ohne Peptid) eine gering ausgeprägte TRP2-spezifische INF-γ-Sekretion. Allerdings wurde auch für Linie 2 aus der Gruppe unbehandelter Tiere eine TRP2-spezifische Antwort erhalten (119 Spots gegenüber 7 Spots ohne Peptid).

Die Ergebnisse aus dem parallel durchgeführten ^{51}Cr-Freisetzungstest sind in Abbildung 4.36 gezeigt:



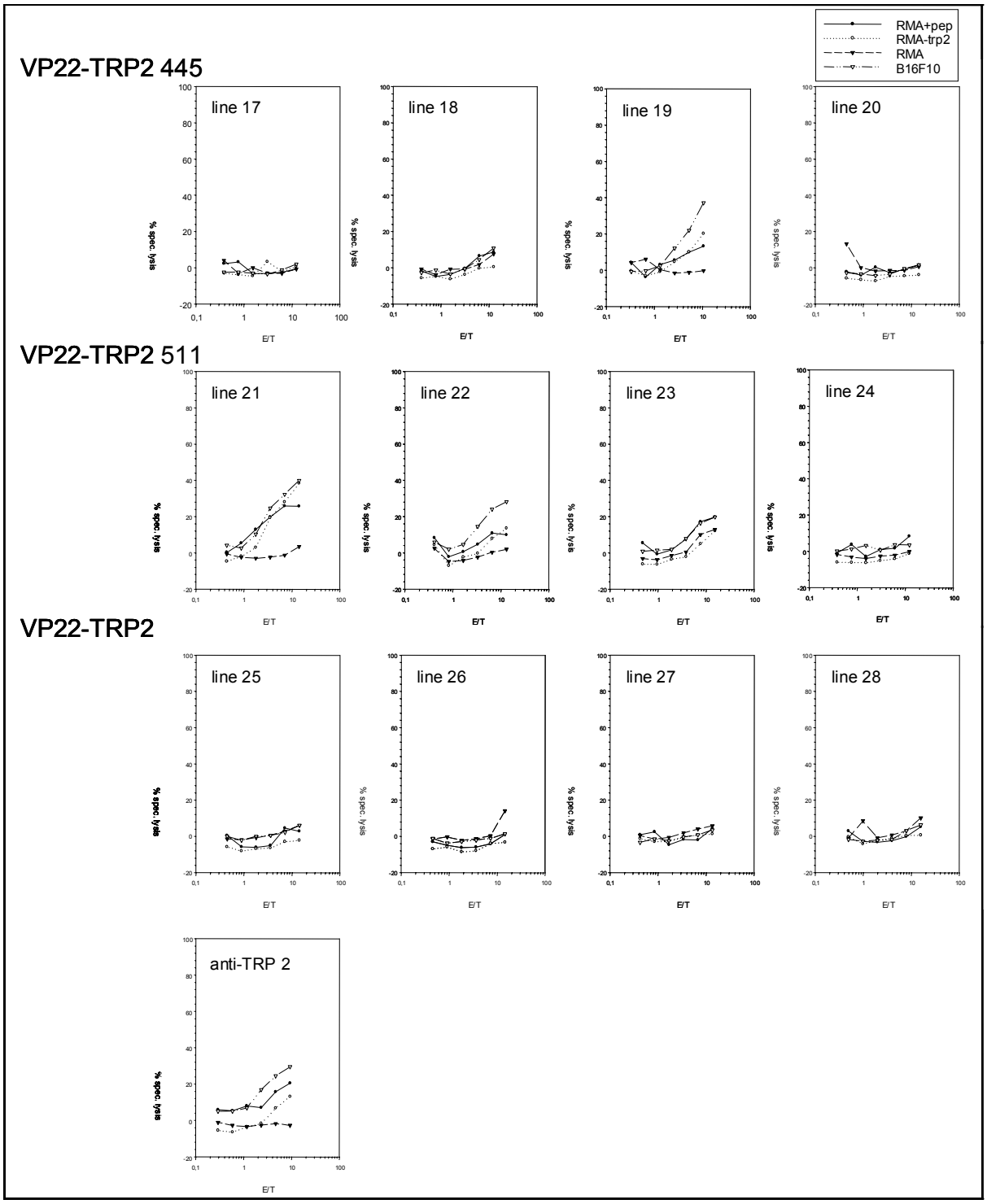


Abbildung 4.36: ^{51}Cr-Freisetzungstest nach zweiter Restimulierung mit RMA-TRP2-Transfektanten. Die Milzzellen aus den immunisierten Tieren des zweiten Kollektivs wurden *in vitro* mit RMA-TRP2-Transfektanten restimuliert. Fünf Tage später wurden diese auf ihre cytotoxische Aktivität gegenüber RMA-Zellen, $TRP2_{180-188}$-Peptid [100 nM] beladenen RMA-Zellen, RMA-TRP2-Transfektanten und der murinen B16F10-Zelllinie getestet. Die Effektorzellen wurden jeweils mit $1X10^4$ radioaktiv markierten Zielzellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Die in 100µl Überstand enthaltene Radioaktivität jeder Kultur wurde im β-Counter gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine $TRP2_{180-188}$-spezifische CTL-Linie eingesetzt.

Eine gute Korrelation der Ergebnisse aus beiden Untersuchungen konnte für die Linien 19, 21 und 22 gesehen werden. Dabei lieferte Linie 19 bei einem E:T-Verhältnis von 11:1 eine TRP2-Spezifität von 13 % auf $TRP2_{180-188}$-Peptid beladenen RMA-Zellen und 20 % auf RMA-TRP2-Transfektanten, während für B16F10-Melanomzellen sogar eine Lyse von 37 % beobachtet werden konnte (gegenüber 0 % auf RMA-Zellen). Für die Linie 21 betrugen die gemessenen Lysewert 26 % auf peptidbeladene RMA-Zellen, 38 % auf RMA-TRP2-Transfektanten und 40 % auf B16F10-Melanomzellen (gegenüber 3 % auf RMA-Zellen). Linie 22 lieferte auf peptidbeladenen RMA-Zellen 10 %, auf RMA-TRP2-Transfektanten 14 % und auf die B16F10-Melanomzelllinie eine cytolytische Aktivität von 28 % (gegenüber 2 % auf RMA-Zellen). Die im INF-γ-Elispot beobachtete TRP2-spezifische Aktivität der Linie 26 konnte im ^{51}Cr-Freisetzungstest nicht bestätigt werden. Eine Ausnahme bildete in diesem Experiment Linie 11: Hier wurden im ^{51}Cr-Freisetzungstest mit 2 % Lyse auf peptidbeladenen RMA-Zellen, 44 % Lyse auf RMA-TRP2-Transfektanten bzw. 21 % auf der B16F10-Melanomzelllinie festgestellt (gegenüber 0 % auf RMA-Zellen). Diese war im INF-γ-Elispot-Test nicht zu sehen.

Eine Übereinstimmung der erhaltenen Daten von INF-γ-Elispot-Test und ^{51}Cr-Freisetzungstest konnte hier nur bedingt festgestellt werden. Dennoch wurde davon ausgegangen, dass eine wiederholte DNA-Immunisierung nicht benötigt wurde, um eine effizientere Induktion TRP2-spezifischer CTLs zu erzielen, da in den vorausgegangenen Experimenten TRP2-spezifische CTL-Antworten in vergleichbarer oder höherer Stärke bereits nach einer Immunisierung zu verzeichnen waren.

Insgesamt konnte für die durchgeführten Experimente eine Verbesserung der TRP2-spezifischen Immunantwort beobachtet werden:

	mit VP22	ohne VP22	Kontrolltiere
Exp. I	4/6	1/6	0/3
Exp. II	6/12	1/12	0/4
Exp. III	2/12	0/12	0/4
Exp. IV	4/24	0/24	0/8
	16/54	**2/54**	**1/19**

Werden alle Ergebnisse aus VP22-enthaltenden Konstrukten zusammengefasst, ergibt sich daraus eine TRP2-spezifische Immunantwort in 29,6 % der Tiere (16 von insgesamt 54 getesteten Tieren), gegenüber einer Antwort in 3,7 % der Tiere nach Immunisierung mit Konstrukten ohne VP22-Anteil (2 von 54 getesteten Tieren) bzw. einer 5,3 %igen Antwort auf die Kontrolltiere (1 von 19 getesteten Tieren).

5 Diskussion

Das maligne Melanom ist ein Tumor der Pigmentzellen, der sich durch seine aggressive Art auszeichnet, stark zu metastasieren und in metastasierter Form resistent gegen chemo- oder strahlentherapeutische Behandlung zu sein. Das Auftreten von Vitiligo und spontaner Regression deutet auf die Immunogenität des Tumors hin. Tatsächlich konnten eine Reihe von Melanom-assoziierten Tumorantigenen von verschiedenen Autoren identifiziert werden, u.a. das Differenzierungsantigen TRP2 ((Tsukamoto *et al.*, 1992), s. Kapitel 1.5), das in zahlreichen Immunisierungsexperimenten Anwendung gefunden hat ((Bronte *et al.*, 2000; Davila and Celis, 2000; Schreurs *et al.*, 2000), s. Kapitel 1.6.2).
TRP2, ein Enzym (DOPAchromtautomerase) der Melaninbiosynthese, wird in Melanozyten und Melanomzellen exprimiert. Daher ist zu erwarten, dass eine Immuntoleranz gegen das Antigen besteht. Tierexperimentelle Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass eine TRP2-spezifische zelluläre Immunität durch verschiedene Immunisierungsstrategien (z.B. DNA, Peptid) induzierbar ist (s. Kapitel 1.6.2). Die Induktion TRP2-spezifischer cytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) kann erst durch den Einsatz von Adjuvantien wie CpG-Motive oder *Freund's complete adjuvant* erzielt werden (Aichele *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2004; Davila *et al.*, 2003). Durch die Fusion des TRP2 an das Tegumentprotein VP22 des Herpes Simplex Virus 1, das die Fähigkeit besitzt, interzellulären Transport von Proteinen zu vermitteln, könnte ein adjuvanter Effekt hervorgerufen werden. VP22 wird wie auch das Tat-Protein des Humanen Immundefizienz Virus 1 zur Gruppe der Proteintransduktionsdomänen (PTD) gezählt. PTDs sind kurze Bereiche positiv geladener Aminosäuren, durch die das Protein effizienter in Zellen dirigiert werden kann. Für das 301 Aminosäuren lange VP22-Protein (Elliott and O'Hare, 1997) wird der interzelluläre Transport dem Bereich 267-301 aa zugeordnet (Aints *et al.*, 2001) und beim 86 Aminosäuren langen Tat-Protein (Vives *et al.*, 1997) im Bereich 48-60 aa (Futaki *et al.*, 2001) festgelegt. Dilber *et al.* konnten zeigen, dass eine Fusion von VP22 und Thymidinkinase bei Behandlung mit Ganciclovir in COS-1-Zellen zu effizientem Zelltod führt, während die alleinige Transfektion der Zellen mit Thymidinkinase diesen Effekt nicht zeigt (Dilber *et al.*, 1999). Untersuchungen von Phelan *et al.* konnten den

interzellulären Transport für das Fuionsprotein VP22-p53 zeigen. In diesem Fall konnte eine effiziente Apoptose in p53-negativen humanen Osteosarkom-Zellen ausgelöst werden (Phelan *et al.*, 1998). Michel *et al.* konnten durch die Fusion des VP22 mit E7 in tierexperimentellen Untersuchungen eine gesteigerte T-Zellantwort erhalten (Michel *et al.*, 2002b).

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Immunisierung mit Plasmid-DNA stellt eine Variante der immuntherapeutischen Ansätze dar (s. Kapitel 1.6.2), die gegenüber zellulären Vakzinen oder Peptidvakzinen Vorteile aufweist: Neben der einfachen Herstellung, Lagerung und Reinigung können Zellen am Injektionsort die DNA aufnehmen und das kodierte Protein endogen synthetisieren, so dass die Konformation des Proteins ähnlich dem Wildtyp-Protein angenommen wird. Zudem kann durch eine DNA-Immunisierung sowohl eine spezifische humorale als auch eine zelluläre Immunantwort ausgelöst werden (Cohen *et al.*, 1998; Donnelly *et al.*, 1997; Gurunathan *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fusionskonstrukte pVP22-TRP2, pVP22-TRP2 dC, pVP22-TRP2 511, pVP22-TRP2 445 und die entsprechenden Kontrollkonstrukte ohne VP22-Anteil hergestellt. Dabei sollte die Eigenschaft des VP22, den interzellulären Transport des fusionierten Antigens zu vermitteln, genutzt werden. Deletionskonstrukte des TRP2 wurden angefertigt, um negative Einflüsse hydrophober Domänen des TRP2 zu minimieren, die das Ein- bzw. Ausschleusen des Proteins beeinträchtigen könnten. Dennoch kann auch ein Einfluss der TRP2-Deletionsvarianten auf die Fähigkeit des interzellulären Transports des VP22 nicht ausgeschlossen werden. Die Fusionskonstrukte wurden *in vitro* charakterisiert und in tierexperimentellen Untersuchungen eingesetzt. Eine verstärkte Induktion TRP2-spezifischer CTLs konnte durch die Verwendung der VP22-Fusionsproteine nachgewiesen werden. Expressionsstudien zur intrazellulären Lokalisation sollten Hinweise auf Mechanismen liefern, die zu einer verbesserten Immunogenität der Vakzine beitragen könnten.

5.1 Induktion TRP2-spezifischer T-Zellantworten nach DNA-Immunisierung

Die Anwendung der intramuskulären DNA-Immunisierung führte in Untersuchungen von Wolff *et al.* zur Expression des Plasmid-kodierten Gens in zellulärem Gewebe (Wolff *et al.*, 1990). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch eine DNA-Immunisierung sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort induziert werden kann (Cohen *et al.*, 1998; Gurunathan *et al.*, 2000; Shedlock and Weiner, 2000). Verschiedene Untersuchungen zeigten, das die Anwendung einer intramuskulären DNA-Immunisierung in der Lage ist, eine antigenspezifische CTL- und T-Helfer-Antwort auszulösen (Bennett *et al.*, 1997; Bronte *et al.*, 2000; Raz *et al.*, 1996; Ridge *et al.*, 1998). Verglichen mit der intramuskulären DNA-Immunisierung benötigt die Anwendung der *gene-gun*-Methode, dem ballistischen Gentransfer mittels DNA-beladener Goldpartikel, eine geringere DNA-Menge, bewirkt jedoch eher eine Antikörperproduktion (Tang *et al.*, 1992). Einen Überblick über diskutierte Mechanismen beschreiben Whitton *et al.* (Whitton *et al.*, 1999) und Gurunathan *et al.* (Gurunathan *et al.*, 2000). Sie postulieren, dass Zellen am Injektionsort direkt transfiziert werden können und somit in der Lage sind, das Antigen intrazellulär zu synthetisieren.

Transfizierte somatische Zellen (intramuskulär: Myozyten, gene-gun: Keratinozyten) werden dabei als mögliche Stimulatoren einer T-Zellantwort angesehen, die jedoch keine zusätzlichen stimulatorischen Oberflächenmoleküle wie CD80 oder CD86 besitzen und somit nicht in der Lage sind, effizient spezifische CTL-Antworten zu induzieren. Im Gegensatz dazu stellt die direkte Transfektion professioneller APCs einen Mechanismus dar, der die Induktion cytotoxischer T-Lymphozyten ermöglicht (Doe *et al.*, 1996). Auf professionellen APCs befinden sich kostimulatorische Oberflächenmoleküle, die eine effiziente Präsentation des Antigens und die Stimulation von T-Zellen bewirken. Eine dritte Möglichkeit stellt die Aufnahme und Präsentation von freigesetztem Protein aus transfizierten Zellen durch professionelle APCs dar (*cross-priming*) (Huang *et al.*, 1994).

Übertragen auf die DNA-Immunisierung mit pVP22-TRP2 und seinen Deletionskonstrukten würde im ersten Fall das Fusionsprotein von somatischen Zellen aufgenommen und über MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden.

Bedingt durch die interzelluläre Migrationsfähigkeit des VP22 könnte das Fusionsprotein effizienter in benachbarte professionelle APCs gelangen. Eine gesteigerte Präsentation über MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Moleküle und eine effizientere Induktion TRP2-spezifischer cytotoxischer T-Zellen wären die Folge. Auch die direkte Transfektion von professionellen APCs mit pVP22-TRP2 oder seinen Deletionskonstrukten könnte insbesondere eine verbesserte Präsentation MHC-Klasse I-restringierter Epitope bewirken und somit eine stärkere Immunantwort auslösen.

Kim *et al.* konnten in Untersuchungen einen Zusammenhang sehen zwischen der Fusionierung des VP22 mit E7, der erhöhten Präsentation über MHC-Klasse I-Moleküle und der damit verbundenen langanhaltenden Immunogenität: Ein Vergleich von CD11c-angereicherten Kulturen aus Lymphknoten von Mäusen, die zuvor intradermal mit VP22/E7/GFP-DNA bzw. E7/GFP-DNA immunisiert worden waren, erbrachte für erstere eine höhere INF-γ-Sekretion E7-spezifischer $CD8^+$-T-Zellen. Zudem zeigten mit VP22/E7-immunisierte Mäuse eine hohe Zahl E7-spezifischer $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen, wodurch die langanhaltende Immunogenität begründetet wurde (Kim *et al.*, 2004). Auch Hung *et al.* konnten eine erhöhte Anzahl E7-spezifischer $CD8^+$-T-Zellen durch die Fusion des Tegumentproteins VP22 mit E7 erhalten (Hung *et al.*, 2001a). Shibagaki *et al.* konnten eine erfolgreiche Immunisierung von Mäusen mit rTAT-PTD-TRP2Δ transduzierten dendritischen Zellen (DC) gegen das murine B16-Melanommodell durchführen (Shibagaki and Udey, 2003). Übertragen auf die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen könnte das Fusionsprotein VP22-TRP2 unter Beibehaltung der Transportfähigkeiten des VP22 vermehrt in professionelle antigenpräsentierende Zellen verteilt werden und zur gesteigerten Immunogenität des TRP2 führen.

Der Mechanismus des interzellulären Transports wird in der Literatur kontrovers diskutiert: Lundberg *et al.* beschreiben den interzellulären Transport als Fixierungsartefakt (Lundberg and Johansson, 2001; Lundberg and Johansson, 2002). Die von Derossi *et al.* und Elliott *et al.* beschriebene Endozytose-unabhängige Aufnahme des Proteins in Zellen (Derossi *et al.*, 1996; Elliott and O'Hare, 1997) wurde von Richard *et al.* in Frage gestellt. Er beschreibt die Kolokalisierung des Tat-Proteins mit Endozytose-Markern in lebenden Zellen (Richard *et al.*, 2003). In wieweit jedoch dieses Ergebnis übertragbar ist auf VP22,

ist unklar. Lundberg *et al.* zeigten eine Perimembran-Bindung des Proteins VP22-GFP nach einer Inkubationszeit von einer Stunde und die Lokalisation des Proteins im Cytoplasma nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden, worin die endozytotische Aufnahme des Proteins begründet läge. Da diese Bindungen durch eine Behandlung mit Heparin gelöst werden konnten, nehmen sie an, dass positivgeladene Proteintransduktionsdomänen (PTD) elektrostatische Bindungen mit negativgeladenen Strukturen eingehen (Lundberg *et al.*, 2003) und über Endozytose ins Zellinnere gelangen können. In einer Übersicht postulierten Järver *et al.* sowohl die Aufnahme über Endozytose als auch über unbekannte Transportmechanismen als „different aspects of the same event“ (Jarver and Langel, 2004). Weitere Untersuchungen, die Hinweise über den Mechanismus des interzellulären Transports geben, sind somit erforderlich.

Neben dem interzellulären Transport beeinflusst die intrazelluläre Lokalisation von VP22 möglicherweise die Vakzinimmunogenität: Elliott *et al.* beschrieben für VP22 die cytoplasmatische Lokalisation des Proteins in transfizierten Zellen, während benachbarte Zellen eine Lokalisation im Kern aufweisen (Elliott and O'Hare, 1997). Bisherige Arbeiten zur interzellulären Transportfähigkeit des VP22 konnten die Lokalisation des Proteins in bestimmten Kompartimenten auf einzelne Bereiche der Sequenz des VP22 beziehen: Anhand von verschiedenen Deletionsmutanten konnten Aints *et al.* unter anderem die Lokalisation im Kern im Bereich 119-159 aa festlegen, während der Bereich 267-301 aa der interzellulären Transporteigenschaft zugeordnet wurde (Aints *et al.*, 2001). Ein Einfluss des fusionierten Proteins auf die Lokalisierung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Hung *et al.* definieren eine gesteigerte MHC-Klasse I-Präsentation und eine damit zusammenhängende stärkere Immunantwort über eine Lokalisierung in Centrosomen. Sie konnten zeigen, dass eine Fusion des E7-Proteins an γ-Tubulin in transfizierten dendritischen Zellen (DC) zu einer Anhäufung von E7 in Centrosomen *in vitro* und gleichzeitig zu einer TAP-1-abhängigen effizienten $CD8^+$-T-Zellaktivität *in vivo* führt (Hung *et al.*, 2003). Chen *et al.* konnten durch Immunisierung mit hsp70-E7 eine gesteigerte $CD8^+$T-Zellantwort erhalten, ausgelöst durch die Eigenschaft des Kerntransports des hsp70 (Chen *et al.*, 2000). Eine Kernlokalisation würde somit zu einer effizienteren Präsentation über MHC-Klasse I-Moleküle führen und die Induktion einer spezifischen CTL-Antwort unterstützen. Da im Kern vorhandene Proteasen

eine Prozessierung bewirken, könnte eine Lokalisation im Kern zudem für eine klassische Präsentation des Peptids über MHC-Klasse I-Moleküle stehen und die daraus resultierende gesteigerte Immunantwort könnte postuliert werden.
Die Induktion einer TRP2-spezifischen CTL-Antwort könnte auch durch die Prozessierung von T-Helfer-Epitopen aus dem VP22-Protein verbessert werden: Bennett *et al.* zeigten, dass für ein effizientes *Cross-Priming* die simultane Epitoperkennung von $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen auf der gleichen professionellen APC erforderlich ist (Bennett *et al.*, 1997). Die MHC-Klasse II-Präsentation von VP22-Epitopen würde eine $CD4^+$-T-Helfer-Zellantwort induzieren, die eine unterstützende Funktion beim Priming von $CD8^+$-Vorläuferzellen besitzt und somit auch zur gesteigerten Immunantwort beitragen kann.
Geiss *et al.* analysierten die Stabilität des VP22-Proteins während der Infektion (Geiss *et al.*, 2001). Ein stabilisierender Effekt des VP22 auf Fusionsproteine könnte daher postuliert und das Phänomen begründet werden, dass pVP22-TRP2 445 auf Proteinebene detektierbar war, während der Nachweis für pTRP2-myc 445 nicht erbracht werden konnte (s. Kapitel 5.2).

5.2 *In vitro* Nachweis der Expression plasmidkodierter Antigene

Die Funktionalität der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmidkonstrukte wurde auf RNA- und Proteinebene überprüft. Dazu wurden COS7-Zellen mit den Plasmiden transient transfiziert und aus den Transfektanten RNA und Protein isoliert. Der Nachweis der Transkription der Fusionsgene erfolgte mittels RT-PCR. Zur Detektion der Proteine in der Western Blot-Analyse wurde ein anti-myc-Antikörper verwendet (s. Kapitel 2.8.1). Die detektierten VP22-Fusionsproteine entsprachen ebenso wie für TRP2-myc 511 der theoretisch berechneten Größe.
Für pTRP2-myc bzw. pTRP2-myc dC wurden statt der erwarteten Banden der Größen 59 kDa bzw. 53 kDa größere Banden mit einem Molekulargewicht von 75 kDa bzw. 70 kDa nachgewiesen. Tanaka *et al.* zeigten gleiche Effekte bei einer *in vitro* Transfektion von NIH3T3 Zellen mit einem Plasmid, das für das humane Melanom-assoziierte Antigen TRP2 kodiert (Tanaka *et al.*, 2002). Posttranslationale Modifikationen wie etwa Glykolysierungen werden als Grund

für das verzögerte Laufverhalten angesehen (Pawelek *et al.*, 1999). Eine Expression des TRP2-myc 445-Proteins konnte trotz der zuvor nachgewiesenen RNA-Expression auch durch den Einsatz eines höherprozentigen SDS-Gels nicht nachgewiesen werden. Eine geringere Stabilität des Proteins in der Zelle wird angenommen, so dass ein schneller Abbau erfolgt und die Menge des nachzuweisenden Proteins unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Im Gegensatz dazu konnte das entsprechende VP22-TRP2 445-Protein detektiert werden. In seiner Dissertation beschreibt Nico Michel, dass erst durch die Fusion von E7 an Ig κ ein höherer *steady state level* des Proteins und somit seine Detektierbarkeit erreicht werden konnte (Michel *et al.*, 2002b). Eine veränderte Konformation, die eine Detektion in der Western Blot-Analyse verhindert, könnte postuliert werden, dies ist jedoch unwahrscheinlich, da das Protein im SDS-Gel denaturiert vorliegt.
Mittles Immuncytologie wurde die intrazelluläre Lokalisierung der Genprodukte analysiert. Ein Vergleich der jeweiligen Fusionskonstrukte mit und ohne VP22-Anteil untereinander lieferte für pVP22-TRP2 und pTRP2-myc keinen sichtbaren Unterschied in der Lokalisation. In beiden Fällen scheint das Protein im Cytoplasma vorzuliegen, so dass in diesem Fall der VP22-Anteil offenbar keinen Einfluss auf die Lokalisation hat. Der Vergleich der Lokalisation für pVP22-TRP2 511 und pTRP2-myc 511 zeigt dagegen deutliche Unterschiede: Während das Fusionsprotein ohne VP22-Anteil cytoplasmatisch verteilt scheint, ist das VP22-TRP2 511-Protein kernnah lokalisiert. Der Vergleich der Expression für pVP22-TRP2 445 und pTRP2-myc 445 liefert für ersteres eine kernnahe Lokalisierung, während die Proteinexpression für pTRP2-myc 445 wie auch in der vorausgegangenen Western Blot-Analyse nicht nachzuweisen war.
Für die Proteine VP22-TRP2 511 und TRP2-myc 511 wurden Lokalisierungsstudien in COS7-Zellen durchgeführt. Für pVP22-TRP2 511 zeigte sich eine Kolokalisierung des Proteins sowohl mit Calnexin, einem Markerprotein des endoplasmatischen Retikulum (ER), als auch mit 58K, einem Markerprotein des Golgi-Apparates. Für pVP22-TRP2 511 konnte somit eine Lokalisation sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat gezeigt werden. Diese wurde zuvor in immuncytologisch durchgeführten Untersuchungen bereits angenommen. Eine Untersuchung zur Lokalisierung im Kern war in unserer Gruppe aus technischen Gründen zum Zeitpunkt der durchgeführten Untersuchungen nicht durchführbar. Sie könnte jedoch die in der Literatur beschriebene Kernlokalisation für VP22

bestätigen (Elliott and O'Hare, 1997; Pomeranz and Blaho, 1999). Für pTRP2-myc 511 konnte eine cytoplasmatische Lokalisation in der Zelle festgestellt werden, während eine Kolokalisierung mit Calnexin nicht detektierbar war. Die fehlende Transportfähigkeit des VP22 kann als mögliche Ursache angesehen werden.

5.3 Effizientere Induktion TRP2-spezifischer cytotoxischer T-Lymphozyten durch DNA-Immunisierung mit pVP22-TRP2, pVP22-TRP2 511 und pVP22-TRP2 445

Der Nachweis, eine gesteigerte Induktion cytotoxischer T-Lymphozyten durch Fusion des Melanom-assoziierten Antigens TRP2 mit dem Tegumentprotein VP22 des Herpes Simplex Virus 1 erhalten zu können, konnte in der vorliegenden Arbeit in den ersten beiden tierexperimentellen Untersuchungen erbracht werden. Im ersten Experiment lieferten vier der sechs Tiere, die mit einem VP22-enthaltenden Konstrukt immunisiert worden waren, eine TRP2-spezifische Immunantwort, während es im zweiten Experiment sechs von zwölf Tiere waren. Diese Ergebnisse konnten bereits in *ex vivo* durchgeführten INF-γ-Elispot-Tests beobachtet und nach zweimaliger Restimulierung bestätigt werden.
Als Nachweismethoden TRP2-spezifischer CTLs wurden der INF-γ-Elispot-Test und der ^{51}Cr-Freisetzungstest angewandt, die sich vor allem in ihren Sensitivitäten unterscheiden: Während der sensitivere INF-γ-Elispot-Test einen spezifischen Nachweis schon bei einer geringen Anzahl aktivierter T-Zellen liefert, wird für den ^{51}Cr-Freisetzungstest eine erheblich größere Menge spezifischer CTLs benötigt. Zudem kann der INF-γ-Elispot-Test bereits in *ex vivo*-Untersuchungen eingesetzt werden, wogegen für den Nachweis im ^{51}Cr-Freisetzungstest mindestens eine *in vitro*-Restimulierung notwendig ist. Einen Vergleich zwischen ^{51}Cr-Freisetzungstest, IFNγ-Elispot-Test, intrazellulärer INF-γ- und Tetramerfärbung liefern Michel *et al.* (Michel *et al.*, 2002a). Eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen aus den INF-γ-Elispot- und den jeweiligen ^{51}Cr-Freisetzungsanalysen konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden. Die Ergebnisse der Immunisierungsexperimente zeigten, dass vereinzelt eine Immunantwort auch für Fusionskonstrukte ohne VP22-Anteil erhalten werden

konnte, dass diese allerdings für Plasmide mit VP22-Anteil gehäuft auftritt und intensiver zu sein scheint. Dies steht mit Ergebnissen von Michel *et al.* in Einklang: Sie konnten durch die Fusionierung des VP22-Gens an das E7-Protein des Humanen Papillomavirus 16 eine gesteigerte Immunantwort verzeichnen (Michel *et al.*, 2002b).

Eine weitere, die Induktion einer Immunantwort auslösende Rolle könnte der Endotoxingehalt der Plasmidpräparationen haben: Der Vergleich der Endotoxinmengen der im ersten bzw. im zweiten Experiment verwendeten Plasmid-DNA lieferte zunächst keine nennenswerten Unterschiede. Daher wurde dieser Faktor als vernachlässigbar betrachtet, was auch mit den erhaltenen Immunisierungsergebnissen übereinstimmt. Erstaunlich waren daher die Ergebnisse der Folgeexperimente, in denen dennoch eine geringere Häufigkeit TRP2-spezifischer Immunantworten beobachtet wurde. Allerdings wurden Bestimmungen des Endotoxingehalts in diesen Fällen nicht durchgeführt. Ein zu geringer Endotoxingehalt der Plasmidpräparationen zur Induktion TRP2-spezifischer Immunantworten konnte daher nicht ausgeschlossen werden.

Eine sog. „prime-boost“-Immunisierung durch zweifache DNA-Injektion sollte bei gleichzeitiger Verwendung von Plasmid-DNA nach „endofree“-Aufreinigung zu einer Verbesserung der T-Zellantwort führen. Eine Steigerung der Immunogenität konnte jedoch nicht beobachtet werden, was im Einklang mit Untersuchungen von Bronte *et al.* steht: Sie konnten bei einer zweifachen DNA-Immunisierung mit TRP2-kodierendem Gen keine gesteigerte Tumorabstoßung im murinen B16-Melanommodell erhalten (Bronte *et al.*, 2000).

Eine Reihe von Untersuchungen beschreibt den Einsatz der sog. „prime-boost“-Strategie als weitere Möglichkeit zur Steigerung der Immunogenität. Ausgangssituation ist üblicherweise eine erste Immunisierung mit Plasmid-DNA und eine sich anschließende zeitlich versetzte Injektion eines attenuierten rekombinanten Virus’ wie etwa Modified Vaccinia Virus Ankara, MVA (Hanke *et al.*, 1999; Ramshaw and Ramsay, 2000; Schneider *et al.*, 1998). Daher wird angenommen, dass die Kombination aus TRP2-kodierender DNA in einer ersten Immunisierung und TRP2-exprimierendem modifiziertem rekombinantem Virus in einer zweiten Immunisierung zu einer effizienteren Induktion TRP2-spezifischer CTLs führen kann.

6 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein aggressiver Hautkrebs, der eine steigende Inzidenz aufweist. Da konventionelle Behandlungen wie Chemo- oder Strahlentherapie im metastasierten Stadium unwirksam sind, besteht die Notwendigkeit, alternative therapeutische Strategien zu entwickeln.

Cytotoxische T-Zellen des Immunsystems sind in der Lage, Melanomzellen zu zerstören. Basierend auf dieser Kenntnis sollte im Rahmen dieser Arbeit die Wirksamkeit verschiedener Varianten einer DNA-Vakzine analysiert und Melanom-spezifische T-Zellen *in vivo* im Mausmodell induziert werden.

Die hergestellte Vakzine kodiert für das Melanom-assoziierte Antigen TRP2, das C-terminal an das Tegumentprotein VP22 des Herpes Simplex Virus 1 fusioniert wurde. VP22 besitzt die Fähigkeit, interzellulären Transport zu vermitteln. Zudem wurde postuliert, dass diese Eigenschaft auch zu einer verbesserten Immunantwort führt, da professionelle antigenpräsentierende Zellen die Fusionsproteine effizienter aufnehmen sollten. Neben der gesamten TRP2 cDNA wurden Deletionsvarianten an VP22 fusioniert, bei denen hydrophobe Domänen deletiert wurden, um ein effizientes Ein- und Ausschleusen zu gewährleisten. Hergestellt wurden dabei Konstrukte, bei denen der VP22-Anteil an Gesamt-TRP2 (pVP22-TRP2), an das Fragment aa 171-302 (pVP22-TRP2 511) bzw. an das Fragment aa 148-220 (pVP22-TRP2 445) fusioniert wurde. Neben diesen Fusionskonstrukten wurden entsprechende Konstrukte ohne VP22-Anteil hergestellt: pTRP2-myc, pTRP2-myc 511 und pTRP2-myc 445.

Nach Bestätigung der korrekten Sequenzen der Fusionskonstrukte konnten ihre Produkte sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden – eine Ausnahme bildete das Konstrukt pTRP2-myc 445, das auf Proteinebene nicht zu detektieren war. Da das entsprechende Konstrukt mit VP22 – pVP22-TRP2 445 – detektiert werden konnte, wird ein proteinstabilisierender Einfluss des VP22-Anteils vermutet. In Expressionsstudien zur Lokalisation konnte für einige Konstrukte ein Einfluss des VP22-Anteils auf die Lokalisation des Fusionsproteins beobachtet werden. Eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum konnte für das VP22-TRP2 511-Protein beobachtet werden. Dagegen

war dies für das entsprechende Protein ohne VP22–Anteil - pTRP2-myc 511 – nicht zu detektieren.

In anschließenden tierexperimentellen Untersuchungen in der C57BL/6 Maus konnte die gesteigerte Induktion TRP2-spezifischer cytotoxischer T-Lymphozyten nach DNA-Immunisierung mit VP22-Fusionskonstrukten beobachtet werden. Bereits in *ex vivo* durchgeführten INF-γ-Elispot-Tests wurden erhöhte TRP2-spezifische T-Zellantworten für Konstrukte mit VP22-Anteil detektiert. Ergebnisse aus parallel angefertigten ^{51}Cr-Freisetzungstests konnten die erhaltenen INF-γ-Elispot-Daten bestätigen. Insgesamt konnte in 29,6 % der Tiere, die mit einem VP22-enthaltenden Konstrukt immunisiert worden waren, eine erhöhte CTL-Antwort erhalten werden. Dies wurde besonders für die Konstrukte pVP22-TRP2 511 und pVP22-TRP2 445 beobachtet. Dahingegen lieferten lediglich 3,7 % der Tiere nach Immunisierung mit einem Konstrukt ohne VP22-Anteil eine TRP2-spezifische Immunantwort.

Zusammenfassend konnte durch die Fusion des VP22 an TRP2 eine verbesserte Induktion einer TRP2-spezifischen T-Zellantwort beobachtet werden. Als Faktoren, die zu einer verbesserten Immunogenität beitragen, werden die Stabilität, die Lokalisierung sowie der interzelluläre Transport des Proteins angenommen.

7 Literaturverzeichnis

Aichele, P., Brduscha-Riem, K., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H. and Pircher, H. (1995). T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *J Exp Med,* **182,** 261-266.

Aints, A., Guven, H., Gahrton, G., Smith, C. I. and Dilber, M. S. (2001). Mapping of herpes simplex virus-1 VP22 functional domains for inter- and subcellular protein targeting. *Gene Ther,* **8,** 1051-1056.

Ashley, D. M., Faiola, B., Nair, S., Hale, L. P., Bigner, D. D. and Gilboa, E. (1997). Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med,* **186,** 1177-1182.

Beddingfield, F. C., 3rd. (2003). The melanoma epidemic: res ipsa loquitur. *Oncologist,* **8,** 459-465.

Bennett, D. C. (2003). Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene,* **22,** 3063-3069.

Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. and Heath, W. R. (1997). Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med,* **186,** 65-70.

Bommhardt, U., Beyer, M., Hunig, T. and Reichardt, H. M. (2004). Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci,* **61,** 263-280.

Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, P. and Boon, T. (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med,* **178,** 489-495.

Bronte, V., Apolloni, E., Ronca, R., Zamboni, P., Overwijk, W. W., Surman, D. R., Restifo, N. P. and Zanovello, P. (2000). Genetic vaccination with "self" tyrosinase-related protein 2 causes melanoma eradication but not vitiligo. *Cancer Res,* **60,** 253-258.

Casrouge, A., Beaudoing, E., Dalle, S., Pannetier, C., Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P. (2000). Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol,* **164,** 5782-5787.

Chen, C. H., Wang, T. L., Hung, C. F., Yang, Y., Young, R. A., Pardoll, D. M. and Wu, T. C. (2000). Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. *Cancer Res,* **60,** 1035-1042.

Chen, L., Linsley, P. S. and Hellstrom, K. E. (1993). Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today,* **14,** 483-486.

Chen, Y. F., Lin, C. W., Tsao, Y. P. and Chen, S. L. (2004). Cytotoxic-T-lymphocyte human papillomavirus type 16 E5 peptide with CpG-

oligodeoxynucleotide can eliminate tumor growth in C57BL/6 mice. *J Virol,* **78,** 1333-1343.

Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M. and Old, L. J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **94,** 1914-1918.

Chicz, R. M., Urban, R. G., Lane, W. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Vignali, D. A. and Strominger, J. L. (1992). Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature,* **358,** 764-768.

Cohen, A. D., Boyer, J. D. and Weiner, D. B. (1998). Modulating the immune response to genetic immunization. *Faseb J,* **12,** 1611-1626.

Coughlin, C. M., Vance, B. A., Grupp, S. A. and Vonderheide, R. H. (2004). RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. *Blood,* **103,** 2046-2054.

Coulie, P. G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J. P. and et al. (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med,* **180,** 35-42.

Davila, E. and Celis, E. (2000). Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J Immunol,* **165,** 539-547.

Davila, E., Kennedy, R. and Celis, E. (2003). Generation of antitumor immunity by cytotoxic T lymphocyte epitope peptide vaccination, CpG-oligodeoxynucleotide adjuvant, and CTLA-4 blockade. *Cancer Res,* **63,** 3281-3288.

Davis, M. M. and Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature,* **334,** 395-402.

de Braud, F., Khayat, D., Kroon, B. B., Valdagni, R., Bruzzi, P. and Cascinelli, N. (2003). Malignant melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol,* **47,** 35-63.

de Gruijl, F. R. (1999). Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer,* **35,** 2003-2009.

Denzin, L. K. and Cresswell, P. (1995). HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell,* **82,** 155-165.

Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem,* **271,** 18188-18193.

Dilber, M. S., Phelan, A., Aints, A., Mohamed, A. J., Elliott, G., Smith, C. I. and O'Hare, P. (1999). Intercellular delivery of thymidine kinase prodrug activating enzyme by the herpes simplex virus protein, VP22. *Gene Ther,* **6,** 12-21.

Doe, B., Selby, M., Barnett, S., Baenziger, J. and Walker, C. M. (1996). Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **93,** 8578-8583.

Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W. and Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. *Annu Rev Immunol,* **15,** 617-648.

Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D. and Mulligan, R. C. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **90,** 3539-3543.

Eggert, A. A., Schreurs, M. W., Boerman, O. C., Oyen, W. J., de Boer, A. J., Punt, C. J., Figdor, C. G. and Adema, G. J. (1999). Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res,* **59,** 3340-3345.

Elliott, G. and O'Hare, P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell,* **88,** 223-233.

Espinoza-Delgado, I. (2002). Cancer vaccines. *Oncologist,* **7 Suppl 3,** 20-33.

Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H. G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature,* **351,** 290-296.

Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K. and Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem,* **276,** 5836-5840.

Garbe, C., Schadendorf, D. (2003). Malignes Melanom- neue Daten und Konzepte zur Nachsorge. In: *Deutsches Ärzteblatt **26***, Vol. 26, pp. A1804-1808.

Gaugler, B., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Romero, P., Gaforio, J. J., De Plaen, E., Lethe, B., Brasseur, F. and Boon, T. (1994). Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med,* **179,** 921-930.

Geiss, B. J., Tavis, J. E., Metzger, L. M., Leib, D. A. and Morrison, L. A. (2001). Temporal regulation of herpes simplex virus type 2 VP22 expression and phosphorylation. *J Virol,* **75,** 10721-10729.

Gromme, M. and Neefjes, J. (2002). Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol,* **39,** 181-202.

Gurunathan, S., Klinman, D. M. and Seder, R. A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol,* **18,** 927-974.

Hanke, T., Neumann, V. C., Blanchard, T. J., Sweeney, P., Hill, A. V., Smith, G. L. and McMichael, A. (1999). Effective induction of HIV-specific CTL by multi-epitope using gene gun in a combined vaccination regime. *Vaccine,* **17,** 589-596.

Hayward, N. K. (2003). Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene,* **22,** 3053-3062.

Herlyn, M. and Satyamoorthy, K. (1996). Activated ras. Yet another player in melanoma? *Am J Pathol,* **149,** 739-744.

Hopkins, L. M., Schall, M., Leykam, J. F. and Gerlach, J. A. (2004). Characterization of major histocompatibility complex-associated peptides from a small volume of whole blood. *Anal Biochem,* **328,** 155-161.

Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D. and Levitsky, H. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science,* **264,** 961-965.

Hung, C. F., Cheng, W. F., Chai, C. Y., Hsu, K. F., He, L., Ling, M. and Wu, T. C. (2001a). Improving vaccine potency through intercellular spreading and enhanced MHC class I presentation of antigen. *J Immunol,* **166,** 5733-5740.

Hung, C. F., Cheng, W. F., He, L., Ling, M., Juang, J., Lin, C. T. and Wu, T. C. (2003). Enhancing major histocompatibility complex class I antigen presentation by targeting antigen to centrosomes. *Cancer Res,* **63,** 2393-2398.

Hung, C. F., Cheng, W. F., Hsu, K. F., Chai, C. Y., He, L., Ling, M. and Wu, T. C. (2001b). Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. *Cancer Res,* **61,** 3698-3703.

Hunt, D. F., Michel, H., Dickinson, T. A., Shabanowitz, J., Cox, A. L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H. M. and Sette, A. (1992). Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science,* **256,** 1817-1820.

Jarver, P. and Langel, U. (2004). The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug Discov Today,* **9,** 395-402.

Jhappan, C., Noonan, F. P. and Merlino, G. (2003). Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene,* **22,** 3099-3112.

Jones, W. O., Harman, C. R., Ng, A. K. and Shaw, J. H. (1999). Incidence of malignant melanoma in Auckland, New Zealand: highest rates in the world. *World J Surg,* **23,** 732-735.

Kim, T. W., Hung, C. F., Kim, J. W., Juang, J., Chen, P. J., He, L., Boyd, D. A. and Wu, T. C. (2004). Vaccination with a DNA vaccine encoding herpes simplex virus type 1 VP22 linked to antigen generates long-term antigen-specific CD8-positive memory T cells and protective immunity. *Hum Gene Ther,* **15,** 167-177.

Kircheis, R., Kupcu, Z., Wallner, G., Rossler, V., Schweighoffer, T. and Wagner, E. (2000). Interleukin-2 gene-modified allogeneic melanoma cell vaccines can induce cross-protection against syngeneic tumors in mice. *Cancer Gene Ther,* **7,** 870-878.

Kuchler, K. (1993). Unusual routes of protein secretion: the easy way out. *Trends Cell Biol,* **3,** 421-426.

Livingston, P. O., Watanabe, T., Shiku, H., Houghton, A. N., Albino, A., Takahashi, T., Resnick, L. A., Michitsch, R., Pinsky, C. M., Oettgen, H. F. and Old, L. J. (1982). Serological response of melanoma patients receiving melanoma cell vaccines. I. Autologous cultured melanoma cells. *Int J Cancer,* **30,** 413-422.

Lundberg, M. and Johansson, M. (2001). Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nat Biotechnol,* **19,** 713-714.

Lundberg, M. and Johansson, M. (2002). Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation. *Biochem Biophys Res Commun,* **291,** 367-371.

Lundberg, M., Wikstrom, S. and Johansson, M. (2003). Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther,* **8,** 143-150.

Ma, B. Y., Mikolajczak, S. A., Yoshida, T., Yoshida, R., Kelvin, D. J. and Ochi, A. (2004). CD28 T cell costimulatory receptor function is negatively regulated by N-linked carbohydrates. *Biochem Biophys Res Commun,* **317,** 60-67.

MacLennan, R., Green, A. C., McLeod, G. R. and Martin, N. G. (1992). Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. *J Natl Cancer Inst,* **84,** 1427-1432.

Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der Bruggen, P. and Boon, T. (1999). Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer,* **80,** 219-230.

Michel, N., Ohlschlager, P., Osen, W., Freyschmidt, E. J., Guthohrlein, H., Kaufmann, A. M., Muller, M. and Gissmann, L. (2002a). T cell response to human papillomavirus 16 E7 in mice: comparison of Cr release assay, intracellular IFN-gamma production, ELISPOT and tetramer staining. *Intervirology,* **45,** 290-299.

Michel, N., Osen, W., Gissmann, L., Schumacher, T. N., Zentgraf, H. and Muller, M. (2002b). Enhanced immunogenicity of HPV 16 E7 fusion proteins in DNA vaccination. *Virology,* **294,** 47-59.

Momburg, F., Roelse, J., Hammerling, G. J. and Neefjes, J. J. (1994). Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med,* **179,** 1613-1623.

Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goodman, S., Bergman, C., Monaco, J. J. and Mellins, E. (1994). An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature,* **368,** 551-554.

Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol,* **7,** 145-173.

Mosmann, T. R. and Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today,* **17,** 138-146.

Nagata, T., Aoshi, T., Uchijima, M., Suzuki, M. and Koide, Y. (2004). Cytotoxic T-lymphocyte-, and helper T-lymphocyte-oriented DNA vaccination. *DNA Cell Biol,* **23,** 93-106.

Namiki, S., Tomida, T., Tanabe, M., Iino, M. and Hirose, K. (2003). Intracellular delivery of glutathione S-transferase into mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun,* **305,** 592-597.

Neefjes, J. J., Momburg, F. and Hammerling, G. J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science,* **261,** 769-771.

Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G. and Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med,* **4,** 328-332.

O'Garra, A. and Arai, N. (2000). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol,* **10,** 542-550.

Parkhurst, M. R., Fitzgerald, E. B., Southwood, S., Sette, A., Rosenberg, S. A. and Kawakami, Y. (1998). Identification of a shared HLA-A*0201-restricted T-cell epitope from the melanoma antigen tyrosinase-related protein 2 (TRP2). *Cancer Res,* **58,** 4895-4901.

Pawelek, J. M., Chakraborty, A. K., Rachkovsky, M. L., Orlow, S. J., Bolognia, J. L. and Sodi, S. A. (1999). Altered N-glycosylation in macrophage x melanoma fusion hybrids. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),* **45,** 1011-1027.

Phelan, A., Elliott, G. and O'Hare, P. (1998). Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat Biotechnol,* **16,** 440-443.

Polsky, D. and Cordon-Cardo, C. (2003). Oncogenes in melanoma. *Oncogene,* **22,** 3087-3091.

Pomeranz, L. E. and Blaho, J. A. (1999). Modified VP22 localizes to the cell nucleus during synchronized herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol,* **73,** 6769-6781.

Ramshaw, I. A. and Ramsay, A. J. (2000). The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today,* **21,** 163-165.

Raz, E., Tighe, H., Sato, Y., Corr, M., Dudler, J. A., Roman, M., Swain, S. L., Spiegelberg, H. L. and Carson, D. A. (1996). Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **93,** 5141-5145.

Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem,* **278,** 585-590.

Ridge, J. P., Di Rosa, F. and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature,* **393,** 474-478.

Rosenberg, S. A. (1997). Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol Today,* **18,** 175-182.

Salgaller, M. L., Marincola, F. M., Cormier, J. N. and Rosenberg, S. A. (1996). Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res,* **56,** 4749-4757.

Saric, T., Chang, S. C., Hattori, A., York, I. A., Markant, S., Rock, K. L., Tsujimoto, M. and Goldberg, A. L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol,* **3,** 1169-1176.

Saveanu, L., Fruci, D. and van Endert, P. (2002). Beyond the proteasome: trimming, degradation and generation of MHC class I ligands by auxiliary proteases. *Mol Immunol,* **39,** 203-215.

Scheibenbogen, C., Schadendorf, D., Bechrakis, N. E., Nagorsen, D., Hofmann, U., Servetopoulou, F., Letsch, A., Philipp, A., Foerster, M. H., Schmittel, A., Thiel, E. and Keilholz, U. (2003). Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and foreign helper protein as immunologic adjuvants on the T-cell response to vaccination with tyrosinase peptides. *Int J Cancer,* **104,** 188-194.

Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J., Hannan, C. M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G. L. and Hill, A. V. (1998). Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med,* **4,** 397-402.

Schreurs, M. W., de Boer, A. J., Figdor, C. G. and Adema, G. J. (1998). Genetic vaccination against the melanocyte lineage-specific antigen gp100 induces cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor protection. *Cancer Res,* **58,** 2509-2514.

Schreurs, M. W., Eggert, A. A., de Boer, A. J., Vissers, J. L., van Hall, T., Offringa, R., Figdor, C. G. and Adema, G. J. (2000). Dendritic cells break tolerance and induce protective immunity against a melanocyte differentiation antigen in an autologous melanoma model. *Cancer Res,* **60,** 6995-7001.

Schuler-Thurner, B., Schultz, E. S., Berger, T. G., Weinlich, G., Ebner, S., Woerl, P., Bender, A., Feuerstein, B., Fritsch, P. O., Romani, N. and Schuler, G. (2002). Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma

patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med,* **195,** 1279-1288.

Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R. and Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature,* **419,** 480-483.

Shedlock, D. J. and Weiner, D. B. (2000). DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol,* **68,** 793-806.

Shibagaki, N. and Udey, M. C. (2003). Dendritic cells transduced with TAT protein transduction domain-containing tyrosinase-related protein 2 vaccinate against murine melanoma. *Eur J Immunol,* **33,** 850-860.

Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J. C., Hodi, F. S., Liebster, L., Lam, P., Mentzer, S., Singer, S., Tanabe, K. K., Cosimi, A. B., Duda, R., Sober, A., Bhan, A., Daley, J., Neuberg, D., Parry, G., Rokovich, J., Richards, L., Drayer, J., Berns, A., Clift, S., Dranoff, G. and et al. (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **95,** 13141-13146.

Stam-Posthuma, J. J., van Duinen, C., Scheffer, E., Vink, J. and Bergman, W. (2001). Multiple primary melanomas. *J Am Acad Dermatol,* **44,** 22-27.

Svane, I. M., Pedersen, A. E., Johnsen, H. E., Nielsen, D., Kamby, C., Gaarsdal, E., Nikolajsen, K., Buus, S. and Claesson, M. H. (2004). Vaccination with p53-peptide-pulsed dendritic cells, of patients with advanced breast cancer: report from a phase I study. *Cancer Immunol Immunother*.

Tagawa, S. T., Lee, P., Snively, J., Boswell, W., Ounpraseuth, S., Lee, S., Hickingbottom, B., Smith, J., Johnson, D. and Weber, J. S. (2003). Phase I study of intranodal delivery of a plasmid DNA vaccine for patients with Stage IV melanoma. *Cancer,* **98,** 144-154.

Tanaka, M., Kaneda, Y., Fujii, S., Yamano, T., Hashimoto, K., Huang, S. K. and Hoon, D. S. (2002). Induction of a systemic immune response by a polyvalent melanoma-associated antigen DNA vaccine for prevention and treatment of malignant melanoma. *Mol Ther,* **5,** 291-299.

Tang, D. C., DeVit, M. and Johnston, S. A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature,* **356,** 152-154.

Tornaletti, S. and Pfeifer, G. P. (1996). UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays,* **18,** 221-228.

Tsukamoto, K., Jackson, I. J., Urabe, K., Montague, P. M. and Hearing, V. J. (1992). A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *Embo J,* **11,** 519-526.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen

recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science,* **254,** 1643-1647.

Vives, E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem,* **272,** 16010-16017.

Volkenandt, M., Schlegel, U., Nanus, D. M. and Albino, A. P. (1991). Mutational analysis of the human p53 gene in malignant melanoma. *Pigment Cell Res,* **4,** 35-40.

Wang, F., Bade, E., Kuniyoshi, C., Spears, L., Jeffery, G., Marty, V., Groshen, S. and Weber, J. (1999). Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res,* **5,** 2756-2765.

Weeratna, R. D., McCluskie, M. J., Xu, Y. and Davis, H. L. (2000). CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine,* **18,** 1755-1762.

Wei, Q., Matanoski, G. M., Farmer, E. R., Hedayati, M. A. and Grossman, L. (1995). DNA repair capacity for ultraviolet light-induced damage is reduced in peripheral lymphocytes from patients with basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol,* **104,** 933-936.

Whitton, J. L., Rodriguez, F., Zhang, J. and Hassett, D. E. (1999). DNA immunization: mechanistic studies. *Vaccine,* **17,** 1612-1619.

Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H. and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science,* **269,** 1281-1284.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science,* **247,** 1465-1468.

Wybranietz, W. A., Prinz, F., Spiegel, M., Schenk, A., Bitzer, M., Gregor, M. and Lauer, U. M. (1999). Quantification of VP22-GFP spread by direct fluorescence in 15 commonly used cell lines. *J Gene Med,* **1,** 265-274.

Yei, S., Bartholomew, R. M., Pezzoli, P., Gutierrez, A., Gouveia, E., Bassett, D., Soo Hoo, W. and Carlo, D. J. (2002). Novel membrane-bound GM-CSF vaccines for the treatment of cancer: generation and evaluation of mbGM-CSF mouse B16F10 melanoma cell vaccine. *Gene Ther,* **9,** 1302-1311.

Yewdell, J. W. and Bennink, J. R. (1989). Brefeldin A specifically inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Science,* **244,** 1072-1075.

Zavaglia, D., Favrot, M. C., Eymin, B., Tenaud, C. and Coll, J. L. (2003). Intercellular trafficking and enhanced in vivo antitumour activity of a non-virally delivered P27-VP22 fusion protein. *Gene Ther,* **10,** 314-325.

Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Walker, G. J., Hayward, N. and Dracopoli, N. C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet,* **12,** 97-99.

8 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die in der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät Heidelberg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen des adjuvanten Effekts des viralen Tegumentproteins VP22 auf die Induktion Melanom-spezifischer cytotoxischer T-Zellen in C57BL/6 Mäusen nach DNA-Immunisierung“ am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg unter Leitung von Prof. Dr. D. Schadendorf ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner anderen Stelle ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Heidelberg, im September 2004

Ebil-lun Gelen